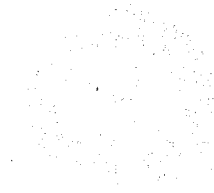


0411007
175 68222

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRARIA DE LLEIDA

PROYECTO FINAL DE CARRERA



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA
DE
PATRONES FRUTALES DE HUESO

Gerardo Balaguer Taberner
Lleida , Junio 1999

10.177

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC), el haberme permitido realizar el Proyecto Final de Carrera en sus instalaciones, poniendo a mi disposición los medios materiales necesarios para llevar a buen término este trabajo.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

A la Dra. Ana Casas Cendoya y a la Dra. M^a. Angeles Moreno Sanchez, por aceptar la dirección de este trabajo, y por su apoyo y orientación durante la realización del mismo.

También deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Ernesto Igartua y a la Dra. Yolanda Gogorcena, por su amistad y colaboración.

Al Dr. Angel Alvarez, por hacer posible el primer contacto con la EEAD.

A todas las personas que forman el Departamento de Pomología, especialmente a : P. Andreu, A. Arbeloa, A. Blanco, C. Gaspar, M.C. Jiménez, J. A. Marín, R. Medjdoub, L. Pascual, J. Pérez y M. P. Soteras, por su ánimo y colaboración prestada.

A todas las personas que forman el Departamento de Genética y Producción Vegetal, especialmente a : P. Asín, A. Castillo, J. Caveró, L. Cistué, A. Costar, A. Galán, P. Gracia, S. Lecina, A. Martínez, E. Playán y M^a Pilar Valles.

Al Dr. I. Hormaza y a M. Arnedo, por su colaboración y ayuda al iniciar el proyecto.

Al Dr. Valero Urbina por aceptar la propuesta de este proyecto.

A Pilar, por su compañía y ánimo constantes.

A mi familia, por la colaboración y comprensión que han mostrado en todo momento, sin su ayuda no hubiese sido posible realizar este trabajo.

RESUMEN

En este trabajo se han utilizado los marcadores moleculares RAPD para caracterizar patrones pertenecientes al género *Prunus* y analizar estadísticamente su nivel de similitud. Se han estudiado patrones frutales seleccionados en la EEAD (Estación Experimental de Aula Dei) comparados con patrones obtenidos en otros centros de investigación. En total se han caracterizado 41 patrones, pertenecientes a diferentes especies: *P. amygdalo-persica*, *P. persica* x *P. davidiana*, *P. cerasifera*, *P. domestica* y *P. insititia*, además de otros híbridos interespecíficos. Los patrones se agruparon inicialmente en tres grupos, de acuerdo con la clasificación morfológica (híbridos almendro x melocotonero, ciruelos de crecimiento rápido y ciruelos de crecimiento lento). Utilizando 2 patrones de cada uno de esos grupos, se realizó una selección inicial de cebadores. De un total de 80, se eligieron 7 cebadores que permitieron evaluar la diversidad genética existente entre los 41 patrones. A partir del análisis de los 41 patrones se obtuvo una clasificación que concuerda con la clasificación morfológica. Asimismo, se confirmó la posible pertenencia del patrón Mirobolán 29C al grupo de los Mariana (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*). En una segunda fase, con un número mayor de cebadores, se procedió a completar el estudio de los patrones dentro de cada uno de los grupos. De este modo, en el grupo de los híbridos almendro x melocotonero, aparecieron dos grupos claramente separados, por una parte los *P. amygdalo-persica* y por otra los *P. persica* x *P. davidiana*. En el grupo de los ciruelos de crecimiento rápido los Mirobolanes (*P. cerasifera*) aparecían diferenciados de los Mariana (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*). En el grupo de los ciruelos de crecimiento lento, los patrones *P. domestica* y *P. insititia*, no forman agrupaciones diferentes, posiblemente debido a que ambas especies se han cruzado frecuentemente de forma natural o en programas de mejora.

ÍNDICE

	Página
Agradecimientos.....	i
Resumen.....	ii
Índice de cuadros.....	vi
Índice de figuras.....	ix
Abreviaturas.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. MARCADORES MOLECULARES.....	3
1.1.1. Tipos de marcadores moleculares.....	3
1.1.1.1 Polimorfismo en los Fragmentos de Restricción del ADN (RFLP).....	4
1.1.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	5
1.1.1.2.1. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPDs).....	6
1.1.1.2.2. Los microsatélites o “Simple Sequence Repeats”.....	8
1.1.1.2.3. Marcadores moleculares Inter Simple Sequence Repeats PCR (ISSR-PCR).....	9
1.1.1.2.4. Marcadores Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLPs).....	10
1.2. UTILIZACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN FRUTALES ASPECTOS PARTICULARES.....	11
1.2.1. Identificación de material vegetal.....	11
1.2.2. Relaciones de similaridad y filogenéticas.....	12
1.2.3. Elaboración de mapas genéticos.....	13
1.2.4. Selección asistida por marcadores (Marker Assisted Selection).....	13
1.2.5. Introgresión de genes.....	14
1.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARAMETROS DE LA PCR. FUENTES DE POLIMORFISMO.....	15
1.4. ANÁLISIS DE DATOS.....	19

2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	23
3.1.1. Organos ensayados para el estudio del ADN.....	25
3.1.2. Preparación del Material Vegetal.....	25
3.1.3. Extracción del ADN.....	25
3.1.4. Cuantificación del ADN.....	28
3.2. MÉTODOS.....	34
3.2.1. Reacción de amplificación.....	34
3.2.2. Separación electroforética.....	36
3.2.3. Tinción del gel.....	39
3.2.4. Conservación de los perfiles electroforéticos.....	39
3.2.5. Diseño experimental.....	39
3.2.6. Análisis de resultados.....	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1. REPRODUCIBILIDAD DE LA TÉCNICA RAPD.....	42
4.2. BARRIDO DE CEBADORES.....	42
4.3. ANÁLISIS ENTRE GRUPOS.....	45
4.3.1. Polimorfismo generado por los RAPDs en el análisis entre grupos.....	45
4.3.2. Relaciones genéticas generadas por los RAPDs en el análisis entre grupos.....	45
4.4. ANÁLISIS DENTRO DE CADA GRUPO.....	55
4.4.1. Híbridos almendro x melocotonero.....	55
4.4.1.1. Polimorfismo generado por RAPDs.....	55
4.4.1.2. Relaciones genéticas generadas por los RAPDs.....	59
4.4.2. Ciruelos de crecimiento rápido.....	62
4.4.2.1. Polimorfismo generado por RAPD.....	62
4.4.2.2. Relaciones genéticas generadas por los RAPDs.....	66

4.4.3. Ciruelos de crecimiento lento.....	70
4.4.3.1. Polimorfismo generado por los RAPDs.....	70
4.4.3.2. Relaciones genéticas generadas por los RAPDs.....	73
5. CONCLUSIONES.....	79
6. BIBLIOGRAFÍA.....	81
7. ANEXOS.....	90
Anexo 1. Características descriptivas del patrón Adara.....	90
Anexo 2. Características morfológicas y agronómicas de los patrones utilizados.....	94
Anexo 3. Cebadores utilizados durante la preselección (barrido de cebadores)	107
Anexo 4. Matriz básica de datos para los 41 patrones utilizando 7 cebadores.....	110
Anexo 5. Matriz básica de datos para los híbridos almendro x melocotonero.....	113
Anexo 6. Matriz básica de datos para los ciruelos de crecimiento rápido.....	116
Anexo 7. Matriz básica de datos para los ciruelos de crecimiento lento.....	119

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	
2. OBJETIVOS	
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
Cuadro 1. Híbridos Almendro x Melocotonero.....	23
Cuadro 2. Ciruelos de crecimiento rápido.....	24
Cuadro 3. Ciruelos de crecimiento lento.....	24
Cuadro 4. Valores de absorbancia, relación 260/280 y concentración obtenida.....	29
Cuadro 5. Valores de absorbancia, relación 260/280 y concentración obtenida en híbridos almendro x melocotonero.....	30
Cuadro 6. Valores de absorbancia, relación 260/280 y concentración obtenida en ciruelos de crecimiento rápido.....	31
Cuadro 7. Valores de absorbancia, relación 260/280 y concentración obtenida en ciruelos de crecimiento lento.....	32
Cuadro 8. Componentes de la mezcla maestra.....	34
Cuadro 9. Porcentajes de agarosa e intervalos de separación.....	37
Cuadro 10. Cebadores elegidos y secuencia de los mismos.....	40

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 11. Cebadores utilizados en el análisis entre grupos, número de bandas y rango en el que aparecen.	46
Cuadro 12. Matriz de similitud obtenida para el análisis entre grupos (41 patrones), utilizando 7 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).	52
Cuadro 13. Cebadores utilizados en la caracterización de los híbridos almendro x melocotonero, número de bandas y rango en el que aparecen.	56
Cuadro 14. Combinación de bandas de 4 cebadores que permiten diferenciar todos los patrones incluidos en el grupo híbridos almendro x melocotonero.	57
Cuadro 15. Matriz de similitud obtenida para el grupo de híbridos almendro x melocotonero utilizando 12 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).	60
Cuadro 16. Cebadores utilizados en la caracterización de ciruelos de crecimiento rápido, número de bandas y rango en el que aparecen.	62
Cuadro 17. Combinación de bandas de 4 cebadores que permiten diferenciar todos los patrones incluidos en el grupo de ciruelos de crecimiento rápido.	64
Cuadro 18. Matriz de similitud obtenida para el grupo de ciruelos de crecimiento rápido, utilizando 13 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).	68
Cuadro 19. Cebadores utilizados en la caracterización de ciruelos de crecimiento lento, número de bandas y rango en el que aparecen.	70

Cuadro 20. Combinación de bandas de 4 cebadores que permiten diferenciar todos los patrones incluidos en el grupo de los ciruelos de crecimiento lento.....	71
Cuadro 21. Matriz de similitud obtenida para el grupo ciruelos de crecimiento lento utilizando 14 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).....	75

5. CONCLUSIONES

6. ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	
2. OBJETIVOS	
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
Figura 1. Análisis en gel de agarosa del 0,8% en el que se comprueba la calidad del ADN extraído.	33
Figura 2. Experimento en el que se prueban 3 enzimas de diferentes casas comerciales y dos tubos de diferentes espesores.	35
Figura 3. Experimento en el que se prueban diferentes concentraciones de cloruro de Magnesio (1.5 mM, 1.9 mM y 3 Mm).	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Figura 4. Patrones de bandas RAPDs obtenidas con los cebadores AB10-05 y AB10-06 durante el cribado de cebadores.	44
Figura 5. Patrones de bandas RAPDs obtenidas con los cebadores OPF-19 y OPF-20 durante el cribado de cebadores.	44
Figura 6. Dendrograma obtenido del análisis entre grupos (41 patrones), utilizando 7 cebadores y el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979).	53
Figura 7. Análisis de coordenadas principales en el que aparecen los 41 patrones del análisis entre grupos.	54

Figura 8. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador OPF-03 en los 14 patrones híbridos almendro x melocotonero.	58
Figura 9. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador AB9-07 en los 14 patrones híbridos almendro x melocotonero.	58
Figura 10. Dendrograma obtenido para el grupo híbridos almendro x melocotonero, utilizando 12 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).	61
Figura 11. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador AB9-20 en los 12 ciruelos de crecimiento rápido.	65
Figura 12. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador AB9-07 en los 12 ciruelos de crecimiento rápido.	65
Figura 13. Dendrograma obtenido para el grupo de ciruelos de crecimiento rápido, utilizando 13 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).	69
Figura 14. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador AB7-11 en los 16 ciruelos de crecimiento lento.	72
Figura 15. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador AB10-02 en los 16 ciruelos de crecimiento lento.	72
Figura 16. Dendrograma obtenido para el grupo de ciruelos de crecimiento lento, utilizando 13 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).	76

5. CONCLUSIONES

6. ANEXOS

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-PCR	<i>Arbitrarily primed polymerase chain reaction</i>
ARN	Ácido ribonucleico
CTAB	Cetiltrimetilamonio bromide
DAF	<i>DNA amplification fingerprinting</i>
dNTP	5' - trifosfatos desoxirribonucleósidos
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
IPGRI	<i>International Plant Genetic Resources Institute</i>
ISSR-PCR	<i>Inter simple sequence repeats PCR</i>
MAAP	<i>Multiple arbitrary amplicon profiling</i>
MAS	Marker assisted selection
MIBD	Matriz básica de datos
NTSYS	<i>Numerical taxonomy multivariate analysis system</i>
OTUs	Unidades taxonomicas operativas
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PVP	Polivinil pirrolidona
RAMPS	Random amplified microsatellite polymorphism
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction fragment lenght polymorphism</i>
SCARs	<i>Sequence characterized amplifieds regions</i>
SSR	<i>Simple sequence repeats</i>
STMS	<i>Sequence tagged microsatellite site</i>
TAE	Tris-acetato
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (hydroximethyl) aminomethane
UPGMA	Unweighted pair group method using arithmetic averages
UPOV	Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales
VNTR	<i>Variable number tandem repeats</i>

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

La Fruticultura es una de las especialidades agrícolas de mayor intensificación y de más alta rentabilidad económica. El desarrollo de nuevos patrones frutales que permitan obtener una gama más amplia de adaptación a diversas condiciones de cultivo, un control del desarrollo del árbol y mayor eficiencia en las características productivas de las variedades injertadas, sigue siendo una de las áreas prioritarias de la investigación en fruticultura.

La investigación internacional está, por ello, buscando la obtención de nuevos patrones que reúnan diferentes caracteres positivos en un único genotipo (Cummins y Aldwinckle, 1983; Fideghelli, 1988; Loreti, 1976 y 1988). En realidad, más que la búsqueda de un “patrón ideal”, es decir, adaptado a toda situación y por ello casi imposible de obtener, se tiende más bien a buscar patrones idóneos para diversos ambientes edafoclimáticos. Estos patrones deberán presentar a su vez unas buenas características tanto para la producción viverista como para la aplicación de las técnicas culturales más modernas y racionales.

El Departamento de Pomología de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) comenzó sus actividades en 1950. Desde su fundación, la selección y estudio del material vegetal de distintas especies frutales de hueso y pepita, han sido uno de sus objetivos prioritarios. Se iniciaron así los trabajos sobre variedades y patrones en las especies albaricoquero, cerezo, ciruelo, manzano, melocotonero y peral, así como los relacionados con la incompatibilidad entre patrón e injerto.

En el campo de los patrones frutales de hueso se han realizado varias selecciones de interés. Entre ellas hay que destacar los híbridos almendro x melocotonero Adafuel (Cambra, 1990) y Adarcias (Moreno y Cambra, 1994), el ciruelo de crecimiento lento Adesoto 101 (Moreno et al., 1995) y los ciruelos de crecimiento rápido Adara (Moreno et al., 1995) y Ademir (Moreno et al., 1995). Estos patrones han sido seleccionados en general, por sus buenas características de propagación, comportamiento con variedades y adaptación a suelos desfavorables muy frecuentes en el área mediterránea. Durante este proceso de selección otros patrones fueron superados por las mejores características de los anteriores, entre ellos, los patrones Albararrech, Calanda, Alcañiz, Herce 5, Tauste y Caspe, todos ellos híbridos almendro x melocotonero y los ciruelos de crecimiento lento Puebla de Soto 67 (Cambra 1970), Alguazas (Cambra 1970) y Constantí 1 (Cambra et al., 1989). En la actualidad son varios los patrones que se encuentran en fase de selección o estudio. En esta situación

podemos encontrarlos a los ciruelos de crecimiento rápido Mirobolán 713 AD y Miral 3278 AD, así como a los ciruelos de crecimiento lento PM 105 AD (Moreno et al., 1990), PM 137 AD y PM 150 AD.

Los programas de mejora en patrones frutales, van acompañados de una caracterización del material vegetal. La caracterización morfológica y fenológica de dichos patrones es imprescindible para que éstos puedan figurar como Obtenciones Vegetales en el registro de variedades protegidas del Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero (INSPV). También la Unión Europea, a través de la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales, demanda esta caracterización en el cuestionario técnico para solicitar la protección Comunitaria de obtención vegetal.

La descripción de las características morfológicas y fenológicas se realiza siguiendo las indicaciones y caracteres propuestos por la "Union pour la protection des Obtentions Végétales" (UPOV) y la "International Plant Genetic Resources Institute" (IPGRI), teniendo en cuenta las especies consideradas. En el anexo 1 se describirá, siguiendo estas normas, uno de los patrones utilizados.

Este método es lento y costoso ya que requiere la observación del material vegetal a lo largo de todo su ciclo vegetativo y durante varios años. En el caso de los árboles frutales con largos períodos juveniles, el proceso se alarga dada la necesidad de observar flores y frutos. Además determinados caracteres pueden estar sujetos a una interpretación subjetiva e influidos por las condiciones ambientales. Por ello, la caracterización morfológica es un método lento en el proceso de registro de obtenciones vegetales y además es muy ineficaz en un posible litigio para la protección legal de dichas obtenciones.

Aunque tradicionalmente se han utilizado marcadores morfológicos, el análisis directo del ADN podría aumentar considerablemente el número de marcadores producidos (Nybom, 1994). De hecho, en los últimos años ha aumentado el interés en el empleo de marcadores moleculares para estudios de identificación varietal. Entre los distintos tipos disponibles, los marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN) se han hecho muy populares por su simplicidad y bajo coste (Virk et al., 1995; Lowe et al., 1996). El método descrito por Welsh y McClelland (1990) y Williams et al. (1990, 1993), se basa en la amplificación arbitraria de ADN utilizando la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR). La metodología es simple, se puede analizar en poco tiempo, emplea cantidades pequeñas de ADN y no requiere radioactividad.

Aunque en la actualidad la caracterización morfológica de los patrones y variedades frutales sigue siendo un requisito totalmente indispensable, es muy probable que en un futuro cercano se admita su caracterización molecular como un método rutinario y mucho más rápido.

1.1. MARCADORES MOLECULARES.

Existen varias definiciones de marcador genético. Rieger et al. (1982) lo definen como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente utilizada en el análisis genético. Gale (1994) lo define como cualquier medio para identificar cualquier locus específico en el cromosoma. Podemos usar como marcador una característica morfológica fácilmente observable en los individuos (fenotipo), proteínas o segmentos de ADN (Pérez de la Vega, 1997). Cada sistema de marcadores ADN, tiene diferentes ventajas, por lo que deben escogerse por su adecuación a cada objetivo particular (Pérez de la Vega, 1997).

1.1.1. Tipos de marcadores moleculares.

Los primeros marcadores moleculares utilizados en mejora fueron los marcadores isoenzimáticos (Tanksley y Orton, 1983) basados en el polimorfismo de proteínas. Estos han tenido una gran influencia en las especies frutales (Torres, 1990). No obstante, el estrecho rango de caracteres morfológicos y el limitado número de isoenzimas polimórficos, hacen de los isoenzimas unos sistemas inadecuados para diferenciar cultivares muy próximos. Además, muchos caracteres fenotípicos son regulados o influidos por el medio ambiente o por factores de desarrollo, por lo que es más interesante recurrir al ADN.

Entre los análisis más importantes y utilizados, podemos encontrar los RFLP (Polimorfismo en los Fragmentos de Restricción) y los marcadores derivados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), basada en la amplificación del ADN.

1.1.1.1. Polimorfismo en los Fragmentos de Restricción del ADN (RFLP).

Los RFLPs fueron introducidos a principios de los años 80 en estudios del genoma humano (Bolstein et al., 1980). En esta técnica se utiliza un tipo especial de enzima, el enzima de restricción. Este enzima es el encargado de cortar el ADN genómico en secuencias específicas. Se producen fragmentos de distinto tamaño que son separados mediante electroforesis. Los enzimas de restricción son nucleasas producidas por una gran variedad de bacterias donde actúan como mecanismo de defensa frente a la presencia de ADN extraño. Estos enzimas reconocen secuencias en el ADN y lo cortan en ese lugar. En las bacterias que lo producen, el ADN está protegido mediante metilación y sólo el ADN no protegido es cortado. El ADN aparece reducido a una serie de fragmentos de un tamaño determinado. El número de fragmentos producidos y su tamaño es consecuencia de la distribución de las secuencias reconocidas por el enzima de restricción a lo largo del genoma. Los fragmentos así producidos son específicos para cada combinación ADN/Enzima, utilizándose como una huella dactilar específica para cada ADN.

En las plantas podemos encontrarnos ADN en los cloroplastos, en las mitocondrias y en el núcleo (Revisión de Doyle, 1993). Si utilizamos ADN cloroplástico obtendremos pocos fragmentos, ya que el tamaño del mismo es pequeño. Esto es una ventaja, pues puede ser visualizado directamente tiñendo el gel de electroforesis con bromuro de etidio (Bachmann, 1994). Sin embargo, su utilidad se ve restringida pues la mayoría de los genes de interés agronómico se encuentran en el ADN nuclear.

Los RFLPs obtenidos de la digestión de ADN nuclear no pueden verse directamente, ya que el número de fragmentos producidos es tan grande que al teñir el gel con bromuro de etidio aparecen como una banda continua sobre el gel. Por ello, es necesario identificar unos pocos fragmentos de restricción, lo que se hace mediante la hibridación de pequeñas sondas de ADN (generalmente de una longitud entre 2000 y 5000 bases). Para ello, se transfiere previamente el ADN del gel de electroforesis a una membrana especial, por un procedimiento llamado transferencia "Southern". La sonda marcada se hibrida con los fragmentos de ADN de la membrana homólogos a ella bajo condiciones determinadas de temperatura y salinidad. Esta técnica utilizaba isótopos radioactivos como el P32 para marcar la sonda, aunque actualmente existen métodos de marcaje no radioactivos. El resultado final del proceso es la obtención de un patrón específico ADN-Enzima de restricción-sonda. Al comparar el ADN de

dos individuos, las diferencias electroforéticas corresponden a diferencias en el tamaño de los fragmentos de ADN que hibridan con la sonda.

La técnica es muy precisa, pero su complejidad y el coste que entraña ha hecho que otro tipo de marcadores alcancen mayor desarrollo.

1.1.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR se basa en la amplificación enzimática de fragmentos de ADN del genoma. Se utiliza para ello un oligonucleótido de cadena corta (cebador) que, al hibridar sobre hebras opuestas del ADN en dos puntos complementarios, permite a una polimerasa termoresistente elongar la cadena entre ambos puntos. Esto lo consigue gracias a la existencia en el medio adecuado (solución tampón) de los nucleótidos disponibles. La PCR se lleva a cabo mediante una serie de ciclos. En cada ciclo se dan una serie de fases o pasos que se repiten sucesivamente.

a) Fase de desnaturalización.

En esta fase tiene lugar la desnaturalización del ADN, molde a 92-95°C.

b) Fase de hibridación o anillamiento.

En una segunda fase, conocida como de hibridación o anillamiento, los cebadores se unen a sus secuencias complementarias del ADN. Las temperaturas que se alcancen en esta fase dependen de la longitud del cebador y de su secuencia de bases. Las temperaturas suelen oscilar entre 30-65°C.

c) Fase de extensión.

La última fase es la de extensión del cebador. La temperatura se incrementa hasta llegar al óptimo de actuación de la polimerasa (alrededor de 70°C).

En cada ciclo se produce una amplificación exponencial del ADN. Todo el proceso está automatizado con aparatos que controlan la temperatura y el tiempo de cada fase. Estos aparatos se conocen con el nombre de termocicladores.

Una vez terminada la amplificación, los productos de la misma se separan en geles de agarosa. Estos se tiñen en una solución de Bromuro de Etidio, que se une al ADN y permite su visualización posterior utilizando luz ultravioleta. Cada producto de amplificación deriva de una zona del genoma cuyos extremos son segmentos de ADN complementarios de la

secuencia del cebador utilizado. Las bandas que aparecen en el gel de electroforesis permiten diferenciar los diferentes materiales vegetales.

El polimorfismo entre individuos puede ser debido a cambios en la secuencia de nucleótidos o cualquier modificación estructural del ADN (duplicación, inserción o delección).

La técnica PCR ha hecho posible el desarrollo de nuevas técnicas que permiten conseguir la “huella dactilar” de diversos cultivares. Se abren con ellas nuevos horizontes y perspectivas para solucionar los problemas de la caracterización.

Desde comienzos de los años 90 se han desarrollado una serie de métodos basados en la PCR. A diferencia del método inicial no se requiere un conocimiento previo de las secuencias específicas o genes de los organismos utilizados. Aún así mantienen buena parte de las ventajas. Todas estas técnicas se engloban dentro de lo que se conoce con el nombre de MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling). Seguidamente se describen algunas de ellas.

1.1.1.2.1. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPDs).

Los RAPDs empezaron a utilizarse a principios de los años 90 (Williams et al., 1990). Su utilización se extendió muy rápidamente debido a su fácil y rápido manejo (Rafalski y Tingey, 1993).

En cada reacción de PCR-RAPD se utiliza generalmente un único cebador de secuencia aleatoria y longitud de 10 nucleótidos. Este cebador hibrida en loci repartidos aleatoriamente en todo el genoma (Williams et al., 1990). Para el diseño de los cebadores las únicas limitaciones son las de poseer un contenido en G+C entre el 50-70% y carecer de secuencias palindrómicas de más de 6 bases. El análisis con marcadores requiere poca cantidad de ADN (5-50 ng/ensayo). Además, no necesita conocerse la secuencia del ADN molde. En la práctica, la reacción de amplificación se repite con varios cebadores diferentes de forma independiente. Con cada reacción se generaran diferentes bandas de amplificación una vez separadas electroforéticamente. Una característica de los RAPDs es la baja temperatura de hibridación (35-38°C).

El mayor problema con el que nos encontramos a la hora de utilizar la técnica de los RAPDs, es que se trata de marcadores genéticos dominantes, no permitiendo diferenciar entre individuos heterocigotos y homocigotos. Además, la falta de repetibilidad de los perfiles electroforéticos cuestionó el uso de estos marcadores en su aplicación a estudios genéticos.

Otras técnicas muy parecidas a los RAPDs son los *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*. En la AP-PCR se emplea un simple cebador de 20 o más nucleótidos y de secuencia aleatoria. Los resultados de la amplificación se separan en geles de poliacrilamida y pueden observarse mediante autoradiografía (Welsh y McClelland, 1990).

Otra variante es la *DNA Amplification Fingerprinting (DAF)*. Se utiliza un cebador corto con 5 u 8 nucleótidos. Los productos de amplificación se separan en geles de poliacrilamida y se visualizan con tinción de plata (Caetano-Anoelles y Gresshoff, 1994). Con esta técnica se consiguen perfiles muy complejos, con muchas bandas difíciles de leer e interpretar (McClelland y Welsh, 1994).

Descripción del marcador molecular Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Variantes	<i>Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)</i> <i>DNA Amplification Fingerprinting (DAF)</i>
Principio	PCR con cebador de secuencia aleatoria
Información previa genoma	NO
Tipo de polimorfismo	Cambios puntuales de bases/ Inserciones...
Nivel de polimorfismo	Alto (Muchos loci)
Herencia	Dominante
Cantidad / Calidad ADN	5-50ng/ Media-Baja
Visualización	RAPD: Bromuro de etidio AP-PCR: Autorradiografía DAF: Plata
Automatización	Fácil pero no completa
Repetibilidad	Cuestionable
Coste de infraestructura	Bajo
Coste Unitario	Medio

1.1.1.2.2. Los microsatélites o “Simple Sequence Repeats”.

Los microsatélites son unas secuencias sencillas de dos o tres nucleótidos repetidas en tandem. Las regiones microsatélites se citan entre las más polimórficas tanto a nivel específico como intraespecífico. Su estudio mediante PCR se suele realizar mediante la técnica STMS (Sequence-Tagged microsatellite site). Con esta técnica se necesita conocer las secuencias que lo flanquean.

El polimorfismo se revela por amplificación del microsatélite mediante PCR. Se utilizan cebadores específicos que hibridan en el inicio de las secuencias repetidas en las regiones flanqueantes. Los fragmentos se separan electroforéticamente en geles de agarosa o poliacrilamida, visualizándose mediante tinción de plata.

Descripción del marcador molecular Sequence- Tagged microsatellite site (STMS).

Principio	PCR con cebadores de secuencia específica
Información previa genoma	SI
Tipo de polimorfismo	Cambios en el nivel de repetición de secuencias sencillas (2-6 pb) dentro de un microsatélite: <i>Simple sequence length polymorphism</i> (SSLP), <i>Variable number of tandem repeats</i> (VNTR)
Nivel de polimorfismo	Muy alto (Un locus, muchos alelos)
Herencia	Codominante
Cantidad / Calidad ADN	50-100ng/Baja
Visualización	Autorradiografía/ Plata
Automatización	Fácil, más completa que los RAPDs
Repetibilidad	Buena
Coste de infraestructura	Bajo, si se dispone de los cebadores específicos
Coste Unitario	Medio, si se dispone de cebadores específicos

1.1.1.2.3. Marcadores moleculares Inter Simple Sequence Repeats PCR (ISSR-PCR).

Con los *ISSR-PCR* es posible realizar una aproximación a las regiones repetidas sin poseer conocimiento de las mismas. Se utiliza un único cebador, pero es de mayor longitud y de secuencia tipo microsatélite. La amplificación es más específica, restringiéndose sólo a determinadas regiones microsatélite.

Descripción del marcador molecular Inter simple sequence repeats PCR (ISSR-PCR).

Variante	<i>Random amplified microsatellite polymorphism (RAMPS)</i>
Principio	PCR con cebadores que en su mayor parte es complementario a una SSR, siendo sólo 2-3 nucleótidos de un extremo arbitrarios
Información previa genoma	NO
Tipo de polimorfismo	Inserciones y deleciones en regiones entre microsatélites
Nivel de polimorfismo	Alto (Más loci que RAPDs)
Herencia	Dominante
Cantidad / Calidad ADN	25ng/Baja
Visualización	Autorradiografía/ Plata
Automatización	Fácil, no completa
Repetibilidad	Mejor que los RAPDs
Coste de infraestructura	Bajo
Coste Unitario	Medio

1.1.1.2.4. Marcadores Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLPs).

Antes de la amplificación, el ADN se somete a un tratamiento con al menos un enzima de restricción. Después, se somete a una modificación de los extremos de los fragmentos de restricción mediante la adición de pequeños oligonucleótidos de secuencia conocida llamados “adaptadores”. La amplificación se realiza utilizando dos cebadores. Cada uno consta de dos partes, una secuencia que se aparee con el adaptador y con el fragmento de restricción, y una secuencia de anclaje o secuencia selectiva. Esta última tiene una misión parecida al anclaje de los cebadores ISSR- PCR.

Los AFLPs son una combinación de RFLPs y PCR. Se basan en la amplificación por PCR de fragmentos específicos obtenidos tras la digestión del ADN genómico.

Descripción del marcador molecular AFLP.

Principio	PCR con 2 cebadores en su mayor parte complementario a adaptadores Endonucleasas de restricción
Información previa genoma	NO
Tipo de polimorfismo	Mutaciones, inserciones y deleciones
Nivel de polimorfismo	Alto (Más loci que RAPDs)
Herencia	Dominante
Cantidad / Calidad ADN	500ng/Alta
Visualización	Autorradiografía
Automatización	Difícil
Repetibilidad	Buena
Coste de infraestructura	Bajo
Coste Unitario	Alto

La técnica RAPD, es la que más ventajas presenta de las descritas anteriormente. Cada cebador dirige la amplificación de varios loci en el genoma. Además no necesita un conocimiento previo del genoma y necesita poca cantidad de ADN. El método de extracción es fácil de realizar y parece probable que pueda automatizarse mucho más en un futuro próximo.

1.2. UTILIZACION DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN FRUTALES. ASPECTOS PARTICULARES.

El largo período juvenil y el gran tamaño que alcanzan los árboles frutales dificultan su análisis genético y la aplicación de las metodologías de mejora .

No obstante, en los últimos años se han producido numerosos avances en la aplicación de este tipo de marcadores con especies frutales. Estos son algunos de los campos más significativos:

- 1.- Identificación de material vegetal, tanto patrones como variedades.
- 2.- Relaciones de similitud y filogenéticas.
- 3.- Elaboración de mapas genéticos.
- 4.- Selección asistida por marcadores o "MAS (Marker Assisted Selection)".
- 5.- Introgresión de genes.

1.2.1. Identificación de material vegetal.

La identificación de cultivares mediante técnicas moleculares es una práctica útil y necesaria. Aparece como un instrumento eficaz para su aplicación en el mundo de la investigación, debido a las ventajas que proporciona el ADN :

- 1.- Los resultados son un reflejo directo del genotipo.
- 2.- Los resultados son independientes del medio ambiente.
- 3.- Presenta gran cantidad de secuencias polimórficas.
- 4.- El ADN puede extraerse de cualquier tejido.

La identificación de individuos puede usarse para la definición de cultivares particulares (variedades, patrones o plantas complejas) en casos de identidad dudosa.

Los marcadores moleculares pueden utilizarse para realizar pruebas de paternidad y caracterizar el material vegetal, por ello pueden ser una herramienta muy útil en la protección de los derechos del mejorador.

En especies frutales se han utilizado los marcadores moleculares para la identificación de variedades de manzano (Koller et al., 1993; D.L. Mulcahy et al., 1993; Harada et al., 1993;

Tancred et al., 1994), olivo (Fabbri et al., 1995), albaricoque (Gogorcena et al., 1994), mandarina (Colleta Filho et al., 1998), aguacate (Fiedler et al., 1998), almendro (Bartolozzi et al., 1998), mango (Schnell et al., 1995), y melocotonero (Warburton y Bliss, 1996). También han servido para caracterizar algunos patrones de melocotonero de los más utilizados en EE.UU (Lu et al., 1996), y de manzano (Landry et al., 1994). Además han sido utilizados in vivo, tanto para la identificación y caracterización de patrones (Xu et al., 1995; This et al., 1997) como de variedades (Collins y Simons, 1993; Jacques et al., 1993; Moreno et al., 1995).

Los marcadores moleculares pueden ser útiles en la conservación de los bancos de germoplasma, evitando posibles duplicaciones de material, o en la clarificación de errores en sinonimias (la misma variedad con distintos nombres) y homonimias (diferentes variedades con el mismo nombre) (Virk et al., 1994).

Los marcadores moleculares representan una forma útil para estimar la variación somaclonal. Un alto número de marcadores moleculares suministran una muestra del genoma de la planta, comprobando la existencia de mutaciones. Casos positivos de variación somaclonal descubiertos mediante la técnica RAPD, podemos encontrarlos en melocotonero (G. Hashmi et al., 1997).

1.2.2. Relaciones de similaridad y filogenéticas.

Los marcadores moleculares pueden certificar las relaciones existentes entre individuos o especies. Cultivares que tienen un mismo origen geográfico o características morfológicas similares aparecen enlazados. Muchos rasgos fenotípicos son regulados o influidos por la interacción genotipo x ambiente. Por ello los marcadores moleculares permiten una eficiencia y seguridad mayores a la hora de buscar relaciones (Caetano-Anoelles et al., 1991; Nybom, 1994). El estudio de la distancia genética entre individuos puede ser interesante a la hora de elegir ciertos cultivares como parentales, ya que se podría maximizar el nivel de heterosis. Se han utilizado los RFLPs para estudios de similaridad en nogal (Fjellstrom et al., 1994) y los RAPDs en pistachero (Hormaza et al., 1994), olivo (Fabri et al., 1995) y manzano (Duneman et al., 1994).

En estudios filogenéticos, se han utilizado RFLPs con ADN de cloroplastos en *Prunus* (Kaneko et al., 1986; Badenes y Parfitt, 1995) y también en *Malus* (Ishikawa et al., 1992).

1.2.3. Elaboración de mapas genéticos.

Lee (1995) señala que los mapas genéticos se convertirán en herramientas claves para los futuros programas de mejora. Los mapas están aportando una nueva fuente de información en mejora vegetal y están creando las bases para modificar algunos métodos de la mejora tradicional. Los mapas genéticos o de ligamiento consisten en la ubicación de diferentes marcadores moleculares en los cromosomas de una especie conociendo la distancia genética entre ellos.

Según Lee (1995), los mapas genéticos tendrán en un futuro no muy lejano varios papeles:

- 1.- Integrar datos de varias disciplinas en cada especie cultivada.
- 2.- Conectar la Mejora con la Biología molecular.
- 3.- Aportar información para la clonación posicional de genes.
- 4.- Acelerar la incorporación e identificación de genes útiles en los cultivares.

En la actualidad existen diversos proyectos de elaboración de mapas genéticos. En la mayoría se combinan diferentes tipos de marcadores. Se pueden encontrar mapas de melocotonero (Chaparro et al., 1994; Dirlewanger y Bodo, 1994; Rajapakse et al., 1995), almendro (Arus et al., 1994; Viruel et al., 1995), nogal (Fjellstrom y Parfitt, 1994), manzano (Hemmat et al., 1994; Weeden et al., 1994; Gardiner et al., 1994), y patrones de melocotonero (Warburton et al., 1996; Dirlewanger et al., 1996).

1.2.4. Selección asistida por marcadores (Marker Assisted Selection).

Con esta técnica se busca el ligamiento entre marcadores ADN y caracteres de interés agronómico. En lugar de seleccionar el carácter, el mejorador puede seleccionar un marcador que puede ser observado mucho antes. Con este sistema se reduce el número de plántulas a observar y evaluar. Además, como consecuencia, se reduce el coste y se aumenta la eficacia del programa de mejora.

Los primeros trabajos hasta la fecha se han dirigido a la identificación de marcadores para diversos caracteres de importancia económica, como la resistencia a oídio en híbridos *Prunus persica x P. davidiana* (Dirlewanger et al., 1996). También la técnica RAPD se ha utilizado en pistachero para localizar un marcador ligado al sexo (Hormaza et al., 1994), en

manzano para localizar un marcador ligado a la resistencia frente a roya (Yang y Krüger, 1994) y en cítricos para encontrar un marcador ligado a la resistencia frente al virus de la tristeza (Gmitter et al., 1996).

1.2.5. Introgresión de genes.

Un objetivo de algunos programas de mejora es el introducir un gen o genes desde un parental a una variedad élite. Los marcadores se utilizarían para identificar y seguir regiones del genoma. Con este método se conseguiría reconocer a los individuos que tuviesen una composición genómica mejor.

Normalmente con un proceso clásico de mejora se requiere una gran cantidad de retrocruzamientos para conseguir introducir un carácter determinado en un cultivar. El largo periodo de juvenilidad en las especies frutales lo hace muy difícil en la mayoría de los casos. Los marcadores pueden reducir enormemente el número de generaciones de retrocruzamientos necesarios.

En manzano se han utilizado RAPDs para localizar un segmento cromosómico introducido a partir de una especie silvestre (Durman y Korban, 1994).

1.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARAMETROS DE LA PCR. FUENTES DE POLIMORFISMO.

Los RAPDs se han convertido en una herramienta capaz de revelar un alto grado de polimorfismo genético. No obstante, algunos investigadores ven en esta técnica el problema de su reproducibilidad (Büscher et al., 1993; Meunier y Grimont, 1993).

Varias pueden ser las causas de la existencia de “falsos positivos” o “falsos negativos”. Una de ellas es la aparición de contaminaciones y otra las diferentes condiciones o parámetros utilizados en la amplificación por PCR.

Los parámetros presentan, como en todas las reacciones, un óptimo. Tres son los factores que debemos tener en cuenta:

1. La composición de la mezcla de reacción. Sobre todo la calidad y concentración del ADN molde, la polimerasa y el cebador.
2. El termociclador, su programación y ejecución del programa.
3. La seguridad y precisión a la hora de visualizar los fragmento amplificados.

La mezcla de amplificación en un volumen final de 25 μ l, está compuesta por el ADN molde, el cebador, la ADN polimerasa, los nucleótidos (dNTPs), el buffer o tampón, el cloruro de magnesio y el agua.

La falta de repetibilidad de las bandas RAPD ha estado asociada en ocasiones al empleo de ADN de baja pureza (Gogorcena et al., 1993; Howland et al., 1995). Durante los últimos años se han desarrollado gran cantidad de métodos para conseguir un ADN de calidad suficiente. No obstante, no está del todo claro en que medida la falta de calidad del ADN condiciona la reproducibilidad de la técnica. Según Micheli et al. (1994), algunos de los contaminantes que aparecen en el ADN son la causa más frecuente de falta de reproducibilidad. Muchos son los contaminantes que pueden influirnos a la hora de realizar un análisis RAPD. Entre ellos podemos destacar los restos de ARN (Micheli et al., 1994; Xu et al., 1995), ADN molde fragmentado (Aldrich y Cullis, 1993; Micheli et al., 1994), polisacáridos, restos de detergente (CTAB), iones metálicos (Aldrich y Cullis, 1993), etc.

La concentración del ADN puede modificar el patrón de bandas obtenido (Tommerup et al., 1993). No obstante se admite como suficiente una medición aproximada de la concentración de ADN. Según Williams et al. (1993), una concentración de 1µg/ml es suficiente para conseguir una amplificación reproducible.

En cuanto a los cebadores, estos deben ser seleccionados en función de su reproducibilidad y polimorfismo. Los cebadores con menor temperatura de fusión dan una reproducibilidad más baja (Meunier y Grimont, 1993). Una vez seleccionados deberán proporcionar bandas fáciles de leer e interpretar. La concentración óptima está entre 0,1-2 µM (Williams et al., 1993).

La disminución de la concentración de ADN o el aumento de la concentración del cebador permite una mejor amplificación de los fragmentos de bajo peso molecular, mientras que los fragmentos de alto peso molecular pierden intensidad o desaparecen (Büscher et al., 1993).

El enzima debe ser termoresistente. El más empleado es la DNA polimerasa *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa), a una concentración de 0,02 unidades/µl. Los resultados pueden ser diferentes según el enzima utilizado y la casa comercial que lo suministra (Büscher et al., 1993; Cenis, 1993; Wolf et al., 1995).

En la mezcla de amplificación juega un papel muy importante el cloruro de magnesio. Este compuesto influye de manera importante en la intensidad de las bandas amplificadas y en su número (Williams et al., 1993). Las concentraciones altas de cloruro de magnesio reducen la reproducibilidad (Caetano-Anoelles et al., 1994; Schnell et al., 1995). El óptimo se considera entre 1,5 y 2 mM.

El termociclador, aparato que proporciona la temperatura adecuada para que la polimerasa amplifique fragmentos del ADN debe mantener la temperatura de cada fase. Las temperaturas que se dan en las distintas fases, así como su duración, influyen de manera muy importante en el número e intensidad de los fragmentos amplificados. Devos y Gale (1992) demostraron que amplificaciones producidas con diferentes aparatos daban lugar a bandas diferentes.

La separación de los RAPDs se realiza por electroforesis en geles de agarosa, tiñéndose el gel con Bromuro de Etidio. La concentración de agarosa interviene en la separación que se produce entre las distintas bandas. Según Howland et al. (1995), los fragmentos de alto peso molecular (mayor de 2 kpb) son los que cuentan con índices de

reproducibilidad más bajos. Otros autores obtienen resultados parecidos con fragmentos de bajo peso molecular (menor de 0,8 kpb) (Gogorcena et al., 1993; Moreno et al., 1995). También la tinción de los geles puede ocasionar problemas de reproducibilidad, ya que la aparición o desaparición de bandas puede ocurrir cuando se tiñe el gel.

A la hora de visualizar y analizar los fragmentos amplificados se pueden producir errores de lectura. Lamboy (1994) propone las siguientes medidas:

- a) Descartar las bandas débiles e inconsistentes. Esta decisión puede acarrear la pérdida de información, con lo que aumentaríamos los falsos negativos.
- b) Utilizar todas las bandas y aceptar un cierto nivel de error.
- c) Realizar varias repeticiones de los experimentos y analizar sólo las bandas que se repitan. Esta medida implica un mayor consumo de tiempo e incrementa el gasto de manera considerable.

Ninguna de las medidas anteriormente expuesta acaba definitivamente con el problema de los artefactos, aunque si los minimiza. Los “artefactos” serian los falsos positivos o falsos negativos que aparecen en una reacción de amplificación. Entendiendo como “falso positivo” la banda que no debería estar presente en un ensayo, pero lo está y como “falso negativo” la banda que debería estar presente en un ensayo, pero no lo está.

Algunos autores como Jacques et al. (1993) y Moreno et al. (1995) optan por la última medida. Otros aumentan el número de cebadores (Tschammer y Zyprian, 1994; Xu et al., 1995). Guirao et al. (1995) creen que se deben leer todas las bandas y utilizar un gran número de cebadores. La utilización de 20-25 cebadores hace posible el disponer de unas 200 bandas informativas. Este alto número de bandas disminuye el posible error y soluciona el problema de los artefactos.

Cualquier cambio de los parámetros de la PCR puede modificar los resultados obtenidos. La aparición o desaparición de los denominados “artefactos” es un problema que en cierto modo desaparece si se estandariza la metodología (Grando et al., 1995; Moreno et al., 1995).

En cuanto a las contaminaciones, Sarkar y Sommer (1990), creen que uno de los mayores problemas a la hora de utilizar la técnica de la PCR es la contaminación que sufren los reactivos antes de la amplificación.

Además de las medidas típicas de un laboratorio, deben tenerse en cuenta una serie de precauciones para acabar con las contaminaciones:

1. La extracción del ADN y la preparación de las reacciones deben realizarse en habitaciones diferentes.
2. Es preferible disponer de dos juegos de pipetas, uno para la extracción de ADN y otro para la preparación de las reacciones.
3. Realizar alícuotas de algunos de los compuestos a utilizar en las reacciones (Tampón, Cloruro de Magnesio, Nucleótidos, Agua estéril y ADN). Cada alícuota sólo sirve para una reacción de amplificación.
4. Se utilizan puntas de pipeta con filtro para la preparación de las reacciones de amplificación. Con ello se impide la contaminación de las pipetas.
5. Se somete a las alícuotas de Buffer, Cloruro de Magnesio, Nucleótidos y Agua estéril a 20 min de radiación ultravioleta. Este tratamiento con rayos ultravioleta acaba con los posibles adiciones involuntarias de ADN.
6. La preparación de las reacciones de amplificación debe realizarse en lugares limpios, sin corrientes de aire y con la mayor celeridad posible.
7. Debe tenerse cuidado a la hora de manipular las alícuotas de ADN. Los guantes pueden quedar impregnados de pequeñas cantidades de ADN que vamos pasando a los tubos siguientes. Con esta técnica se amplifican pequeñísimas cantidades de ADN que pueden dar lugar a resultados erróneos.

Habitualmente se suele realizar un primer barrido con un número elevado de cebadores. En este primer pase se observan los cebadores más polimórficos, que cuenten con bandas consistentes y fáciles de leer. Además de cumplir esto último, las bandas deben permitir diferenciar individuos. Con los cebadores elegidos realizaremos el estudio definitivo (Aboelwafa et al., 1995; Karihaloo et al., 1995; Schnell et al., 1995).

1.4. ANALISIS DE DATOS.

Las bandas obtenidas por electroforesis pueden estudiarse desde un punto de vista cualitativo o cuantitativo. El estudio cualitativo (presencia o ausencia de bandas) permite seleccionar los RAPDs como útiles capaces de caracterizar individuos o como herramientas capaces de encontrar similitudes genéticas. El estudio cuantitativo (intensidad de banda) permite revelar las diferencias de actividad enzimática.

Los marcadores moleculares (fragmentos de ADN) tras la electroforesis se revelan como bandas. Los perfiles electroforéticos contienen información que representamos en forma de datos binarios. La presencia de una banda será codificada como "1" y la ausencia como "0".

El estudio de similitud genética permite conocer la distancia genética entre los individuos estudiados. La información codificada en forma de "unos" y "ceros" hará posible la utilización de técnicas de taxonomía numérica.

Con la información recabada se obtiene una matriz básica de datos (MBD). Las filas representan a los caracteres (bandas) y las columnas a los individuos en estudio. Estas últimas también reciben el nombre de unidades taxonómicas operativas (OTUs). La matriz básica se estudia desde un punto de vista de asociación de OTUs. Se aplicará un coeficiente de similitud que cuantificará el parecido o relación existente entre cada par posible de individuos. Existen tres grupos de coeficientes de similitud (Distancia, Correlación y Asociación), siendo el de Asociación el que mejor cuantifica las coincidencias y diferencias existentes.

Cuando se comparan dos individuos u OTUs pueden darse cuatro posibilidades:

- a) Que los dos individuos tengan el carácter comparado (1-1).
- b) Que el primer individuo tenga el carácter presente y el segundo ausente (1-0).
- c) Que el primero no tenga el carácter presente y el segundo si lo tenga (0-1).
- d) Que los dos individuos no tengan el carácter comparado (0-0).

Esto puede llevarse a una matriz 2 x 2, con lo que obtendríamos una muestra de las combinaciones posibles. El resultado de la suma de $(a + b + c + d)$ es el número total de caracteres estudiados, donde a (1-1) es el "número de caracteres" en los cuales el mismo estado está presente en ambos individuos; b (1-0) es el "número de caracteres" en los cuales un estado está presente en el primer individuo pero no en el segundo; c (0-1) es el "número de caracteres" en los cuales un estado está ausente en el primer individuo y presente en el segundo y d (0-0) es el "número de caracteres" en los cuales el mismo estado está ausente en los dos individuos.

Para el cálculo de la similitud genética podemos utilizar varios coeficientes de asociación. Sus valores varían entre 1 (máxima similitud) y 0 (mínima similitud):

El Coeficiente simple "Simple Matching Coefficient", expresado por la fórmula $SMC = (a + d) / (a + b + c + d)$, dando paso a todas las combinaciones posibles (Connolly et al., 1994).

El Coeficiente de Jaccard, expresado por la fórmula $CJ = a / (a + b + c)$ no considera a la ausencia común como un elemento a favor de la similitud (Link et al., 1995).

El Coeficiente de Roger, expresado por la fórmula $CR = (a + d) / (a + 2b + 2c + d)$ da más importancia a las diferencias (Singsit et al., 1993).

El Coeficiente de Dice o Nei y Li (1979) viene expresado por la fórmula $NL = 2a / (2a + b + c)$ y da peso a la presencia de un carácter (Guirao et al., 1995).

Autores como Lamboy (1994) creen que el coeficiente de Nei y Li es el que presenta más ventajas. Otros autores como Link (1995) creen sin embargo que el más efectivo para el estudio de los RAPDs es el de Jaccard, pues se trata de marcadores dominantes.

El coeficiente de Nei y Li tiene como ventaja que presenta menos diferencias entre el valor real y el valor estimado cuando hay falsos positivos o negativos en los datos. Además es un coeficiente que presenta una estimación de la similitud entre dos muestras que tienen antepasados comunes.

Los coeficientes de similitud aplicados sobre los pares posibles de OTUs, permite obtener una "matriz de similitud". En esta matriz las OTUs ocupan tanto las filas como las columnas, siguiendo el mismo orden en ambas, de esta manera se consigue comparar cada OTU consigo misma y con las restantes (Crisci y Lopez-Armengol, 1978).

Para que las relaciones de similitud se den entre la totalidad de los individuos deben aplicarse técnicas como la de “Análisis de Agrupamiento” o del “Método de Ordenación”. La estructura taxonómica obtenida de la matriz de similitud con la técnica de agrupamiento puede representarse gráficamente con un diagrama en forma de árbol, conocido como “dendrograma”. El dendrograma muestra la relación (en el grado de similitud) entre dos OTUs o grupo de OTUs (Romesburg, 1984).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

Vista la creciente importancia e interés que la técnica RAPD está despertando en el sector viverista y científico, se pensó que sería necesario complementar la identificación morfológica tradicional con la caracterización molecular mediante RAPDs. Por ello, con este trabajo se pretende:

1. Optimizar las condiciones de amplificación del ADN.
2. Evaluar el grado de polimorfismo existente entre los patrones de la EEAD y los patrones obtenidos en otros centros de investigación.
3. Analizar estadísticamente la diversidad genética entre los patrones objeto del estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la primera parte de este apartado se describe el material vegetal utilizado en el proyecto. Se indican los criterios utilizados para la selección de los patrones y los órganos empleados en las extracciones de ADN. A continuación se especifican los métodos y el material de laboratorio utilizado. En el anexo 2 se detallan las características morfológicas y agronómicas de cada uno de los patrones utilizados.

3.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado está formado por patrones de especies frutales de hueso (género *Prunus*). Se puede dividir en tres grupos: 1) Híbridos Almendro x Melocotonero, 2) Ciruelos de crecimiento rápido y 3) Ciruelos de crecimiento lento. Los patrones se encuentran en campos de plantas madres ubicados en la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Se escogieron 14 híbridos almendro x melocotonero, 12 ciruelos de crecimiento rápido y 16 ciruelos de crecimiento lento.

En los cuadros 1, 2 y 3 se presentan los diferentes patrones utilizados para el análisis, indicando la especie a la que pertenecen y el lugar o país de procedencia.

Cuadro 1. Híbridos Almendro x Melocotonero.

Número	Patrón	Especie	Procedencia
1	Adafuel	<i>Prunus amygdalo-persica</i>	España (EEAD)
2	Adarcias	<i>P. amygdalo-persica</i>	España (EEAD)
3	GF 677	<i>P. amygdalo-persica</i>	Francia (INRA Burdeos)
4	GF 557	<i>P. amygdalo-persica</i>	Francia (INRA Burdeos)
5	Cadaman	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Francia + Hungría
6	Barrier	<i>P. persica x P. davidiana</i>	Italia
7	Nemaguard	<i>P. persica x P. davidiana</i>	EE.UU
8	Nemared	<i>F3 de(P.p x d) x P.persica</i>	EE.UU
9	Albatarrech	<i>P. amygdalo-persica</i>	España (EEAD)
10	Calanda	<i>P. amygdalo-persica</i>	España (EEAD)
11	Alcañiz	<i>P. amygdalo-persica</i>	España (EEAD)
12	Herce 5	<i>P. amygdalo-persica</i>	España (EEAD)
13	Tauste	<i>P. amygdalo-persica</i>	España (EEAD)
14	Caspe	<i>P. amygdalo-persica</i>	España (EEAD)

Cuadro 2. Ciruelos de crecimiento rápido.

Número	Patrón	Especie	Procedencia
1	Adara	<i>Prunus cerasifera</i>	España (EEAD)
2	Ademir	<i>P. cerasifera</i>	España (EEAD)
3	Mirobolán 713 AD	<i>P. cerasifera</i>	España (EEAD)
4	Miral 3278 AD	<i>P. cerasifera</i> x <i>P. amygdalus</i> ?	España (EEAD)
5	Mirobolán B	<i>P. cerasifera</i>	Inglaterra
6	Mirobolán 29C	<i>P. cerasifera</i>	EE.UU
7	Myrocal	<i>P. cerasifera</i>	Francia
8	Mirobolán GF 3-1	<i>P. cerasifera</i> x <i>P. salicina</i>	Francia
9	Ishtara	(<i>P.cer.x sal.</i>) x (<i>P.cer.x P. per</i>)	Francia
10	Fereley-Jaspi	<i>P. japonica</i> x <i>P. spinosa</i>	Francia
11	Mariana GF 8-1	<i>P. cerasifera</i> x <i>P. munsoniana</i>	Francia
12	Mariana 2624	<i>P. cerasifera</i> x <i>P. munsoniana</i>	EE.UU

Cuadro 3. Ciruelos de crecimiento lento.

Número	Patrón	Especie	Procedencia
1	Adesoto101	<i>Prunus insititia</i>	España (EEAD)
2	PM 105 AD	<i>P. insititia</i>	España (EEAD)
3	PM 137 AD	<i>P. insititia</i>	España (EEAD)
4	PM 150 AD	<i>P. insititia</i>	España (EEAD)
5	Puebla de Soto 67	<i>P. insititia</i>	España (EEAD)
6	Alguazas	<i>P. insititia</i>	España (EEAD)
7	Montizo	<i>P. insititia</i>	España (SIA)
8	Monpol	<i>P. insititia</i>	España (SIA)
9	San Julián A	<i>P. insititia</i>	Francia
10	GF 655/2	<i>P. insititia</i>	Francia
11	Constantí 1	<i>P. domestica</i>	España (EEAD)
12	Brompton	<i>P. domestica</i>	Inglaterra
13	Torinel	<i>P. domestica</i>	Francia
14	Tetra	<i>P. domestica</i>	Italia
15	Damas GF 1869	<i>P.domestica</i> x <i>P. spinosa</i>	Francia
16	Ishtara	(<i>P.cer.xP.sal.</i>)x(<i>P.cer.x P.per</i>)	Francia

El patrón Ishtara fue incluido en los dos grupos de ciruelos, ya que no se tenía claro a cual de ellos pertenecía. Además, este patrón nos sirvió como referencia a la hora de comparar las amplificaciones obtenidas.

3.1.1. Organos ensayados para el estudio del ADN.

Se realizaron extracciones de ADN a partir de hojas jóvenes y hojas adultas. Se comprobó que con las primeras se obtenía un mayor rendimiento de ADN y que este era de mejor calidad. Estos resultados se analizarán con más detenimiento en el apartado 2.4 de cuantificación del ADN.

3.1.2. Preparación del Material Vegetal.

Las muestras fueron tomadas de tejidos jóvenes en crecimiento, procedentes del campo de plantas madre. Para evitar posibles cambios metabólicos, las hojas eran recogidas por las mañanas antes de que la temperatura ambiental fuese superior a los 25°C (Aralsekar y Parfitt, 1986). Las hojas eran revisadas para impedir que ningún insecto o enfermedad pudiese interferir y distorsionar los resultados. Rápidamente, se guardaban en bolsas de aluminio y se congelaban al ser introducidas en un depósito que contenía Nitrógeno líquido. Posteriormente, se almacenaban en el congelador a una temperatura de -20°C hasta el momento de la extracción.

3.1.3. Extracción del ADN.

El método de extracción del ADN sigue el protocolo de Cheng et al. (1.997). Se utilizan hojas jóvenes como fuente de material vegetal y como tampón de extracción el que se describe a continuación:

Tampón de extracción (para un volumen de 1 litro)

	Peso molecular	gramos/litro
* 2% CTAB	364,5	20g
* 1,5 M NaCl	58,44	87,6g
* 20 mM EDTA	372,2	7,44g
* 100mM Tris, pH 8.0	121,1	12,1g
* 2% soluble PVP	4000	20 g
* Agua		a 1 litro
* 2% 2- Mercaptoethanol	30 µl por cada	12 ml de tampón de extracción.

Propiedades de los productos utilizados en el tampón de extracción:

- El NaCl reduce la contaminación por polisacáridos.
- El EDTA (Ácido etilendiaminotetracético) se utiliza como inactivador de nucleasas.
- El CTAB (Bromuro de Cetiltrimetil amoniobromuro) es un detergente que se utiliza para reducir la contaminación por polisacáridos.
- El PVP (Polivinil pirrolidona) es un polímero que tiene por finalidad evitar la oxidación de polifenoles.
- El mercaptoetanol es un antioxidante.

Además del tampón de extracción se utilizan otros productos, como son:

- El Cloroformo - Alcohol isoamílico (24:1), utilizado como disolvente orgánico.
- Tampón de lavado (10x, pH 8,0) formado por 3M de Acetato Sódico y 0,1M de Acetato de Magnesio (214,5mw), utilizado para eliminar los restos de polisacáridos y de CTAB.
- Tampón TE formado por 10mM de Tris-Hcl pH 8,0 y 1 mM EDTA, que se utiliza para disolver el ADN.

El proceso de extracción se realiza con material estéril (a una atmósfera de presión durante 20 minutos en un autoclave Autester modelo 437-G, Selecta).

Procedimiento.

1. Pre calentamos el tampón de extracción en baño María a 65°C (modelo Tectrón Selecta).
2. Se introducen las bolsitas con las hojas de las muestras (guardadas en el congelador a -20°C) en una caja con hielo que las mantiene frías e impide la degradación.
3. Homogeneizamos 1g de tejido con la ayuda de un mortero en presencia de nitrógeno líquido, hasta conseguir pulverizar el material vegetal. Evitando que se descongele se introduce rápidamente en un tubo de centrifuga de 50 ml.
4. Añadimos 12ml de tampón de extracción CTAB, al que se le incorpora como agente protector 30µl de 2- mercaptoethanol.
5. Las muestras se calientan a 65°C en baño María. Deben calentarse durante al menos 30 min (hasta 1 hora), con suave agitación cada 10 min. Pasado este periodo de tiempo se formará una especie de papilla.

6. Añadimos 12ml del disolvente orgánico (Cloroformo-Alcohol isoamílico) y manualmente lo agitamos vigorosamente con la mano hasta formar una emulsión.
7. Al dejar reposar el tubo, en la zona inferior permanece el cloroformo-alcohol isoamílico con proteínas, lípidos y azúcares disueltos. En la zona superior queda el tampón CTAB con el ADN disuelto y diversos contaminantes como proteínas, azúcares, pigmentos y ARN en menor proporción. Seguidamente centrifugamos a 4.000 rpm durante 10 min
8. Después de la centrifugación, se pueden observar 3 fases: una fase acuosa superior en la que se encuentra el CTAB, el ADN y los contaminantes; una fase sólida intermedia, en la que aparecen células y paredes de celulosa; y una fase acuosa inferior con el cloroformo-alcohol isoamílico.
9. Transferimos la fase acuosa a otro tubo y añadimos 50µl de RNAsa. Incubamos a 37°C durante 1 hora y después precipitamos con etanol 95% frío (2,5 volúmenes). Al añadir etanol el ADN precipita.
10. Se mezclan cuidadosamente las dos fases balanceandolas durante unos minutos. Este movimiento facilita la formación de madejas de ADN. Cuando esto se produce las sacamos con ayuda de una pipeta Pasteur y las transferimos a un Eppendorf.

Los siguientes pasos permiten la disolución, lavado y protección del ADN.

11. Una vez tenemos las madejas de ADN en los tubos Eppendorf, y en presencia de 75% etanol, añadimos 1X tampón de lavado e incubamos el tubo en hielo durante 1 hora.
12. Centrifugamos a 4.000 rpm durante 2-3 min
13. Dejamos escurrir el líquido colocando los tubos Eppendorf abiertos y boca abajo. Las madejas de ADN se quedan pegadas a las paredes del tubo y no se caen. Posteriormente lavamos el precipitado con 75% etanol. Seguidamente eliminamos el líquido y dejamos escurrir durante unos 10 minutos.
14. Finalmente disolvemos el ADN en tampón TE estéril a pH 8,0 (10mM de Tris-Hcl y 1 mM EDTA). El Tris⁻ disuelve el ADN y el EDTA lo protege de las nucleasas.

3.1.4. Cuantificación del ADN.

La concentración de ADN del extracto original se determinó utilizando un espectrofotómetro modelo GeneQuant (Amersham Pharmacia Biotech). El instrumento mide muestras de RNA y DNA en cubetas de UV a 230nm, 260nm, 280nm y 320nm simultáneamente. Después de la lectura de cada muestra la información se almacena y se usa en cálculos hasta que se tome la lectura siguiente.

En este trabajo se han leído las absorbancias de cada extracción a 230, 260 y 280 nm. La lectura a 230nm nos da una idea de los carbohidratos existentes, la lectura a 260nm hace lo propio refiriéndose a los ácidos nucleicos y a 280nm obtenemos información sobre la cantidad de proteínas.

Este aparato se utiliza para comprobar la pureza de la extracción. Consideramos que en el ADN limpio la relación A_{260} / A_{280} ha de ser del orden de 1,7 (entre 1,7-2). Según Cheng et al. (1997), una relación por debajo de 1,7 nos indicará que la muestra está contaminada por proteínas, aunque lo realmente importante es que las lecturas a 230nm y 280nm sean parecidas, y que la densidad óptica a 260nm tenga un valor superior a las anteriores. Si se realizara una representación gráfica de las absorbancias medidas para cada extracción, debería aparecer una especie de campana de Gauss. El punto máximo debería estar representado por la DO_{260} y los valores mínimos por las lecturas obtenidas a 280nm y 230nm.

Como ya se ha mencionado anteriormente, se utilizaron hojas jóvenes y adultas para comprobar la calidad de las extracciones. Con las hojas jóvenes la relación existente entre las absorbancias medidas a 260nm y 280nm (ratio), es más alta que la obtenida con hojas adultas. Este resultado nos confirma la mejor calidad del ADN de hojas jóvenes. Además el rendimiento obtenido con las hojas jóvenes es superior (Cuadro 4).

En este experimento también puede observarse que con las hojas adultas la densidad óptica a 230nm obtiene valores más altos que el resto de absorbancias. Este resultado no aconsejaría la posterior utilización del ADN extraído.

Cuadro 4. Valores de absorbancia, relación 260/280 y concentración obtenida.

Patrón	Volumen (μ l)	Abs. 230	Abs. 260	Abs. 280	Relación 260/280	μ g / μ l
Adesoto 101						
Hojas adultas	600	0,910	0,535	0,499	1,192	0,224
PM 105 AD						
Hojas adultas	300	0,403	0,342	0,267	1,480	0,230
Adesoto 101						
Hojas jóvenes	750	0,671	0,964	0,667	1,603	0,789
PM 105 AD						
Hojas jóvenes	600	0,493	0,580	0,416	1,577	0,449

Antes de realizar la cuantificación de las muestras, los Eppendorf que contienen los extractos de ADN deben agitarse suavemente con la ayuda de un vortex. Así se favorece su mejor homogeneización. A partir de la concentración inicial del extracto se hacen diluciones, utilizando agua destilada y estéril. Se busca una concentración de ADN de 10ng/ μ l, que será la solución normalmente utilizada en el trabajo.

En los siguientes cuadros aparecen las lecturas de las absorbancias, índices y concentraciones de las extracciones para cada grupo de patrones estudiados.

Cuadro 5. Valores de absorbancia, relación 260/280 y concentración obtenida en híbridos almendro x melocotonero.

Patrón	Volumen (μ l)	Abs. 230	Abs. 260	Abs. 280	Relación 260/280	μ g / μ l
Adafuel	380	1,024	1,759	0,994	1,731	1,384
Adarcias	380	1,623	2,417	1,597	1,669	2,045 *
GF 677	480	1,559	2,254	1,458	1,658	2,005
GF 557	380	1,079	1,694	1,058	1,752	1,483
Cadaman	400	1,090	1,641	1,016	1,698	1,521
Barrier	500	0,841	1,331	0,828	1,736	1,186
Nemaguard	600	1,005	1,498	0,898	1,830	1,322
Nemared	450	1,478	2,160	1,387	1,738	1,821
Albatarrech	450	2,077	2,455	1,982	1,277	2,183 *
Calanda	550	1,747	2,351	1,664	1,506	2,044
Alcañiz	480	1,791	2,402	1,702	1,540	1,998
Herce 5	500	2,096	2,678	1,980	1,437	2,298 *
Tauste	500	1,922	2,426	1,809	1,399	2,163 *
Caspe	500	1,793	2,488	1,731	1,497	2,281

* Se corrige la concentración añadiendo TE (era demasiado alta).

Adarcias	580	1,651	2,352	1,608	1,626	1,934
Albatarrech	650	1,513	2,280	1,487	1,612	2,088
Herce	700	1,596	2,188	1,496	1,569	1,907
Tauste	700	1,544	2,376	1,486	1,705	2,152

Cuadro 6. Valores de absorbancia, relación 260/280 y concentración obtenida en ciruelos de crecimiento rápido.

Patrón	Volumen (μ l)	Abs. 230	Abs. 260	Abs. 280	Relación 260/280	μ g / μ l
Adara	400	2,036	2,788	2,019	1,563	2,134 *
Ademir	300	0,689	0,980	0,617	1,816	0,809
Mirobolán 713	450	0,667	0,993	0,609	1,835	0,843
Miral 3278	450	1,477	2,143	1,385	1,656	1,912
Mirobolán B	200	0,506	0,785	0,482	1,830	0,668
Mirobolán 29C	300	1,439	2,077	1,337	1,696	1,802
Myrocal	450	1,122	1,594	1,016	1,803	1,298
Mirobolán GF	450	1,352	1,947	1,250	1,730	1,652
Ishtara	450	0,743	0,976	0,654	1,736	0,759
Fereley-Jaspi	450	1,241	1,830	1,102	1,781	1,659
Mariana GF 8-1	450	1,073	1,630	1,017	1,799	1,381
Mariana 2624	450	1,752	2,558	1,728	1,623	2,160

* Se corrige la concentración añadiendo TE (era demasiado alta).

Adara	600	1,349	2,064	1,301	1,771	1,754
-------	-----	-------	-------	-------	-------	-------

Cuadro 7. Valores de absorbancia, relación 260/280 y concentración obtenida en ciruelos de crecimiento lento.

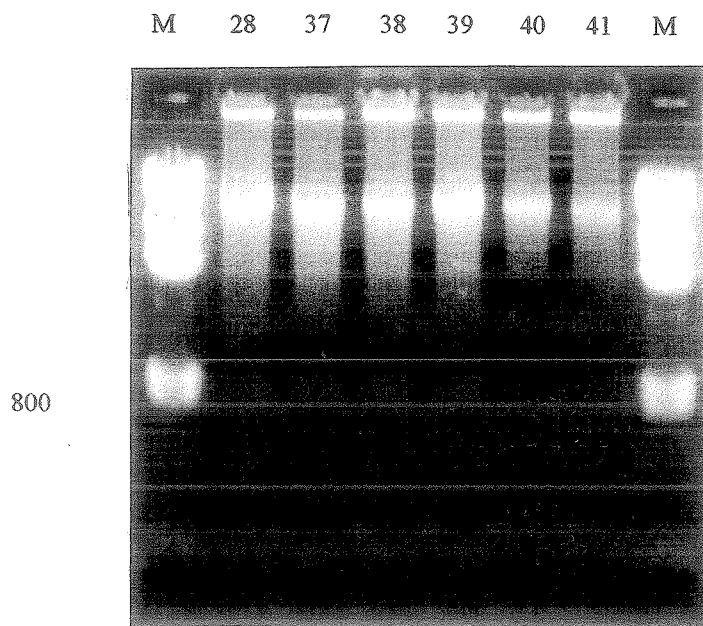
Patrón	Volumen (μ l)	Abs. 230	Abs. 260	Abs. 280	Relación 260/280	μ g / μ l
Adesoto 101	300	1,064	1,159	0,833	1,630	0,843
PM 105 AD	300	1,442	1,738	1,183	1,664	1,391
PM 137 AD	300	1,019	1,133	0,812	1,655	0,811
PM 150 AD	450	1,429	2,005	1,301	1,698	1,712
Puebla Soto 67	450	1,529	1,582	1,145	1,573	1,200
Alguazas	450	1,453	1,989	1,343	1,635	1,660
Montizo	450	2,088	2,679	1,920	1,498	2,284 *
Monpol	450	1,588	1,906	1,333	1,621	1,497
San Julián A	400	1,585	2,189	1,463	1,590	1,959
GF 655/2	450	2,271	2,543	2,032	1,306	2,180 *
Constantí 1	300	1,614	2,071	1,420	1,672	1,619
Brompton	450	1,268	1,591	1,074	1,686	1,270
Torinel	450	1,744	2,414	1,667	1,544	2,122
Tetra	450	1,009	1,353	0,860	1,752	1,149
Damas GF 1869	450	1,195	1,462	1,004	1,688	1,125
Ishtara	450	0,743	0,976	0,654	1,736	0,759

* Se corrige la concentración añadiendo TE (era demasiado alta).

Montizo	600	1,645	2,210	1,507	1,590	1,894
GF 655/2	600	1,814	2,442	1,709	1,515	2,158

Además de cuantificarlo, analizamos la calidad del ADN extraído en un gel de agarosa al 0,8 % (0,42g de Agarosa en 50 ml. de TAE). Se consigue así comprobar su estado (alto peso molecular, ADN sin degradar, ausencia de ARN) (Figura 1).

Figura 1. Análisis en gel de agarosa del 0,8% en el que se comprueba la calidad del ADN extraído. Los ADNs analizados proceden de: (28) PM 105 AD, (37) Constantí, (38) Brompton, (39) Torinel, (40) Tetra, (41) Damas GF 1869, (M) Marcador.



3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Reacción de amplificación.

Para facilitar la reproducibilidad y comparación de los resultados de distintos ADNs suele prepararse una “mezcla maestra” ó “master mix”, cuyos componentes aparecen en el cuadro 8.

Cuadro 8. Componentes de la mezcla maestra.

COMPONENTES	CANTIDAD / MUESTRA	CONCENTRACIÓN
	μL .	FINAL.
Agua estéril	13,98	-
Tampón 10x	2,5	10x
Cl ₂ Mg	1,9	25 mM
DNTPs	2,5	2 mM
Cebador	2	5 μM
Enzima	0,12	5 U/ μl

El tampón de amplificación (20mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0,01% Tween 20), fue suministrado por Advanced Biotechnologies Ltd. (Surrey, Inglaterra), al igual que el Cloruro de Magnesio y el enzima. Los nucleótidos fueron suministrados por Amersham Pharmacia Biotech (Barcelona, España).

El enzima elegido para la amplificación fue seleccionado tras una serie de experimentos, en los que se comparaban enzimas pertenecientes a diferentes empresas. Se probaron los enzimas de Amersham Pharmacia Biotech (Barcelona, España), Ecogen (Barcelona, España) y Advanced Biotechnologies (Surrey, Inglaterra), siendo este último el elegido (Figura 2).

También se realizaron diferentes pruebas o experimentos para determinar cuales eran las concentraciones más adecuadas de Cloruro de Magnesio. Se ensayaron reacciones con concentraciones 1,5 mM, 1,9mM y 3mM, siendo la segunda la que mejores resultados mostró.(Figura 3)

Figura 2. Experimento en el que se prueban 3 enzimas de diferentes casas comerciales y dos tubos de diferentes espesores. Los enzimas utilizados pertenecen a : (A) Advanced Biotechnologies (Surrey, Inglaterra), (E) Ecogen (Barcelona, España) y (P) Amersham Pharmacia Biotech. F y G indican el espesor del tubo, fino y grueso respectivamente. El ADN utilizado en el experimento pertenece a los patrones Adafuel (1) y Adarcias (2). El cebador utilizado es el AB10-08. M y B indican la posición del marcador y de los blancos.

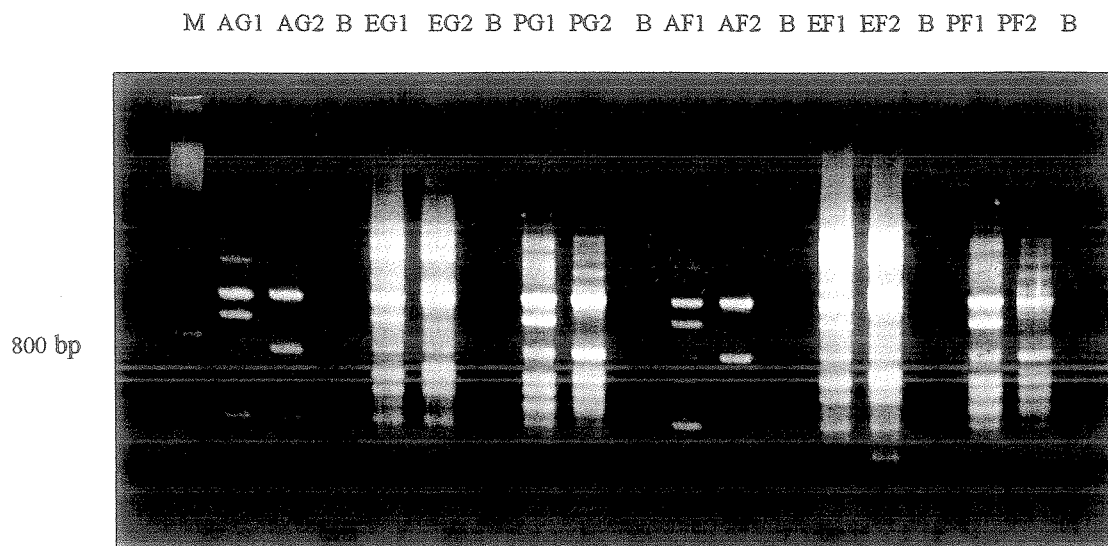
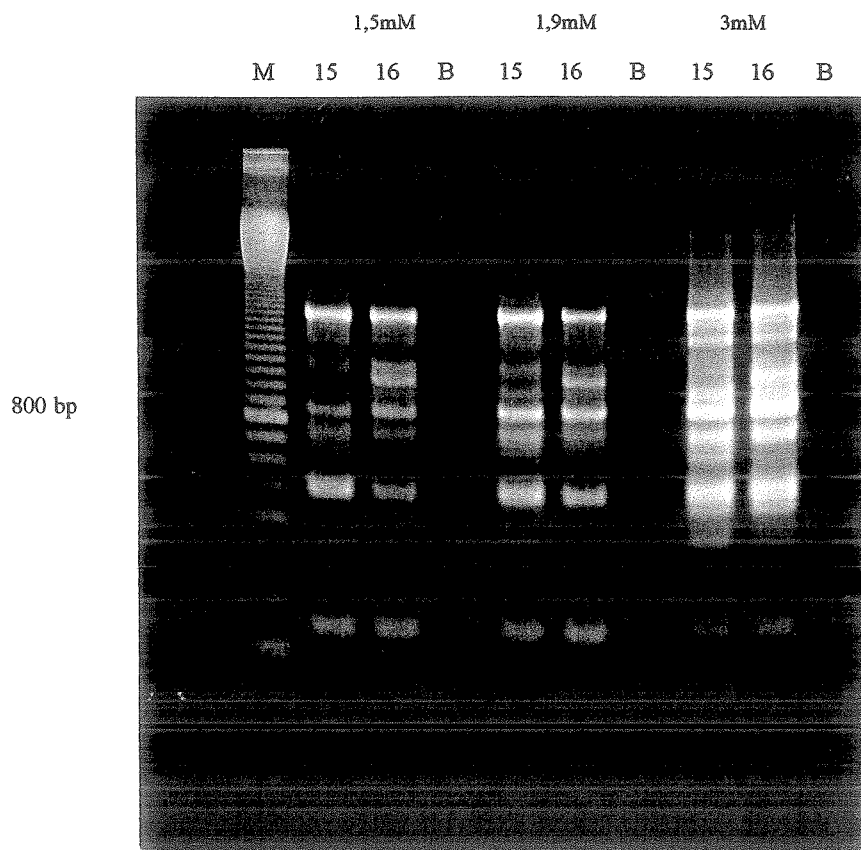


Figura 3. Experimento en el que se prueban diferentes concentraciones de cloruro de Magnesio (1.5 mM, 1.9 mM y 3 mM). El ADN utilizado en este experimento pertenece a los patrones Adara (15) y Ademir (16). El enzima utilizado es el de Advanced Biotechnologies y el cebador es el AB10-15.



Los cebadores fueron suministrados por Operon Technologies (Alameda, California) kit F, así como por Advanced Biotechnologies (Surrey, Inglaterra): kits 7, 9 y 10.

Para realizar las reacciones de amplificación se disponía de dos tipos de tubos; unos finos y otros gruesos, con una capacidad de 0,5 ml y 0,6 ml respectivamente. Se realizó un experimento para comprobar que tipo de tubos PCR eran los mejores. Los primeros resultaron ser los que mejor amplificaban, dando bandas más nítidas y claras (Figura 2).

A partir de la mezcla maestra se hacen alícuotas de 23 μ l, se añaden 2 μ l del ADN a amplificar (10ng/ μ l) y una gota de aceite mineral (Sigma). Todo esto supone un volumen final de 25 μ l. El aceite mineral impide que se evapore la muestra. Las mezclas maestras debido al volumen que ocupan suelen prepararse en tubos del tipo Eppendorf.

Cuando la solución completa más el aceite se encuentra en los tubos de PCR, estos se centrifugan para facilitar el desplazamiento de la solución a la parte inferior del tubo. Se realiza a unas 10.000 rpm durante 5 segundos.

Para la amplificación de las muestras se utilizó un termociclador con una capacidad para 60 tubos de 0,5ml (modelo PTC-100 de MJ. Research Inc EE.UU).

El programa de amplificación consta de una etapa previa de desnaturalización del ADN (1 ciclo de 5 minutos a 93°C), seguido de 45 ciclos de amplificación. En cada uno de los 45 ciclos nos encontramos una nueva etapa de desnaturalización del ADN, que tiene una duración de 1 min a 93 °C, otra de unión del cebador a 36°C durante 1 min y otra de elongación de la cadena a 72 °C durante 2 min La fase de elongación se alarga durante 10 min a 72°C para que las moléculas terminen de unirse y no quede ninguna sin completar.

Una vez terminados los 45 ciclos de amplificación, el programa finaliza con una fase de conservación de los productos amplificados a 4°C.

3.2.2. Separación electroforética.

Los RAPDs se separan mediante electroforesis horizontal empleando como soporte geles de agarosa.

La electroforesis es eficaz como técnica analítica y preparativa. Permite por una parte la separación, identificación y calibrado de fragmentos de DNA o de RNA y por otra, puede ser utilizada para la purificación de DNAs específicos. En la electroforesis el efecto de tamiz molecular del gel es el principal factor de separación ya que la relación carga/masa es

prácticamente la misma para todos los polinucleótidos. El DNA lineal de doble cadena y el RNA en condiciones desnaturalizantes cargados negativamente se desplazarán hacia el cátodo al ser sometidos a un campo eléctrico. Su velocidad de migración será inversamente proporcional al \log_{10} de su peso molecular. La comigración de marcadores de peso molecular conocido permite calibrar el tamaño de los fragmentos analizados. La porosidad del gel será una característica a tener en cuenta para un correcto análisis. Existe una relación lineal entre el \log_{10} de la movilidad electroforética del DNA y la porosidad del gel que se refleja en el cuadro 9.

Cuadro 9. Porcentajes de agarosa e intervalos de separación.

<u>Porcentaje de agarosa en el gel</u>	<u>Intervalo de separación</u>
0,3 %	60-50 Kb
0,7 %	20-1,0 Kb
1,2 %	6-0,4 Kb
1,5 %	4-0,2 Kb
2 %	2- 0,1 Kb

La velocidad de migración también dependerá de la estructura de la molécula. Además el voltaje regula la corriente, por lo que la velocidad de migración de los fragmentos de DNA será proporcional a la diferencia de potencial existente.

En este trabajo se han utilizado dos tipos de agarosa (específicas para separar fragmentos de pequeño tamaño), pertenecientes a diferentes casas comerciales. Durante el cribado de cebadores se utilizó la agarosa NuSieve GTG (FMC,USA). Para separar los patrones utilizados en el trabajo se eligió la agarosa MS-12 (Pronadisa, España). Estas agarosas separan fragmentos de ADN inferiores a 1500 bp, siendo esta la zona que interesa estudiar por ser la más estable.

La concentración de agarosa utilizada fue del 2%, ya que permite una separación mayor de las bandas así como una mayor resolución de las mismas.

El gel se prepara cinco horas antes de la electroforesis, ya que debe permanecer ese tiempo en el frigorífico para aumentar su consistencia. Los geles se rompen con facilidad si no se actúa de esta forma.

Los geles se preparan de la siguiente forma:

1. Se calientan hasta ebullición 6 g de agarosa con 300 ml de 1XTAE en un erlenmeyer, tapando la boca del mismo con un trozo de parafina agujereado que impide una evaporación excesiva. El 1XTAE se obtiene a partir de una dilución de 50XTAE (121 g TRIS, 28,55 ml de Ac. Acético Glacial, 50 ml 0,5M EDTA y 300 ml H₂O, ajustando a pH 8,0 y volumen 500ml).
2. Cuando la agarosa esta disuelta se enfría con agitación hasta 60°C. Se utiliza para ello un agitador magnético. Con esta operación se evita la formación de grumos.
3. Seguidamente se vierte la agarosa en un molde de metacrilato. En el molde están colocados los peines que harán posible la formación de los pocillos. Cada peine da lugar a 22 pocillos. Debemos evitar que se formen burbujas y ondulaciones en el gel que pudiesen influir en la separación posterior.
4. Finalmente se deja polimerizar la agarosa aproximadamente 20 min y se introduce en el frigorífico.

Cuando el gel ha pasado unas horas en el frigorífico (4-5 h) se saca y se deja unos minutos a temperatura ambiente. Después se introduce en la cubeta de electroforesis GNA 200 Pharmacia, que contiene 1XTAE. El tampón de electroforesis debe cubrir totalmente el gel. La electroforesis la realizamos a 65-70 voltios con refrigeración de agua. Gracias a la refrigeración con agua se consiguen bandas más claras y mejor definidas, impidiendo el calentamiento del gel. La fuente de alimentación utilizada pertenece a la casa Pharmacia.

Para dar mayor consistencia a las muestras amplificadas y poder visualizar el frente de electroforesis en el gel, se mezclan las muestras con un colorante. Se añaden entre 1 y 2 µl de Loading Buffer (0,25% de bromophenol azul, 0,25% de xilenecyanol FF, 30% glycerol en agua) en el tubo de PCR y se mezclan con la muestra amplificada utilizando una pipeta de 200 µl. Sobre el gel polimerizado se cargan 23µl (muestra amplificada + loading buffer).

Para poder conocer el tamaño de los fragmentos amplificados, se rellena uno de los pocillos con 15 µl del marcador de peso molecular conocido. Se utiliza el marcador "100 Base-Pair Ladder" suministrado por Pharmacia Biotech (Barcelona, España), cuya solución se prepara de la siguiente forma: 98 µl de agua destilada y estéril, 2 µl de 50XTAE, 8 µl de loading buffer y 12 µl de stock (1µg/µl en TE buffer). La electroforesis tiene una duración de unas 5 horas a 60 voltios.

3.2.3. Tinción del gel.

Cuando la electroforesis ha finalizado, se sumerge el gel en una solución de Bromuro de Etidio (0,5 µg /ml) durante 20-30 min en oscuridad y con agitación. Pasado este tiempo, la solución de Bromuro de Etidio se pasa a un frasco de almacenamiento para su utilización posterior. El gel se lava con agua destilada durante 15-20 min y se observa sobre un transiluminador de luz ultravioleta. Así, podemos observar si se ha producido amplificación y si el gel está suficientemente teñido.

El Bromuro de Etidio es un producto altamente mutagénico, que ha de manipularse con mucha precaución tanto su solución stock como las soluciones que lo contengan. La manipulación deberá hacerse con guantes y en caso de contacto accidental se lavará con abundante agua.

3.2.4 Conservación de los perfiles electroforéticos.

Los perfiles electroforéticos que aparecen en los geles no pueden mantenerse durante mucho tiempo. Las bandas pierden intensidad y acaban por desaparecer. La forma más fácil de conservación es la fotografía (Polaroid 665 blanco y negro con negativo), sobre la que se llevará a cabo el estudio posterior de los perfiles.

Las fotografías deben realizarse en una habitación oscura. Se coloca el gel sobre el transiluminador y los perfiles electroforéticos dentro del campo fotográfico. Se hace la fotografía cuando las bandas se vean claras y nítidas. La cámara utilizada es una Polaroid modelo MP- 4.

3.2.5 Diseño experimental.

Con este trabajo se busca profundizar en la caracterización molecular de patrones frutales. Asimismo, se realizará un estudio de similitud entre los diferentes patrones, pertenecientes a diversas especies del género *Prunus*.

Se realizará en primer lugar un barrido de cebadores, aplicado a 6 patrones obtenidos en Aula Dei. Los patrones elegidos son: Adafuel (Cambra, 1990) y Adarcias (Moreno y Cambra, 1994) híbridos almendro x melocotonero, Ademir (Moreno et al., 1995) y Adara

(Moreno et al., 1995) ciruelos de crecimiento rápido, Adesoto 101 (Moreno et al., 1995) y PM 105 AD (Moreno et al., 1990) ciruelos de crecimiento lento. La elección inicial de estos patrones se debe a que han sido seleccionados en la EEAD y por ello se dispone de bastante información sobre ellos. Además representan los tres grupos de patrones a estudiar.

El trabajo con ADN se divide en dos partes:

1ª Parte: Cribado y selección de cebadores.

a) Se lleva a cabo el barrido con 80 cebadores, aplicados sobre los patrones inicialmente elegidos.

b) Se hace una selección de los cebadores que presentan polimorfismo.

2ª Parte: Reacciones de amplificación con los cebadores elegidos.

Con los cebadores elegidos (Cuadro 10) se realizan estudios de caracterización y similitud genética mediante RAPDs.

Cuadro 10. Cebadores elegidos y secuencia de los mismos.

Cebadores	Secuencia	Cebadores	Secuencia
OPF-08	GGGATATCGG	AB9-14	AGCCGGGTAA
AB7-14	GAACGAGGGT	AB9-20	GAGTCCTCAC
AB9-06	GGGAACCCGT	AB10-07	GACGAGCAGG
AB9-18	TGTCCTGCGT	AB10-17	ACTTCCGCGA
AB10-03	ACGGTTCCAC	OPF-20	GGTCTAGAGG
AB10-06	GGCGCGTTAG	AB7-11	CAATCGGGTC
AB10-10	CCCGTCTACC	AB9-01	ACTCCACGTC
OPF-03	CCTGATCACC	AB10-01	CACACCGTGT
OPF-17	AACCCGGGAA	AB10-02	GTCCTCGTGT
AB10-08	GGCTGCCAGT	AB10-05	GTCACCTGCT
AB7-03	TCTCGCCTAC	AB10-11	ACCGTGCCGT
AB9-07	TCGCTGCGGA		

3.2.6 Análisis de resultados.

Sólo se tuvieron en cuenta las bandas más claras e intensas. Las bandas débiles o inconsistentes se descartaron para el análisis. Las bandas RAPDs se evaluaron como "1" si estaban presentes y como "0" en caso de ausencia. Las bandas que no dieron ningún polimorfismo también fueron tenidas en cuenta en el análisis de datos. Las bandas se nombrarán de la siguiente forma:

1. En primer lugar aparece la abreviatura de la empresa que ha suministrado el cebador, "AB" si es Advanced Biotechnologies (Surrey, Inglaterra) y "OP" si se trata de Operon Technologies (Alameda, California).
2. En segundo lugar aparece el número o letra de Kit utilizado.
3. En tercer lugar se nombra el cebador correspondiente.
4. En cuarto lugar se indica el tamaño, en pares de bases (pb), de los fragmentos amplificados.

Empresa Kit Cebador Tamaño

AB - 10 - 06 - 180

Para el análisis de similitud genética se utilizó el programa de taxonomía numérica NTSYS versión 1.80 (Rohlf, 1995) y se aplicó el coeficiente de asociación de Dice (Nei Li, 1979). El estudio de similitud de las matrices obtenidas fue analizado con el programa Mantel matrix-correspondence test (Mantel, 1967). Para la construcción del dendrograma se utilizó el ligamiento promedio, a través de la media aritmética no ponderada UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se ha abordado la caracterización mediante RAPDs de los patrones frutales seleccionados en la EEAD, conjuntamente con patrones obtenidos en otros centros de investigación (Cuadros 1, 2 y 3). Con este estudio se pretende evaluar el grado de polimorfismo existente entre el conjunto de patrones y analizar estadísticamente su nivel de similitud.

4.1. REPRODUCIBILIDAD DE LA TÉCNICA RAPD.

La validez de la técnica y por tanto de los resultados con ella obtenidos, depende de la repetibilidad de la misma.

Para conocer si las amplificaciones eran reproducibles se realizaron experimentos con dos extracciones diferentes. En la primera extracción se utilizaron hojas jóvenes de los patrones Adafuel (Cambra, 1990), Adarcias (Moreno y Cambra, 1994), Ademir (Moreno et al., 1995), Adara (Moreno et al., 1995), Adesoto 101 (Moreno et al., 1995) y PM 105 AD (Moreno et al., 1990), recogidas en 1997. En la segunda extracción se utilizaron los mismos patrones pero las hojas fueron recogidas en 1998. En este trabajo hemos observado que, una vez optimizadas las condiciones de reacción y manteniéndolas estrictamente se puede conseguir una buena reproducibilidad intralaboratorio, como ya había sido apuntado por Grando et al. (1995) y Moreno et al., (1995). Por otro lado, también hemos observado que la reproducibilidad aumenta si se tienen en cuenta sólo las bandas más intensas, lo cual vendría a certificar los trabajos realizados por Skroch y Nienhuis (1995). Estos investigadores demostraron que cuando no se tenían en cuenta las bandas debilmente amplificadas la reproducibilidad pasaba de un 76% a un 83-96%. Asimismo, la preselección de los cebadores (Barrido de cebadores), ayuda a mejorar la reproducibilidad.

4.2. BARRIDO DE CEBADORES.

El barrido tiene como misión encontrar cebadores que den amplificaciones de calidad y que, al mismo tiempo, revelen polimorfismos claros. Se pretende hacer una preselección de los cebadores más interesantes que puedan ser utilizados posteriormente en los experimentos.

Se ha realizado un barrido con 80 cebadores, correspondientes a los Kits F de Operon Technologies (Alameda, California), y los números 7, 9 y 10 de Advanced Biotechnologies Ltd. (Surrey, Inglaterra). El barrido se realizó sobre seis patrones pertenecientes a tres grupos diferentes. Los patrones elegidos fueron Adafuel (Cambra, 1990) y Adarcias (Moreno y Cambra, 1994) pertenecientes al grupo híbridos almendro x melocotonero, Ademir (Moreno et al., 1995) y Adara (Moreno et al., 1995) ambos ciruelos de crecimiento rápido y Adesoto 101 (Moreno et al., 1995) y PM 105 AD (Moreno et al., 1990) los dos ciruelos de crecimiento lento.

La extracción, amplificación y separación electroforética del ADN ha sido descrita anteriormente en Material y Métodos.

De los 80 cebadores utilizados, 47 resultaron polimórficos entre Adafuel (Cambra, 1990) y Adarcias (Moreno y Cambra, 1994), 42 cebadores lo fueron entre Ademir (Moreno et al., 1995) y Adara (Moreno et al., 1995), y sólo 32 cebadores fueron polimórficos entre Adesoto 101 (Moreno et al., 1995) y PM 105 AD (Moreno et al., 1990). Por otro lado, 22 cebadores revelaron polimorfismo entre los 6 patrones y 4 cebadores no amplificaron.

En las figuras 4 y 5 se muestran ejemplos del barrido de cebadores. En el anexo nº 3 se presentan los cebadores polimórficos y los que no lo son, así como los que no amplifican.

Una vez realizado el barrido, se puede tener una idea de cuales pueden ser los cebadores que generan un mayor número de bandas polimórficas y cuales son los que mejor amplifican. Para facilitar la lectura elijeremos cebadores que amplifiquen pocas bandas. Asimismo, las bandas no deberán ser débiles ni inconsistentes pues pueden dar lugar a mayores errores y falta de repetibilidad.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se eligieron 7 cebadores que permitieron evaluar la diversidad genética existente entre los 41 patrones. Además de los cebadores anteriores, se utilizaron otros que permitieron completar el estudio de los patrones dentro del grupo en el que previamente se habían integrado. Se consigue así evaluar cada patrón de dos formas diferentes:

1. Con el conjunto de patrones, *análisis entre grupos*.
2. Dentro del grupo al que pertenece, *análisis dentro del grupo*

Figura 4. Patrones de bandas RAPDs obtenidas con los cebadores AB10-05 (izq.) y AB10-06 (der.), durante el cribado de cebadores.

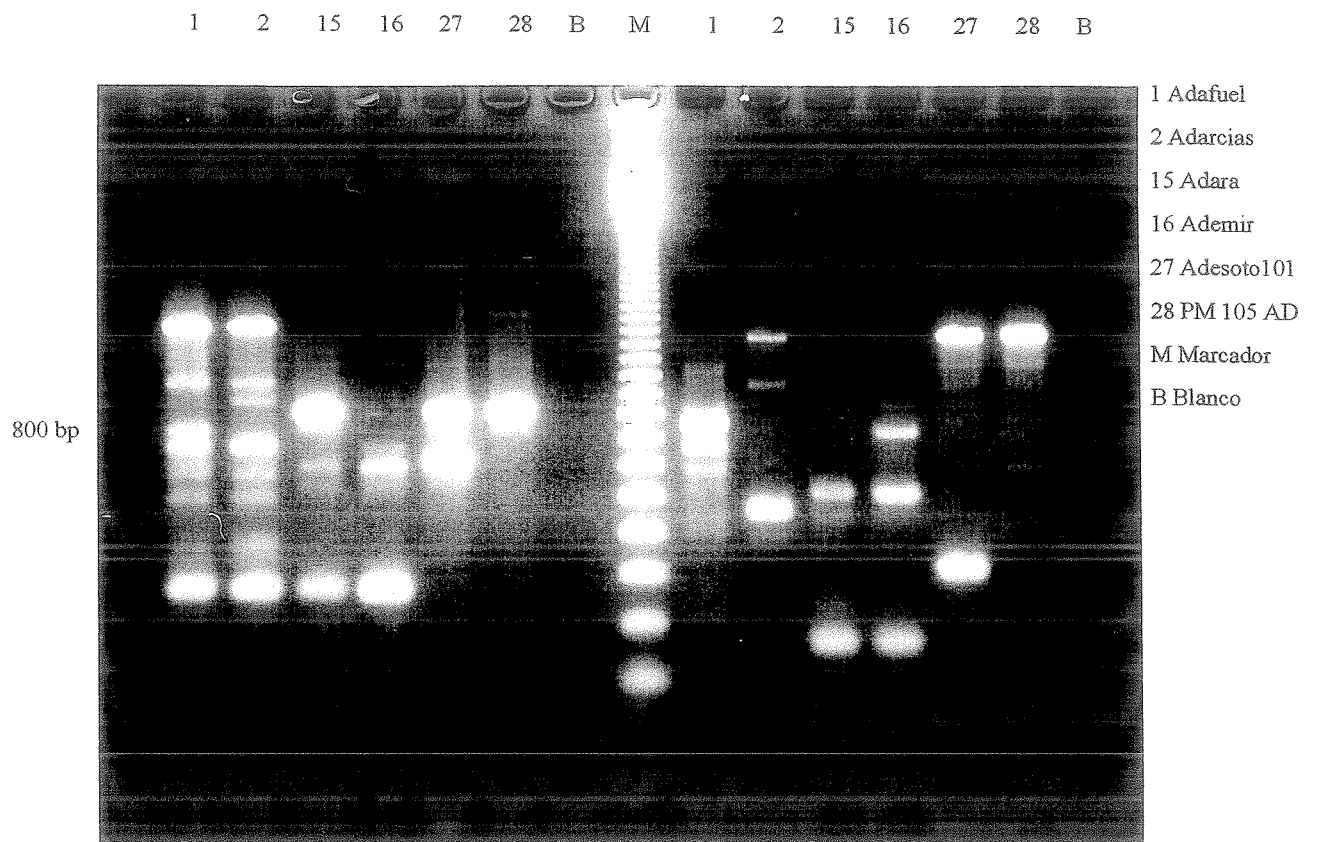
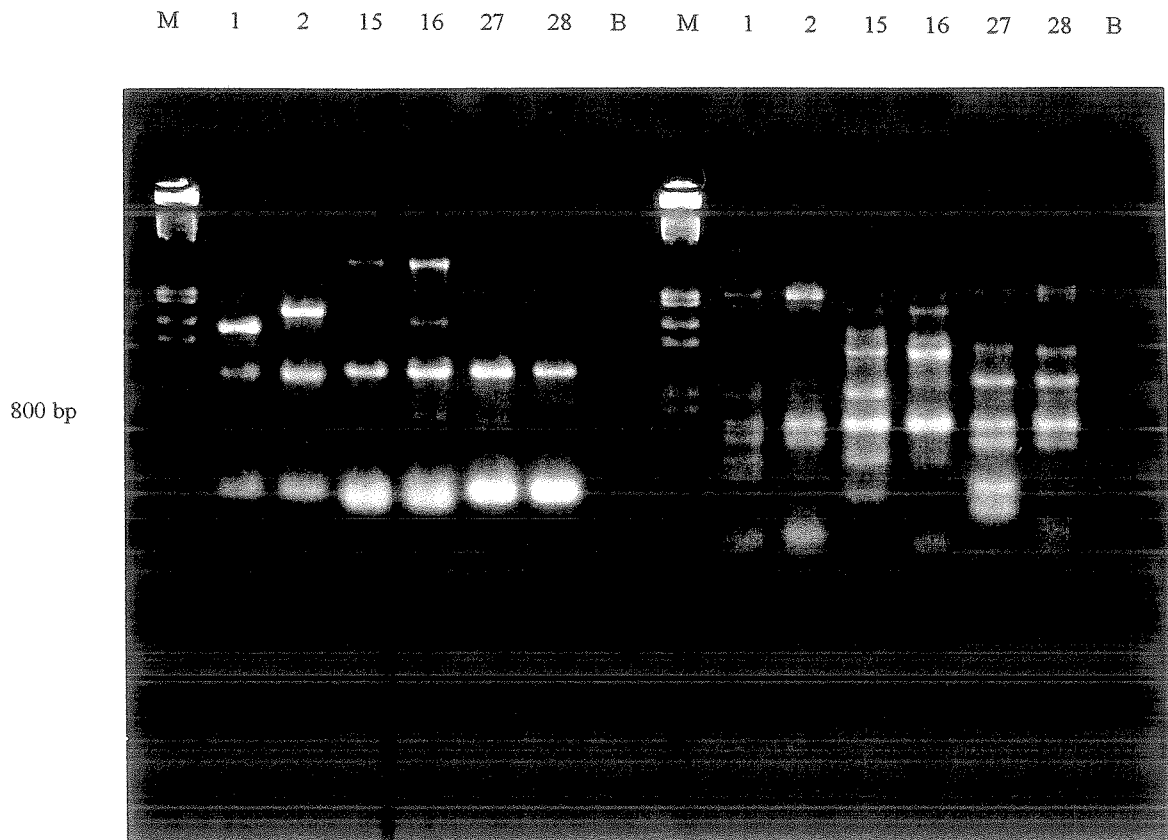


Figura 5. Patrones de bandas RAPDs obtenidas con los cebadores OPF-19 (izq.) y OPF-20 (der.), durante el cribado de cebadores.



Para realizar el análisis entre grupos, se deben comparar los resultados de los tres grupos amplificadas con un mismo cebador. Para saber si dos bandas eran iguales se debían superponer las fotografías, lo cual acarrea dificultades. Por ello, en el análisis entre grupos, se desecharon algunas bandas. Sólo se consideraron bandas claras y legibles en los tres grupos.

4.3. ANÁLISIS ENTRE GRUPOS.

Algunas especies del subgénero *Prunophora* hibridan fácilmente entre ellas mismas y con las del subgénero *Amygdalus* (Ramming y Cociu, 1990), produciéndose híbridos interespecíficos con relativa facilidad. Este hecho, favorecido por la presencia de sistemas de autoincompatibilidad, dificulta los estudios taxonómicos, ya que los límites entre especies son confusos y no están claros. Además, en muchas ocasiones los parentales son desconocidos. Estos factores, junto con la actual tendencia a la producción de híbridos interespecíficos, justifican el análisis combinado de patrones pertenecientes a diferentes especies dentro del género *Prunus*. En el anexo nº 2 aparecen los patrones que forman parte de este estudio, detallándose sus características morfológicas y agronómicas más importantes.

4.3.1. Polimorfismo generado por los RAPDs en el análisis entre grupos.

Para el análisis de los 41 patrones se llevaron a cabo reacciones de amplificación con cada uno de los 7 cebadores elegidos.

Con los 7 cebadores utilizados en el análisis entre grupos se obtuvo una matriz formada por 75 bandas, de las cuales 5 eran monomórficas. El número de bandas por cebador varía desde 7 bandas, obtenido con los cebadores AB9-18 y AB10-06, hasta un máximo de 15 bandas reveladas con los cebadores AB7-14 y AB10-03 (Cuadro 11).

De los 70 marcadores polimórficos, 5 son únicos, exclusivos de un determinado patrón y 7 son compartidos únicamente por dos patrones a la vez (Anexo nº4).

Cuadro 11. Cebadores utilizados en el análisis entre grupos, número de bandas y rango en el que aparecen.

<u>Cebador</u>	<u>Rango (bp)</u>	<u>Bandas</u>
OPF-08	450-2100	13
AB7-14	260-1800	15
AB9-06	300-1700	9
AB9-18	270-1500	7
AB10-03	420-2200	15
AB10-06	180-1300	7
AB10-10	470-1800	9
TOTAL		75

Los patrones que se engloban dentro del subgénero *Amygdalus* pueden diferenciarse del resto de patrones estudiados, ya que se identificaron bandas que sólo poseían los híbridos (AB9-06-1300, AB10-03-1650). Asimismo, los patrones que se engloban dentro del subgénero *Amygdalus* muestran ausencia de banda en el marcador OPF08-1150, algo que no ocurre con el resto de patrones del estudio. Se observaron bandas que compartían todos los ciruelos de crecimiento lento y rápido. Sin embargo, no fue posible encontrar bandas que sólo perteneciesen al grupo de Mirobolanes-Marianas o al grupo de ciruelos de crecimiento lento. Este resultado corrobora la hipótesis de Crane y Lawrence (1952) que sugiere que las especies hexaploides *P. insititia* y *P. domestica* tendrían un origen híbrido entre *P. spinosa* (tetraploide) y *P. cerasifera* (diploide). Por otro lado, algunas bandas RAPD están presentes en los ciruelos de crecimiento lento y en algunos patrones híbridos almendro x melocotonero. Como se ha dicho anteriormente, algunas especies del subgénero *Prunophora* hibridan fácilmente con el subgénero *Amygdalus* (Ramming y Cociu, 1990) y la existencia de bandas comunes podría confirmar posibles relaciones entre ambos subgéneros.

4.3.2. Relaciones genéticas generadas por los RAPDs en el análisis entre grupos.

Para conocer la similitud genética entre los diferentes patrones, a la matriz básica de datos (Anexo nº 4) se le aplica un “coeficiente de similitud,” obteniéndose la “matriz de similitud” correspondiente, que reflejará el parecido entre cada par de patrones estudiados (Cuadro 12). El coeficiente de similitud utilizado es el de Nei y Li (1979). La media de similitud genética entre pares de patrones es de 0,53, y varía desde 0,27 entre Cadaman y Torinel a 1,00 entre Adesoto 101 y Alguazas.

El “análisis de agrupamiento” de los patrones se realizó a partir de la matriz de similitud (Cuadro 12), aplicando el ligamiento promedio (UPGMA) a través del programa SAHN de NTSYS, obteniéndose el dendrograma presentado en la figura 6. Los dendrogramas permiten apreciar mejor las distancias existentes entre patrones que aparecen en extremos de la clasificación (Sneath y Sokal, 1973).

No obstante, para observar de forma más clara las distancias y relaciones existentes entre los diferentes grupos, se empleó el análisis de coordenadas principales (Figura 7). El análisis de coordenadas principales sobre la matriz de similitud generó dos ejes claramente significativos, que explicaron un 32% y un 16% del total de la varianza respectivamente.

Si se observa el dendrograma (Figura 6) se ven dos grupos perfectamente definidos, un grupo formado por los patrones que podrían englobarse dentro del subgénero *Amygdalus* y otro formado por los patrones que podrían englobarse dentro del subgénero *Prunophora*.

El primer grupo incluye a los patrones que tienen como uno de sus parentales el melocotonero. Este grupo queda a su vez dividido en dos subgrupos, que corresponden por una parte a los híbridos *P. amygdalo-persica* y por otra a los híbridos *P. persica* x *P. davidiana*.

Dentro del subgrupo de los *P. amygdalo-persica*, nos encontramos las obtenciones de la EEAD (Adafuel, Adarcias, Albarrech, Calanda, Alcañiz, Herce 5, Tauste y Caspe) conjuntamente con los patrones franceses GF-677 y el GF-557. Los patrones con un nivel de similitud más alto son Calanda y Tauste (0,90). En este subgrupo el patrón que difiere más de los restantes es Adarcias. Esto puede observarse tanto en el dendrograma como en el análisis de coordenadas principales (Figuras 6 y 7).

Los híbridos *P. persica* x *P. davidiana* aparecen divididos. Por una parte, Cadaman y Barrier patrones seleccionados en Europa y por otro, Nemaguard y Nemared seleccionados en Estados Unidos. Los primeros forman un conjunto con un nivel de similitud de 0,80; mientras que los segundos llegan a un valor de 0,91 el más alto de los niveles de similitud dentro de los patrones pertenecientes al subgénero *Amygdalus*. Nemaguard y Nemared poseen un marcador único (OPF08-560). En el análisis del grupo híbridos almendro x melocotonero, estudiaremos con más detenimiento estos patrones. Asimismo, sus características morfológicas y agronómicas, al igual que las del resto de patrones, son descritas en el Anexo nº 2.

El segundo grupo (subgénero *Prunophora*), incluye tanto a los ciruelos de crecimiento rápido como a los ciruelos de crecimiento lento. Ambos aparecen formando agrupaciones diferentes (Figura 6). Dentro de los primeros se incluyen principalmente los Mirobolanes o *P. cerasifera*, así como los Mariana o *P. cerasifera* x *P. munsoniana*. Por otro lado, en los ciruelos de crecimiento lento aparecen reflejados los patrones *P. domestica* y los *P. insititia*.

Dentro de los ciruelos de crecimiento rápido los patrones Adara, Ademir, Mirobolán 713AD, Myrocal, Mirobolán GF 3-1 y Mirobolán B, forman un grupo separado del formado por los patrones Mariana GF 8-1, Mariana 2624 y Mirobolán 29C. Los patrones Miral e Ishtara aparecen más distanciados, sin formar parte de ningún conjunto (Figura 6). Este distanciamiento puede observarse mejor en el Análisis de coordenadas principales (Figura 7).

Los 6 patrones nombrados en primer lugar son, según la clasificación botánica, *P. cerasifera*, a excepción del Mirobolán GF 3-1 (*P. cerasifera* x *P. salicina*). El patrón Mirobolán 29C, clasificado como *P. cerasifera*, aparece muy unido a los Mariana GF 8-1 y Mariana 2624. Además estos tres patrones poseen dos marcadores únicos como son el AB9-06-1200 y AB7-14-750 (Anexo nº4). En el análisis del grupo Mirobolán-Mariana se hablará con más detenimiento de estos patrones.

Si se considera la clasificación botánica y las características agronómicas, los patrones Fereley-Jaspi, Isthara y Miral, todos ellos híbridos interespecíficos, son los patrones que difieren en mayor grado dentro de este grupo.

En el análisis entre grupos, Fereley-Jaspi (*P. japonica* x *P. spinosa*), se encontró siempre en el grupo de los ciruelos de crecimiento lento. Aunque si observamos el dendrograma del análisis entre grupos (Figura 6), se puede ver como esta inclusión se dio siempre con el nivel de agregación más bajo. Como puede apreciarse en el análisis de

coordenadas principales (Figura 7), Fereley-Jaspi ocupa una posición intermedia entre los dos grupos de ciruelos. Además la media de similitud genética con los dos grupos es muy parecida. Con los ciruelos de crecimiento lento es de 0,687 y con los Mirobolanes y Marianas de 0,633.

Ishtara es un híbrido interespecífico complejo, cuyo parental masculino es un híbrido natural de *P. cerasifera* x *P. persica* (Renaud et al., 1988). Ishtara posee una banda común (AB9-18-1500) a todos los patrones que se incluyen dentro del subgénero *Amygdalus* (excepto con Adarcias). Esta banda no aparece en ningún Mariana, Mirobolán o ciruelo de crecimiento lento. Esto podría confirmar la posible presencia de *P. persica* en su ascendencia. Además en el análisis de coordenadas principales (Figura 7), vemos a este patrón formando parte de los ciruelos de crecimiento rápido pero separado del núcleo de Mirobolanes-Marianas, y con una dirección evidente hacia los patrones del subgénero *Amygdalus*. Si se observa el dendrograma de los 41 patrones (Figura 6), se aprecia al patrón Ishtara dentro del grupo de ciruelos de crecimiento rápido pero sin formar parte de ningún conjunto y con un nivel de agregación bastante bajo.

Miral 3278 AD es un híbrido natural de parentales desconocidos. Sus características morfológicas se asemejan a las de los Mirobolanes, pero tiene algunas de ellas que recuerdan a los almendros. Por todo ello, se cree que este patrón podría ser un híbrido interespecífico entre *P. cerasifera* x *P. amygdalus* (M.A. Moreno, datos no publicados). El patrón Miral posee dos bandas que no aparecen en los Mirobolanes y Marianas, pero que están presentes en algunos de los híbridos almendro x melocotonero, son las bandas: AB10-03-420 y OPF8-600. Por lo tanto, el estudio o análisis molecular apoyaría la hipótesis de ser un posible híbrido interespecífico entre *P. cerasifera* y algunas de las especies del subgénero *Amygdalus*.

Como se ha dicho anteriormente, los ciruelos de crecimiento lento aparecen claramente separados de los ciruelos de crecimiento rápido.

Si se observa la posición que ocupan los ciruelos de crecimiento lento en el dendrograma, podemos ver como éstos aparecen divididos en dos grupos. Un primer grupo formado por Adesoto 101, Alguazas, Puebla de Soto 67, PM 150 AD, Montizo, Brompton, Monpol, Tetra y San Julián A, y otro que engloba a los patrones PM 137 AD, San Julián GF 655/2, PM 105 AD, Damas GF 1869, Torinel y Constantí 1.

Si nos centramos en el primer grupo, podemos ver como Adesoto 101 y Alguazas tienen el máximo nivel de similitud, con un valor de 1. Estos patrones son muy parecidos (proceden de la misma región) y fueron prospectados con vistas a realizar una selección clonal de pollizos de Murcia. Debido al reducido número de cebadores utilizado y a la elección de las bandas más claras, en este análisis no existe ningún marcador que diferencie estos dos patrones. En el análisis de los ciruelos de crecimiento lento, al utilizarse más cebadores y un número mayor de bandas, aparecen marcadores que los diferencian. No obstante, queda claro que Adesoto 101, Alguazas, y Puebla de Soto 67 son ciruelos con unos niveles de similitud muy altos. Estas relaciones de similitud podemos observarlas tanto en el dendrograma (Figura 6), donde aparecen formando un conjunto, como en la matriz de similitud (Cuadro 12), en la que aparecen los valores de esta relación. A estos tres patrones se les une posteriormente en el dendrograma el patrón PM 150 AD.

Montizo y Monpol (Felipe, 1989) son patrones procedentes de la polinización libre del Pollizo de Murcia y han sido seleccionados en el Departamento de Fruticultura del SIA (Servicio de Investigación Agroalimentario) perteneciente a la Diputación General de Aragón. En el dendrograma aparecen agrupados respectivamente con Brompton y Tetra. El último patrón en sumarse a este grupo es el San Julián A.

Dentro del segundo grupo de ciruelos de crecimiento lento, cabe destacar a los patrones PM 105 AD y Damas GF 1869, que forman un conjunto con un nivel de similitud de 0,86. Estos dos patrones se separan claramente del patrón Torinel que se une a ellos con un nivel de similitud de aproximadamente 0,82. PM 137 AD y San Julián GF 655/2 forman otro conjunto que se une a los tres patrones anteriores. El patrón Constantí 1 es el último en incorporarse.

Los patrones PM 105 AD, PM 137 AD y PM 150 AD, proceden de la polinización libre de Pollizos (*P. insititia*) y aparecen formando parte de grupos diferentes, lo cual podría explicarse por la posible hibridación de los pollizos originales, que actuaron como parental femenino, con otros ciruelos de crecimiento lento.

La media de similitud genética entre grupos dio valores muy bajos. El grupo que presentó mayores distancias con los otros fue el de los híbridos almendro x melocotonero, que presentó medias de similitud de 0,396 con el grupo de los Mirobolanes-Marianas, y de 0,360 con los ciruelos de crecimiento lento. Por el contrario, la media de similitud entre los dos

subgrupos del subgénero *Prunophora* fue relativamente grande, con un valor de 0,540.

Del análisis entre grupos se obtiene una clasificación que concuerda con la obtenida a partir de las características morfológicas de los patrones.

Para saber si el dendrograma es un fiel reflejo de la matriz de similitud, se utiliza el "coeficiente de correlación cofenético". Este coeficiente relaciona una matriz que se obtiene a partir del dendrograma, con la matriz de similitud original. Según Rolhf (1995), el grado de ajuste entre dos matrices se puede interpretar subjetivamente como sigue: si la relación es mayor o igual a 0,9 el ajuste es muy bueno; si la relación se encuentra entre 0,8 y 0,9 el ajuste es bueno; si aparece un valor entre 0,7 y 0,8 se trata de un mal ajuste; y si el valor es inferior a 0,7 el ajuste es muy malo. El coeficiente de correlación entre la matriz cofenética (desarrollada a partir del dendrograma) y la matriz de similitud original, es de 0,95. Este buen resultado legitima el dendrograma obtenido a partir de la matriz de similitud. Similares resultados han sido obtenidos en caracterizaciones de ciruelo (Ortiz et al., 1997), utilizando marcadores RAPDs.

El polimorfismo existente entre los patrones utilizados en este proyecto es grande. De los 41 patrones que forman el análisis, se han conseguido diferenciar 40 patrones utilizando sólo 7 cebadores. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores. Graham y McNicol (1995) consiguieron separar 13 especies de *Rubus* en 3 subgéneros utilizando 10 cebadores. Millan et al. (1996) lograron diferenciar 4 especies de rosa silvestre a partir de 10 cebadores y 75 bandas (12 monomórficas) y Ko et al. (1998), diferenciaron 10 especies de violetas utilizando 13 cebadores y 56 bandas (3 monomórficas).

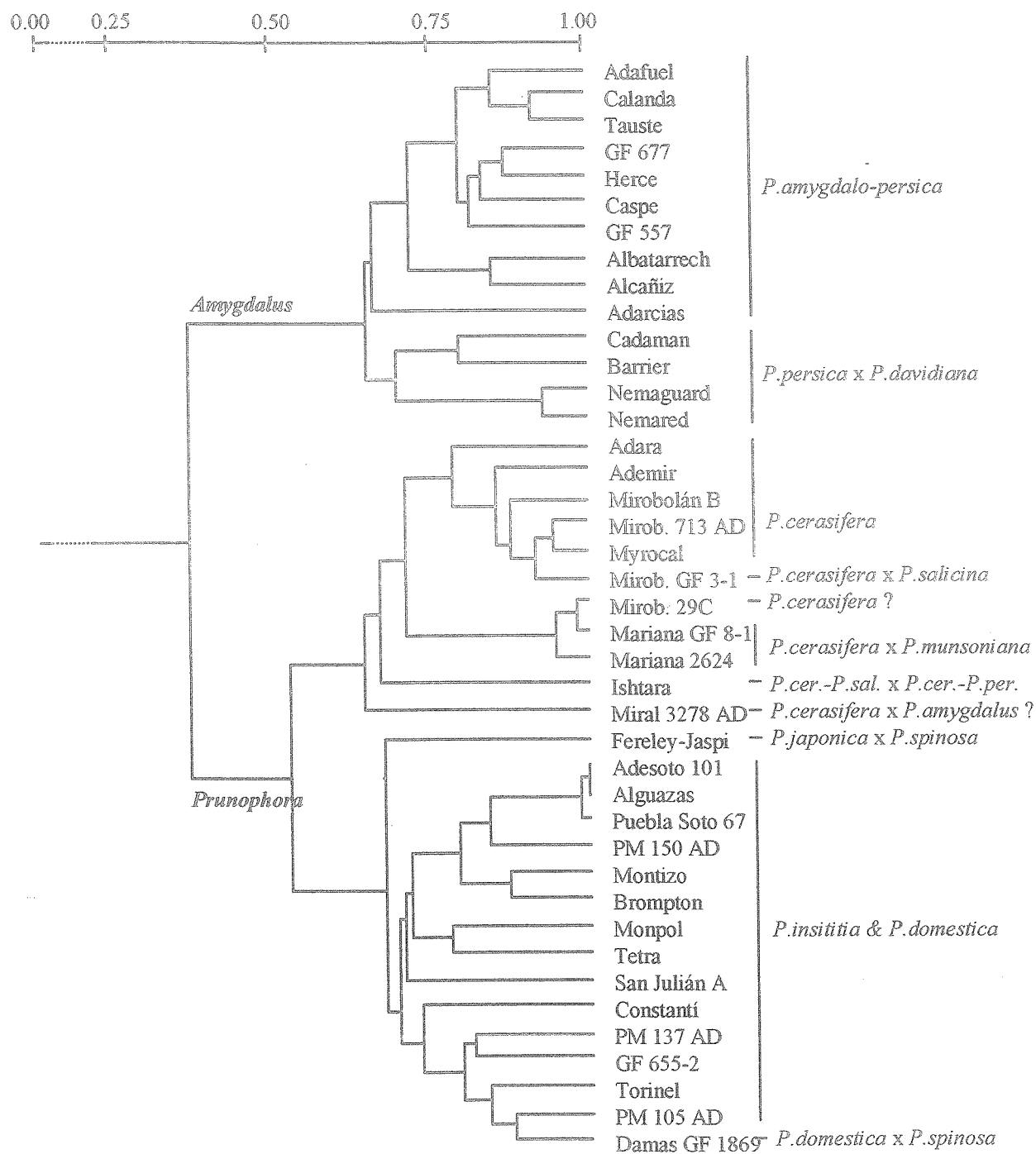


Figura 6. Dendrograma obtenido del análisis entre grupos (41 patrones), utilizando 7 cebadores y el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979).

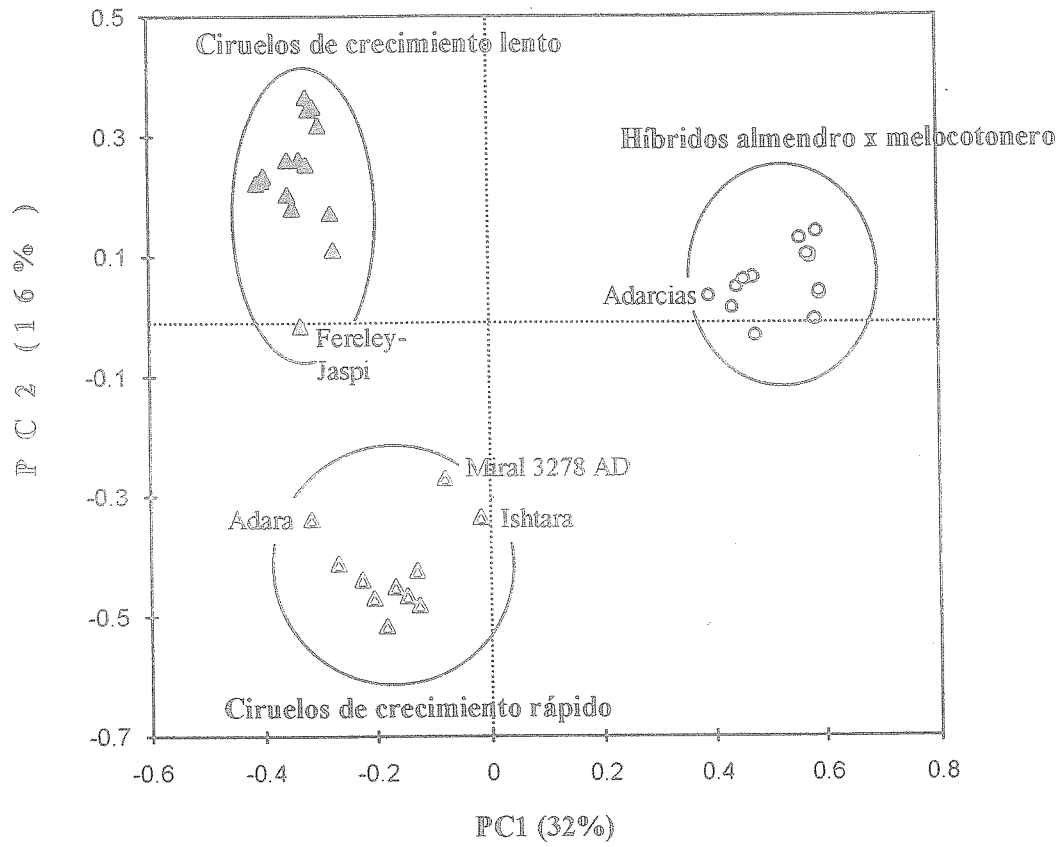


Figura 7. Análisis de coordenadas principales en el que aparecen los 41 patrones del análisis entre grupos.

4.4 ANÁLISIS DENTRO DE CADA GRUPO.

La diversidad genética existente dentro de un mismo grupo es otra característica a considerar en este trabajo.

Se evaluaron 12 cebadores para los híbridos almendro x melocotonero, 13 cebadores para el grupo de ciruelos de crecimiento rápido y 14 cebadores para los ciruelos de crecimiento lento.

4.4.1. Híbridos almendro x melocotonero.

4.4.1.1. Polimorfismo generado por RAPDs

A partir de los perfiles electroforéticos generados por los 12 cebadores, se encontraron un total de 108 bandas, lo cual equivale a una media de 9 bandas por cebador.

El número de bandas por cebador varía desde 5 bandas, obtenidas con los cebadores AB10-08 y AB7-03, hasta un máximo de 13 bandas reveladas con el cebador AB7-14 (Cuadro 13). Del total de bandas amplificadas, 88 son polimórficas, lo cual representa aproximadamente un 82% y las restantes 20 son comunes a todos los patrones estudiados, lo que representa aproximadamente un 18% del total.

De los 88 marcadores polimórficos, 23 son únicos, exclusivos de un determinado patrón y 15 son compartidos únicamente por dos patrones a la vez (Anexo nº 5).

Se obtiene un promedio de 50 bandas por patrón, siendo Adarcias el patrón que menos bandas muestra (43 bandas) y los patrones GF-677 y Tauste los que más bandas muestran (56) (Anexo nº 5).

Se identificó un marcador que separaba los patrones *P. amygdalo-persica* de los *P. persica* x *P. davidiana*. Es la combinación de dos bandas pertenecientes al primer AB10-08, en las posiciones 1100bp y 1150bp.

Cuadro 13. Cebadores utilizados en la caracterización de los híbridos almendro x melocotonero, número de bandas y rango en el que aparecen.

Híbridos almendros x melocotonero		
<u>Cebador</u>	<u>Rango(bp)</u>	<u>Bandas</u>
OPF-08	420-1600	11
AB7-14	260-1800	13
AB9-06	300-1700	10
AB9-18	260-1500	7
AB10-03	430-1650	11
AB10-06	240-1380	10
AB10-10	480-1300	8
OPF-03	450-1600	11
OPF-17	400-1700	8
AB10-08	620-1150	5
AB7-03	250-800	5
AB9-07	350-2100	9
TOTAL		108

En las figuras 8 y 9 se pueden ver las ampliaciones obtenidas para los 14 patrones híbridos almendro x melocotonero a partir de los cebadores OPF-03 y AB9-07 respectivamente. Con el cebador OPF-03 (Figura 8) se obtienen bandas específicas para algunos patrones. De este modo, Calanda (10) muestra el marcador OPF03-450, el patrón GF 557 (4) exhibe el marcador OPF03-930 y Barrier (6) posee el marcador (OPF03-1220). Estos marcadores podrían ser utilizados para diferenciar a estos patrones del resto de patrones del grupo. Asimismo, este cebador presenta una banda que sólo poseen los patrones Cadaman (5) y Barrier (6) (OPF03-800). Este marcador vendría a certificar la gran relación existente entre ambos, ya que se trata de patrones *P. persica* x *P. davidiana* obtenidos en Europa.

Con un número mínimo de cuatro cebadores se pueden diferenciar todos los patrones de este grupo (Cuadro 14).

Cuadro 14. Combinación de bandas de 4 cebadores que permiten diferenciar todos los patrones incluidos en el grupo híbridos almendro x melocotonero.

	AB10-06-240	AB10-06-300	AB10-06-500	AB10-06-620	AB10-06-940	AB10-06-1100	OPF17-590	OPF17-1200	OPF17-1700	AB7-14-380	AB7-14-580	AB7-14-600	AB7-14-810	AB7-14-1400
Adafuel	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Adarcias	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
GF 677	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
GF 557	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Cadaman	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Barrier	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Nemaguard	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nemared	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Albatarrech	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
Calanda	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Alcañiz	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Herce 5	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Tausó	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
Caspe	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0

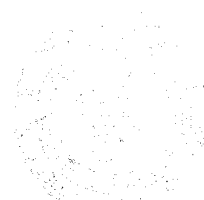


Figura 8. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador OPF-03 en los 14 patrones híbridos almendro x melocotonero.

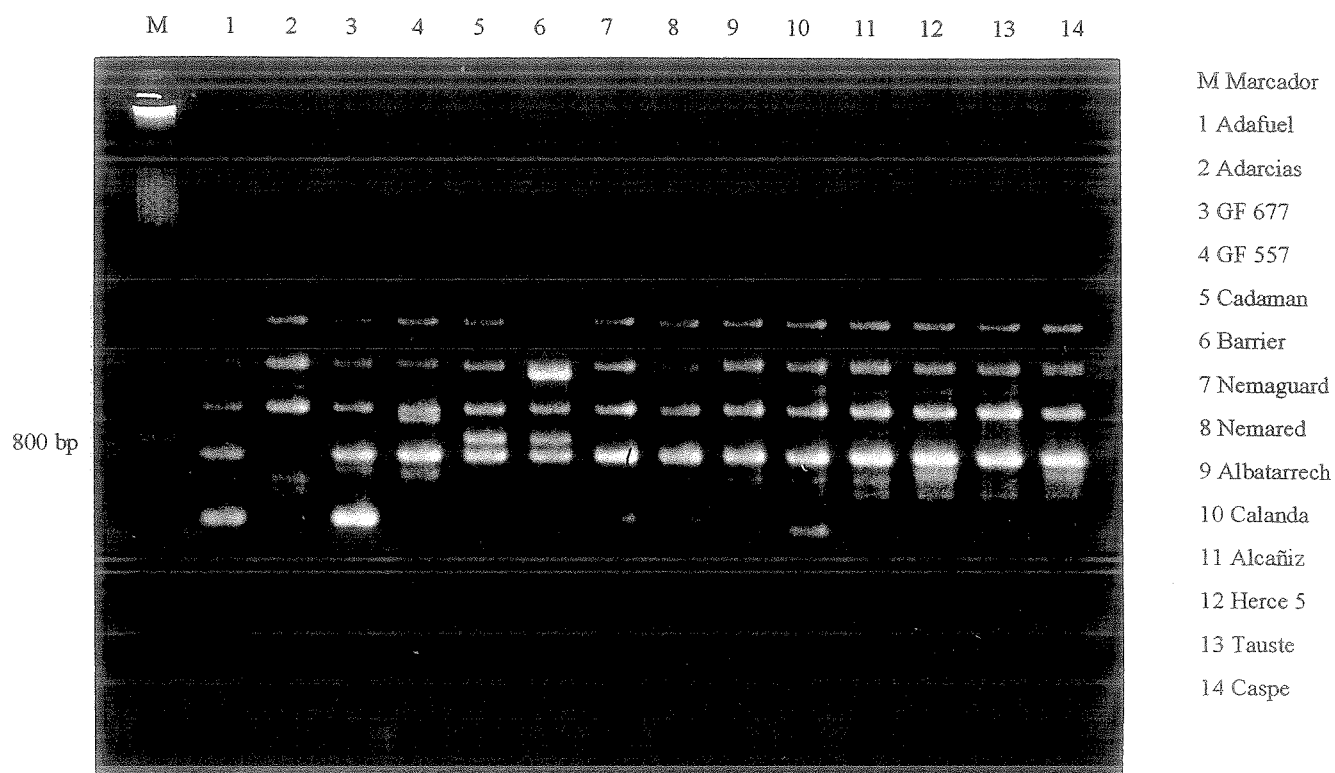
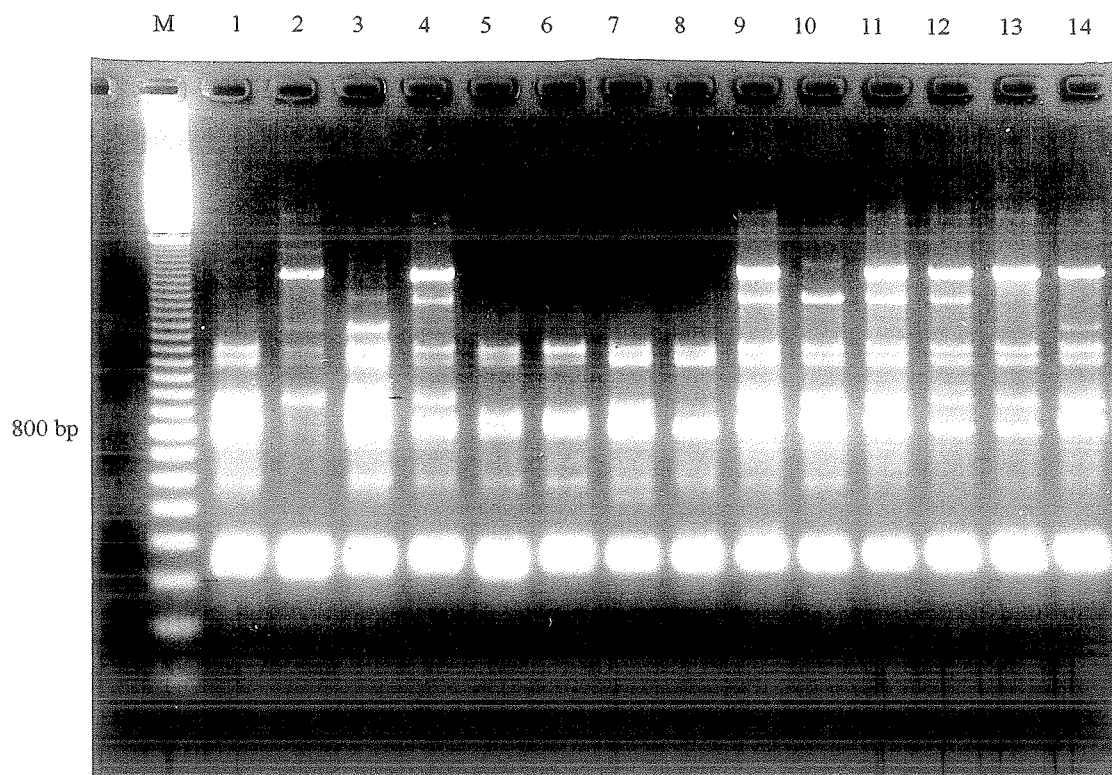


Figura 9. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador AB9-07 en los 14 patrones híbridos almendro x melocotonero.



4.4.1.2 Relaciones genéticas generadas por los RAPDs.

A partir de la matriz de similitud (Cuadro 15) obtenemos un dendrograma (Figura 10) que muestra una distribución similar a la ya observada con el dendrograma conjunto para los 41 patrones. La media de similitud genética observada para el conjunto de patrones pertenecientes al grupo almendro x melocotonero, es bastante elevada (0,723). Las similitudes genéticas van desde 0,543 entre Cadaman y Adarcias, a 0,90 entre Nemaguard y Nemared.

Del estudio del dendrograma (Figura 10) se observa que hay dos grupos perfectamente definidos, un grupo formado por los patrones *P. amygdalo-persica* (excepto Adarcias), y otro formado por los *P. persica x davidiana*.

Dentro de los *P. amygdalo-persica*, el patrón Adarcias fue el que presentó las mayores diferencias, apareciendo con el nivel de similitud más bajo. Este patrón muestra características botánicas muy diferentes al resto. Entre dichas características cabe mencionar que sus hojas y brotes son más parecidos al melocotonero que las del resto de patrones híbridos almendro x melocotonero. Además, tiene un menor vigor y sus flores tienen una fertilidad muy baja.

Dentro de los *P. persica x P. davidiana*, Nemaguard y Nemared son los patrones más próximos y se alejan claramente de Cadaman y Barrier. El nivel de similitud entre Nemaguard y Nemared alcanza un valor de 0,90 resultado que no sorprende, ya que Nemaguard es uno de los parentales de Nemared. Lu et al. (1996) clasificaron 18 patrones de melocotonero, la mayoría de ellos *P. persica*, también incluyeron Nemaguard y Nemared y al igual que nosotros encontraron un alto nivel de similitud entre ambos. Por su parte, Cadaman y Barrier alcanzan un valor de similitud de 0,857 resultado que certifica la relación existente entre ambos, ya que son *P. persica x davidiana*. Como ya se ha mencionado, Nemaguard y Nemared fueron seleccionados en los Estados Unidos y Cadaman y Barrier son selecciones europeas.

Cuadro 15. Matriz de similitud obtenida para el grupo de híbridos almendro x melocotonero, utilizando 12 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).

	Adafael	Adarcias	GF 677	GF 557	Cadaman	Barrier	Nemaguard	Nemared	Albatarrech	Calanda	Alcaniz	Herce 5	Tausie	Caspe
Adafael	1.000													
Adarcias	0.607	1.000												
GF 677	0.765	0.637	1.000											
GF 557	0.792	0.733	0.738	1.000										
Cadaman	0.717	0.543	0.745	0.688	1.000									
Barrier	0.717	0.617	0.745	0.710	0.857	1.000								
Nemaguard	0.703	0.600	0.774	0.674	0.771	0.747	1.000							
Nemared	0.697	0.615	0.725	0.689	0.765	0.765	0.900	1.000						
Albatarrech	0.717	0.617	0.681	0.731	0.619	0.643	0.602	0.593	1.000					
Calanda	0.800	0.629	0.784	0.812	0.717	0.696	0.703	0.697	0.739	1.000				
Alcaniz	0.758	0.690	0.742	0.813	0.690	0.713	0.674	0.690	0.897	0.821	1.000			
Herce 5	0.808	0.682	0.812	0.860	0.703	0.703	0.689	0.705	0.725	0.848	0.850	1.000		
Tausie	0.835	0.696	0.724	0.827	0.695	0.737	0.660	0.674	0.758	0.835	0.816	0.843	1.000	
Caspe	0.784	0.681	0.808	0.796	0.702	0.723	0.667	0.681	0.702	0.784	0.763	0.851	0.819	1.000

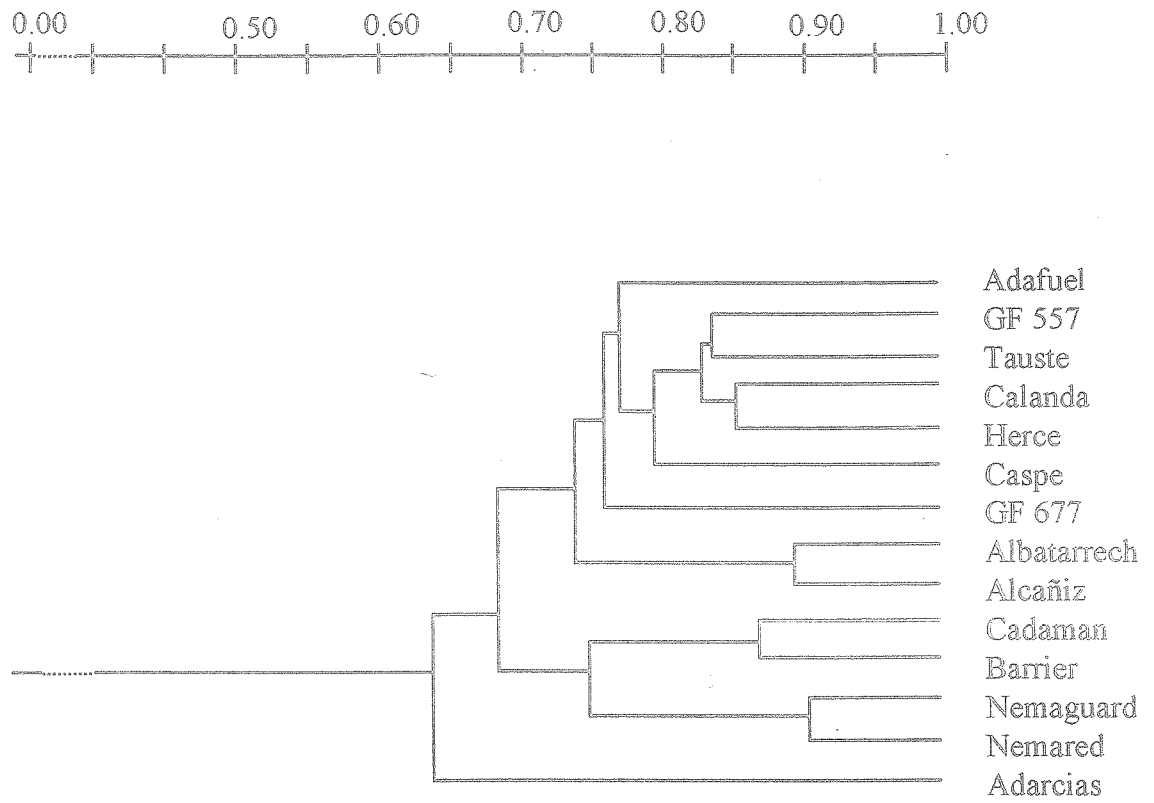


Figura 10. Dendrograma obtenido para el grupo híbridos almendro x melocotonero, utilizando 12 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).

4.4.2. Ciruelos de crecimiento rápido.

4.4.2.1. Polimorfismo generado por RAPD

Dentro del grupo de ciruelos de crecimiento rápido se incluyeron 12 patrones pertenecientes a diferentes especies (Cuadro 2).

Para el análisis de este grupo se utilizaron 13 cebadores, los cuales produjeron 142 bandas (Cuadro 16), siendo la media de bandas por cebador de 11.

De los 142 marcadores, 25 son comunes a todos los patrones estudiados, lo cual representa un 17,6% del total y los 117 marcadores restantes son polimórficos, representando una media de 9 marcadores polimórficos por cebador. El grado de polimorfismo total encontrado es del 65%. Hay que destacar que con todos los cebadores aparecieron marcadores polimórficos (como cabría esperar ya que se parte de cebadores seleccionados por esta característica).

Cuadro 16. Cebadores utilizados en la caracterización, número de bandas y rango en el que aparecen.

<u>Cebador</u>	<u>Rango(bp)</u>	<u>Bandas</u>
OPF-08	600-1600	7
AB7-14	250-1800	17
AB9-06	300-1800	6
AB9-18	240-2200	13
AB10-03	320-2200	14
AB10-06	180-1900	14
AB10-10	470-1900	9
AB7-03	170-1600	11
AB9-07	360-1850	10
AB9-14	380-1060	7
AB9-20	300-1550	15
AB10-07	580-1320	8
AB10-17	430-1800	11
	TOTAL	142

De los 117 marcadores polimórficos, 43 son únicos, exclusivos de un determinado patrón. El patrón con mayor número de bandas es Fereley-Jaspi con 66 y el que cuenta con menos Mirobolán B con 49 (Anexo 6). Aunque los Marianas no disponen de marcadores exclusivos para cada uno de ellos, si que existen 4 marcadores que diferencian a estos dos patrones del resto del grupo (AB10-10-1080, AB7-14-1550, AB9-14-380, AB9-07-700). Con los tres primeros muestran banda y en el último se caracterizan por la ausencia de la misma, cuando el resto de patrones disponen de ella. En las figuras 11 y 12 pueden verse las amplificaciones obtenidas para los 12 ciruelos de crecimiento rápido a partir de los cebadores AB9-07 y AB9-20. En la figura 12 (cebador AB9-07) puede observarse la existencia de dos bandas que sólo posee Fereley-Jaspi (24) (AB9-07-1350 y AB9-07-1700). Estas bandas permiten diferenciarlo del resto de patrones del grupo. Con este cebador los patrones Miral 3278 AD (18) e Ishtara (23) presentan un marcador común a ambos (AB9-07-360). Si se observa la figura 9, grupo híbridos almendro x melocotonero, puede verse como todos los patrones de este grupo poseen también el marcador AB9-07-360. Este resultado podría confirmar la presencia de alguna de las especies del subgénero *Amygdalus* como parental de los patrones Miral 3278 AD e Ishtara. Con el cebador AB9-20 (Figura 11) estos dos patrones muestran bandas exclusivas. Miral 3278 AD (18) posee los marcadores AB9-20-340 y AB9-20-620 e Ishtara (23) el marcador AB9-20-300. En la figura 11 aparece también reflejada la relación existente entre el Mirobolán 29C (19) y los Mariana (25 y 26) Estos tres patrones comparten el marcador AB9-20-820. Con cuatro cebadores se consigue diferenciar todos los patrones de este grupo (Cuadro 17).

Cuadro 17. Combinación de bandas de 4 cebadores que permiten diferenciar todos los patrones incluidos en el grupo de ciruelos de crecimiento rápido.

	AE9-07-360	AE9-07-300	AE9-07-1300	AE9-07-1700	AE10-07-580	AE10-07-840	AE10-07-900	AE10-07-1120	AE9-20-620	AE9-20-660	AE9-20-440	AE9-20-700	AE9-20-820	AE10-10-620	AE10-10-1000	AE10-10-1080
Adara	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Admir	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mirob. 713 AD	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Miral 3278 AD	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
Mirobolán B	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mirobolán 29C	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
Myrocal	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mirob. GF 3-1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Ishtara	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
Fereley-Jaspi	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mariana GF 8-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
Mariana 2624	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1

Figura 11. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador AB9-20 en los 12 ciruelos de crecimiento rápido.

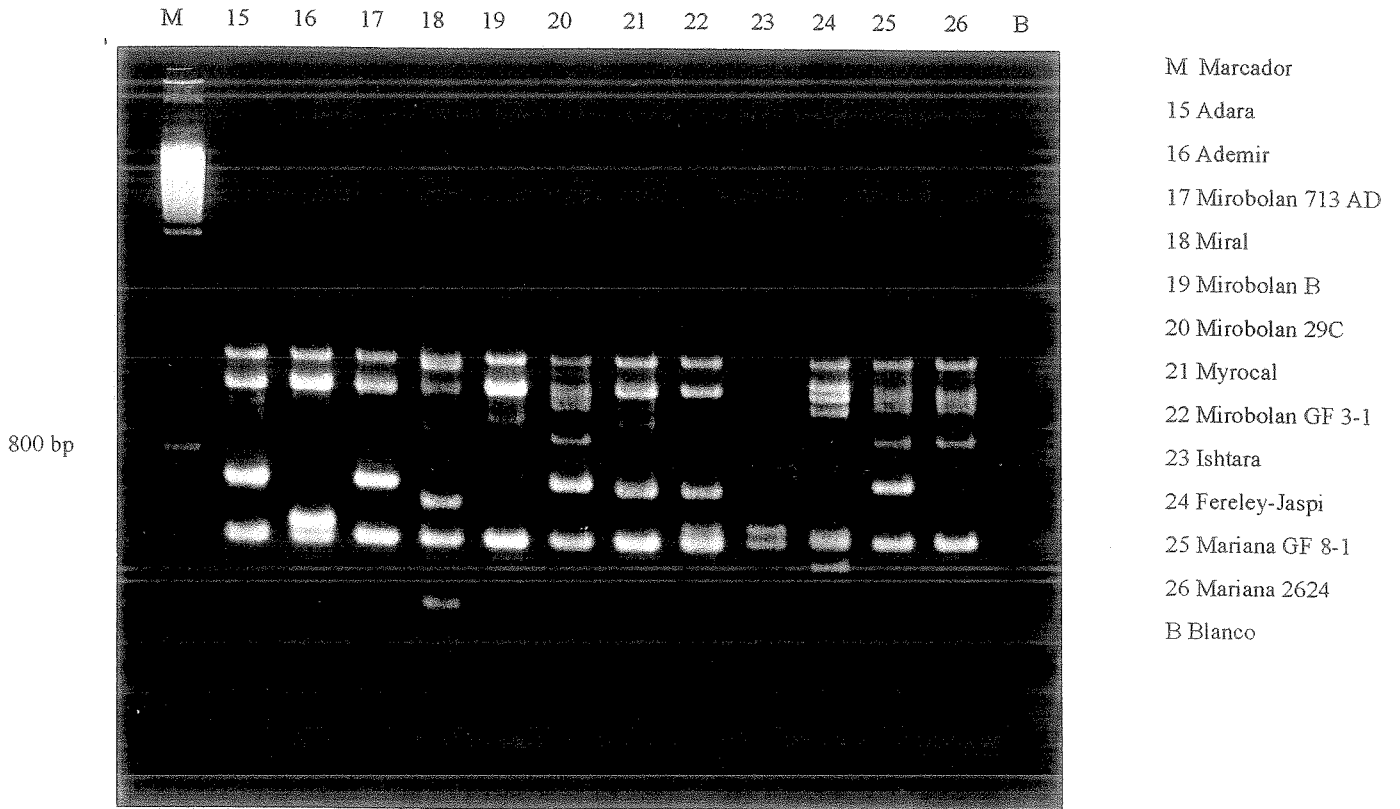
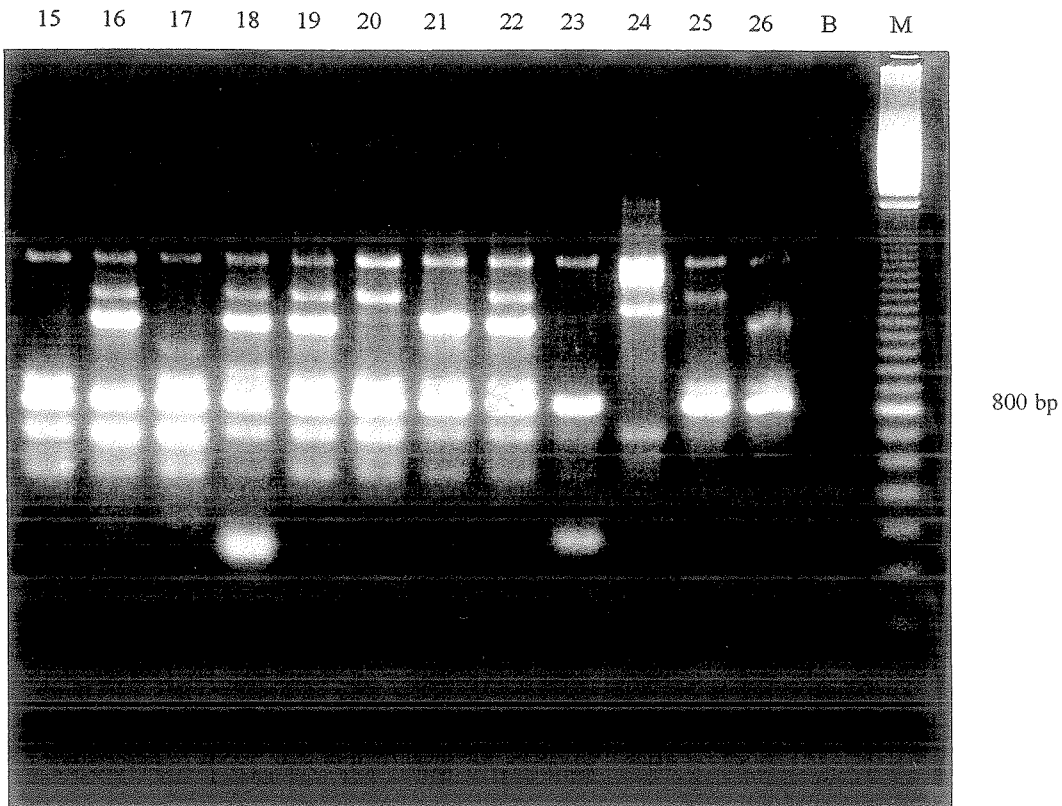


Figura 12. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador AB9-07 en los 12 ciruelos de crecimiento rápido.



4.4.2.2. Relaciones genéticas generadas por los RAPDs.

La media de similitud genética fue de 0,678. Este resultado da una idea de lo diferentes que son los materiales vegetales incluidos en el estudio. Las similitudes genéticas van desde 0,552 entre Ishtara y Fereley-Jaspi, hasta 0,933 entre Mariana GF 8-1 y Mariana 2624 (Cuadro 18).

Si observamos el dendrograma vemos como los patrones más parecidos fueron Mariana GF 8-1, Mariana 2624 y Mirobolán 29C (Figura 13). Estos patrones forman un grupo compacto, con una media de similitud genética alta (0,88). El origen del patrón Mariana es desconocido. Según Crossa-Raynaud y Audergon (1987), se trata de un híbrido espontáneo entre *P. cerasifera* y una especie diploide americana perteneciente al género *Prunus*, seguramente *P. munsoniana*.

El patrón Mirobolán 29C aparece en la bibliografía como un *P. cerasifera*, sin embargo este patrón aparece en los dendrogramas agrupado con los Mariana (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*). Las características morfológicas del Mirobolán 29C recuerdan bastante a las de los Marianas. Según Grasselly (citado por Crossa-Raynaud y Audergon, 1987), se trataría de un Mariana procedente de semilla. Los patrones Mariana GF 8-1, Mariana 2624 y Mirobolán 29C muestran 7 bandas comunes, que no posee ningún otro patrón del grupo (AB9-06-1200, AB9-20-390, AB9-20-820, AB9-20-1320, AB10-06-550, AB7-14-1720, AB7-14-750). Además muestran la ausencia de una banda que poseen el resto de patrones (AB7-14-1350). Este resultado confirmaría la idea anteriormente expuesta y reafirmaría la incorporación de este patrón en el grupo de los Mariana.

Si se analiza el dendrograma (Figura 13), se observa que los patrones Miral 3278 AD (*P. cerasifera* x *P. amygdalus?*), Ishtara (*P. cerasifera* x *P. salicina*) x (*P. cerasifera* x *P. persica*) y Fereley-Jaspi (*P. japonica* x *P. spinosa*), son los patrones que aparecen con los niveles de agregación más bajos. Se trata de patrones muy diferentes al resto en cuanto a sus parentales y este resultado certifica esta particularidad. Si comparamos el dendrograma obtenido con los 41 patrones, 7 cebadores (Figura 1), con el obtenido para este grupo, 13 cebadores (Figura 13), se pueden observar como la posición de Miral 3278 AD es diferente. Usando 13 cebadores, el patrón aparece agrupado con los *P. cerasifera*, aunque sigue siendo el más diferente de ellos.

Otro grupo que aparece claramente diferenciado es el formado por los ciruelos Adara, Ademir, Mirobolán GF 3-1, Mirobolán 713 AD, Mirobolán B y Myrocal. Dentro de este grupo, cabe destacar el conjunto formado por el Mirobolán B y Myrocal, que se separan claramente del Mirobolán 713 AD, que es el patrón más próximo. El resto de patrones se agrupa de forma escalonada, primero Ademir y Mirobolán GF 3-1, que forman también un conjunto y después Adara que aparece en solitario

Cuadro 18. Matriz de similitud obtenida para el grupo de ciruelos de crecimiento rápido, utilizando 13 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).

	Adara	Ademir	Mirobolán 713 AD	Miral 3278 AD	Mirobolán B	Mirobolán 29C	Myrocal	Mirobolán GF 3-1	Ishtara	Fereley-Jaspi	Mariana GF 8-1	Mariana 2624
Adara	1.000											
Ademir	0.725	1.000										
Mirobolán 713 AD	0.795	0.774	1.000									
Miral 3278 AD	0.667	0.635	0.673	1.000								
Mirobolán B	0.744	0.813	0.841	0.707	1.000							
Mirobolán 29C	0.667	0.673	0.733	0.643	0.707	1.000						
Myrocal	0.791	0.729	0.817	0.654	0.857	0.673	1.000					
Mirobolán GF 3-1	0.680	0.781	0.765	0.637	0.800	0.673	0.762	1.000				
Ishtara	0.626	0.673	0.653	0.643	0.646	0.625	0.635	0.655	1.000			
Fereley-Jaspi	0.641	0.630	0.667	0.569	0.641	0.621	0.685	0.615	0.552	1.000		
Mariana GF 8-1	0.660	0.626	0.688	0.636	0.702	0.916	0.667	0.630	0.561	0.577	1.000	
Mariana 2624	0.660	0.667	0.727	0.636	0.742	0.891	0.725	0.685	0.600	0.614	0.933	1.000

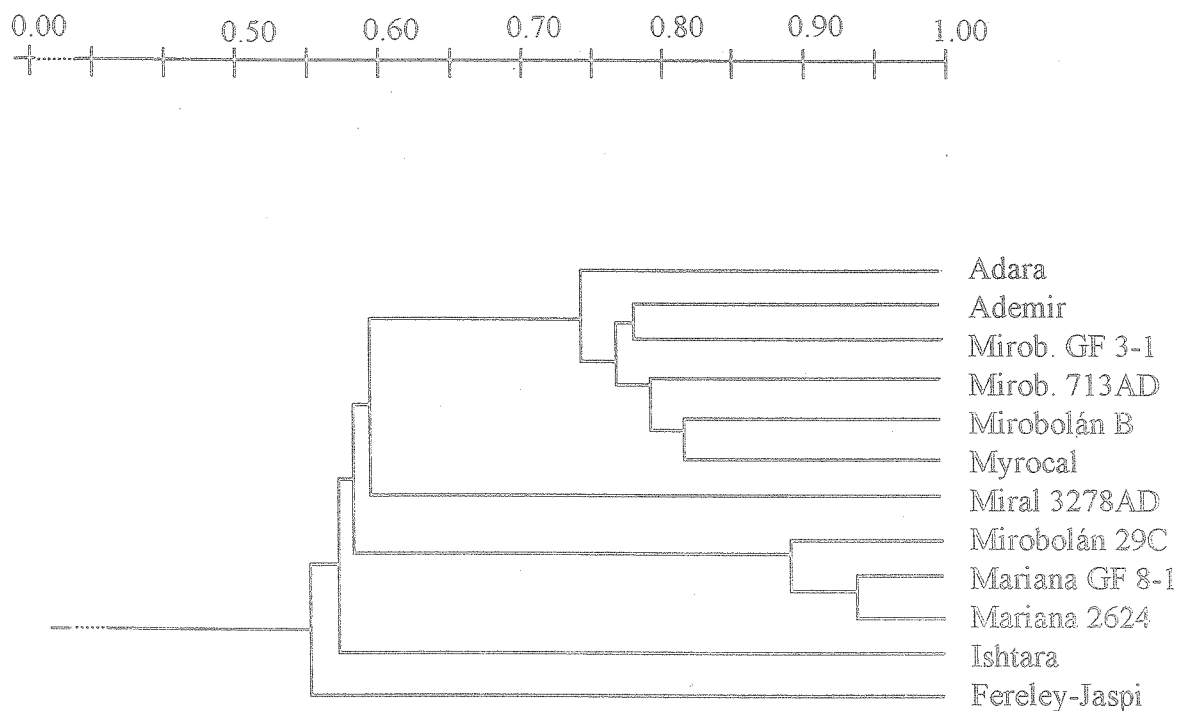


Figura 13. Dendrograma obtenido para el grupo de ciruelos de crecimiento rápido, utilizando 13 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).

4.4.3. Ciruelos de crecimiento lento.

4.4.3.1. Polimorfismo generado por los RAPDs.

Se utilizaron 14 cebadores para estudiar los 16 patrones incluidos en el grupo de ciruelos de crecimiento lento. Estos cebadores generaron 121 bandas, presentando una media aproximada de 9 bandas por cebador (Cuadro 19).

Cuadro 19. Cebadores utilizados en la caracterización, número de bandas y rango en el que aparecen.

<u>Cebador</u>	<u>Rango(bp)</u>	<u>Bandas</u>
OPF-08	460-2100	10
AB7-14	360-1800	11
AB9-06	660-1800	4
AB9-18	410-1500	9
AB10-03	420-2200	12
AB10-06	180-1480	11
AB10-10	480-1950	8
OPF-20	400-1450	6
AB7-11	260-2000	16
AB9-01	430-1400	7
AB10-01	450-1450	4
AB10-02	280-2400	11
AB10-05	410-1140	5
AB10-11	480-1650	7

TOTAL 121

De las 121 bandas, 106 fueron polimórficas, lo cual representa un 87% del total, y el resto (15 bandas) fueron monomórficas (Anexo 7). El patrón que mostró mayor número de bandas fue el PM 150 AD (59 bandas) y el que menos el Ishtara (45bandas). La media de bandas mostradas por cada patrón fue de 52 bandas. En las figuras 14 y 15 se muestran

amplificaciones obtenidas para el grupo de ciruelos de crecimiento lento a partir de los cebadores AB7-11 y AB10-02 respectivamente. En la figura 14 (cebador AB7-11) el patrón Ishtara (número 42) muestra una serie de marcadores que permiten diferenciarlo del resto del grupo (AB7-11-540, AB7-11-580 y AB7-11-1250). Los patrones Damas GF 1869 (41) y San Julián A (35) también muestran marcadores que permiten diferenciarlos del resto del grupo (AB7-11-550 y AB7-11-920 respectivamente). En las dos figuras existen 3 patrones que muestran el mismo "patrón de bandas". Se trata de los patrones Adesoto 101 (27), Puebla de Soto 67 (31) y Alguazas (32). Estos patrones fueron prospectados en la región de Murcia y presentan las características típicas de los Pollizos. Poseen 55, 56 y 57 marcadores respectivamente y comparten 54 de ellos, lo que da una idea de la gran relación existente entre ellos. La combinación de cuatro cebadores permite separar todos los patrones de este grupo (Cuadro 20).

Cuadro 20. Combinación de bandas de 4 cebadores que permiten diferenciar todos los patrones incluidos en el grupo de los ciruelos de crecimiento lento.

	AB7-11-450	AB7-11-540	AB7-11-680	AB7-11-1500	AB7-11-1650	AB10-11-480	AB10-11-560	AB10-11-1200	AB10-11-1650	AB10-10-720	AB10-10-790	AB10-10-1650	OPF20-400	OPF20-460	OPF20-950	OPF20-1080
Adesoto 101	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
PM 105 AD	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
PM 137 AD	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1
PM 150 AD	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
Puebla de Soto 67	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1
Alguazas	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
Montizo	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Mompel	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
San Julián A	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1
GF 655/2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
Constantí I	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1
Erompton	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Terincl	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
Tetra	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
Damas GF 1869	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Ishtara	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Figura 14. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador AB7-11 en los 16 ciruelos de crecimiento lento.

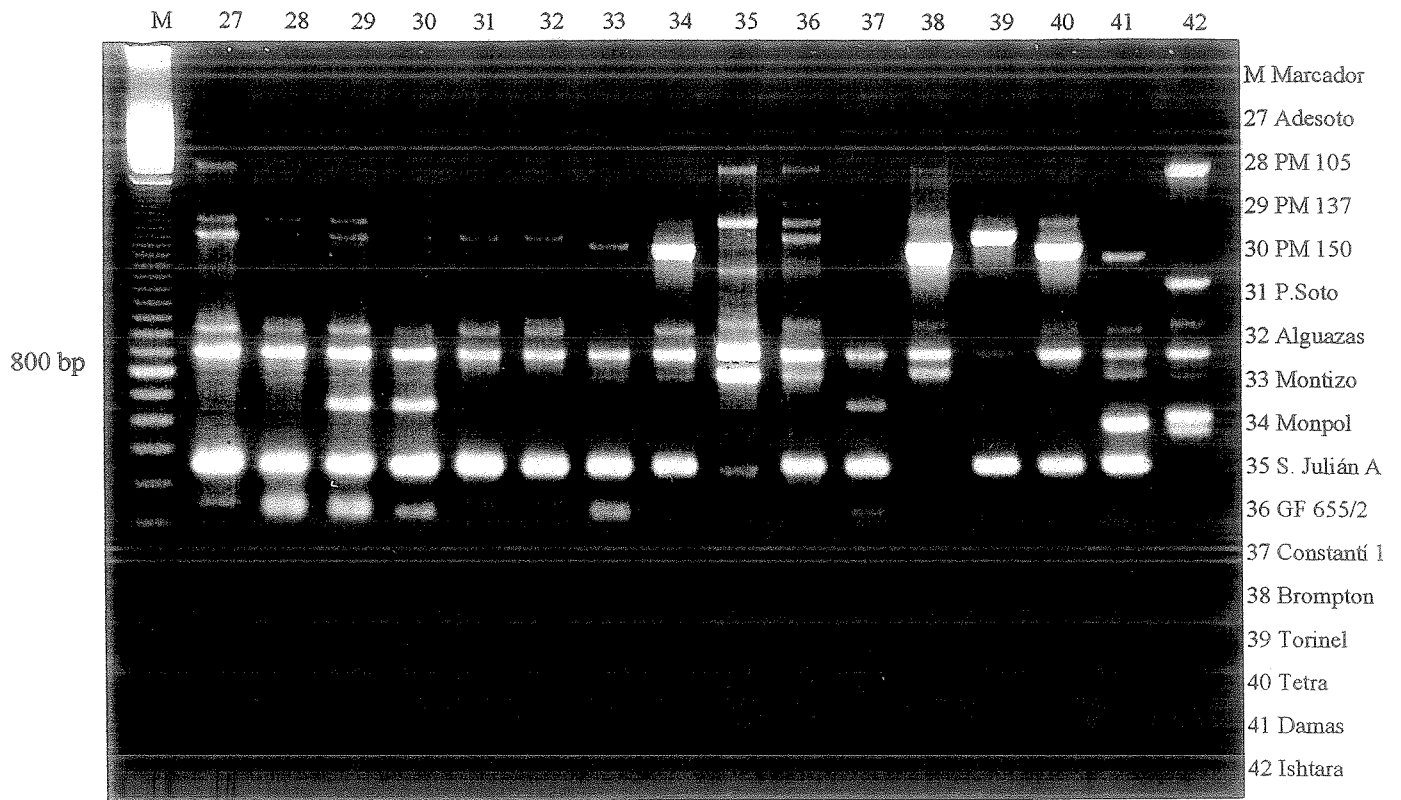
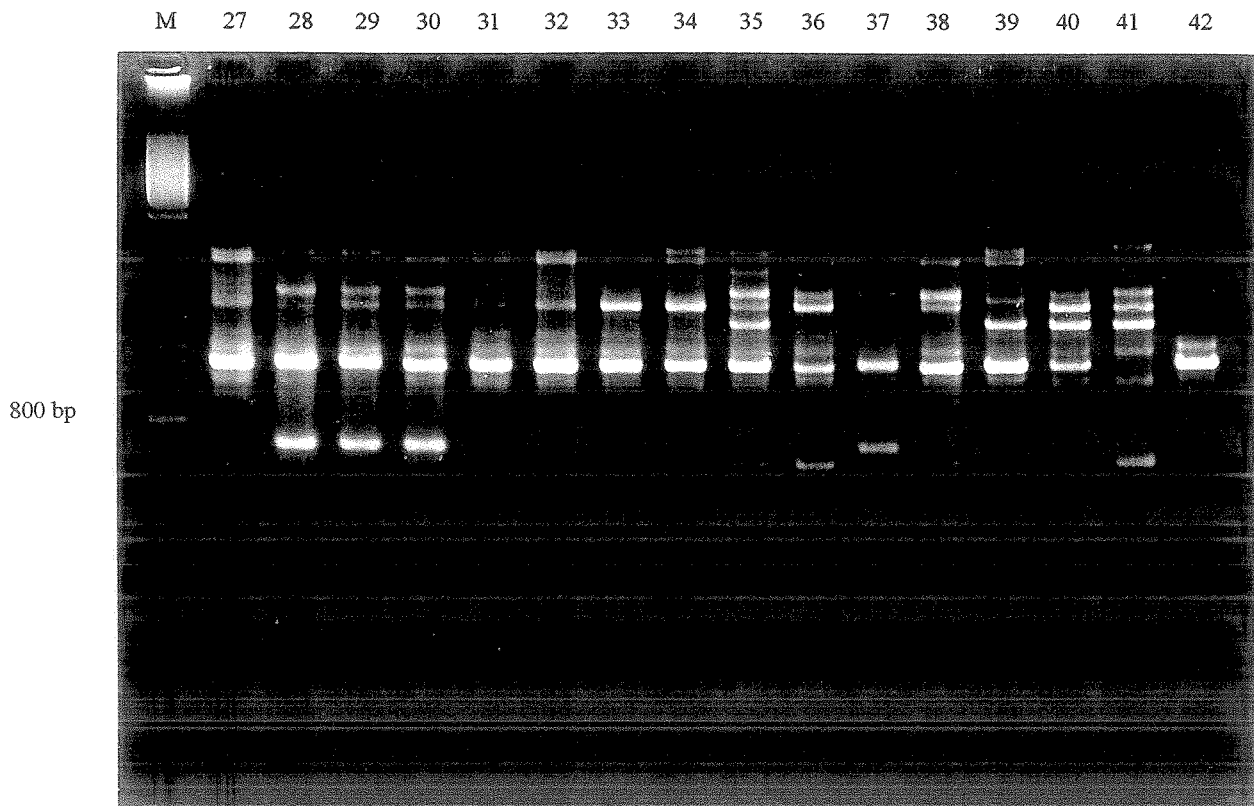


Figura 15. Amplificaciones RAPD obtenidas con el cebador AB10-02 en los 16 ciruelos de crecimiento lento.



4.4.3.2. Relaciones genéticas generadas por los RAPDs.

Si analizamos el dendrograma (Figura 16) podemos ver como en este análisis los patrones incluidos en las especies *P. insititia* y *P. domestica* no aparecen formando grupos diferentes. Esto podría deberse a que ambas especies evolucionaron en la misma zona geográfica (Ramming y Cociu, 1990). Además, estas especies pueden cruzarse entre sí con bastante facilidad (Crane y Lawrence, 1952). La hibridación espontánea entre *P. domestica* y *P. insititia* puede haberse visto favorecida por los fenómenos de incompatibilidad entre polen y estilo (autoincompatibilidad) presentes en los antiguos cultivares de ciruelo (Bernhard et al., 1951). Su proximidad genética podría explicarse por la recombinación intensiva entre genotipos, ya sea en la naturaleza o en programas de mejora.

Ortiz et al. (1997) estudiaron 31 ciruelos mediante la utilización de la técnica RAPD, la mayor parte de ellos *P. domestica*, y también tuvieron dificultades a la hora de agrupar los ciruelos en grupos bien definidos. No obstante, fueron capaces de diferenciar todos los genotipos usando sólo 3 cebadores. Uno de los cebadores es común a este análisis, el AB7-14.

El dendrograma obtenido con un número mayor de marcadores para los ciruelos de crecimiento lento, es algo diferente al inicial de los 41 patrones (Figuras 6 y 16).

Del estudio del dendrograma representado para el grupo de ciruelos de crecimiento lento se observa que hay dos grupos perfectamente definidos. Un grupo formado por los patrones Adesoto 101, Alguazas, Puebla de Soto 67, Monpol, Montizo, Brompton, PM 105 AD, PM 137 AD, PM 150 AD, Constantí 1, Tetra, San Julián y San Julián GF 655/2, se separa claramente de Torinel y Damas GF 1869 que forman otro grupo.

Dentro del primer grupo, Adesoto 101, Alguazas y Puebla de Soto 67 son los patrones más parecidos, alcanzando niveles de similitud muy altos (Cuadro 21). Estos patrones fueron prospectados en la región de Murcia, y su proximidad en el dendrograma no es sorprendente. A este conjunto de patrones se les une el Monpol, obtención del SIA-DGA que proviene de poblaciones de Pollizos de Murcia polinizados libremente. Los patrones Montizo y Brompton aparecen formando un conjunto con un nivel de similitud de 0,775 y se unen al resto del grupo con un nivel de similitud aproximado de 0,72.

También deben destacarse los núcleos formados por los patrones PM 105 AD y PM 137 AD, así como el núcleo formado por PM 150 AD y Constantí 1, que se alejan

discretamente del patrón Tetra. San Julián A y San Julián GF 655/2 se unen a estos patrones con un nivel de similitud de 0,74 aproximadamente.

Torinel y Damas GF 1869, obtenciones francesas, forman el otro grupo con un nivel de similitud de 0,681.

Cuadro 21. Matriz de similitud obtenida para el grupo de ciruelos de crecimiento lento, utilizando 14 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).

	Adesoto	PM 105AD	PM 137AD	PM 150AD	Puebla de Soto	Alguazas	Montizo	Monpol	San Julián A	GF 65S/2	Constantí 1	Brompton	Torinel	Tetra (6)	Damas	Ishlara
Adesoto 101	1.000															
PM 105AD	0.696	1.000														
PM 137AD	0.791	0.787	1.000													
PM 150AD	0.788	0.784	0.792	1.000												
Puebla de Soto 67	0.968	0.710	0.804	0.780	1.000											
Alguazas	0.979	0.702	0.796	0.792	0.969	1.000										
Montizo	0.736	0.729	0.714	0.717	0.727	0.719	1.000									
Monpol	0.755	0.708	0.674	0.699	0.747	0.780	0.659	1.000								
San Julián A	0.695	0.688	0.696	0.740	0.708	0.722	0.705	0.687	1.000							
GF 65S/2	0.652	0.644	0.719	0.701	0.667	0.681	0.612	0.625	0.753	1.000						
Constantí 1	0.653	0.796	0.761	0.780	0.646	0.660	0.682	0.586	0.688	0.667	1.000					
Brompton	0.736	0.706	0.667	0.674	0.705	0.719	0.775	0.725	0.705	0.635	0.636	1.000				
Torinel	0.646	0.723	0.688	0.693	0.660	0.653	0.652	0.700	0.639	0.596	0.639	0.607	1.000			
Tetra (6)	0.626	0.763	0.708	0.731	0.640	0.653	0.630	0.718	0.740	0.701	0.760	0.674	0.614	1.000		
Damas GF 1869	0.543	0.756	0.629	0.639	0.581	0.553	0.635	0.542	0.667	0.622	0.667	0.682	0.681	0.680	1.000	
Ishlara	0.442	0.405	0.458	0.440	0.437	0.455	0.405	0.444	0.529	0.571	0.483	0.456	0.409	0.462	0.405	1.000

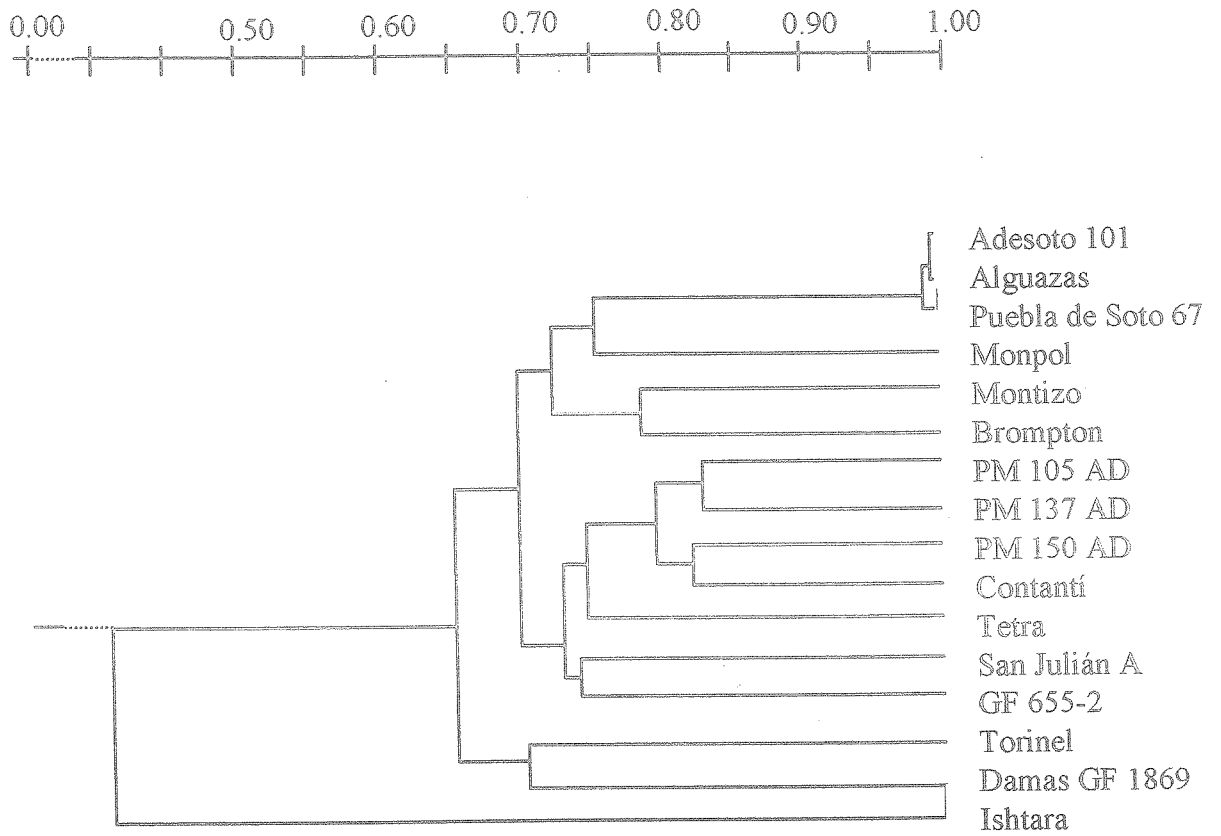


Figura 16. Dendrograma obtenido para el grupo de ciruelos de crecimiento lento, utilizando 13 cebadores y el coeficiente de Nei y Li (1979).

Finalmente, se podría cuestionar si la cantidad de cebadores o de marcadores RAPD utilizados, es o no suficiente para representar la diversidad genética existente en cada grupo de patrones. Algunos investigadores como Guirao et al (1995) recomiendan 200 bandas para obtener una estimación adecuada de la similitud genética entre variedades. Sin embargo, son muchos los autores que utilizan un menor número de bandas en sus trabajos. Landry et al. (1994) utilizaron 101 marcadores RAPD para caracterizar 25 patrones de manzano y estimar su similitud genética. Stiles et al. (1993) utilizaron 11 cebadores (102 bandas), para caracterizar y relacionar genéticamente 11 cultivares de papaya. Fabbri et al. (1995), caracterizaron y estimaron la similitud genética de 17 variedades de olivo, utilizando 17 cebadores y 47 bandas polimórficas. Bartolozzi et al. (1998) diferenciaron y relacionaron genéticamente 17 variedades de almendro y un patrón, el Nemared. En dicho trabajo se emplearon 21 cebadores y 37 bandas polimórficas. Lu et al. (1996) identificaron y relacionaron genéticamente 18 patrones de melocotonero, entre ellos, Nemaguard y Nemared, patrones que también han sido incluidos en nuestro trabajo. Lu et al. (1996) utilizaron 20 cebadores que proporcionaron 40 marcadores RAPD. Ortiz et al. (1997), caracterizaron y buscaron relaciones de similaridad entre 31 variedades de ciruelo, utilizando 96 bandas polimórficas. Wanburton et al. (1996) investigaron la diversidad genética entre 136 variedades de melocotón de diferentes regiones de Estados Unidos, utilizando 94 marcadores RAPD.

En el presente trabajo se han utilizado un número de cebadores y de marcadores moleculares similares a los utilizados en otros estudios. No obstante, para verificar los resultados se ha realizado una comparación de las matrices de similitud obtenidas con 7 o más cebadores. Utilizando el test estadístico de Mantel (1967), se obtienen unos valores de 0,866, 0,922 y 0,836 para los tres grupos respectivamente. Estos valores denotan un buen ajuste entre pares de matrices (Rolhf, 1995) e indican que no existen grandes diferencias entre los resultados obtenidos con 7 cebadores y los obtenidos con más cebadores. No obstante, para clasificar el germoplasma de los híbridos almendro x melocotonero y ciruelos de crecimiento lento parece aconsejable recomendar un mayor número de cebadores. Cuando se realizó el análisis utilizando 7 cebadores, el coeficiente de correlación cofenético para estos dos grupos era bastante bajo, 0,785 y 0,771 respectivamente. Estos valores ascienden hasta 0,872 en el caso de los híbridos almendro x melocotonero, utilizando 12 cebadores, y hasta un valor de 0,820 en los ciruelos de crecimiento lento, empleando 13 cebadores. Al elevar la cantidad de

marcadores moleculares, se obtiene una matriz de similitud y dendrograma ligeramente diferentes. El coeficiente de correlación cofenético que se obtiene es más alto y el ajuste entre matrices pasa de ser un mal ajuste a convertirse en un buen ajuste (Rolhf, 1995).

El incremento en el coeficiente de correlación cofenético que sufrían los ciruelos de crecimiento rápido no era tan espectacular. Con 7 cebadores se obtenía un coeficiente de correlación cofenético de 0,916 (muy buen ajuste) y este valor ascendía hasta 0,936 con 14 cebadores.

Si comparamos nuestros coeficientes de correlación cofenéticos, con los obtenidos en otros trabajos de caracterización mediante RAPDs, podemos ver como hemos conseguido buenos resultados. Nicese et al. (1998), llegan a un valor de 0,65 caracterizando variedades de nogal. Fabbri et al. (1995), caracterizando variedades de olivo, obtienen un coeficiente cofenético de 0.79. Wanburton et al. (1996), en su trabajo de caracterización de variedades de melocotonero y Ortiz et al. (1997), caracterizando ciruelos, obtienen valores similares a los nuestros, 0,894 y 0,93 respectivamente.

Con el presente trabajo se han conseguido diferenciar, por medio de 4 cebadores, los patrones que forman cada uno de los grupos. Esta característica certifica el alto grado de discriminación alcanzado. Resultados parecidos han sido obtenidos por otros autores. Landry et al. (1994), lograron separar 25 patrones de manzano a partir de la combinación de 5 cebadores y Lu et al. (1996) caracterizaron 18 patrones de melocotonero con la utilización de 6 cebadores.

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, se han podido sacar las siguientes conclusiones:

1. La técnica RAPD puede ser una herramienta muy útil para identificar patrones frutales. La combinación de varios marcadores que caractericen al patrón, pueden resultar de gran ayuda para solucionar de una forma más rápida y precisa los problemas de identificación.
2. Los marcadores RAPD son útiles para conocer las relaciones genéticas existentes entre patrones.
3. A través del análisis entre grupos y utilizando 7 cebadores, se diferencian 40 de los 41 patrones. Al realizar el análisis de cada grupo por separado, se consiguen diferenciar por medio de cuatro cebadores todos los patrones. Con ello se pone de manifiesto el alto grado de discriminación alcanzado con este análisis.
4. Del análisis entre grupos se obtiene un dendrograma que concuerda con la clasificación obtenida a partir de las características morfológicas de los patrones.
5. Los patrones pertenecientes al subgénero *Amygdalus* se separan claramente de los patrones englobados en el subgénero *Prunophora* y pueden ser diferenciados de estos por medio de una serie de marcadores que sólo poseen los híbridos almendro x melocotonero.
6. El análisis mediante RAPDs podría confirmar la presencia de *P. persica* en la ascendencia de Ishtara (*P. cerasifera* x *P. salicina*) x (*P. cerasifera* x *P. persica*). Este patrón muestra una banda que no aparece en ninguno de los ciruelos y que sí lo hace en los patrones híbridos almendro x melocotonero (excepto Adarcias). Además, en el análisis de coordenadas principales aparece formando parte del grupo de ciruelos de crecimiento rápido pero con una dirección hacia el grupo de patrones híbridos almendro x melocotonero.

7. La hipótesis que define Miral como un híbrido *P. cerasifera* x *P. amygdalus* podría verse respaldada con este análisis molecular, ya que este patrón posee bandas que están presentes en algunos híbridos almendro x melocotonero y que no aparecen en ningún ciruelo de crecimiento rápido.
8. El análisis mediante RAPDs permite diferenciar, dentro del grupo de los híbridos almendro x melocotonero, a aquellos que tienen la especie *P. davidiana* como uno de sus parentales.
9. Adarcias posee unas características morfológicas particulares, que lo diferencian del resto del grupo *P. amygdalo-persica*. El análisis molecular confirma estas diferencias, apareciendo aislado en el dendrograma.
10. El patrón Mirobolán 29C, que aparece en la bibliografía como un *P. cerasifera*, se encuentra agrupado en los dos análisis con los patrones Mariana (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*). Con ellos comparte 7 bandas que no poseen ninguno de los patrones restantes englobados en el grupo de los *P. cerasifera*. Además, se observa la ausencia de una banda que muestran todos los patrones *P. cerasifera* a excepción de los Mariana. Estos resultados apoyarían la hipótesis que considera al patrón Mirobolán 29C como un Mariana.
11. Los patrones Miral 3278 AD, Ishtara y Fereley-Jaspi alcanzan niveles de similitud bastante bajos con el resto de ciruelos de crecimiento rápido. Se trata de patrones muy diferentes al resto en cuanto a sus parentales, por lo que este resultado confirmaría esta peculiaridad.
12. Dentro de los patrones de crecimiento lento Adesoto 101, Alguazas y Puebla de Soto 67 son los patrones que comparten más bandas. Se trata de patrones que fueron prospectados en la región de Murcia y su proximidad genética queda de manifiesto en este análisis, alcanzando niveles de similitud muy altos.

Referencias

- Abo-elwafa A, Murai K, Shimada T (1995) Intra and Inter-specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theor Appl Genet* 90: 335-340.
- Aldrich J, Cullis CA (1993) RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using KlenTaq 1 DNA polymerase, Chelex 100, and gel purification of genomic DNA. *Plant Mol Biol* 11: 128-141.
- Anonymous (1992) Porte-greffe Avifel-Torinel. *L'Arboric Fruit* 450: fiche variétale.
- Arulsekhar S, Parfitt DE (1986) Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. *HortScience* 21(4): 928-933.
- Arús P, Messeguer R, Viruel M, Tobutt K, Dirlewanger E, Santi F, Quarta R, Ritter E (1994) The European *Prunus* mapping project. Progress in the almond linkage map. *Euphytica* 77: 97-100.
- 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. *J Am Soc Hort Sci* 123: 381-387.
- Bachman O (1994) Peroxidase isoenzyme patterns in Vitaceae. *Vitis* 33: 151-161.
- Badenes ML, Parfitt DE (1995) Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation. *Theor Appl Genet* 90: 1035-1041.
- Bernhard R, Grasselly C (1959) Les pruniers porte-greffes du pêcher. *Jour Fruit et Maraich d'Avignon*, pp 75-100.
- Bernhard R, Grasselly C (1981) Les pêchers x amandiers. *L'Arboric Fruit* 328: 37-42.
- Bernhard R, Renaud R (1990) Le point sur les porte-greffe du prunier. *L'Arboric Fruit* 432: 28-36.
- Bernhard R, Delmas HG, Sanfourche G (1951) Recherches sur la pollinisation de quelques variétés de pruniers. *Ann Amélior Plantes* 2: 179-209.
- Bolstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet* 32: 314-330.
- Büscher N, Zyprian E, Blaich R (1993) Identification of grapevine cultivars by DNA analyses: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10mer primers. *Vitis* 32: 187-188.
- Cambra R (1970) Selección de Pollizos de Murcia y otros ciruelos locales españoles. *ITEA* 1: 115-126.

- Cambra R (1990) Adafuel, an almond x peach hybrid rootstock. *HortScience* 25: 584.
- Cambra R, Gella R, Moreno MA (1989) Comportamiento de ciruelo 'Constanti' como patrón de melocotonero. *ITEA* 83: 33-41.
- Caetano-Anollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1991) DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnol* 9: 553-557.
- Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1994) DNA amplification fingerprinting of plant genomes. *Method Cell Biol* 5: 62-70.
- Cenis JL (1993) Identification of four major *Meloidogyne* ssp. By random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology* 83: 76-78.
- Chaparro JX, Werner DJ, O'Malley D, Sederoff RR (1994) Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme and RAPD markers in peach. *Theor Appl Genet* 87: 805-815.
- Cheng FS, Brown SK, Weeden NF (1997) A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. *HortScience* 32: 921-922.
- Colleta Filho HD, Machado MA, Targon MLPN, Moreira MCPQDG, Pompeu Jr (1998) Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. *Euphytica* 102: 133-139.
- Collins GG, Symons RH (1993) Polymorphism in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant Mol Biol* 11 (2): 105-112.
- Connolly AG, Godwin ID, Coopeer M, DeLacy IH (1994) Interpretation of randomly amplified polymorphic DNA marker data for fingerprinting sweet potato (*Ipomoea Batatas* L.) genotypes. *Theor Appl Genet* 88: 332-336.
- Crane MB, Lawrence WJC (1952) *The Genetics of Garden Plants*. McMillan and Co London, 301 p.
- Crisci JV, Lopez MF (1983) *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Washington DC; OEA Secretaría General; p 133.
- Crossa-Raynaud P, Audergon JM (1987) Apricot rootstocks. En: Rom RC y Carlson RF (eds) *Rootstocks for Fruit Crops*, pp 295-320. John Wiley and Sons, NY.
- Cumins JN, Aldwinckle HS (1983) Rootstock breeding. "Methods in Fruit Breeding", Moore JN and Janick J (eds) *Purdue Univ Press*, pp 294-327.
- De Salvador FR, Liverani A, Fideghelli C (1991) La scelta dei portinnesti delle piante arboree da frutto: Pesco. *L'Informatore Agrario*, supplemento, 36: 43-50.

- Devos KM, Gale MD (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in Wheat. *Theor Appl Genet* 84: 567-572.
- Dirlewanger E, Bodo C (1994) Molecular genetic mapping of peach. *Euphytica* 77: 101-103.
- Dirlewanger E, Pascal T, Zuger C, Kervella J (1996) Analysis of molecular markers associated with powdery mildew resistance genes in peach (*Prunus persica* (L) Batsch) x *Prunus davidiana* hybrids. *Theor Appl Genet* 93: 909-919.
- Doyle JJ (1993) DNA, phylogeny, and the flowering of plant systematics. *BioScience* 43 (6):380-389.
- Duneman F (1994) Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD "fingerprinting" of cultivars and wild species. En : Schmidt H, Kellerhals M (eds), *Progress in temperate fruit breeding*, pp 309-311. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Durman RE, Korban SS (1994) Evidence of gene introgression in apple using RAPD markers. *Euphytica* 79 (1-2): 109-114.
- Edin M and Garcin A (1994) Un nouveau porte-greffe du pêcher Cadaman® Avimag L'Arboric Fruit 475: 20-23.
- Fabbri A, Hormaza JJ, Polito VS (1995) Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J Am Soc Hort Sci* 120: 538-542.
- Felipe AJ (1989) *Patrones para frutales de pepita y hueso*. Ediciones Técnicas Europeas SA, Barcelona, 181 p.
- Fidghelli C (1988) Programmi, obiettivi e traguardi del miglioramento genetico. *Frutticoltura* 50(1/2): 59-66.
- Fjellstrom RG, Parfitt DE, Mcgranaham G (1994) Genetic relationships and characterization of Persian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *J Am Soc Hort Sci* 119 (4): 833-839.
- Fjellstrom RG Parfitt DE (1994) RFLP inheritance and linkage in walnut. *Theor Appl Genet* 89 (&): 665-670.
- Gale MD (1994) Genetics, markers, maps and wheat breeding. *J R Agric Soc Engl* 155, 162-176.
- Gardiner SE, Zhu JM, Whitehead HCM, Madie C (1994) The New Zealand apple genome mapping project. *Euphytica* 77: 77-81.
- Gogorcena Y, Arulsekar S, Dandekar AM, Parfitt DE (1993) Molecular markers for grape characterization. *Vitis* 32: 183-185.

- Gogorcena Y, Parfitt DE (1994) Evaluation of RAPD marker consistency for detection of polymorphism in apricot. *Sci Hortic-Amsterdam* 59: 163-167.
- Graham J, McNicol RJ (1995) An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theor Appl Genet* 90: 1128-1132.
- Grando MS, De Micheli L, Biasetto L, Scienza A (1995) RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera*. *Vitis* 24 (1): 37-39.
- Guirao P, Moya A, Cenis JL (1995) Optimal use of Random Amplified Polymorphic DNA in estimating the genetic relationship of four major species of *Meloidogyne* spp. *Phytopatology* 85 (5):547-551.
- Harada T, Matsukawa K, Sato T, Ishikawa R, Niizaki M, Saito K (1993) DNA-RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphytica* 65: 87-91.
- Hashmi G., Huettel R, Meyer R, Krusberg L, Hammerschlag F (1997) RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Rep* 16: 624-627.
- Hemmat M, Weeden NF, Manganaris G, Lawson DM (1994) Molecular marker linkage map for apple. *J Hered* 85: 4-11.
- Hormaza JJ, Dollo L, Polito VS (1994) Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor Appl Genet* 89 (1): 9-13.
- Howland DE, Oliver RP, Davy AJ (1995) Morphological and molecular variation in natural populations of *Betula*. *New Phytol* 130: 117-124.
- Ishikawa S, Kato S, Imakawa S, Mikami T, Shimamoto Y (1992) Organelle DNA polymorphism in apple cultivars and rootstocks. *Theor Appl Genet* 83: 963-967.
- Jean-Jacques I, Defontaine A, Hallet JN, (1993) Characterization of *vitis vinifera* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis* 32 : 189-190.
- Koller B, Lehmann A, McDermott JM, Gessler C (1993) Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 85: 901-904.
- Kaneko T, Terachi T, Tsunewaki K (1986) Studies on the origin of crop species by restriction endonuclease analysis of organellar DNA.II. Restriction analysis of ctDNA of 11 *Prunus* species. *Jpn J Genet* 61: 157-168.
- Karihaloo JL, Brauner S, Gottlieb LD (1995) Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). *Theor Appl Genet* 90: 767-770.

- Lamboy WF (1994) Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: correcting for the effects of PCR artifacts caused by variation in experimental conditions. *PCR Methods Applic* 4: 38-43.
- Lamboy WF (1994) Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. *PCR Methods Applic* 4: 31-37.
- Landry BS, Li RQ, Cheung WY, Granger RL (1994) Phylogeny analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and tactical gene tagging. *Theor Appl Genet* 89: 847-852.
- Layne REC (1987) Peach rootstocks. En: Rom RC y Carlson RF (eds) *Rootstocks for Fruit Crops*, pp 185-216. John Wiley y Sons, NY.
- Lee M (1995) DNA markers and plant breeding programs. *Adv Agron* 55, 265-344.
- Link, W.; C. Dixkens; M. Singh; M. Singh; M. Schwall, A.E. Melchinger (1995). Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germoplasm revealed by RAPD markers. *Theor Appl Genet* 90: 27-32.
- Loreti F (1976) Aspetti e problemi nella scelta dei portinnesti dei fruttiferi. *Atti Incontro SOI "I portinnesti delle piante da frutto"*, Ferrara 15-16 dicembre, pp.45-50.
- Loreti F (1988) Presente e futuro dei portinnesti degli alberi da frutto. *Frutticoltura* 50 (1/2): 77-86.
- Lowe AJ, Hanotte O, Guarino L (1996) Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germoplas collections: The case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genet Res* 107: 50-54.
- Lu Z-X, Reighard GL, Baird WV, Abbott AG, Rajapakse S, (1996) Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. *HortScience* 31: 127-129.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220.
- Menier JR, Grimont PAD (1993) Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol* 144: 373-379.
- McClelland M, Welsh J (1994) DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *PCR Method Applic* 4: 59-65.
- Micheli MR, Bova R, Pascale E, D'Ambrosio E (1994) Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic Dna (rapd) method. *Nucl Acid Res* 22(10): 1921-1922.

- Moreno MA (1990) Selección del Pollizo de Murcia (*Prunus domestica/insititia*) como patrón de melocotonero (*P. persica* L. Batsch.). Tesis doctoral (PhD), Universitat Politècnica de Catalunya.
- Moreno MA, Cambra R (1994) Adarcias, an almond x peach hybrid rootstock. *HortScience* 29(8): 925.
- Moreno MA, Tabuenca MC, Cambra R (1995a) Adesoto 101, a plum rootstock for peaches and other stone fruit. *HortScience* 30: 1314-1315.
- Moreno MA, Tabuenca MC, Cambra R (1995b) Adara, a plum rootstock for cherries and other stone fruit species. *HortScience* 30: 1316-1317.
- Moreno MA, Tabuenca MC, Cambra R (1995c) Ademir, a myrobalan rootstock for plums. *HortScience* 30: 1475-1476.
- Moreno S, Gogorcena Y, Ortiz JM (1995) The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera*). *Sci Hortic-Amsterdam* 62:237-243.
- Mulcahy DL, Crestim, Sansavini S, Douglas GC, Linskens HF, Mulcahy GB, Vignani R, Pancaldi M (1993) The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. *Sci Hortic-Amsterdam* 54: 89-96.
- Nei M, Li WH, (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5269-5273.
- Nybom H (1994) DNA fingerprinting - A useful tool in fruit breeding. *Euphytica* 77: 59-64.
- Okie WR (1987) Plum rootstocks. En: Rom RC y Carlson RF (eds) *Rootstocks for Fruit Crops*, pp 321-360. John Wiley y Sons, NY.
- Ortiz A, Renaud R, Calzada I, Ritter E (1997) Analysis of plum cultivars with RAPD markers. *J Hortic Sci* 72: 1-9.
- Pérez de la Vega (1997) El uso de marcadores moleculares en genética vegetal y mejora. *Invest. Agr.: Prod Prot Veg* Vol 12 (1,2 y 3),1997.
- Rafalski JA, Tingey SV (1993) Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet* 9 (8): 275-280.
- Rajapakse S, Belthoff LE, He G, Estager AE, Scorza R, Verde I, Ballard RE, Baird WV, Callahan A, Monet R, Abbot AG (1995) Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and isozyme markers for almond. *Theor Appl Genet* 91: 964-971.
- Ramming DW, Tanner O (1983) 'Nemared' peach rootstock. *HortScience* 18: 376.

- Ramming DW, Cociu V (1990) Plums (*Prunus*). En: Moore JN y Ballington JR (eds) Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops, International Society for Horticultural Science, Wageningen, pp. 235-287.
- Renaud R, Bernhard R, Grasselly C, Dosba F (1988) Diploid plum x peach hybrid rootstocks for stone fruit trees. HortScience 23: 115-116.
- Rohlf FJ (1995) NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80. Exeter Software Setauket, NY.
- Romesburg HCH (1984) Cluster analysis for researchers. Wadsworth Inc California.
- Salesses G (1977) Recherches sur l'origine de deux pruniers porte-greffe hybrides interspécifiques naturels: Un exemple d'étude cytologique développée pour la création de porte-greffe nouveaux chez les pruniers. Ann Amélior Plantes 27: 235-243.
- Sarkar G, Sommer SS (1990) Shedding light on PCR contamination. Nature vol 343: 27.
- Schnell RJ, Ronning CM, Knight RJ (1995) Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. Theor Appl Genet 90: 269-274.
- Singist C, Ozias-Akins P (1993) Genetic variation in monoploids of diploids potatoes and detection of clone-specific random amplified polymorphic DNA markers. Plant Cell Reports 12: 144-148.
- Skroch PW, Nienhuis J (1995) Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. Theor Appl Genet 91: 1086-1091
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. Freeman WH and Co, San Francisco, 573 p.
- Tancred SJ, Zeppa AG, Graham G (1994) The use of the PCT-RAPD technique in improving the plant variety rights description of a new Queensland apple (*Malus domestica*) cultivar. Aust J Exp Agr 34(5): 665-667.
- This P, Cuisset C, Boursiquot JM (1997) Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. Am J Enol Vitic 48: 492-501.
- Tanksley SD, Orton TJ (1983) Isozymes in plant genetics and breeding. Elsevier, New York.
- Tommerup IC, Barton JE, O'Brien PA (1995) Reliability of RAPD fingerprinting of three basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* and *Rhizoctonia*. Mycol Res 99: 173-180.

- Torres AM (1990) Isozyme analysis of tree fruits. En: Soltis DE (eds) Isozymes in plant biologie, pp.192-205. Chapman and Hall, London.
- Tschammer J, Zyprian E (1994) Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-Type and of closely related Burgundies. *Vitis* 33: 249-250.
- Union Internationale pour la Protection des Obtentions Vegetales (UPOV) (1977) Principes directeurs pour la conduite de l'examen des caracteres distinctifs de l'homogeneite et de la stabilite. *Prunier European* 14 pp.
- Virk PS, Ford-Lloyd BV, Jackson MT, Newbury HJ (1995) Use of RAPD for the study of diversity within plant germoplasm collections. *Heredity* 74: 170-179.
- Viruel MA, Messeguer R, de Vicente MC, Garcia Mas J, Puigdomenech P, Vargas F, Arús P, (1995) A linkage map with RFLP and isozyme markers for almond. *Theor Appl Genet* 91: 964-971.
- 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. *J Am Soc Hort Sci* 121: 1012-1019.
- Weeden NF, Hemmat M, Lawson DM, Lodhi M, Bell RL, Manganaris AG, Reisch BI, Brown SK, Ye GN (1994) Development and application of molecular marker linkage maps in woody fruit crops. *Euphytica* 77: 71-75.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res* 18: 7213-7218.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey S (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18: 6531-6535.
- Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey S (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Method Enzymol* 218: 704-740.
- Wolff K, Zietkiewicz E, Hofstra H (1995) Identification of Chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprinting patterns. *Theor Appl Genet* 91: 439 - 447.
- Xu H, Wilson DJ, Arulsekar S, Bakalinski AT (1995) Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks. *J Am Soc Hort Sci* 120: 714-720.
- Yang H, Krüger J (1994) Identification of a RAPD marker linked to the Vf gene for scab resistance in apples. *Plant Breeding* 112: 323-329.

Anexo 1. Características descriptivas del patrón Adara.

Características del árbol, brote y hoja.

Arbol :	
Vigor	Fuerte
Porte	Semierguido
Ramo de un año:	
Actitud	Semierguido
Grosor	Intermedio
Longitud del entrenudo	Corto-medio
Pubescencia	Ausente
Color	Marrón-rojizo
Lenticelas:	
Número	Pocas
Distribución	Dispersas
Tamaño	Pequeñas
Color	Marrón claro
Forma	Alargadas
Yema de madera:	
Tamaño	Muy pequeñas
Forma	Cónica
Forma del ápice	Agudo
Posición relativa al brote	Abrazada
Compacidad	Compacta
Color	Castaño oscuro
Soporte de la yema:	
Tamaño	Pequeño
Decurrencia	No decurrente
Brote en el periodo vegetativo:	
Pubescencia	Ausente
Coloración antociánica del extremo	Fuerte
Hoja:	
Actitud	Horizontal
Limbo:	
Relación longitud/anchura	Media
Forma	Ovoide ancha
Angulo del ápice	Recto o casi recto
Forma del ápice	Cuspidado
Base	Redondeada
Color del haz	Medio

Brillo del haz	Débil
Pubescencia del haz	Ausente o muy débil
Pubescencia del envés	Débil
División del margen	Dentado
Divisiones secundarias del margen	A veces
Pecíolo:	
Longitud	Media
Pubescencia del lado superior	Débil
Pubescencia del lado inferior	Muy débil
Profundidad del canal	Media
Número predominante de glándulas	Ninguna
Estípulas:	
Tamaño	Pequeña
<u>Características de la flor.</u>	
Flores:	
Número	Abundantes
Diámetro de la corola	Pequeño
Pedúnculo:	
Longitud	Media
Grosor	Fino
Pubescencia	Presente
Intensidad de la pubescencia	Muy débil
Cáliz:	
Sépalo:	
Posición	Contacto con el receptáculo
Forma	Oval ancha
Pubescencia de la cara interna	Débil
Pubescencia de la cara externa	Ausente
Flores con dobles sépalos	Ninguna o muy pocas
Receptáculo:	
Profundidad	Débil
Pubescencia de la superficie interna	Presente
Pubescencia de la superficie externa	Ausente
Pétalos:	
Flores con dobles pétalos	Ninguna o muy pocas
Posición	Ligeramente separados
Tamaño	Pequeño
Forma	Ovoide
Color	Blanco
Ondulación del margen	Débil

Angulo de la base	Grande
División del margen superior	Entero
Pubescencia de la cara interna	Ausente
Pubescencia de la cara externa	Ausente
Pubescencia del margen	Ausente
Pistilos:	
Frecuencia de pistilos suplementarios	Ninguno o muy pocos
Estigma:	
Posición comparada con las antenas	Mismo nivel
Estilo:	
Pubescencia en la base	Ausente
Ovario:	
Pubescencia	Ausente
Estambres:	
Posición	Periginea
Anteras:	
Color justo antes de la dehiscencia	Amarillo
<u>Características del fruto</u>	
Frutos:	
Tamaño	Pequeño
Forma general del perfil	Redondeada
Posición del diámetro máximo	Mitad del fruto
Simetría (vista frontal)	Simétrico
Profundidad de la sutura	Muy débil
Regularidad de la sutura	Ligeramente profunda en la base
Pruina	Presente
Depresión del punto pistilar	Indistinta
Base del pistilo	Persistente
Pubescencia del punto pistilar	Ausente
Pedúnculo:	
Pubescencia	Presente
Densidad de la pubescencia	Débil
Profundidad de la cavidad del pedúnculo	Débil
Piel:	
Grosor	Medio
Reticulación	Débil
Rugosidad	Ausente
Color de fondo	Amarillo

Carne:	
Color	Amarillo
Firmeza	Media
Textura	No fibrosa
Jugosidad	Media
Acidez	Débil
Contenido de azúcar	Medio
Hueso:	
Tamaño relativo al fruto	Medio
Forma general de perfil	Elíptica-redondeada
Forma en vista ventral	Subglobular
Forma en vista basal	Elíptica-redondeada
Simetría de perfil	Asimétrico
Simetría en vista ventral	Simétrico
Posición de la máxima anchura (vista ventral)	Hacia la mitad
Quilla (de perfil)	Ausente
Textura de las superficies laterales	Grano fino
Fusión de los márgenes de las aristas dorsales	Completa
Fusión de los márgenes de las aristas laterales	Completa
Prominencia de las aristas laterales ventrales	Fuerte
Anchura de la zona ventral	Intermedia
Anchura del final del pedúnculo	Intermedia
Angulo del final del pedúnculo	Recto o casi recto
Forma del final del pistilo	Ligeramente apuntada

Anexo 2. Características morfológicas y agronómicas de los patrones utilizados.

Híbridos almendro x melocotonero.

Las mayores ventajas que se obtienen con el uso de este patrón son:

- Elevada rusticidad en ambientes calizos, áridos, pedregosos y dotados de escasa fertilidad.
- Rápida entrada en producción y elevada productividad.
- Compatibilidad óptima del injerto con melocotonero y almendro.
- Buen comportamiento en vivero y aptitud de trasplante.
- Resistencia a la fatiga del terreno.
- Aparato radicular profundo y bien anclado.
- Aportan un gran vigor (vigor híbrido).

En este trabajo se han utilizado 14 patrones incluidos en el grupo de Híbridos almendro x melocotonero, aunque 4 de ellos son *P. persica x P. davidiana*.

Seguidamente se describen las características morfológicas más destacables de cada uno de ellos, así como su comportamiento agronómico.

Adafuel (Cambra,1990).

Es un híbrido almendro x melocotonero seleccionado en la Estación Experimental de Aula Dei, entre un conjunto de más de sesenta híbridos espontáneos procedentes de varias regiones españolas.

Es un patrón vigoroso. Tiene un porte erguido y sus ramos son de color oscuro en invierno. Las hojas son de color verde intenso, estrechas y algo curvadas longitudinalmente hacia arriba. Recuerdan a las hojas de la variedad de almendro Marcona. Su flor es de color rosa intenso, y su sistema radicular abundante. La propagación se realiza por estaquilla leñosa, semi-leñosa y herbácea. Parece ser más resistente a la clorosis que el GF-677. Es compatible con todas las variedades de almendro y melocotonero con las que ha sido injertado, así como con algunas de albaricoquero y ciruelo.

Adarcias (Moreno y Cambra, 1994).

Adarcias es un híbrido almendro x melocotonero seleccionado a partir de una población silvestre de híbridos almendro x melocotonero. Es un patrón menos vigoroso que el GF-677 y el Adafuel. Los ramos son verdes en primavera o verano, pero cambian a un rojo intenso en invierno. Las hojas son parecidas a las del melocotonero, largas y de color verde pálido, con los márgenes serrados. Sus flores son grandes y de color rosa claro. Su sistema radicular es también abundante. Es resistente a clorosis pero necesita un buen drenaje.

GF-677 (Bernhard y Grasselly, 1981).

Se trata de un híbrido almendro x melocotonero seleccionado en La Grande Ferrade (Burdeos, Francia), a partir de una población de híbridos naturales.

Es un patrón vigoroso. Las hojas son de aspecto y tamaño intermedio, entre las de almendro y melocotonero. Los ramos en invierno, siendo intermedios en aspecto, se acercan más al melocotonero por sus gruesos y pubescentes botones florales. La flor es de color rosa pálido. Propagación por estaquilla semi-leñosa y herbácea, o micropropagación *in vitro*.

La productividad es buena, aunque retrasa la maduración unos días. El GF-677 es resistente a clorosis pero no tolera la asfixia radicular. Es sensible a *Agrobacterium tumefaciens*, *Armillaria mellea* y a nemátodos, aunque se ha comportado bien en terrenos infestados con *Meloidogine incognita*. Presenta buena compatibilidad con las variedades de almendro y melocotonero, así como con algunas de albaricoquero y ciruelo.

GF-557 (Bernhard y Grasselly, 1981).

Es un híbrido entre melocotonero "Shallil" y almendro, seleccionado en La Grande Ferrade (Burdeos, Francia).

Es muy vigoroso, entre un 15 y un 25% más que el franco de melocotonero. El porte es erguido. Las hojas son de aspecto y tamaño intermedio, entre las de almendro y melocotonero. La flor es campanulacea de color rosa. El sistema radicular esta formado por raíces fuertes y numerosas. Su comportamiento es análogo al GF-677, aunque es más sensible a asfixia. Es sensible a *Agrobacterium* y al nemátodo *Pratylenchus vulnus*. Es compatible con las variedades de almendro y melocotonero, así como con algunas de albaricoquero y ciruelo.

Cadamam. (Edin y Garcin, 1994).

Es un híbrido interespecífico (*P. persica* x *P. davidiana*) obtenido por el GYDFV (Hungria) y seleccionado en Francia por el INRA.

Durante los primeros años puede ser más vigoroso que el GF 677, pero a partir del quinto año tiene un crecimiento del orden de un 5% inferior. Las hojas son muy puntiagudas. Sus frutos son esféricos, pequeños, de color amarillo pálido y carne blanca. La propagación se realiza por estacilla leñosa, semi-leñosa y herbácea, o micropropagación *in vitro*.

Resiste mejor la clorosis que el franco y parece tolerar mejor la humedad que los GF 677 y GF 557. Es sensible a *Agrobacterium tumefaciens* y resistente a *Meloidogine incognita* pero no a *M. javanica*. Es compatible con todas las variedades de melocotonero, almendro y nectarina. No es recomendable para albaricoquero.

Barrier (De Salvador et al., 1991).

Es un híbrido interespecífico *P. persica* x *P. davidiana* obtenido en Italia, por el Istituto di Propagazione delle Specie Legnose de Florencia.

Imprime un vigor ligeramente superior al GF-677. La propagación es buena por estacilla leñosa e *in vitro*. El sistema radicular es abundante y profundo. Barrier presenta una productividad elevada, superior al GF-677. No es sensible a clorosis y resiste la asfixia radicular. Es resistente a los nemátodos agalladores del genero *Meloidogyne*.

Nemaguard (Layne, 1987).

Seleccionado en Georgia (USA) a partir de plantas de semillas procedentes de Extremo Oriente. Se cree que es un híbrido interespecífico entre *P. davidiana* y *P. persica*.

El árbol productor de semillas es vigoroso y erecto, muy ramificado. La flor es de color rosa. El fruto es esférico, pequeño, verde amarillento de carne blanca y hueso adherente. Las semillas son esféricas y pequeñas (270-300 semillas/Kg). El sistema radicular es abundante.

Produce árboles de muy buen vigor, con rápida entrada en fructificación. La productividad es media. Nemaguard tolera los nemátodos *Meloidogine javanica*, *M. arenaria* e *incognita*, así como *Agrobacterium tumefaciens*, aunque es sensible a los nemátodos *Pratylenchus*. También es sensible a *Armillaria* y a *Verticillium*, así como a la clorosis férrica

en suelos calizos. Es un patrón compatible con almendro y melocotonero, así como con algunas variedades de albaricoquero y ciruelo.

Nemared (Ramming y Tanner, 1983).

Fue obtenido y seleccionado en la Estación USDA de Fresno, California. Procede de un plantel de la tercera generación del cruzamiento entre "Nemaguard" y un melocotonero de hoja roja descendiente de "Bond Brook".

Es un árbol vigoroso, erecto y con hoja roja. El color de la hoja lo hace muy apropiado en las operaciones de vivero (desyemado más fácil). La flor es de color rojo pálido y los huesos son alargados y puntiagudos, 225-250 semillas por kilo. El anclaje es bueno.

Es un franco que produce árboles vigorosos con buena productividad. No es tan sensible a clorosis como "Nemaguard", aunque no puede decirse que sea resistente. Se ha mostrado más resistente a los nemátodos *M.javanica* y *M.incognita* que Nemaguard. Se muestra compatible con variedades de almendro y melocotonero, así como con algunas de albaricoquero y ciruelo.

Los patrones Albatarrrech, Calanda, Alcañiz, Herce, Tauste y Caspe son otros híbridos almendro x melocotonero que también destacaron en el proceso de selección llevado a cabo en la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza). Sin embargo, en dicho proceso fueron superados por los híbridos Adafuel y Adarcias, dadas las mejores características de estos dos patrones

Ciruelos de crecimiento rápido. Mirobolanes y Marianas.

Este grupo de patrones se caracteriza por un crecimiento vigoroso durante los primeros años de vida, por una fácil propagación, y por una cierta polivalencia con las variedades injertadas, aunque esta es menor que la que presentan los ciruelos de crecimiento lento.

Seguidamente se describen algunas de las características morfológicas más destacables de cada uno de ellos, así como su comportamiento agronómico.

Adara (Moreno et al., 1995).

Es un patrón clonal seleccionado en La Estación Experimental de Aula Dei. Fue seleccionado de entre una población de Mirobolanes obtenidos por polinización libre.

Se trata de un patrón vigoroso, de porte semierguido. Los brotes presenta una coloración antociánica fuerte. La hoja es de un tamaño mediano y forma ovoide. Sus flores son blancas y pequeñas. El fruto es redondeado y simétrico. El color de la piel es amarillo al igual que su pulpa. Este patrón propaga bien por estaquilla leñosa, y se adapta bien a suelos pesados y calizos. Se utiliza principalmente como patrón de cerezo, aunque puede presentar incompatibilidad con alguna variedad. También es compatible con algunas variedades de melocotonero y almendro.

Ademir (Moreno et al., 1995)

Fue obtenido en la Estación Experimental de Aula Dei por selección clonal a partir de una población de Mirobolanes silvestres. Seleccionado por su buena aptitud a la propagación vegetativa por estaquilla leñosa y por su buen comportamiento en suelos pesados y calizos. Presenta buena compatibilidad con variedades de ciruelo (incluso aquellas que no lo son con Mirobolán B). El vigor es inferior ligeramente al del Mirobolán B. Su porte es erguido y posee una fuerte coloración antociánica de los brotes. Sus hojas son largas y con los márgenes ondulados y dentados. Sus flores son pequeñas y blancas, similares en tamaño a las del Mirobolán B. Los frutos son más pequeños que los del Mirobolán B, el color de la pulpa es amarillo y rojo teñido debajo de la piel y junto al hueso.

Mirobolán 713 AD (EEAD).

Patrón en proceso de selección en la EEAD.

Miral 3278 AD (EEAD).

Patrón en proceso de selección en la EEAD. Se cree que es un híbrido espontáneo entre *P. cerasifera* x *P. amygdalus*.

Mirobolán B (Okie, 1987).

Es un *P. cerasifera* seleccionado en la estación inglesa de East Malling.

Es un patrón vigoroso. Sus tallos son delgados, frecuentemente curvados, de color verde claro y con muchos anticipados. Las hojas son casi planas, ligeramente pubescentes en el envés. Las hojas adultas son largas y estrechas, ovales, alargadas y separadas del brote. El sistema radicular es semiprofundo y muestra buen anclaje. Retrasa un poco la entrada en producción y también la maduración.

Medianamente resistente a *Verticillium*. Parece resistente a chancro bacteriano (*Pseudomonas syringae*), así como a los nemátodos agalladores. También soporta bien la sequía. Es sensible a *Armillaria mellea* y a *Agrobacterium tumefaciens*. Se usa como patrón de ciruelo, aunque es incompatible con algunas variedades de ciruelo europeo y japonés. Lo mismo ocurre con el albaricoquero. Incompatible con almendro y melocotonero.

Mirobolán 29-C (Okie, 1987).

Se trata de un *P. cerasifera* obtenido por la Universidad de Davis, California.

Fue seleccionado por su resistencia a nemátodos del grupo *Meloidogyne*. Es sensible a *Pratylenchus vulnus* y a *Pseudomonas syringae*.

Es vigoroso aunque un 25-30% menos que el Mirobolán B. La productividad es algo superior a la obtenida con Mirobolán B, además no retrasa la maduración. Tolera bastante bien los suelos húmedos. Se propaga bien por estaquilla leñosa e *in vitro*. Es moderadamente resistente a *Armillaria mellea*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Verticillium*. Se utiliza principalmente como patrón de ciruelo.

Myrocal (Bernhard y Renaud, 1990).

Es un patrón *P. cerasifera*, más resistente a clorosis que el resto de mirobolanes. Asimismo, es más resistente a asfixia radicular que el Mirobolán B y el GF-31.

Mirobolán GF-31 (Bernhard y Renaud, 1990).

Se trata de un híbrido entre mirobolán y ciruelo japonés (*P. cerasifera* x *P. salicina*). Fue obtenido en Francia, en la Grande Ferrade.

Es muy vigoroso, ligeramente superior al Mirobolán B. Propaga fácilmente por estaquilla leñosa y permite un buen anclaje, ya que su sistema radicular es abundante. Vegeta bien en suelos superficiales, pedregosos y calizos, pero es sensible a la asfixia radicular. Su productividad es alta, además adelanta la producción. Es compatible con los ciruelos europeos pero no así con todos los cultivares japoneses. Es resistente a *Verticillium*.

Ishtara (Renaud et al., 1988).

Ishtara fue obtenido en Francia, en La Grande Ferrade. Es un híbrido complejo (*P. cerasifera* x *P. salicina*) x (*P. cerasifera* x *P. persica*).

Como patrón proporciona un vigor medio. Su crecimiento es erguido y poco ramificado. Sus flores son pequeñas y sin ovario (esterilidad femenina). Propaga fácilmente por estaquilla leñosa y semileñosa. Su anclaje es en ocasiones defectuoso. El tamaño de los frutos de la variedad injertada suele ser mayor, así como su calidad, además proporciona una rápida entrada en producción, adelanto en la maduración y una alta productividad. Resiste bastante bien la sequía, aunque es sensible a clorosis. Además aparece como tolerante del nemátodo *Meloidogine javanica* y del hongo *Armillaria mellea*. Compatible con almendro, albaricoquero, melocotonero y ciruelo. Algunas variedades de melocotonero han mostrado problemas de compatibilidad.

Fereley-Jaspi (Bernhard y Renaud, 1990).

Es un híbrido *P. japonica* x *P. spinosa*. Se propaga por estaquilla leñosa y micropropagación. Presenta buena compatibilidad con melocotonero y nectarina, su anclaje es bueno y además no emite sierpes. Se adapta bien a diversos tipos de suelos, presentando buena productividad.

Mariana GF 8-1 (Salésses, 1977).

Selección realizada en Francia, en La Grande Ferrade, a partir de plantas procedentes de semilla de Mariana (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*).

Produce arboles grandes, más vigorosos que el Mirobolán 29C pero menos que el Mirobolán B. Las hojas son elípticas, apuntadas en los dos extremos, con un color verde más intenso que los mirobolanes. Los ramos son de color marrón intenso en invierno y con pocos anticipados. El sistema radicular es superficial pero no serpea. Induce una buena productividad y calidad de frutos. Propaga fácilmente por estaquilla leñosa, y es resistente a asfixia y clorosis férrica. Es moderadamente resistente a *Armillaria mellea*, *Agrobacterium tumefaciens* y a los nemátodos *M. incognita* y *M. javanica*. Se trata de un patrón compatible con las variedades de ciruelo japonés, pero no con todas las de ciruelo europeo. En cuanto al albaricoquero, algunas variedades tampoco son compatibles. No es compatible con la mayoría de las variedades de melocotonero y almendro.

Mariana 2624 (Okie, 1987).

Es una selección realizada en la Universidad de California a partir de una población de plantas de Mariana (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*)

El crecimiento de los brotes es vigoroso, con pocos anticipados y muy erguidos. Las hojas son elípticas, apuntadas en los dos extremos, con un color verde más intenso que las de los mirobolanes. El sistema radicular es superficial y serpea bastante. Propaga fácilmente por estaquilla leñosa, y produce árboles de tamaño medio. La productividad es buena y además adelanta la maduración. Se muestra resistente a los nemátodos *M. incognita* y *M. javanica*, así como a la asfixia radicular. Moderadamente resistente a *Armillaria mellea* y *Agrobacterium tumefaciens*. Se utiliza como patrón de ciruelos europeos y japoneses, también para algunas variedades de albaricoquero, pero no es compatible con la mayoría de las variedades de melocotonero y almendro.

Ciruelos de crecimiento lento.

Los ciruelos de crecimiento lento podemos agruparlos dentro de las especies:

- *P. domestica*

- *P. insititia*

También incluimos dentro de este grupo el clon “Damas GF 1.869”, que se supone un híbrido de *P. domestica* x *P. spinosa*.

En términos generales, los ciruelos de crecimiento lento aportan una aceptable resistencia a la asfixia radicular, a la clorosis férrica y a la salinidad. Los frutos de las variedades injertados sobre ellos son de buena calidad. El desarrollo de los árboles no es excesivo, en ocasiones se les reprocha esta falta de vigor. Tienden a serpear y la compatibilidad con otras especies es desigual.

Prunus insititia.

Adesoto 101 (Moreno et al., 1995).

Es un clon de ciruelo “Pollizo de Murcia” seleccionado en la Estación Experimental de Aula Dei.

Muestra un vigor medio y un porte semierguido. Su sistema radicular es superficial, pero su anclaje es bueno, aunque serpea bastante. Abundante pigmentación antociánica en los brotes durante el periodo de crecimiento, y color marrón rojizo y grisáceo en invierno. Las hojas completamente desarrolladas, son de un color verde intenso y brillante, tamaño grande y forma ovalada, con base redondeada. La flor es de color blanco y el fruto redondeado, algo asimétrico, de color azul oscuro violáceo, casi negro en maduración, con mucha pruina. La propagación se realiza por cultivo *in vitro*. Es un patrón útil para plantaciones en regadío de albaricoque, melocotonero, almendro y nectarina. Induce un vigor medio, un adelanto de la producción, y una buena productividad, así como buen calibre y color del fruto. Es resistente a *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, aunque es sensible a *Pratylenchus vulnus*.

PM 105 AD (Moreno et al.,1990).

Se trata de un clon de Pollizos de Murcia en fase de seleccion en la Estación Experimental de Aula Dei.

Es un clon de vigor similar al patrón Brompton y superior al de San Julián A. Su porte es erguido. El color de los brotes más jóvenes es púrpura. Los brotes más adultos son de color marrón castaño. Las hojas son de un tamaño medio y forma ovoide ancha.

PM 137 AD (EEAD).

Se trata de un clon en fase de selección en la Estación Experimental de Aula Dei. Pertenece al grupo de los Pollizos de Murcia.

Tiene un vigor medio, ligeramente inferior al de Brompton y superior al de San Julián A. Su porte es erguido y un poco extendido. El color de los brotes es púrpura y un poco rojo vinoso en los crecimientos más recientes. Las hojas son pequeñas y de forma ovoide.

PM 150 AD (EEAD).

Se trata de un clon en fase de selección en la Estación Experimental de Aula Dei. Pertenece al grupo de los Pollizos de Murcia.

Su vigor es medio-bajo, similar al de San Julián A. Su porte es erguido aunque un poco más extendido que el clon 105, Brompton o San Julián A. El color del brote es púrpura y castaño oscuro. Las hojas son parecidas a las del clon 105, pero de tamaño menor.

Puebla de Soto 67 y Alguazas (Cambra,1970).

Proviene de una selección de Pollizos de Murcia y otros ciruelos locales españoles prospectados en las distintas zonas de origen. Se encuentran en proceso de estudio.

Montizo (Felipe,1989).

Es un ciruelo "Pollizo de Murcia" seleccionado por la Unidad de Fruticultura del SIA.

Es un patrón de vigor medio. Los ramos son de color marrón rojizo en invierno, con anticipados cortos y espinosos. Su hoja es elíptica, de color verde intenso y brillante por el haz, y verde claro y mate por el envés. La flor es blanca, de tamaño medio. El fruto es esférico, azulado y recubierto de pruina.

Sobre este patrón las variedades injertadas alcanzan un vigor medio, una rápida entrada en producción y una buena productividad. Propaga bien por estaquilla leñosa. Es un patrón útil para plantaciones en regadío de albaricoquero, melocotonero, almendro y nectarina.

Mompol (Felipe, 1989).

Es un ciruelo "Pollizo de Murcia" seleccionado por la Unidad de Fruticultura del SIA.

Se trata de un patrón con características muy similares a las del Montizo. Ambos patrones provienen de una selección de plantas procedentes de semillas de "Pollizos de Murcia", obtenidas por libre polinización. Una de las características que lo diferencian del Montizo, es su mayor vigor.

San Julián A (Okie, 1987).

Es un clon seleccionado conjuntamente por la estación de East Malling y Long Aston. Se trata de un patrón de vigor medio. Los ramos son derechos, erguidos y de color marrón rojizo. Las hojas son relativamente pequeñas, abolladas, coriáceas, con nerviaduras bien marcadas y bordes biserrados. Su sistema radicular es bastante superficial y serpea bastante. Las variedades injertadas sobre él alcanzan un vigor medio, con una rápida entrada en producción y una buena productividad, además la calidad de los frutos es buena. Propaga bien por estaquilla leñosa. No resiste tan bien la clorosis y la sequía como otros ciruelos. Se utiliza como patrón de ciruelo y melocotonero, aunque también es compatible con algunas variedades de albaricoquero y almendro.

San Julián GF 655/2 (Bernhard y Grasselly, 1959).

Patrón seleccionado en la Grande Ferrade (Burdeos, Francia), a partir de una población de plantas obtenidas de semilla del patrón San Julián de Orleans.

La morfología corresponde en términos generales a la del grupo San Julián, diferenciándose por el color de sus hojas, con un tono verde grisáceo muy característico. El sistema radicular es superficial, pero su anclaje es bueno, aunque serpea un poco. Produce arboles de tamaño medio-grande (más pequeños que Brompton). La entrada en producción es rápida, presentando una buena productividad y calidad de los frutos. Propaga bien por estaquilla leñosa, y es un buen patrón para cultivos de regadío, con suelos pesados y con

niveles de caliza no muy altos. Se utiliza como patrón de ciruelo y melocotonero, aunque también es compatible con algunas variedades de albaricoquero y almendro.

P. domestica

Constantí (Cambra et al.,1989).

Se trata de un ciruelo de crecimiento lento seleccionado en la Estación Experimental de Aula Dei.

El vigor del patrón es medio, con brotes erguidos. Las flores son blancas y pequeñas, y los frutos son de tamaño medio, con mucha pruina. El color de la pulpa es verde-amarillenta. La propagación por estaquilla leñosa es buena. Reune cualidades positivas para ser utilizado como patrón de numerosas variedades de melocotonero y nectarina, aunque presenta problemas de compatibilidad con algunas de ellas.

Brompton (Okie,1987).

Patrón seleccionado en colaboración entre las estaciones de East Malling y Long Aston.

Los brotes tienen un crecimiento derecho y erguido. Las hojas son anchas y redondeadas, con nervios hundidos que producen una superficie arrugada. El sistema radicular es superficial pero proporciona buen anclaje, además produce pocas sierpes. La propagación por estaquilla leñosa es buena.

Produce árboles de buen vigor y con buena productividad. Es moderadamente tolerante a suelos calizos, así como a *Verticillium*, aunque es sensible a asfixia radicular. Es compatible con variedades de ciruelo, con la mayoría de melocotón y nectarina, y con algunas de albaricoquero y almendro.

Torinel (Anónimo, 1992).

Obtenido por el INRA a partir de un cruzamiento entre Reina Claudia 994 x Reina Claudia de Bavay.

Se propaga bien por estaquilla leñosa y se adapta bien a terrenos pesados, aunque no tolera demasiado la asfixia. Tolera bastante bien el estrés hídrico y su entrada en producción

es rápida. Es bastante resistente a *Meloidogine incognita* y *M. javanica*, y sensible a *Pratylenchus vulnus*.

Tetra (J. Pinochet, comunicación personal).

Se trata de un patrón obtenido por el Instituto Experimental para la Fruticultura de Roma, Italia.

Es un patrón que se encuentra en fase de experimentación. No obstante parece que proporciona un vigor medio-alto y que muestra una satisfactoria compatibilidad con albaricoquero y ciruelo, así como con algunas variedades de melocotonero y nectarina. Parece ser un patrón tolerante a asfixia y resistente a Roya.

Damas GF 1869 (Salesses, 1987).

Es un híbrido espontáneo seleccionado en La Grande Ferrade.

Es una planta que forma un matorral muy espinoso, con madera grisácea en invierno. Los frutos son esféricos, pequeños y de color azulado oscuro. Produce arboles de vigor medio, con rápida entrada en fructificación y buena productividad. Los frutos son de buen tamaño y color. Se adapta bien a terrenos pesados y húmedos, siendo el patrón ciruelo más resistente a la asfixia radicular. También es resistente a clorosis. El anclaje es bueno pero serpea muchísimo. La propagación por estaquilla leñosa es buena. Es compatible con variedades de ciruelo y de melocotonero, aunque presenta una incompatibilidad casi generalizada con las variedades de nectarina.

Amexo 3. En el siguiente cuadro se exponen los cebadores utilizados durante la preselección. Se indican aquellos que son polimórficos y los que no lo son, así como los que no amplifican.

Cebador	Adafuel / Adarcias	Ademir / Adara	Adesoto / PM 105
OPF-01	No polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
OPF-02	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
OPF-03	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
OPF-04	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
OPF-05	Sí polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
OPF-06	Sí polimórfico	Si polimórfico	No polimórfico
OPF-07	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
OPF-08	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
OPF-09	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
OPF-10	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
OPF-11	Sí polimórfico	No polimórfico	Sí polimórfico
OPF-12	No polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
OPF-13	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
OPF-14	Sí polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
OPF-15	Sí polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
OPF-16	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
OPF-17	Sí polimórfico	No polimórfico	Sí polimórfico
OPF-18	Sí polimórfico	No polimórfico	Sí polimórfico
OPF-19	Si polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
OPF-20	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB7-01	Sí polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB7-02	Sí polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB7-03	Sí polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB7-04	Sí polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB7-05	Si polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB7-06	Sí polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB7-07	No amplifica	No amplifica	No amplifica
AB7-08	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB7-09	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB7-10	Sí polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB7-11	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico

Cebador	Adafuel / Adarcias	Ademir / Adara	Adesoto / PM 105
AB7-12	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB7-13	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB7-14	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB7-15	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB7-16	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB7-17	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB7-18	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB7-19	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB7-20	No polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB9-01	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB9-02	Sí polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB9-03	No polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB9-04	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB9-05	No polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB9-06	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB9-07	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB9-08	No amplifica	No amplifica	No amplifica
AB9-09	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB9-10	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB9-11	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB9-12	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB9-13	Sí polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB9-14	Si polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB9-15	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB9-16	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB9-17	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB9-18	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB9-19	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB9-20	Si polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB10-01	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB10-02	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB10-03	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB10-04	Sí polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB10-05	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB10-06	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico

Cebador	Adafuel /	Ada Ademir / Adara	Adesoto / PM 105
AB10-07	Sí polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB10-08	Sí polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB10-09	Sí polimórfico	No polimórfico	Sí polimórfico
AB10-10	Sí polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB10-11	Sí polimórfico	No polimórfico	Sí polimórfico
AB10-12	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB10-13	No polimórfico	Sí polimórfico	Sí polimórfico
AB10-14	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB10-15	Sí polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB10-16	No polimórfico	No polimórfico	No polimórfico
AB10-17	Sí polimórfico	Sí polimórfico	No polimórfico
AB10-18	No amplifica	No amplifica	No amplifica
AB10-19	No polimórfico	No polimórfico	Sí polimórfico
AB10-20	No amplifica	No amplifica	No amplifica

Anexo 5. Matriz básica de datos para los híbridos almendra x melocotonero.

Los números "1" indican presencia de banda y los "0" ausencia de banda.

	Adafuel	Adarkis	GF 677	GF 557	Cadaman	Barrier	Nemaguard	Nemared	Albatarrtech	Calanda	Alcaliz	Herve 5	Tausie	Caspe
AB10-03-430	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
AB10-03-640	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-03-700	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-03-850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-03-870	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-03-900	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
AB10-03-930	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-03-1120	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-03-1300	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AB10-03-1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-03-1650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-06-240	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
AB10-06-300	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
AB10-06-400	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-06-600	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
AB10-06-700	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-06-800	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
AB10-06-1240	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-06-1260	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
AB10-06-1300	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
AB10-06-1380	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
AB10-10-480	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-10-510	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AB10-10-600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
AB10-10-620	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AB10-10-680	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
AB10-10-760	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AB10-10-850	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
AB10-10-1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-06-300	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
AB9-06-500	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AB9-06-610	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AB9-06-680	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB9-06-780	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1
AB9-06-800	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AB9-06-880	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB9-06-1300	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
AB9-06-1380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
AB9-06-1700	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
AB7-03-250	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1
AB7-03-400	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
AB7-03-570	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB7-03-630	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB7-03-800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-07-350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-07-820	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-07-900	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

	Adafuel	Adarcias	GF 677	GF 557	Cadaman	Barrier	Nemaguard	Nemared	Albarreoch	Calanda	Alcañiz	Herve 5	Tauste	Caspe
AB9-07-950	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
AB9-07-1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-07-1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-07-1500	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB9-07-1800	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
AB9-07-2100	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
OPF-08-420	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
OPF-08-520	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
OPF-08-540	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPF-08-560	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
OPF-08-600	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
OPF-08-750	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OPF-08-970	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
OPF-08-1240	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1
OPF-08-1350	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPF-08-1460	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
OPF-08-1600	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
AB9-18-260	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0
AB9-18-650	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
AB9-18-750	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-18-800	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
AB9-18-1160	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
AB9-18-1350	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB9-18-1500	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF-03-450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
OPF-03-480	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
OPF-03-620	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
OPF-03-680	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
OPF-03-720	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF-03-800	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPF-03-930	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPF-03-970	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF-03-1220	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPF-03-1270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF-03-1600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF-17-400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF-17-550	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OPF-17-590	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
OPF-17-900	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
OPF-17-950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF-17-1200	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
OPF-17-1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OPF-17-1700	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-08-620	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
AB10-08-720	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-08-940	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
AB10-08-1100	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
AB10-08-1150	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB7-14-1800	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
AB7-14-1700	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0

	Adafuel	Adarcizas	GF 677	GF 557	Calaman	Barrier	Nemguard	Nemared	Albatarrech	Calanda	Alcañiz	Hierve S	Tauste	Caspe
AB7-14-1580	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB7-14-1500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB7-14-1400	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
AB7-14-1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB7-14-850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB7-14-810	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
AB7-14-650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
AB7-14-600	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
AB7-14-580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB7-14-380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB7-14-260	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 6. Matriz básica de datos para los ciruelos de crecimiento rápido.
Los números "1" indican presencia de banda y los "0" ausencia de banda.

	Adara	Ademir	Mirobolán 713 AD	Miral 3278 AD	Mirobolán B	Mirobolán 29C	Myrcal	Mirobolán GF 3-1	Ishara	Fereley-Jaspi	Mariana GF 8-1	Mariana 2624
AB10-03-320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB10-03-350	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
AB10-03-410	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-03-440	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-03-630	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AB10-03-610	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB10-03-750	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1
AB10-03-830	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-03-950	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
AB10-03-1030	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB10-03-1120	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-03-1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-03-1480	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-03-2200	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AB10-10-470	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-10-530	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1
AB10-10-620	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
AB10-10-915	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-10-1000	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
AB10-10-1080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
AB10-10-1280	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-10-1800	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
AB10-10-1900	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
AB9-06-300	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
AB9-06-570	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-06-700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-06-890	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
AB9-06-1200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
AB9-06-1800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB7-03-170	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB7-03-230	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB7-03-300	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AB7-03-390	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0
AB7-03-440	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB7-03-590	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB7-03-700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB7-03-780	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
AB7-03-800	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB7-03-1400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB7-03-1600	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AB9-07-360	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
AB9-07-700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
AB9-07-800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
AB9-07-900	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1

	Adara	Ademir	Mirobolán 713 AD	Miral 3278 AD	Mirobolán E	Mirobolán 29C	Myreca	Mirobolán GF 3-1	Ishtara	Fereby-Jaspi	Mariana GF 8-1	Mariana 2624
AB9-07-1000	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB9-07-1300	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1
AB9-07-1350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB9-07-1500	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0
AB9-07-1700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB9-07-1850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-17-430	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AB10-17-500	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AB10-17-570	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AB10-17-610	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-17-700	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
AB10-17-840	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
AB10-17-1000	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AB10-17-1050	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-17-1260	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-17-1600	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-17-1800	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
AB10-07-580	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
AB10-07-620	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-07-640	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
AB10-07-900	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB10-07-940	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-07-1080	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-07-1120	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
AB10-07-1320	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
AB9-14-380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
AB9-14-400	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AB9-14-420	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AB9-14-520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-14-610	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
AB9-14-680	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB9-14-1060	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-20-300	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB9-20-340	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB9-20-390	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
AB9-20-440	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
AB9-20-500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-20-530	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
AB9-20-620	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB9-20-660	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
AB9-20-700	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
AB9-20-820	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
AB9-20-1020	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
AB9-20-1130	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-20-1160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB9-20-1320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-20-1550	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
AB10-06-180	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1

	Adara	Ademir	Mirobolán 713 AD	Miral 3278 AD	Mirobolán B	Mirobolán 29C	Myrcal	Mirobolán GF 3-1	Ishtara	Fereley-Jaspi	Mariana GF 8-I	Mariana 2624
AB10-06-220	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
AB10-06-270	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
AB10-06-300	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
AB10-06-340	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
AB10-06-550	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
AB10-06-700	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
AB10-06-800	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
AB10-06-860	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
AB10-06-900	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-06-1000	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
AB10-06-1090	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
AB10-06-1240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB10-06-1900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-18-240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB9-18-400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB9-18-490	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
AB9-18-620	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
AB9-18-680	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB9-18-710	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AB9-18-750	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB9-18-780	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
AB9-18-800	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB9-18-920	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AB9-18-1500	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB9-18-1800	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AB9-18-2200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
OPF-08-600	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
OPF-08-760	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OPF-08-1100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
OPF-08-1160	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF-08-1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OPF-08-1500	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
OPF-08-1600	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
AB7-14-1800	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0
AB7-14-1720	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
AB7-14-1550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
AB7-14-1350	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
AB7-14-1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB7-14-1080	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
AB7-14-950	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
AB7-14-920	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB7-14-860	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
AB7-14-820	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
AB7-14-750	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
AB7-14-700	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB7-14-660	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB7-14-600	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
AB7-14-550	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB7-14-360	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB7-14-250	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 7. Matriz básica de datos para los ciruelos de crecimiento lento.
 Los números "1" indican presencia de banda y los "0" ausencia de banda.

	Adesoto 101	PM 105 AD	PM 137 AD	PM 150 AD	Puebla de Soho 67	Aguasas	Monzizo	Mompel	San Julián A	CF 655/2	Constantí 1	Brompton	Torinel	Tetra (6)	Damas CF 1869	Lehtara
AB10-06-180	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AB10-06-310	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
AB10-06-400	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB10-06-580	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AB10-06-700	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1
AB10-06-800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AB10-06-840	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
AB10-06-1000	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
AB10-06-1240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AB10-06-1480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AB10-06-1900	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1
AB10-03-420	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
AB10-03-520	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
AB10-03-610	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
AB10-03-650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB10-03-850	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1
AB10-03-870	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
AB10-03-1000	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
AB10-03-1030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB10-03-1120	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-03-1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB10-03-1420	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-03-2200	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
AB10-10-480	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-10-720	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
AB10-10-790	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
AB10-10-1280	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-10-1320	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AB10-10-1650	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AB10-10-1850	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
AB10-10-1950	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
AB9-06-660	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-06-760	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB9-06-800	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AB9-06-1800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AB9-18-410	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
AB9-18-440	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
AB9-18-515	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0
AB9-18-660	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB9-18-815	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AB9-18-970	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0
AB9-18-1250	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AB9-18-1330	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AB9-18-1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
OPF-08-460	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
OPF-08-600	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1

	Adesote 101	PM 105 AD	PM 137 AD	PM 150 AD	Puebla de Soho 67	Alguasas	Montizo	Mompol	San Julián A	CF 655/2	Constandí I	Brompton	Torimel	Tetra (6)	Damas CF 1869	Ishara
OPF-08-620	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0
OPF-08-830	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
OPF-08-900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
OPF-08-950	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
OPF-08-1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF-08-1600	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
OPF-08-1950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
OPF-08-2100	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
OPF-20-400	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
OPF-20-460	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
OPF-20-800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
OPF-20-950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
OPF-20-1080	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
OPF-20-1450	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB7-11-260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
AB7-11-320	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AB7-11-350	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
AB7-11-540	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB7-11-550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AB7-11-580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB7-11-680	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
AB7-11-800	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1
AB7-11-900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB7-11-920	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AB7-11-1250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB7-11-1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AB7-11-1550	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
AB7-11-1600	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB7-11-1850	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
AB7-11-2000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
AB10-01-450	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
AB10-01-480	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
AB10-01-920	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-01-1450	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB10-02-280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB10-02-710	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
AB10-02-780	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB10-02-1020	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-02-1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
AB10-02-1360	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
AB10-02-1510	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
AB10-02-2050	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
AB10-02-2200	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
AB10-02-2300	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
AB10-02-2400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AB10-11-480	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
AB10-11-560	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
AB10-11-660	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
AB10-11-1200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0

	Adcaoto 101	PM 105 AD	PM 137 AD	PM 150 AD	Puebla de Soho 67	Alvarez	Monizo	Mompel	San Julian A	CF 655/2	Constandi I	Brompton	Terinel	Tetra (6)	Damas CF 1869	Ishara
AB10-11-1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB10-11-1480	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-11-1650	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AB9-01-430	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AB9-01-630	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB9-01-920	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
AB9-01-980	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
AB9-01-1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB9-01-1360	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AB9-01-1400	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
AB10-05-410	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
AB10-05-620	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
AB10-05-700	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
AB10-05-820	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB10-05-1140	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB7-14-1800	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
AB7-14-1350	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
AB7-14-1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB7-14-1080	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AB7-14-950	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0
AB7-14-660	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
AB7-14-580	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB7-14-550	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
AB7-14-500	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
AB7-14-400	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB7-14-360	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

