



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE BIOLOGÍA

Bases genéticas y moleculares de la calidad del fruto  
en albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.)

**Juan Alfonso Salazar Martínez**

2014





**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

## **Bases genéticas y moleculares de la calidad del fruto en albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.)**

**Juan Alfonso Salazar Martínez**

Ingeniero Agrónomo

Murcia, 2014

### **Directores:**

**Dr. Pedro Martínez Gómez**

Dpto. Mejora Vegetal (CEBAS-CSIC)

**Dr. David Ruiz González**

Dpto. Mejora Vegetal (CEBAS-CSIC)



## ***Agradecimientos***

En primer lugar me gustaría ofrecer mi gratitud a todas aquellas personas e instituciones que han sido partícipes de forma directa o indirecta en la consecución de esta tesis con la aportación de sus conocimientos, experiencia, instalaciones, equipos, financiación o simplemente con su propia amistad

Dr. David Ruiz, por la confianza depositada en mí para acceder a la beca pre-doctoral que me ha permitido la realización de esta tesis, así como la aportación de sus conocimientos, experiencia en la parte de caracterización fenotípica y su amistad

Dr. Pedro Martínez Gómez, por su aportación sobre todo en lo que respecta a la caracterización molecular, sus conocimientos tanto científicos como de la vida misma y su gran versatilidad tanto a nivel personal como científico

Dr. José Egea Caballero, responsable del programa de mejora de albaricoquero, por compartir y transmitir su gran experiencia y conocimientos especialmente en lo referente al manejo y mejora del cultivo del albaricoquero

Dr. Juan Cuello Moreno por aceptar la tutoría de esta tesis y por su predisposición y buen trato en todo momento

A D. Antonio Molina padre e hijo por su gran profesionalidad y sabiduría en todos los aspectos relacionados con el manejo de especies frutales, haciendo posible gran parte de la realización de esta tesis

A Dña. M<sup>a</sup> Dolores Nortes por su gran compañerismo y ayuda tanto a pie de campo como en laboratorio, así como por los buenos momentos compartidos

A los Dres. Federico Dicenta, Encarna Ortega, Lorenzo Burgos y Nuria Alburquerque por su predisposición a nivel profesional y su gran simpatía

Al Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos por dejarme hacer uso de sus instalaciones y equipo necesarios en la realización de mi tesis



Al Dr. Santiago Martínez por su gran labor de asesoramiento en la etapa final de mi carrera en Orihuela, permitiéndome llegar con éxito a la etapa inicial de mi doctorado

A mis compañeros de doctorado y laboratorio por hacerme más llevadera esta dura pero emocionante etapa de doctorado, especialmente a Jorge, Eva, Manolo, Tere y Raquel

A Pedro Díaz, Gregorio, Jose Ramón, Pepe y M<sup>a</sup> José por su amistad y tertulias compartidas durante los ratos del café

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por la beca recibida y la financiación para mi estancia en la universidad de UC Davis en California (EE.UU.)

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología por los proyectos "Mejora genética del albaricoquero" (AGL2007-60694 y AGL2010-2190) con los que he financiado las investigaciones conducentes a esta Tesis Doctoral y mi segunda estancia (AGL2010-21903) en la Facultad Agraria de Bolonia (Italia)

Al Dr. Carlos Crisosto por permitirme formar parte de su grupo en UC Davis durante mi primera estancia de doctorado en California

Al Dr. Pedro Martínez (P.J) por su desinteresada ayuda durante mi breve estancia en EE.UU., compartiendo sus conocimientos a nivel molecular y su gran amistad

A los Dres. Luca Dondini y Stefano Tartarini, así como a todos los miembros de su departamento por su gran dedicación y ayuda en la parte molecular de mi tesis durante mi estancia en Bolonia que sin duda no olvidaré

A mis padres, hermano/as, Carmen y Juan, que siempre han estado presentes en los buenos y malos momentos depositando toda su confianza en mí, y en especial al pequeño Javier





*Muy especialmente a M<sup>a</sup> Jesús (MB) por su gran paciencia,  
comprensión y especial dedicación en hacerme mejor persona*



**ÍNDICE GENERAL**

<b>1. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. El albaricoquero .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Descripción taxonómica y botánica de la especie .....	3
1.1.2. Origen, diversidad genética y antecedentes del cultivo .....	5
1.1.3. Importancia económica, variedades cultivadas y aprovechamientos .....	8
1.1.4. Problemática del cultivo .....	13
<b>1.2. Conceptos y herramientas moleculares para la mejora genética .....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Fenotipo .....	15
1.2.2. Genómica .....	15
1.2.3. Transcriptómica .....	17
1.2.4. Proteómica.....	19
1.2.5. Metabolómica.....	19
1.2.6. Técnicas de secuenciación masiva de genomas y transcriptomas.....	20
<b>1.3. Mejora genética del albaricoquero .....</b>	<b>23</b>
1.3.1. Programas de mejora genética.....	23
1.3.2. Mejora genética de la calidad del fruto.....	25
1.3.3. Mapeo genético, análisis de QTLs y genes candidatos .....	28
<b>1.4. Justificación del trabajo .....</b>	<b>32</b>
<b>1.5. Objetivos del trabajo .....</b>	<b>34</b>
<b>2. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES EXPERIMENTALES.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1 Material vegetal .....</b>	<b>39</b>
2.1.1. Población ‘Z701-1’ × ‘Palsteyn’ .....	40
2.1.2. Población ‘Bergeron’ × ‘Currot’ .....	41
2.1.3. Población ‘Goldrich’ × ‘Currot’ .....	42
2.1.4. Colección de variedades .....	43
<b>2.2. Condiciones experimentales.....</b>	<b>45</b>
2.2.1. Localización y condiciones climáticas .....	45
2.2.2. Condiciones del cultivo .....	46

<b>3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y ESTUDIO DEL MODO DE HERENCIA DE CARACTERES FENOLÓGICOS Y DE CALIDAD DEL FRUTO.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1. Introducción y Objetivos .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Material vegetal .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3. Metodología .....</b>	<b>55</b>
3.3.1. Toma de muestras.....	55
3.3.2. Fecha de floración y maduración .....	56
3.3.3. Peso del fruto .....	56
3.3.4. Color del fruto .....	56
3.3.5. Firmeza del fruto .....	58
3.3.6. Contenido en sólidos solubles .....	59
3.3.7. Acidez y pH del fruto .....	60
3.3.8. Análisis estadístico .....	60
<b>3.4. Resultados y discusión .....</b>	<b>61</b>
3.4.1. Resumen de valores fenotípicos y análisis estadístico de las poblaciones evaluadas.....	61
3.4.2. Caracterización fenotípica y modo de herencia de caracteres fenológicos y de calidad del fruto .....	68
3.4.2.1. Fecha de floración .....	69
3.4.2.2. Fecha de maduración .....	71
3.4.2.3. Ciclo de desarrollo del fruto .....	73
3.4.2.4. Peso del fruto.....	76
3.4.2.5. Color de piel.....	78
3.4.2.6. Color de chapa .....	79
3.4.2.7. Color de pulpa.....	81
3.4.2.8. Firmeza del fruto .....	82
3.4.2.9. Contenido en sólidos solubles .....	84
3.4.2.10. Acidez y pH del fruto .....	86
3.4.3. Correlaciones entre caracteres fenológicos y de calidad de fruto .....	88
<b>3.5. Conclusiones .....</b>	<b>95</b>

<b>4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE EL USO DE MARCADORES TIPO SSR, CONSTRUCCIÓN DE MAPAS DE LIGAMIENTO GENÉTICO Y ANÁLISIS DE QTLs LIGADOS A CALIDAD DEL FRUTO.....</b>	<b>99</b>
4.1. Introducción y Objetivos.....	101
4.2. Material vegetal.....	108
4.3 Metodología.....	108
4.3.1. Toma de muestras, extracción y cuantificación del ADN.....	108
4.3.2. Marcadores moleculares utilizados.....	109
4.3.3. Método de amplificación del ADN.....	109
4.3.4. Análisis de los productos de PCR.....	110
4.3.5. Análisis estadístico.....	111
4.4. Resultados y discusión.....	112
4.4.1. Mapas de ligamiento genético.....	112
4.4.2. Análisis e identificación de QTLs.....	113
4.4.2.1. Fecha de floración.....	113
4.4.2.2. Fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto.....	115
4.4.2.3. Peso del fruto y peso del hueso.....	118
4.4.2.4. Color del fruto.....	120
4.4.2.5. Contenido en sólidos solubles.....	121
4.4.2.6. Acidez del fruto.....	122
4.4.2.7. Resumen de QTLs identificados.....	123
4.5. Conclusiones.....	126
<b>5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE ALBARICOQUERO MEDIANTE MARCADORES TIPO SNP DESARROLLADOS A PARTIR DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA DE ARN (RNA-SEQ) Y ANALIZADOS MEDIANTE LA TECNOLOGÍA SNPlex.....</b>	<b>129</b>
5.1. Introducción y Objetivos.....	131
5.2. Material vegetal.....	134
5.3. Metodología.....	134
5.3.1. Extracción de ARN, secuenciación e identificación de SNPs.....	134
5.3.2. ‘Target sequences’, diseño de cebadores y genotipado de SNPs.....	135
5.3.3. Análisis de datos y relaciones genéticas.....	136

<b>5.4. Resultados y discusión</b> .....	136
5.4.1. Identificación de SNPs a partir de los datos del RNA-Seq.....	136
5.4.2. Diseño de SNPlex y polimorfismos.....	139
5.4.3. Diversidad genética de variedades de albaricoquero.....	140
5.4.4. Dendrograma de asociación de variedades .....	142
<b>5.5. Conclusiones</b> .....	145
<b>6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE EL USO COMBINADO DE MARCADORES TIPO SSR Y SNP, CONSTRUCCIÓN DE MAPAS DE LIGAMIENTO GENÉTICO Y ANÁLISIS DE QTLs LIGADOS A CALIDAD DEL FRUTO.....</b>	<b>147</b>
<b>6.1. Introducción y Objetivos</b> .....	149
<b>6.2. Material vegetal</b> .....	152
<b>6.3. Metodología</b> .....	152
6.3.1. Toma de muestras, extracción y cuantificación del ADN .....	152
6.3.2. Marcadores moleculares utilizados .....	152
6.3.2.1. Simple sequence repeats (SSRs).....	152
6.3.2.2. Single nucleotide polymorphims (SNPs).....	153
6.3.3. Método de amplificación del ADN .....	153
6.3.4. Análisis de los productos de PCR .....	154
6.3.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	154
6.3.4.2. Electroforesis capilar .....	155
6.3.4.3. Espectrometría de masas .....	155
6.3.4.4. Análisis estadístico.....	156
<b>6.4. Resultados y discusión</b> .....	157
6.4.1. Mapas de ligamiento genético.....	157
6.4.2. Detección, localización de QTLs e identificación de genes candidatos .....	160
6.4.2.1. Fecha de floración .....	160
6.4.2.2. Fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto .....	163
6.4.2.3. Peso del fruto y peso del hueso .....	169
6.4.2.4. Calibre del fruto .....	172
6.4.2.5. Color del fruto.....	174
6.4.2.6. Firmeza del fruto .....	180
6.4.2.7. Contenido en sólidos solubles .....	183
6.4.2.8. Acidez del fruto.....	185

6.4.2.9. Resumen de QTLs identificados .....	189
<b>6.5. Conclusiones.....</b>	<b>192</b>
<b>7. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>195</b>
<b>8. GENERAL CONCLUSIONS.....</b>	<b>203</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>209</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>233</b>

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.1.</b> Producción y superficie nacional de cultivo de albaricoque de las comunidades autónomas más representativas (MAGRAMA, 2012).	11
<b>Tabla 2.1.</b> Resumen de los caracteres fenológicos y de la calidad del fruto de los parentales utilizados.	43
<b>Tabla 2.2.</b> Origen y características agronómicas más interesantes de las variedades ensayadas (autocompatibilidad, floración, maduración y color de piel).	44
<b>Tabla 2.3.</b> Acumulación de frío invernal parcial en Chill units y Horas <7 °C.	46
<b>Tabla 3.1.</b> Resumen de valores descriptivos para los caracteres fenológicos evaluados.	61
<b>Tabla 3.2.</b> Resumen de valores descriptivos para los caracteres físicos evaluados.	62
<b>Tabla 3.3.</b> Resumen de valores descriptivos para los caracteres bioquímicos evaluados.	63
<b>Tabla 3.4.</b> Análisis Kruskal-Wallis de muestras independientes para los caracteres fecha de floración, fecha de maduración y color del fruto en las poblaciones 'Z×P', 'B×C' y 'G×C'.	65
<b>Tabla 3.5.</b> ANOVA de factor genotipo para el carácter ciclo de desarrollo del fruto.	66
<b>Tabla 3.6.</b> Análisis multivariante para los años 2009 y 2010 en los diferentes caracteres pomológicos evaluados de la población 'Z701-1' × 'Palsteyn'.	66
<b>Tabla 3.7.</b> Análisis multivariante para los años 2012 y 2013 en los diferentes caracteres pomológicos evaluados de la población 'Bergeron' × 'Currot'.	67
<b>Tabla 3.8.</b> Análisis multivariante para los años 2012 y 2013 en los diferentes caracteres pomológicos evaluados de la población 'Goldrich' × 'Currot'.	67
<b>Tabla 3.9.</b> Coeficiente de correlación de Pearson para 2009 y 2010 entre los diferentes caracteres evaluados de la población 'Z701-1' × 'Palsteyn'.	88
<b>Tabla 3.10.</b> Coeficiente de correlación de Pearson para 2012 y 2013 entre los diferentes caracteres evaluados de la población 'Bergeron' × 'Currot'.	91
<b>Tabla 3.11.</b> Coeficiente de correlación de Pearson para 2012 y 2013 entre los diferentes caracteres evaluados de la población 'Goldrich' × 'Currot'.	92



---

<b>Tabla 4.1.</b> Marcadores de ADN de primera generación.	103
<b>Tabla 4.2.</b> Marcadores de ADN de segunda generación basados en la PCR.	103
<b>Tabla 4.3.</b> Marcadores de ADN de nueva generación.	104
<b>Tabla 4.4.</b> Protocolo (izquierda) y condiciones de PCR (derecha) empleadas en la amplificación de ADN.	110
<b>Tabla 4.5.</b> Marcadores SSRs más importantes ligados a QTLs de fecha de floración mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Z701-1' (Z) y 'Palsteyn' (P)	114
<b>Tabla 4.6.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Z701-1' (Z) y 'Palsteyn' (P).	116
<b>Tabla 4.7.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de peso del fruto y peso del hueso mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Z701-1' (Z) y 'Palsteyn' (P).	119
<b>Tabla 4.8.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de color del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Z701-1' (Z) y 'Palsteyn' (P).	120
<b>Tabla 4.9.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de contenido en sólidos solubles del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Z701-1' (Z) y 'Palsteyn' (P).	121
<b>Tabla 4.10.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de acidez del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Z701-1' (Z) y 'Palsteyn' (P).	122
<b>Tabla 5.1.</b> Características del mapeo genético y variantes totales (SNPs e INDELS) identificadas mediante RNA-Seq en los genotipos de albaricoquero, 'Rojo Pasión' y 'Z506-7'.	137
<b>Tabla 5.2.</b> Nivel de heterocigosidad de los cultivares de albaricoquero ensayados. Entre paréntesis se indica la heterocigosidad sólo para los SNPs diseñados a partir de secuencias de 'Rojo Pasión'.	141
<b>Tabla 6.1.</b> Principales ventajas e inconvenientes de los marcadores tipo SSRs (Simple sequence repeat) y SNPs (Single nucleotide polymorphism) (Dhanapal y col. 2012; Ball y col. 2010).	150
<b>Tabla 6.2.</b> Protocolos empleados para PCR convencional y PCR marcada con fluorescencia (izquierda). Condiciones de amplificación de ADN para PCR convencional y PCR marcada con fluorescencia (derecha).	154

- Tabla 6.3.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de fecha de floración mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013. 161
- Tabla 6.4.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de fecha de floración mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013. 162
- Tabla 6.5.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013. 163
- Tabla 6.6.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013. 165
- Tabla 6.7.** Mapa integrado del LG 4 en la población 'B×C', indicando los marcadores más significativos en cuanto a fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD y % expl.) para 2 años de fenotipado. 166
- Tabla 6.8.** Mapa integrado del LG 4 en la población 'G×C', indicando los marcadores más significativos en cuanto a fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD y % expl.) para 2 años de fenotipado. 167
- Tabla 6.9.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de peso del fruto y peso del hueso mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013. 170
- Tabla 6.10.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de peso del fruto y peso del hueso mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013. 171
- Tabla 6.11.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de calibre del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013. 173
- Tabla 6.12.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de calibre del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013. 173
- Tabla 6.13.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de color del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013. 175

---

<b>Tabla 6.14.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de color del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.	176
<b>Tabla 6.15.</b> Mapa integrado del LG 3 en la población 'G×C', indicando los marcadores más significativos en cuanto a color de piel y color de pulpa mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD y % expl.) para 2 años de fenotipado.	179
<b>Tabla 6.16.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de firmeza del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.	181
<b>Tabla 6.17.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de firmeza del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.	181
<b>Tabla 6.18.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de sólidos solubles mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.	183
<b>Tabla 6.19.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de sólidos solubles mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.	184
<b>Tabla 6.20.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de acidez del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.	185
<b>Tabla 6.21.</b> Marcadores más importantes ligados a QTLs de acidez del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.	186
<b>Tabla 6.22.</b> Posición de los SNPs ligados con los QTLs más importantes de calidad del fruto en las poblaciones de albaricoquero 'B×C' y 'G×C' y funciones descritas en los genes de melocotonero circundantes a estas posiciones.	187

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.1.</b> Detalle del porte general del árbol, flores y frutos.	4
<b>Figura 1.2.</b> Esquema de los diversos centros de origen y de distribución mundial del albaricoquero.	7
<b>Figura 1.3.</b> Producción mundial de albaricoque (FAOSTAT 2012). Los valores representan la producción en miles de toneladas para el año 2012.	9
<b>Figura 1.4.</b> Balance monetario de exportaciones e importaciones de los tres países exportadores más importantes. Los valores representan el valor monetario de 2011 en miles de euros (FAOSTAT 2012).	10
<b>Figura 2.1.</b> Vista general de una de las poblaciones de albaricoquero situadas en la finca del CEBAS-CSIC en Cieza (Murcia).	39
<b>Figura 2.2.</b> Detalle del fruto de los parentales utilizados 'Z701-1' (izquierda) y 'Palsteyn' (derecha).	40
<b>Figura 2.3.</b> Detalle del fruto de los parentales utilizados 'Bergeron' (izquierda) y 'Currot' (derecha).	41
<b>Figura 2.4.</b> Detalle del fruto de los parentales utilizados 'Goldrich' (izquierda) y 'Currot' (derecha).	42
<b>Figura 2.5.</b> Detalle de la ubicación de la finca experimental del CEBAS-CSIC, en Cieza (Murcia).	45
<b>Figura 3.1.</b> Detalle de balanza digital utilizada para el peso del fruto.	56
<b>Figura 3.2.</b> Detalle del colorímetro y el círculo cromático utilizados.	57
<b>Figura 3.3.</b> Detalle de la prensa Lloyd utilizada.	58
<b>Figura 3.4.</b> Detalle del refractómetro utilizado en la medición de °Brix.	59
<b>Figura 3.5.</b> Detalle del valorador automático ácido-base empleado.	60
<b>Figura 3.6.</b> Distribución de frecuencias en la población 'ZxP' para fecha de floración.	69
<b>Figura 3.7.</b> Distribución de frecuencias de las poblaciones 'BxC' y 'GxC' para fecha de floración.	70
<b>Figura 3.8.</b> Distribución de frecuencias de la población 'ZxP' para fecha de maduración.	72
<b>Figura 3.9.</b> Distribución de frecuencias de las poblaciones 'BxC' y 'GxC' para fecha de maduración.	73

<b>Figura 3.10.</b> Distribución de frecuencias de la población 'Z×P' para ciclo de desarrollo del fruto.	74
<b>Figura 3.11.</b> Distribución de frecuencias de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' para ciclo de desarrollo del fruto.	75
<b>Figura 3.12.</b> Distribución de frecuencias de la población 'Z×P' para peso del fruto.	76
<b>Figura 3.13.</b> Distribución de frecuencias de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' para peso del fruto.	77
<b>Figura 3.14.</b> Distribución de frecuencias de la población 'Z×P' para color de piel.	78
<b>Figura 3.15.</b> Distribución de frecuencias de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' para color de piel.	79
<b>Figura 3.16.</b> Distribución de frecuencias de la población 'Z×P' para color de chapa.	80
<b>Figura 3.17.</b> Distribución de frecuencias de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' para color de chapa.	80
<b>Figura 3.18.</b> Distribución de frecuencias de la población 'Z×P' para color de pulpa.	81
<b>Figura 3.19.</b> Distribución de frecuencias de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' para color de pulpa.	82
<b>Figura 3.20.</b> Distribución de frecuencias de la población 'Z×P' para firmeza del fruto.	83
<b>Figura 3.21.</b> Distribución de frecuencias de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' para firmeza.	84
<b>Figura 3.22.</b> Distribución de frecuencias de la población 'Z×P' para sólidos solubles.	84
<b>Figura 3.23.</b> Distribución de frecuencias de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' para sólidos solubles.	85
<b>Figura 3.24.</b> Distribución de frecuencias de la población 'Z×P' para acidez.	86
<b>Figura 3.25.</b> Distribución de frecuencias de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' para acidez.	87
<b>Figura 4.1.</b> Espectrofotómetro utilizado para la cuantificación del ADN (izquierda) y curva patrón óptima de ADN (derecha).	109
<b>Figura 4.2.</b> Visualización de fragmentos de ADN en geles de agarosa Metaphor®.	111
<b>Figura 4.3.</b> Mapas de ligamiento genético construidos a partir de 160 descendientes de la familia 'Z701' × 'Palsteyn' mediante marcadores tipo SSR (Simple Sequence Repeat).	112

---

<b>Figura 4.4.</b> Gradiente de LOD scores obtenidos para fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis 'Interval-Mapping' en el mapa integrado del grupo 4 de ligamiento de 'Z×P' para los años 2008, 2009 y 2010.	117
<b>Figura 4.5.</b> QTLs más representativos de la población 'Z701-1' (Z) × 'Palsteyn' (P) (al menos en 2 años) para un LOD superior a 3.	124
<b>Figura 5.1.</b> Número de SNPs e INDELS mapeados a partir del RNA-Seq de los genotipos de albaricoquero 'Rojo Pasión' y 'Z506-7'.	138
<b>Figura 5.2.</b> Dendrograma obtenido mediante el software MEGA6 basado en las distancias genéticas obtenidas entre las variedades ensayadas.	142
<b>Figura 6.1.</b> Visualización de fragmentos de ADN en geles de poliacrilamida.	154
<b>Figura 6.2.</b> Secuenciador automático ABI Prism-3730 de 96 capilares y visualización de fragmentos de ADN en el software Peak Scanner 1.0.	155
<b>Figura 6.3.</b> Plataforma Sequenom IPLEX Mass Array utilizada y esquema resumen de la reacción de extensión IPLEX (Gabriel y col., 2009).	156
<b>Figura 6.4.</b> Mapas de ligamiento genético construidos a partir de 130 descendientes de la familia 'B×C' utilizando marcadores tipo SSR (Simple sequence repeat) y SNPs (Single nucleotide polymorphism).	157
<b>Figura 6.5.</b> Mapas de ligamiento genético construidos a partir de 166 descendientes de la familia 'G×C' utilizando marcadores tipo SSR (Simple sequence repeat) y SNPs (Single nucleotide polymorphism).	158
<b>Figura 6.6.</b> Gradiente de LOD scores obtenidos para fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto, sólidos solubles y firmeza mediante análisis 'Interval-Mapping' en el mapa integrado del LG 4 de 'B×C' para los años 2012 y 2013.	168
<b>Figura 6.7.</b> Gradiente de LOD scores obtenidos para fecha maduración, ciclo de desarrollo del fruto y sólidos solubles para el LG 4 (izquierda), así como para el color de piel en el LG 3 (derecha) mediante análisis 'Interval-Mapping' de la población 'G×C' para los años 2012 y 2013.	169
<b>Figura 6.8.</b> QTLs más representativos (en 2 años de fenotipado) para un LOD superior a 3 en la población 'Bergeron' (B) × 'Currot' (C).	189
<b>Figura 6.9.</b> QTLs más representativos (en 2 años de fenotipado) para un LOD superior a 3 en la población 'Goldrich' (G) × 'Currot' (C).	190







***Resumen/Summary***



## **Resumen**

### **Antecedentes y objetivos**

El albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) es una especie diploide con un genoma de  $2n=2x=16$  cromosomas. Pertenece a la familia *Rosaceae* siendo una de las especies del género *Prunus* más importantes desde el punto de vista agrícola ya que representa el tercer frutal de hueso en importancia económica a nivel mundial después de melocotonero y ciruelo.

Los objetivos de esta tesis doctoral son por una parte la caracterización fenotípica y estudio del modo de herencia de los principales caracteres relacionados con la fenología y calidad del fruto en albaricoquero, así como la caracterización genotípica con marcadores de ADN (SSR y SNP) y construcción de mapas de ligamiento genético, identificación de QTLs (Quantitative traits loci) asociados a caracteres de interés y localización de posibles genes candidatos. A través de estos objetivos generales, se pretende avanzar en el estudio de las bases genéticas y moleculares de la calidad del fruto en la especie albaricoquero, hacia la búsqueda de las herramientas moleculares más adecuadas para conseguir sentar las bases de lo que conocemos como mejora asistida mediante marcadores moleculares en la especie albaricoquero dentro del género *Prunus*.

### **Evaluación, modo de herencia y transmisión de caracteres fenológicos y de calidad del fruto en albaricoquero**

En primer lugar, hemos abordado el fenotipado y estudio del modo de herencia de los caracteres agronómicos más importantes relacionados con fenología y calidad del fruto en las poblaciones de albaricoquero 'Z701-1' × 'Palsteyn' ('Z×P'), 'Bergeron' × 'Currot' ('B×C') y 'Goldrich' × 'Currot' ('G×C') con un total de 160, 187 y 200 descendientes respectivamente. En las tres poblaciones no se observan diferencias significativas para fecha de floración y ciclo de desarrollo del fruto entre genotipos, aunque sí se obtienen diferencias entre años. La alta variabilidad entre años de estos caracteres explica la no existencia de diferencias significativas entre genotipos.

Sin embargo, para el resto de caracteres se han encontrado diferencias significativas entre genotipos y entre años, así como también para la interacción genotipo/año. Esto nos muestra la gran variabilidad y segregación existente en cada una de nuestras poblaciones, así como las evidentes diferencias interanuales. También, se elaboraron histogramas de frecuencias con los datos medios de cada carácter de los descendientes de cada población y año, revelando en las tres poblaciones una distribución normal de los descendientes en la mayoría de los caracteres evaluados, lo que confirma el carácter poligénico y herencia cuantitativa para todos ellos, a excepción de fecha de floración y maduración que muestran distribuciones bi-modales o tri-modales, ya que se ven mucho más influenciados por las variaciones interanuales, especialmente por las diferencias de acumulación de frío invernal entre años.

En cuanto a la transmisión de caracteres, los resultados fenotípicos obtenidos muestran una mayor tendencia hacia floración tardía, lo cual es especialmente evidente en el caso de la población 'Bergeron' × 'Currot', ya que 'Bergeron' es un parental de floración muy tardía y 'Currot' se caracteriza por una floración muy temprana. También se observa una mayor influencia del carácter peso bajo de fruto en estas poblaciones, influenciado tal vez por el parental 'Currot', que se caracteriza por su bajo peso y tamaño del fruto.

Debemos destacar asimismo la presencia de valores transgresivos fuera del rango de los progenitores en muchos de los caracteres, debido a la influencia del fondo genético de los parentales, el cual determina en gran medida la segregación obtenida en los descendientes estudiados. Así pues, el parental 'Z701-1' parece transmitir ciclos de desarrollo del fruto más cortos debido a la influencia de uno de sus parentales, 'Orange Red'. Igualmente, en el caso del color de piel los resultados obtenidos revelan la herencia de colores de fondo más amarillo crema ('Currot') o más anaranjados ('Orange Red'). En otros caracteres se manifiesta también de forma muy clara la herencia intermedia de los descendientes con respecto a sus parentales, sobre todo en el caso de la acidez (g ácido málico/100ml) en la población 'Goldrich' × 'Currot', donde los parentales se sitúan en los extremos de los histogramas debido a la transmisión de genes co-dominantes.

En cuanto a las correlaciones obtenidas, los resultados muestran una buena correlación entre años de todos los caracteres evaluados, especialmente de fecha de floración, fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto, acidez y color de piel y pulpa. Con respecto a la correlación entre distintos caracteres, destacan las correlaciones entre fecha de floración y fecha de maduración, fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto, color de piel y color de pulpa o peso y calibre, que se suelen dar todos los años estudiados. Asimismo, podemos destacar algunas correlaciones que se deben claramente a la influencia de los parentales, como es el caso de la correlación positiva entre fecha de maduración y firmeza en 'B×C', o las correlaciones puntuales debido a las variaciones ambientales como la correlación inversa entre ciclo de desarrollo del fruto y el color de piel en la población 'Z×P'.

El estudio de la transmisión de estos caracteres confirma por tanto su carácter poligénico y herencia cuantitativa, una notable influencia del fondo genético, la herencia intermedia debido a la transmisión de genes co-dominantes, así como también se observa la gran variabilidad y segregación de los descendientes de cada población y la buena correlación entre años para cada uno de los caracteres evaluados.

### **Caracterización molecular mediante el uso de marcadores tipo SSR, construcción de mapas de ligamiento genético y análisis de QTLs ligados a calidad del fruto**

En este capítulo, se abordó la construcción de los mapas de ligamiento genético de la población 'Z701-1' × 'Palsteyn', utilizando un total de 292 marcadores tipo microsatélite (Simple sequence repeats, SSRs) desarrollados en diferentes especies de *Prunus* tales como melocotonero, almendro, albaricoquero o cerezo. De todos los marcadores evaluados 182 amplificaron y 42 fueron utilizados para el mapeo genético final a través de geles de agarosa metaphor. La mayoría de los marcadores mapeados fueron desarrollados a partir de ADN genómico de albaricoquero, concretamente del tipo UDAp, los cuales amplificaron en un 90 % de los casos.

Los mapas cubren una extensión para 'Z701-1' de 336,2 cM, mientras que en 'Palsteyn' fue de 363,1 cM. Posteriormente se llevó a cabo el análisis de QTLs, identificando importantes QTLs para fecha de floración, fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto, peso del fruto, peso del hueso, color del fruto, contenido en sólidos solubles y acidez.

A partir de los resultados obtenidos, debemos considerar el trabajo de mapeo genético como preliminar, ya que no se trata de mapas muy saturados. Sin embargo, el fenotipado de 3 años y el hecho de que muchos marcadores mapeados sean polimórficos en ambos parentales le da mayor robustez y relevancia a los QTLs identificados. Además, el hecho de identificar y asociar QTLs con ciertos marcadores moleculares en algunos caracteres previamente descritos por otros autores en otras especies nos confirma la elevada homología y sintenia existente entre especies del mismo género.

El carácter fecha de floración, a pesar de su variabilidad entre años, parece estar más relacionado con los grupos de ligamiento (linkage group, LG) 4 y 7. Esta intermitencia de QTLs en algunos caracteres como fecha de floración, peso del fruto y peso del hueso revela el carácter poligénico y la influencia de las diferencias ambientales entre años de la mayoría de los caracteres evaluados. Los resultados obtenidos muestran sin lugar a dudas la gran influencia del LG 4 en la calidad del fruto, sobre todo en el caso de fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto, así como también en el caso del contenido en sólidos solubles y acidez, aunque en una menor medida. En el LG 6 también aparecen QTLs importantes relativos a fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto aunque se da una menor influencia que en el caso del LG 4. También se observa cierta relación del LG 6 con el color de pulpa del fruto.

Esta información, aunque es preliminar nos ayuda a enfocar futuros estudios dirigidos hacia zonas más concretas del genoma en la búsqueda de QTLs que controlen un mayor porcentaje de la variación del carácter, saturando las zonas de interés y diseñando marcadores específicos que nos aporten información del comportamiento de determinados caracteres en cada uno de los descendientes de una población. Además, se confirma la gran importancia del LG 4 para mejora en albaricoquero, ya que fueron identificados importantes QTLs, sobre todo en el caso de fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto.

Por tanto, el LG 4 se perfila como uno de los más importantes en lo que respecta a la calidad del fruto en albaricoquero y en otras especies del género *Prunus*. Otra posibilidad para avanzar en este sentido puede derivarse de la reciente secuenciación del genoma completo del melocotón [*Prunus persica* (L.), Bosch] llevada a cabo por la International Peach Genome Initiative (IPGI).

## **Caracterización molecular de genotipos de albaricoquero mediante marcadores tipo SNP desarrollados a partir de la secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq) y analizados mediante la tecnología SNPlex**

En este capítulo se llevó a cabo un estudio de mejora en la eficiencia de la metodología para el desarrollo y análisis de SNPs (Single nucleotide polymorphisms), combinando la secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq) y espectrometría de masas mediante la tecnología de la plataforma SEQUENOM.

Para ello, fueron diseñados 136 SNPs a partir del RNA-Seq de los genotipos 'Rojo Pasión' y 'Z506-7' ('Orange Red' × 'Currot'), en los cuales fueron identificadas un total de 282.977 y 293.574 variaciones respectivamente, siendo el 98 % de estas variaciones SNPs. Los SNPs fueron validados en todo el genoma para su uso en estudios de diversidad genética y genotipado de poblaciones, lo que nos hace considerar la secuenciación de ARN como una forma eficiente para generar marcadores moleculares de alta calidad en albaricoquero.

El conjunto de variedades utilizado como material vegetal consta de un total de 37 genotipos de los cuales 20 proceden de la colección del CEBAS-CSIC, mientras que el resto son variedades procedentes de la Facultad de Agraria de Bolonia (Italia). En este conjunto de variedades se incluyen las ya mencionadas 'Bergeron', 'Goldrich' y 'Currot', las nuevas variedades del CEBAS-CSIC tales como 'Sublime', 'Estrella', 'Rojo Pasión', 'Mirlo Blanco', 'Mirlo Anaranjado' y 'Mirlo Rojo', la variedad griega 'Lito', variedades italianas como 'Ninfa' y 'BO81604311', así como diversas variedades con orígenes de diferentes áreas geográficas que abarcan desde países de la Cuenca Mediterránea como España, Francia, Italia y Grecia, así como orígenes tan diversos como Irán, Japón, EE.UU. o Canadá.

Finalmente, el software Mass ARRAY Assay Design 3.1 (disponible en la plataforma SEQUENOM) organizó 3 SNPlex de 36, 34 y 31 SNPs, analizando un total de 101 SNP de los cuales 99 amplificaron y 95 fueron polimórficos en alguno de los 37 genotipos (97 %).

A partir de los resultados del análisis de variaciones de secuencia de nucleótidos (SNPs) en el genoma de albaricoquero basado en la secuenciación de alto rendimiento del ARN (RNA-Seq) y combinando la espectrometría de masas para el genotipado de SNPs, podemos decir que se trata de un enfoque que proporciona una alta flexibilidad, reproducibilidad y precisión en los ensayos, suponiendo una herramienta sólida para detectar diversidad de nucleótidos en regiones codificantes del genoma del *Prunus*. Además, el uso de regiones codificantes de ADN para el desarrollo de SNPs a partir del RNA-Seq representa una ventaja adicional, ya que las funciones de muchos de los genes identificados en el genoma del melocotonero son a menudo conocidas. Los SNPs validados identificaron un total de 267 combinaciones alélicas en los 37 genotipos, dándose para la mayoría de los SNPs 3 combinaciones alélicas en cada genotipo.

A pesar de esto, la naturaleza bi-alélica de los SNPs hace que la media del número de alelos por locus (2,8), la media observada de heterocigosidad (0,38) y el poder de discriminación (0,51) den valores más bajos que en el caso de los SSRs. Sin embargo, la disponibilidad de un mayor número de SNPs con respecto a SSRs hace que los SNPs sean una herramienta idónea para estudios de relaciones y diversidad genética entre variedades. La heterocigosidad observada en estos cultivares osciló entre 0,19 de 'Yamagata3' y 0,95 en el caso de 'Rojo Pasión', ya que la mayoría de SNPs fueron diseñados a partir de librerías de esta variedad.

También, se mostraron relaciones fenéticas y de distancia genética lógicas entre los cultivares de albaricoquero ensayados acorde con la procedencia de cada uno de ellos, siendo 'Orange Red' y 'Currot' dos de las variedades más alejadas genéticamente, mientras que las variedades tradicionales españolas 'Búlida', 'Mauricio' y 'Currot', así como también la variedad italiana 'Ninfa' tienen orígenes genéticos similares. En el otro extremo del dendrograma se encuentran los 'Mirlos' muy cercanos a 'Rojo Pasión'.



**Caracterización molecular mediante el uso combinado de marcadores tipo SSR y SNP, construcción de mapas de ligamiento genético y análisis de QTLs ligados a calidad del fruto**

En el último capítulo, se muestran los resultados relativos a la construcción de los mapas de ligamiento genético de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' utilizando un total de 130 y 166 descendientes respectivamente. Los mapas fueron construidos combinando marcadores tipo SSR y SNP. Los SNPs utilizados fueron previamente diseñados en el capítulo anterior. Se mapearon un total de 87 marcadores en la población 'B×C' (50 SNPs y 37 SSRs) y 89 marcadores en 'G×C' (54 SNPs y 35 SSRs). Los mapas de ligamiento genético de 'Bergeron' y 'Currot' cubrieron una extensión del genoma de 394,9 y 414,3 cM respectivamente, mientras que en 'Goldrich' y 'Currot' fue de 353,5 y 422,3 cM respectivamente.

El análisis de QTLs permitió la identificación de diferentes QTLs ligados a fecha de floración, fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto, peso del fruto, calibre, color del fruto, firmeza, contenido en sólidos solubles y acidez. Fecha de floración es un carácter muy dependiente de las variaciones interanuales, lo que puede explicar en parte que diferentes autores hayan identificado QTLs ligados a este carácter en casi todos los grupos de ligamiento descritos en las diferentes especies del género *Prunus*.

En nuestro caso, destacamos sobre todo los QTLs localizados en el LG 4 de ambas poblaciones, probablemente por su relación con fecha de maduración, así como el LG 7 en el caso de la población 'B×C'. Los QTLs de mayor relevancia por su significación se dan en el LG 4, considerando este grupo de vital importancia para el control de fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto y contenido en sólidos solubles tanto en la especie albaricoquero como en melocotonero. En el intervalo del QTL de sólidos solubles se localizan los genes ppa001122m y ppa000854m, que tienen una función de unión de di-glucosas a nivel del retículo endoplasmático, mecanismo relacionado sin duda con el contenido en sólidos solubles.

Peso del fruto, peso del hueso y calibre son caracteres muy relacionados entre sí, identificando los QTLs más importantes en el LG 2 y LG 6 de la población 'G×C', destacando asimismo la presencia de un importante QTL ligado a calibre de fruto al final del LG 1.

En el caso del color de piel y color de pulpa fueron identificados QTLs al final del LG 3 de 'Goldrich' y en la zona media de 'Currot'. En el intervalo de este QTL se localiza un gen *MYB* previamente descrito por otros autores en cerezo y manzano, lo que confirma la homología entre especies de diferentes géneros en la familia *Rosaceae*. En la población 'B×C', el color de pulpa parece estar más relacionado con el LG 6.

En cuanto al nivel de acidez del fruto, destacamos los QTLs identificados en el LG 2 y LG 8 de la población 'G×C' como los más importantes, siendo estos QTLs menos significativos en el caso de la población 'B×C', posiblemente debido a la mayor influencia del parental 'Goldrich', caracterizado por una elevada acidez. Un significativo QTL ligado a firmeza del fruto ha sido detectado en el LG 4, especialmente en el mapa de 'Bergeron', dándose además una fuerte correlación con fecha de maduración. En la población 'G×C' identificamos los QTLs de firmeza más importantes en los LG 1, 3 y 6, siendo este carácter heredado de forma conjunta con el color del fruto en el LG 3.

A la vista de los resultados obtenidos, el enfoque que nos podría aportar mayores éxitos en esta línea de investigación, sería la búsqueda de los genes implicados en la maduración y contenido en azúcares en el LG 4, y el color de piel en el LG 3 en la especie albaricoquero. Para ello, una primera aproximación podría ser el análisis y evaluación en nuestras poblaciones de albaricoquero de los marcadores NAC diseñados por Pirona y col. (2013) para el LG 4 de melocotonero, ya que estos marcadores están diseñados en la misma región del QTL de fecha de maduración obtenida en nuestras poblaciones. Por tanto, si obtenemos polimorfismos con estos marcadores y éstos se corresponden con QTLs significativos, podríamos secuenciar el ADN resultante de estos fragmentos para comprobar si se trata de las mismas secuencias y por tanto de los mismos genes identificados en melocotonero.

En el caso del color del fruto, sería necesario saturar mucho más el final del LG 3 para detectar una zona del genoma más concreta vinculada a este carácter y finalmente desarrollar diferentes combinaciones de marcadores que nos puedan permitir discriminar entre descendientes mediante mejora asistida por marcadores moleculares.

## **Summary**

### **State of the art and objectives**

Apricot (*Prunus armeniaca* L.) is a diploid specie with a genome of  $2n = 2x = 16$  chromosomes included inside the *Rosaceae* family and is one of the most important species of *Prunus* from an agricultural point of view. Apricot production around the globe places it as the third stone fruit in terms of worldwide economic importance after peach and plum.

The objective of this thesis has been to carry out a phenotypic characterization of apricot by studying the inheritance of the major traits related to phenology and fruit quality. In addition, a genotypic characterization using DNA markers (SSRs and SNPs) has been performed to develop genetic linkage maps for QTL (Quantitative traits loci) detection and identification of potential candidate genes and markers. Through these overall objectives, we are seeking to establish the groundwork in the search for the most suitable molecular tools for marker assisted selection (MAS) in apricot breeding programs.

### **Evaluation, inheritance and transmission of phenological and fruit quality traits in apricot**

This chapter is focused on the phenotyping of plant material and the study of the inheritance of the most important phenological and fruit quality traits in apricot progenies 'Z701-1' × 'Palsteyn' ('Z×P'), 'Bergeron' × 'Currot' ('B×C') and 'Goldrich' × 'Currot' ('G×C') through assaying 160, 187 and 200 seedlings, respectively. In all progenies, there were no statistically significant differences for blooming date and fruit development period within genotype, although differences between years were observed. This could be due to the high variability of these traits between years, making the difference lesser between genotypes. For the other traits, however, there were significant differences by genotype and year, as well as for interaction between genotype/year. This was highly variable for each progeny in addition to the already described inter-annual differences.

Different histograms were also developed using average data for each seedling, trait and year, revealing in the three populations a normal distribution in the majority of the traits. We can therefore confirm the polygenic character and quantitative inheritance of all three populations. Nevertheless, blooming and ripening date showed bi-modal or tri-modal distribution, probably due to the fact that these traits are greatly influenced by climatic conditions, with high inter-annual variation influenced by the chill unit differences among years.

In addition, late blooming has been observed to have a greater influence than early blooming, especially in the 'B×C' population, probably due to the fact that 'Bergeron' is an extremely late blooming cultivar. On the other hand, low fruit weight influence was observed in 'B×C' and 'G×C' populations due to the small size of 'Currot'. We should also note the presence of many transgressive trait values, probably due to the influence of the genetic background of the parents, which largely determines the segregation obtained in the offspring studied.

'Z701-1' transmitted shorter fruit development periods due to the influence of one of its parents ('Orange Red'). On the other hand, yellow or orange skin colour was transmitted for 'Currot' and 'Orange Red', respectively. Intermediate inheritance of seedlings was also observed with respect to parents, especially in terms of acidity level (g malic acid/100ml) in the 'G×C' population, which may be due to the high acidity level from 'Goldrich' and low acidity from 'Currot'.

We can affirm that there was good correlation between years for all traits evaluated, especially blooming date, ripening time, fruit development period, acidity and skin and flesh colour. Regarding the correlation among different traits that occurred every year, we can highlight the correlations between blooming date and ripening time, ripening time and fruit development period, skin and flesh colour, as well as between weight and fruit diameter. In addition we can highlight some important correlations that are clearly due to the influence of the parents, such as the positive correlation between ripening time and fruit firmness in 'B×C' or occasional correlations due to environmental variations such as the inverse correlation between fruit development period and skin colour in the 'Z×P' population.

Finally, the traits evaluated show the influence of genetic background and intermediate inheritance due to the transmission of co-dominant genes. We can thus confirm the polygenic nature of the trait and quantitative inheritance as well as the large variability of the seedlings in each population and the good correlation between years.

### **Molecular characterization using SSR molecular markers, construction of genetic linkage maps and identification of QTLs linked to fruit quality traits**

In this chapter a genetic linkage map of the population 'Z701-1' × 'Palsteyn' was constructed assaying 160 seedlings. 292 microsatellite markers (simple sequence repeats, SSRs) developed in different *Prunus* species such as peach, almond, apricot and cherry were screened. Of all these markers, 182 amplified but only 42 were used to construct the final genetic map using metaphase agarose gel. Most markers mapped were developed from genomic apricot DNA, UDAP type specifically, which amplified in 90% of cases. 'Z701-1' and 'Palsteyn' covered a genome extension of 336.2 and 363.1 cM, respectively. We subsequently carried out QTL analysis to detect significant QTLs for blooming date, ripening time, fruit development period, fruit weight, stone weight, fruit colour, soluble solids and acidity content.

We have to consider this mapping as a first approach, because the map developed was not very saturated. However, three years of phenotyping and using polymorphic molecular markers in both parents gives the QTLs identified greater significance. Furthermore, through QTL analyses, some traits were associated with molecular markers previously described by other authors in other species, which confirms the high homology and synteny among species of the same genus. There are QTLs from some traits that appear and disappear according to the year. For example, the blooming date trait shows an irregular trend between years and seems to be more related to the linkage groups (LG) 4 and 7. Other examples of such traits include blooming date, fruit weight and stone weight. This reveals the polygenic nature of these traits and the environmental effects among years in the majority of the evaluated traits.

Results show without any doubt the great influence of LG 4 on fruit quality traits, especially in the case of ripening time and fruit development period and also in the case of malic acid and soluble solids content. Important QTLs for ripening time and fruit development period also appear in LG 6, but they have less influence than in LG 4. In addition, LG 6 is an important group with key QTLs related to fruit flesh colour.

This information allows us to focus on more specific regions of the genome in the search for major QTLs that control a greater percentage of the variation of the trait. For this purpose we should saturate these interest regions and design specific primers that provide more information on the behaviour of certain traits of each seedling. We thus have to highlight the importance of LG 4 for improvement in apricot, because the most significant and important QTLs of ripening time and fruit development period were found in this group. We can therefore consider LG 4 as one of the most important in terms of fruit quality in apricot and other species of the *Prunus* genus. Another possibility for making progress in this research line has emerged from the recent sequencing of the complete genome of peach [*Prunus persica* (L.), Batch] carried out by the International Peach Genome Initiative (IPGI).

### **Molecular characterization of apricot genotypes through the development of SNP markers from massive sequencing of RNA (RNA-Seq) and analysis using the SNPlex technology**

This chapter is focused on improving the development and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) via an efficient and flexible method combining high throughput sequencing (RNA-Seq) and mass spectrometry using the SEQUENOM technology platform. We designed 136 SNPs from the RNA-Seq genotypes 'Rojo Pasión' and 'Z506-7' ('Orange Red' × 'Currot'). A total of 282,977 and 293,574 variations were identified in 'Rojo Pasión' and 'Z506-7' respectively. A total of 98% of these variations corresponded to single nucleotide variations. SNPs were validated in the *Prunus* genome for use in genetic diversity and genotyping studies. We can therefore consider RNA sequencing as an efficient method for generating high quality molecular markers in apricot.

The set of varieties used included 37 genotypes, of which 20 came from collections of CEBAS-CSIC, while the rest were varieties from the Faculty of Agriculture (Bologna, Italy). This set of varieties included 'Bergeron', 'Goldrich' and 'Currot' in addition to new varieties from the CEBAS-CSIC research center such as 'Sublime', 'Estrella', 'Rojo Pasión', 'Mirlo Blanco', 'Mirlo Anaranjado' and 'Mirlo Rojo'. The set also included a greek variety as 'Lito', Italian varieties such as 'Ninfa' and 'BO81604311' as well as other varieties with origins in different geographic areas. This set thus included varieties from Mediterranean countries such as Spain, France, Italy and Greece as well as from diverse countries like Iran, Japan, USA and Canada.

Finally, the software Mass ARRAY Assay Design 3.1 (available in the SEQUENOM platform) organized 3 SNPLex of 36, 34 and 31 SNPs, analysing a total of 101 SNPs, of which 99 amplified and 95 were polymorphic in at least in some of the 37 genotypes (97 %). From the results of variations in nucleotide sequences (SNPs) within the apricot genome based on high throughput RNA sequencing (RNA-Seq) and combining mass spectrometry for genotyping of SNPs, we can say that this is an approach that provides high flexibility, reproducibility and accuracy and that it can be considered a robust tool for detecting nucleotide diversity in coding and non-coding regions of the *Prunus* genome.

Furthermore, the use of DNA coding regions for the development of SNPs from RNA-Seq sequences represents an additional advantage because the functions of many genes identified in the peach genome are often known. The validated SNPs identified 267 allele combinations in the 37 genotypes studied. Despite these results, the bi-allelic nature of SNP markers makes the average number of alleles per locus (2.8), the observed heterocigosity (0.38) and the power discrimination (0.51) lower compared to SSR markers. However, the increased availability of SNP in comparison with SSR markers makes Single Nucleotide Polymorphisms a suitable tool for studying genetic diversity and relationships among varieties. Heterozygosity observed in the cultivars studied ranged from 0.19 ('Yamagata3') to 0.95 ('Rojo Pasión'), because the majority of SNPs were designed from 'Rojo Pasión' libraries.

Moreover, logical phenetic relationships and genetic distance were shown among apricot cultivars tested according to the origin of each one. 'Orange Red' and 'Currot' were the most genetically distant varieties, while traditional Spanish varieties 'Búlida', 'Mauricio' and 'Currot' as well as the Italian variety 'Ninfa' have similar genetic origins. In the other extreme of the dendrogram we can find 'Rojo Pasión' and 'Mirlos' with similar genetic origins.

### **Molecular characterization through the combined use of SSR and SNP markers, construction of genetic linkage maps and QTL analysis linked to fruit quality traits**

In the final chapter, genetic linkage maps of populations 'B×C' and 'G×C' were constructed using a total of 130 and 166 seedlings, respectively. Maps were constructed combining SSR and SNP markers. The SNPs used were designed in the previous chapter, making it possible to map a total of 87 markers in the 'B×C' population (50 SNPs and 37 SSRs) and 89 markers in 'G×C' (54 SNPs and 35 SSRs). 'Bergeron' and 'Currot' covered a genome extension of 394.9 and 414.3 cM, while 'Goldrich' and 'Currot' covered 353.5 and 422.3 cM, respectively. In the phenotype and genotype integrated analysis, different QTLs were detected for blooming date, ripening time, fruit development period, fruit and stone weight, fruit diameter, fruit colour, acidity, soluble solids and firmness.

Blooming date is highly dependent on inter-annual variations and therefore different authors have associated this trait with almost all linkage groups described in different species of the *Prunus* genus. In our case, we can highlight QTLs included in LG 4 in the 'G×C' population, probably due to its relation to ripening time, as well as in LG 7 in the 'B×C' population. The most significant QTLs are localized in LG 4, showing that this group is of vital importance to ripening time, fruit development period and soluble solids content in both apricot populations. In the soluble solids QTL of LG 4, ppa000854m and ppa001122m genes were localized that play an important role in di-glucose binding within the endoplasmic reticulum, and this mechanism is undoubtedly related to the soluble solids content.



Fruit weight and stone weight are related to LG 2 and LG 6 in the 'B×C' population. However we can highlight the greatest influence of stone weight in LG 2 in the 'G×C' population as well as the presence of an important fruit diameter QTL at the end of LG 1. Regarding skin and flesh colour, the most important QTLs were detected at the end of LG 3 in 'Goldrich' and in the middle region of 'Currot'. In the QTL interval, a *MYB* gene previously described by other authors in cherry and apple tree was localized, confirming the homology and sinteny among species of different genera in the *Rosaceae* family. In the 'B×C' population, on the other hand, flesh colour seems to be more related to LG 6.

In regards to fruit acid content, the most important malic acid QTLs were identified in LG 2 and LG 8 in the 'G×C' population. The influence on acidity in these groups was lower, however, in the 'B×C' population. This difference may be due to the high acidity level provided by 'Goldrich'. Fruit firmness and ripening time are transmitted together by 'Bergeron' in LG 4, while in the 'G×C' population, firmness seems to be related to LG 1, 3 and 6 and is inherited together with fruit colour in LG 3. According to the results obtained, the approach that could provide the greatest level of success in this research line would be searching for the genes involved in the ripening time of apricot tree species as well as in fruit skin colour in LG 4 and LG 3 respectively.

In this sense, we should continue testing certain molecular markers designed over the most important NAC genes in peach related to ripening time in LG 4 (Pirone et al., 2013) because these markers were designed in the same region as ripening time QTLs in our population. Therefore, if these molecular markers are polymorphic and related to significant QTLs, we can sequence these DNA fragments in order to see whether these sequences are the same as the genes identified in peach. In terms of fruit skin colour, it would be necessary to saturate the final region of the LG 3 with more molecular markers to detect more specific regions of the apricot genome linked to this trait. Finally, we can develop different combinations of markers that allow us to discriminate among seedlings through marker-assisted breeding.







## ***1. Antecedentes, Justificación y Objetivos***



## 1. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. El albaricoquero

#### 1.1.1. Descripción taxonómica y botánica de la especie

El albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) perteneciente a la familia *Rosaceae* y la subfamilia *Prunoideae*, se encuentra encuadrado dentro del género *Prunus* (frutales de hueso) y subgénero *Prunophora*. La mayoría de los albaricoqueros cultivados pertenecen a la especie *Prunus armeniaca* (Linneo), también denominada *Armeniaca vulgaris* (Lamark) (Forte, 1992). El género *Prunus* es uno de los más importantes desde el punto de vista agrícola, con más de 100 especies cultivadas (Bailey y Hough, 1975). El género se divide en 5 subgéneros: *Prunus* (albaricoqueros y ciruelos), *Amygdalus* (melocotoneros y almendros) y *Cerasus* (cerezos) con gran interés agronómico, y *Laurocerasus* y *Padus* que no poseen especies de interés agrícola. El género *Prunus* alberga gran número de especies frutales. Algunas de estas especies, emparentadas filogenéticamente con el albaricoquero, suponen una fuente secundaria de genes para su uso en mejora (Paunovic, 1988; Boonprakob y Byrne, 1990):

- *Prunus brigantia* (ciruelo alpino), deriva de *P. armeniaca*. Se cultiva en los Alpes franceses.
- *Prunus ansu* y *Prunus holoserica*, cultivadas en el Extremo Oriente. Algunos autores consideran que pertenecen a *P. armeniaca*.
- *Prunus mume* (albaricoquero japonés), cultivado en zonas húmedas de China y Japón. Es más resistente a las enfermedades de tipo fúngico que *P. armeniaca*.
- *Prunus sibirica* (albaricoquero siberiano) y *Prunus mandshurica* (albaricoquero de Manchuria), cultivadas al norte de Mongolia y caracterizadas por su resistencia al frío.

Dentro de la especie *P. armeniaca* existe una gran diversidad varietal. Sólo en Europa, hay descritos más de 1.300 cultivares diferentes. Por otro lado, existen descritas en el mundo alrededor de 10.000 accesiones de albaricoquero censadas en 225 bancos de germoplasma de todo el mundo, según la Comisión de Recursos Fitogenéticos de la FAO (FAO, 2009).

El albaricoquero es una especie diploide con un genoma de  $2n=2x=16$  cromosomas, aunque se han encontrado algunos mutantes tetraploides. Si bien la auto-incompatibilidad floral es frecuente dentro del género *Prunus*, *P. armeniaca* es generalmente auto-compatible, aunque existe una gran variabilidad para este carácter dentro de la especie.

En general, las variedades cultivadas en el sur de Europa son auto-compatibles, mientras que las variedades cultivadas en América, Asia y Norte de África son auto-incompatibles. La incompatibilidad es de tipo gametofítica determinada por una serie alélica (Burgos y col., 1997). También existen algunas variedades androestériles como 'Colorao' y 'Arrogantes' (García y col., 1988).



**Figura 1.1.** Detalle del porte general del árbol, flores y frutos.

El albaricoquero es un árbol grande, de hasta 7-8 m de altura, con raíz pivotante, caducifolio, vigoroso, de porte abierto, con tronco robusto y de madera oscura (Figura 1.1). Además de las ramas principales, presenta diferentes tipos de ramos que configuran la forma y estructura natural del árbol: dardos, brindillas, ramos mixtos, ramos anticipados y chupones. Las hojas son simples y alternas, lisas, brillantes, de color rojizo cuando inician el desarrollo y verde intenso cuando son adultas, con el haz de color verde oscuro y más pálidas en el envés, de forma oval o redondeadas, algo acorazonadas, con el ápice agudo, irregularmente dentadas en los márgenes y poseen un pecíolo largo, asurcado y glanduloso.



Su longevidad supera los 50 años, aunque comercialmente su cultivo oscila entre los 25-30 años (Lichou y Audubert, 1992; Forte, 1992). Sus flores se encuentran situadas, mayoritariamente, en ramos mixtos, con pedúnculo corto, con brácteas, pentámeras, con numerosos estambres, pétalos de color blanco rosáceo y hermafroditas (*Figura 1.1*).

El fruto es una drupa de forma entre globosa u oval, con un surco ventral bien diferenciado, de tamaño variable, entre pequeño y mediano, ligeramente pubescente (*Figura 1.1*). El color de la piel varía del amarillo claro al anaranjado e incluso naranja-rojizo, y frecuentemente presenta una chapa de color rojizo en la zona expuesta al sol. La pulpa o mesocarpo es carnosa y de color blanquecino, amarillento o anaranjado, aromática y azucarada, con un dulzor característico muy apreciado para consumo en fresco, así como para mermeladas, confituras, zumos y desecados como “orejones”, y puede estar adherida al hueso o libre. El hueso o endocarpo es lignificado, duro, de forma oval aplanada y con dos surcos bien definidos. La semilla es grande, con cubiertas de color marrón y cotiledones blancos (Agustí, 2004).

Los hábitats idóneos del albaricoquero son las regiones de clima templado mediterráneo, pero se encuentra extendido en zonas tan diferentes como Europa central, la cuenca mediterránea, Estados Unidos o Australia (Mehlenbacher y col., 1991). En el hemisferio norte su floración tiene lugar entre febrero y abril, y la maduración de sus frutos entre mayo y julio según las regiones (Bailey y Hough, 1975). Su adaptación a las diferentes zonas de cultivo ha dado lugar a un proceso de selección natural que ha originado numerosos cultivares diferentes (Monastra y De Salvador, 1995).

### **1.1.2. Origen, diversidad genética y antecedentes del cultivo**

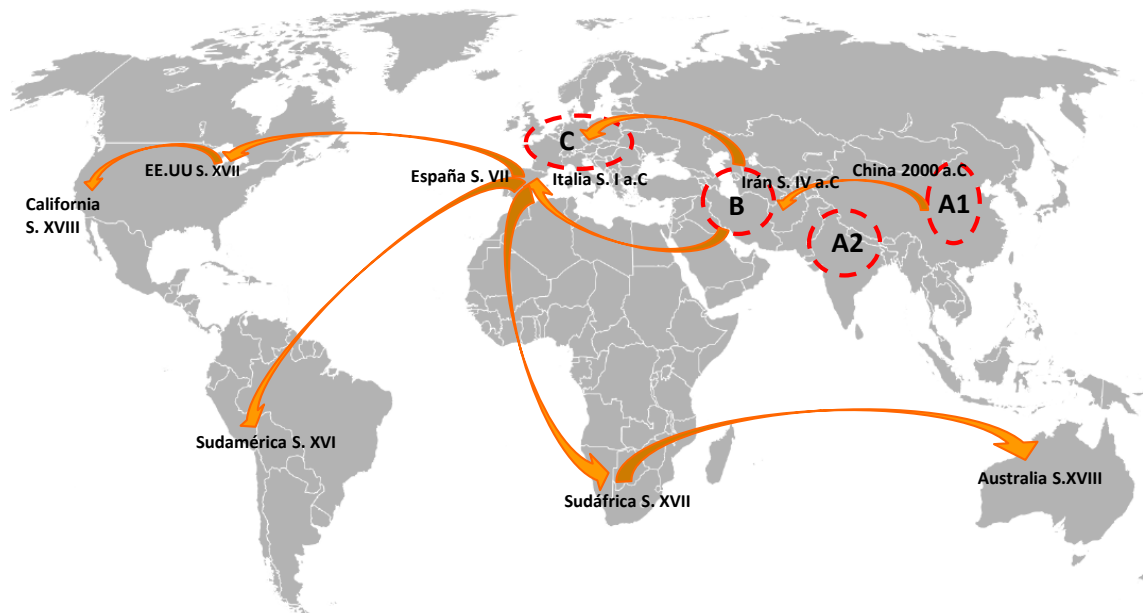
El origen de la especie albaricoquero fue localizado por el botánico ruso Vavilov en Asia en tres centros diferentes: Centro Chino (A1), que comprende las regiones montañosas del noroeste, centro y oeste de China, llegando hasta la provincia de Kansu y el noreste del Tíbet; Centro de Asia Central (A2), que comprende el área montañosa que se extiende desde el sur de Tien-Shan hasta Kashmir, y el Centro del Cercano Oriente (B), considerado por Vavilov como secundario, que comprende la zona montañosa que se extiende desde el noroeste de Irán hasta el Cáucaso y el centro de Turquía (Vavilov, 1951) (*Figura 1.2*).

Desde estos centros se distribuyó posteriormente al resto del mundo (Figura 1.2) (Bailey y Hough, 1975; Mehlenbacher y col., 1991; Lichou y Audubert, 1992; Layne y col., 1996). Kostina (1964) clasificó la especie albaricoquero en cuatro grupos ecogeográficos mayores según su origen geográfico:

- **Asia Central:** es el más antiguo y el de mayor diversidad de formas. Incluye árboles vigorosos y longevos que forman una copa densa y de ramas pequeñas. Estos árboles tienen un periodo de latencia largo y resisten bien las fluctuaciones de temperatura del final del invierno. Tienen una floración tardía, muchos son auto-incompatibles y los frutos tienen un alto contenido en azúcares, son de tamaño medio o pequeño y de almendra dulce. La susceptibilidad a hongos del tipo *Monilia* spp. y *Stigmata carpophila* limita su cultivo en zonas húmedas.
- **Dzungar-Trasylian:** procedente de Oriente Próximo, Mar Caspio y China. Se caracteriza por sus elevadas necesidades de frío, resistencia a las bajas temperaturas y producción de frutos pequeños.
- **Irano-Caucásico:** este grupo incluye las selecciones locales de Armenia, Georgia, Azerbaiyán, Daguestán, Irán, Siria, Turquía, Norte de África, y parte de España e Italia. Los árboles no son tan vigorosos ni longevos como los de Asia Central; tienen ramas más finas y hojas más anchas y brillantes. Son menos resistentes a los inviernos fríos pero brotan antes en primavera. Las semillas son dulces y su pulpa es blanca o poco coloreada. Probablemente si Kostina hubiera tenido acceso a las colecciones de albaricoqueros del Norte de África, como Túnez y la cadena del Atlas, habría incluido en este grupo otro subgrupo norte africano adaptado a un clima más cálido.
- **Europeo:** es el grupo de origen más reciente y de menor diversidad. Se ha originado de las pocas formas que han podido llegar a Europa desde Armenia, Irán y otros países árabes hace 2000 años. La palabra inglesa *apricot*, procede del latín *praecoquus*, que significa frutos de precoz maduración, indicando que los romanos sólo conocían las formas precoces. Los cultivares comerciales de Norte América, Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia pertenecen también al grupo europeo.

Los árboles de este grupo son poco vigorosos y precoces en floración, aunque los cultivares del Norte de Europa pueden tener grandes requerimientos en horas frío. Son todos auto-compatibles con frutos de menor grado de azúcar y acidez que los del grupo irano-caucásico y la mayoría tienen la semilla amarga.

Más recientemente, Layne y col. (1996) propusieron seis principales grupos eco-geográficos (Asia Central, Oriente Chino, Norte Chino, Dzhungar-Zailij, Irano-Caucásico y Europeo), aunque esta clasificación es cada vez más complicada debido a la introducción de nuevas variedades derivadas de cruces entre los genotipos de los diferentes grupos (Faust y col., 1998). En este sentido, Maghuly y col. (2005) dividieron el grupo europeo en Europa del Este y Europa del Oeste, y se introdujo el grupo de variedades de América del Norte. Por otro lado, Hagen y col. (2002) propusieron cuatro grupos de cultivares (Diversificación, Geográficamente Adaptable, Europa Continental y la Cuenca del Mediterráneo) sobre la base de la diversidad genética, la procedencia geográfica y las características agronómicas. Aunque los grupos europeos y norteamericanos son los más recientes y menos variables, la mayor parte de los avances en la mejora genética del albaricoquero se ha llevado a cabo a través de la hibridación y selección dentro de estos grupos de cultivares.



**Figura 1.2.** Esquema de los diversos centros de origen y de distribución mundial del albaricoquero.

Así pues, el cultivo de albaricoquero comenzó en China hace más de 3000 años, desde donde se expandió a Asia Central, Irán, Asia menor, Armenia y Siria (Faust y col., 1998). La expansión del albaricoquero desde Asia Central hacia el oeste parece que tuvo lugar a través de las rutas comerciales abiertas por Alejandro Magno en el siglo IV A.C. (Layne y col., 1996) (*Figura 1.2*).

A Europa llegó por dos rutas: en el siglo I A.C., los romanos lo introdujeron procedente de Irán y Armenia (de donde procede el nombre de la especie) a través de Grecia e Italia, y a partir del siglo VII los árabes lo introdujeron en España desde Oriente Próximo (*Figura 1.2*). De ahí se extendió por el resto del continente, llegando a España entre los siglos II y IV d.C. También fue introducido en nuestro país por los árabes hacia el siglo VII proveniente del Norte de África (Forte, 1992), desarrollándose fuertemente su cultivo entre los siglos XVI y XVIII (Forte, 1992). Desde Europa fue introducido al resto de los continentes a partir del siglo XVII (*Figura 1.2*) (Lichou y Audubert, 1992).

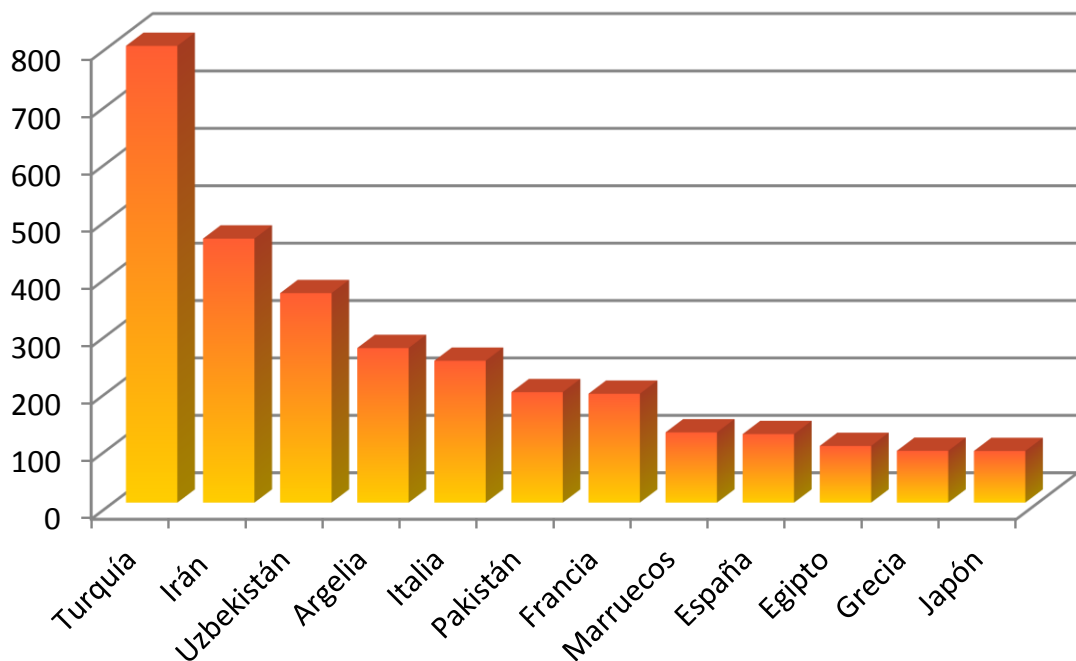
En España su cultivo se desarrolló entre los siglos XVI y XVII, y fruto del comercio exterior llegó a Inglaterra y Estados Unidos en el siglo XVII (Ogawa y Southwick, 1995). Posteriormente los españoles lo introdujeron en California en el siglo XVIII (Faust y col., 1998) (*Figura 1.2*). Hasta finales del siglo XIX la mayoría de los albaricoqueros procedían de semilla. A principios del siglo XX comienza a desarrollarse el injerto y con ello a multiplicarse las variedades, iniciándose así el cultivo moderno del albaricoquero. Desde ese momento se inicia una permanente mejora de las técnicas de cultivo con objeto de optimizar al máximo la productividad de esta especie.

En Murcia, el origen de las variedades cultivadas es resultado de la confluencia de las dos vías, a través del norte y sur del mediterráneo, lo que podría explicar la peculiaridad de algunas variedades (Egea y col., 1988).

### **1.1.3. Importancia económica, variedades cultivadas y aprovechamientos**

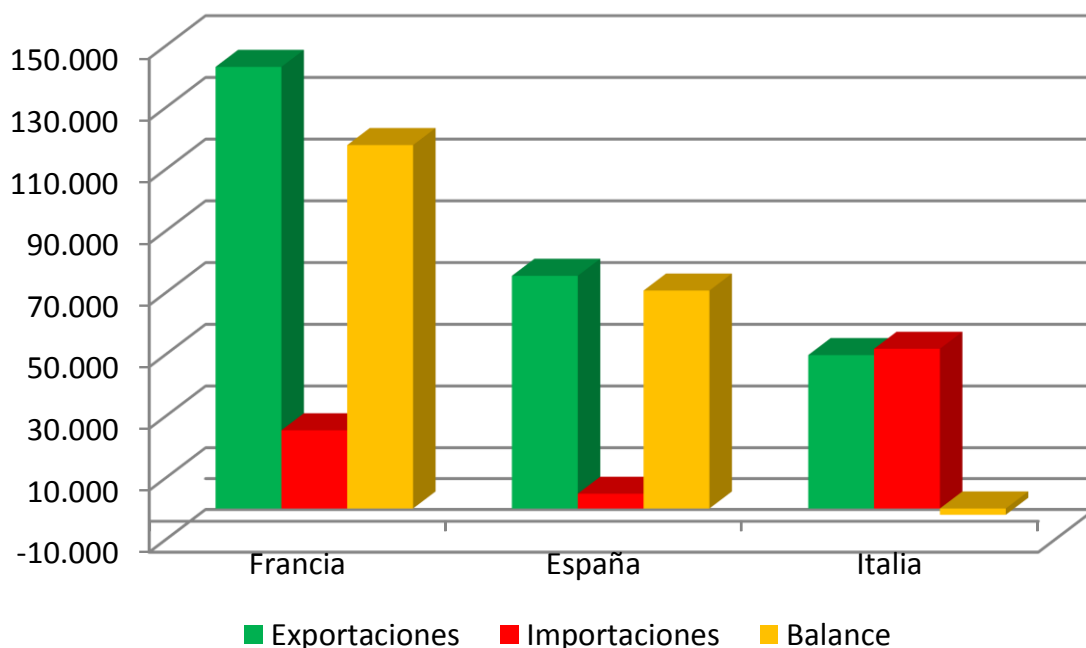
La producción mundial de albaricoque alcanzó en 2012 3,95 millones de toneladas (FAOSTAT, 2012), siendo el albaricoquero el tercer frutal de hueso en cuanto a producción después de melocotones y ciruelas. Hay que destacar que su producción está principalmente localizada en los países de la cuenca Mediterránea alcanzando entre todos ellos el 50 % de la producción global.

Turquía es el productor más importante con una producción en 2012 que osciló en torno al 20,4 % de la producción mundial, aunque gran parte de su producción es albaricoque destinado a secado. Otros importantes productores son Irán (11,8 %), Uzbekistán (9,4 %), Argelia (6,9 %) o Italia (6,3 %) (Figura 1.3) (FAOSTAT 2012). España es uno de los principales productores mundiales de albaricoque, cifrándose su producción en unas 120.000 toneladas anuales (FAOSTAT 2012, MAGRAMA, 2012), siendo el tercer productor de Europa tras Italia y Francia, y el noveno país a nivel mundial (FAOSTAT, 2013). Gran parte de la producción española está destinada al consumo en fresco, al contrario que ocurre en los casos de Turquía, Irán o Uzbekistán.



**Figura 1.3.** Producción mundial de albaricoque (FAOSTAT 2012). Los valores representan la producción en miles de toneladas para el año 2012.

Si analizamos el nivel de exportaciones para consumo en fresco en todo el mundo, Francia, España e Italia son los 3 exportadores principales tanto a nivel monetario como en toneladas. A pesar de ello, en el balance económico de exportaciones e importaciones, Italia presenta saldo negativo, mientras que Francia y España presentan un balance positivo con 115 y 70 millones de euros respectivamente para el año 2011 (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Balance monetario de exportaciones e importaciones de los tres países exportadores más importantes. Los valores representan el valor monetario de 2011 en miles de euros (FAOSTAT 2012).

El cultivo del albaricoquero tiene una gran tradición en España. En muchas áreas de nuestro país se dan unas condiciones edafoclimáticas particularmente idóneas para su cultivo, con resultados excelentes en cuanto a productividad, calidad y precocidad. El albaricoquero es el cuarto frutal de hueso en importancia en nuestro país tras el melocotonero, el almendro y el ciruelo. La superficie de cultivo actual es de unas 21.000 hectáreas, de las cuales 17.500 se encuentran en regadío y 3.500 en secano (MAGRAMA, 2012). La Región de Murcia es con diferencia la principal zona productora, con aproximadamente el 64 % de la producción nacional (unas 75.000 toneladas), seguida de Aragón, Castilla La Mancha, Comunidad Valenciana y Cataluña (MAGRAMA, 2012) (Tabla 1.1).

Del total de la producción nacional de albaricoque, en torno al 37 % (unas 44.000 toneladas) se exporta como fruta en fresco a terceros países, y el 63 % restante de producción se destina al mercado nacional en fresco (41 %) y a la industria conservera (22 %) (MAGRAMA, 2008-2012). El principal destino de las exportaciones de albaricoque es el mercado europeo, siendo Francia (24 %), Alemania (23 %) e Italia (16 %) los principales países de destino, seguidos de Países Bajos, Polonia, Bélgica y Portugal.

Debemos destacar el incremento en la exportación en los últimos años a países como Reino Unido y Rusia, que están aumentando exponencialmente la importación de albaricoque español (Base de datos de Comercio Exterior, 2012).

**Tabla 1.1.** Producción y superficie nacional de cultivo de albaricoque de las comunidades autónomas más representativas (MAGRAMA, 2012).

Comunidad Autónoma	Superficie		Producción	
	ha	%	Miles de toneladas	%
Región de Murcia	10.159	48,0	75,8	63,5
Aragón	3.102	14,6	9,9	8,3
Castilla La Mancha	1.717	8,1	9,7	8,1
Comunidad Valenciana	4.439	21,0	8,7	7,3
Cataluña	855	4,0	7,3	6,1
Andalucía	354	1,7	2,7	2,3
Extremadura	68	0,3	2,3	1,9
Resto de España	477	2,3	3,0	2,5
<b>Total</b>	<b>21.172</b>	<b>100</b>	<b>119,4</b>	<b>100</b>

En cuanto a las variedades cultivadas en España, el panorama varietal en albaricoquero se caracteriza en estos momentos por un gran dinamismo, ya que se está produciendo una intensa renovación en los últimos años. Las variedades tradicionales aún juegan un papel relevante, aunque se encuentran en clara regresión. Variedades tradicionalmente orientadas a la transformación industrial tales como ‘Búlida’, ‘Canino’ y ‘Real Fino’ han disminuido notablemente su aportación a la producción total, arrastradas por la notable caída del sector de la transformación (Egea y col., 2010a). Esta situación está cambiando el panorama dado el importante peso de estas variedades, especialmente en el caso de la variedad ‘Búlida’, que significaba en tiempo reciente bastante más del 50 % de la producción total de albaricoque en España.

Por otra parte, otro conjunto de variedades tradicionales que acaparaba buena parte de la producción nacional se ha visto severamente afectado en los últimos años por el virus de la sharka, enfermedad provocada por el Plum pox virus (PPV). Entre las variedades más sensibles cabe citar a ‘Currot’ (Valenciano), ‘Mauricio’, ‘Pepito del Rubio’, ‘Galta Rocha’ y ‘Mitger’, cuya producción ha disminuido de forma muy acusada (Egea y col., 2010a).

En este contexto, durante los últimos años se está produciendo una importante renovación varietal en la especie albaricoquero. La renovación inicial fue encaminada a la introducción de variedades foráneas con las características exigidas por el mercado europeo, es decir, frutos con chapa roja y carne naranja. Es el caso de variedades tales como 'Goldbar' (Traver), 'Goldstrike', 'Goldcot', 'Tiryntos', 'Jordan' o 'Poppy'. Sin embargo, la deficiente calidad gustativa, las excesivas necesidades de frío invernal en muchas de ellas y la susceptibilidad al virus de la sharka, ha resultado finalmente en un fracaso productivo en la mayoría de los casos. Más recientemente se han introducido otras variedades de mejores características organolépticas tales como 'Magic Cot', 'Lilly Cot' o 'Wonder Cot'. Otras variedades incluidas en esta oleada de renovación han sido 'Sweet Cot', 'Flavor Cot', 'Pink Cot', 'Kioto', etc., que responden a la demanda de, en general buen aspecto, atractivos, pero no siempre con las características deseables de sabor o auto-compatibilidad (Egea y col., 2010a).

En el último periodo, algunos obtentores nacionales han realizado un esfuerzo importante encaminado a la renovación varietal y han introducido en el mercado interesantes variedades especialmente por su notable precocidad. Es el caso de las variedades 'Mogador', 'Madison', 'Alba' o 'Colorao' y otras de reciente incorporación al mercado, que están contribuyendo a ocupar el hueco dejado por la progresiva desaparición de la variedad 'Currot' (Valenciano), si bien los primeros indicios indican que pueden seguir teniendo dificultades por su susceptibilidad al virus de la sharka (Egea y col., 2010a).

Finalmente, debemos reseñar el conjunto de variedades obtenidas por el CEBAS-CSIC de Murcia, que están acaparando buena parte de la renovación varietal del albaricoquero en España, dadas sus características de elevada calidad de fruto, auto-compatibilidad y resistencia al virus de la sharka. Entre ellas debemos destacar las variedades de maduración temprana 'Mirlo Blanco', 'Mirlo Anaranjado', 'Mirlo Rojo' y 'Rojo Pasión', las variedades de maduración media como 'Murciana' y 'Valorange', y la variedad de maduración tardía 'Dorada' (Egea y col., 2004a; 2005ab; 2010b; Ruiz y col., 2010a).



#### 1.1.4. Problemática del cultivo

La importancia económica del cultivo del albaricoquero en nuestro país y particularmente en la Región de Murcia es indudable, como lo demuestran los datos de superficie cultivada y producción descritos en apartados anteriores. Además, debemos destacar que el albaricoquero (*P. armeniaca*) a diferencia de otros frutales, presenta buenas perspectivas de futuro en España, ya que se trata de un cultivo no excedentario en la Unión Europea, por tanto, admitiría producciones superiores a las actuales.

Sin embargo, el cultivo del albaricoquero presenta una serie de deficiencias y problemas que son necesarios abordar con premura, a fin de asegurar la sostenibilidad y rentabilidad económica del mismo. Dos factores han tenido una especial trascendencia en la evolución decreciente de este cultivo durante los últimos años: la aparición y diseminación del virus de la sharka (Plum pox virus) y las nuevas exigencias de calidad en los mercados, que ha evolucionado hacia la demanda de frutos de piel y pulpa naranja con amplia chapa roja en la epidermis y elevada calidad gustativa.

La sharka, presente en España desde hace más de 20 años (Llácer y col., 1985) con sus efectos devastadores sobre la calidad del albaricoque, es probablemente el principal responsable de la progresiva reducción de la superficie dedicada a este frutal. A ello ha contribuido de manera apreciable la sensibilidad de prácticamente todas las variedades cultivadas de albaricoquero al virus (Martínez-Gómez y col., 2000; Rubio y col., 2008). Otras enfermedades virales que están causando graves problemas a la producción de albaricoque en España son la viruela (Rubio y col., 2013) y el Hop Stunt Viroid (Amari y col., 2007), que deprecian la calidad del fruto ocasionando importantes pérdidas económicas. Una plaga de notable incidencia en albaricoquero es el gusano cabezudo (*Capnodis tenebrionis*) capaz de provocar el debilitamiento y muerte de los árboles. Su presencia y difusión a nuevas zonas se ha multiplicado en los últimos años.

Otro aspecto que está originando serias dificultades al cultivo y producción de albaricoque en nuestras áreas de cultivo en los últimos años, es la auto-incompatibilidad floral de buena parte de las nuevas variedades introducidas.

Esta circunstancia está teniendo consecuencias extraordinariamente negativas en la producción, bien porque se han realizado muchas plantaciones con una sola variedad que resultó ser auto-incompatible, siendo en estos casos la pérdida de cosecha casi total, y en otras ocasiones los problemas derivan de que la variedad polinizadora aconsejada no ha sido testada como tal en las condiciones climáticas del área de cultivo de que se trate, resultando que la coincidencia en la época de floración es escasa, y por tanto, también la idoneidad de la combinación.

En el actual proceso de renovación varietal, también se está produciendo un serio problema de adaptación de muchas de las nuevas variedades introducidas en las diferentes áreas de cultivo, motivado en la mayoría de los casos por las elevadas necesidades de frío invernal de muchas de estas variedades foráneas, aspecto que no se tiene suficientemente en consideración y que origina serias pérdidas de producción.

Finalmente, en lo relativo a calidad del fruto, las nuevas exigencias de los mercados demandan una tipología de fruto caracterizado por un elevado atractivo, con coloración de piel y pulpa anaranjada y chapa roja, así como elevada calidad gustativa. Las variedades tradicionales de albaricoquero, si bien muchas de ellas presentan una elevada calidad gustativa, adolecen de color para su exportación a los mercados europeos.

Por su parte, muchas de las nuevas variedades introducidas en los últimos años, aunque presentan una atractiva coloración, muestran una deficiente calidad gustativa. Por tanto, se hace indispensable el cultivo de variedades que integren todas las características deseables desde el punto de vista de la calidad del fruto que demandan los canales de distribución y los propios consumidores, asegurando así la rentabilidad futura del albaricoque.

En el contexto de dificultades descrito y problemáticas asociadas al cultivo del albaricoquero, la mejora varietal de la especie está siendo cada vez más demandada por el sector productor y exportador, con el objetivo de paliar las problemáticas señaladas y obtener nuevas variedades que aúnen todas las características deseadas por productores, distribuidores y consumidores.

## 1.2. Conceptos y herramientas moleculares para la mejora genética

En la expresión final del fenotipo se dan 4 niveles interrelacionados entre sí, que abarcan genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. Estos niveles deben ser estudiados con la intención de utilizar aquellas herramientas moleculares que más se adecuen a nuestros propósitos de mejora. A continuación pasamos a explicar brevemente cada uno de ellos.

### 1.2.1. Fenotipo

El fenotipo puede ser definido como el conjunto de caracteres observables de un individuo, resultado de la interacción entre el genotipo (información genética de un individuo) y el ambiente. El fenotipo en su conjunto define la relación de una parte del genoma con un carácter específico del individuo (Alberch, 1991). Esta definición clásica es aplicable de acuerdo a las nuevas investigaciones.

El fenotipo puede ser descrito como la expresión final del genotipo teniendo en cuenta 3 procesos interrelacionados:

- Transcripción de ADN a ARN (incluyendo transcripciones de función desconocida).
- Traducción del ARN a proteínas (jugando las enzimas un papel clave en los procesos biológicos).
- Interacción con el medio ambiente y expresión final.

### 1.2.2. Genómica

La genómica concierne el estudio de la estructura y función del genoma de los organismos vivos (Baer y col., 1984). El genoma de la planta está compuesto por nucleótidos o pares de bases (adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G)) que se organizan en diferentes cromosomas dentro del núcleo celular. El ADN genómico incluye tanto ADN codificante (genes con función fenotípica) y no codificante (Scherrer y Jost., 2007). Dentro del ADN codificante encontramos dos tipos de regiones, una son los exones (región expresada que se transcribe a pre-ARN mensajero) y el resto son intrones (inserciones que no aparecen en el ARNm maduro).

Los primeros estudios genómicos en *Prunus* estuvieron orientados hacia el desarrollo de marcadores de ADN (marcadores moleculares) para la caracterización molecular (estructura genómica) y su relación con caracteres agronómicos (funciones genómicas) mediante la construcción de mapas de ligamiento genético y análisis de QTLs (Quantitative Trait Loci). Las poblaciones que generalmente han sido evaluadas a través de estos estudios son del tipo F1, F2 y BC1 con una alta diversidad y bajos niveles de desequilibrio en el ligamiento, teniendo en cuenta la estructura genética y el nivel de heterocigosidad de las especies de *Prunus*, principalmente en el caso del almendro, ciruelo o cerezo (Arús y col., 2005; Martínez-Gómez y col., 2003; Collard y Mackill., 2008; Sorkheh y col., 2008).

Estos estudios de ADN se iniciaron en 1990 con el uso de los marcadores RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), que suponen un método eficiente por su naturaleza co-dominante e ilimitado número de marcadores. Sin embargo, la aplicación de estos marcadores ha sido limitada debido a la complejidad y el tiempo necesario para su aplicación (Arús y col., 2005; Martínez-Gómez y col., 2007; Peace y Norelli, 2009).

La utilización de la PCR (Polymerase Chain Reaction) ha incrementado las posibilidades de la caracterización y mapeo genético (Martínez-Gómez y col., 2003). Los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) fueron los primeros marcadores de PCR ensayados, pero su naturaleza dominante y baja repetibilidad ha limitado su uso. Los AFLPs (Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism) son una potente herramienta tecnológica para estudios de huella genética mediante PCR. Estos AFLPs tienen mayores ventajas sobre los RAPDs ya que permiten el análisis de un mayor número de locis por experimento, así como también presentan mayor reproducibilidad. Sin embargo, los AFLPs son de difícil aplicación debido al tiempo necesario para su aplicación rutinaria (Sorkheh y col., 2007).

Por ello, los marcadores SSR (Simple Sequence Repeat) también llamados microsatelites han llegado a ser los marcadores de elección para la identificación genotípica y mapeo genético en *Prunus* debido fundamentalmente a su alto polimorfismo, abundancia, naturaleza co-dominante y transferebilidad (Gupta y col., 1996; Martínez-Gómez y col., 2003; Arús y col., 2005).

Recientemente, se han ido desarrollando marcadores moleculares basados en la secuenciación de ADN (marcadores de nueva generación) desarrollados en especies de *Prunus* incluyendo los ESTs (Expressed sequence tags) y SNPs (Single nucleotide polymorphisms).

El desarrollo de los ESTs fue iniciado en melocotonero en 2002 (Yamamoto y col., 2002) y ha sido aplicado a otras especies como albaricoquero (Decroocq y col., 2003) y almendro (Jiang y Ma, 2003). Debido a la abundancia y polimorfismo de los marcadores tipo SNP, éstos han llegado a ser junto con los SSRs los marcadores de elección para el mapeo genético y análisis de QTLs en *Prunus* (Tavassolian y col., 2010).

Además, la reciente secuenciación completa del genoma del melocotonero realizada por el IPGI [*Prunus persica* genome (v1.0)] (<http://www.rosaceae.org>) posibilita nuevas perspectivas en la mejora de especies del género *Prunus*. Peach v1.0 consiste en 8 pseudomoléculas (scaffolds) que representan los 8 cromosomas del melocotonero, numerados de acuerdo a sus correspondientes grupos de ligamiento (Sosinski y col., 2010). El genoma del melocotonero fue inicialmente estimado en 280.000.000 pb (280 Mpb) (Baird y col., 1994), aunque la reciente secuenciación del genoma del melocotonero indica un total de 227 Mpb (Verde y col., 2013).

El tamaño de este genoma es relativamente pequeño dentro del reino *Plantae*, ya que los genomas oscilan entre los 125 Mpb de *Arabidopsis thaliana* L. Heynh a los 35.817 Mpb del lirio (*Lilium longiflorum* Duch) (157,78 veces más grande que en *Prunus*) (Bennett y Leitch, 2011) (Martínez-Gómez y col, 2012).

### 1.2.3. Transcriptómica

La transcriptómica es la disciplina relacionada con el análisis del transcriptoma, el cual, incluye los nucleótidos adenina (A), citosina (C), guanina (G) y uracilo (U), expresados en células, tejidos y en todo el organismo (Velculescu y col., 1997). El ARN incluye ARN codificante y no codificante. El ARN es una estructura biológica menos estable que transmite de forma selectiva la información genética del ADN a diferentes tiempos y diferentes tipos de células (Atkins y col., 2011; Darnell, 2011).

El ADN se transcribe a ARN mensajero (ARNm), el cual supone el 5 % del total, ARN no codificante que incluye el ARN ribosomal (ARNr) que es alrededor de un 85 %, ARN transferencia (ARNt) en torno a un 10 % y ARN de regulación (menos del 5 %).

En las especies de *Prunus*, los primeros estudios de transcriptómica comenzaron a finales de 1990 con el desarrollo de los marcadores ESTs previamente mencionados, el desarrollo de ADNc-AFLP y el análisis de varios genes candidatos (CGs). Posteriormente, las nuevas estrategias de análisis masivo de transcriptomas (tecnologías de alto rendimiento) han sido aplicadas produciendo una gran cantidad de datos de expresión de genes en un único experimento.

En el análisis masivo de transcriptomas, se usan biochips de ADNc (microarrays) para analizar miles de genes por hibridación de ARNm marcado con fluorescencia. Además, la secuenciación de transcriptomas ha experimentado un gran avance mediante las nuevas tecnologías como el RNA-Seq, el cual ha reducido los costes de secuenciación del ADN (en el caso del ADNc) y podría ser más adecuado que la aplicación de microarrays ya que está empezando a ser aplicado en las especies de *Prunus* (Martínez-Gómez y col., 2011).

Con respecto a la regulación transcripcional y maduración de pre-ARNm (incluyendo el 'splicing', proceso de corte y empalme de ARN), en el caso de *Prunus*, se calcula que cientos de miles de proteínas (casi 1 millón) se pueden crear a partir de 27.852 genes (Peace y Norelli, 2009). Sin embargo, existe mucho desconocimiento sobre los procesos de 'splicing' que tienen lugar en estas especies. Sosinski y col. (2010) describieron 838 procesos de 'splicing' alternativos en un total de 26.689 genes codificadores de proteínas descritos en el genoma de referencia del *Prunus* (<http://www.rosaceae.org>).

Finalmente, la regulación de mecanismos post-transcripcionales ha sido descrita en *Prunus* en sólo dos caracteres agronómicos importantes como son la resistencia a *Plum pox virus* (Zagrai y col., 2008; Di Nicola-Negri y col., 2010) y fecha de floración (Leida y col., 2012) (Martínez-Gómez y Rubio, 2012).

#### 1.2.4. Proteómica

Esta disciplina concierne al estudio del proteoma, lo que incluye todas las proteínas presentes en células, tejidos y todos los organismos vivos (incluyendo las plantas) expresadas por el genoma (Pandey y Mann, 2000). Los estudios en plantas relacionados con proteómica son más escasos que los realizados a nivel de genoma o transcriptoma. La proteómica incluye la identificación y clasificación de todas las proteínas en las células, la función de los genes sobre la base de la estructura de proteínas y el análisis global de las interacciones proteína-proteína (Pukkila, 2011).

Las proteínas son moléculas activas involucradas en procesos estructurales, funcionales, de almacenamiento y transporte. Las proteínas incluyen a las enzimas que actúan como catalizadores en el inicio de la aceleración de las reacciones bioquímicas de las unidades estructurales (Cozzone, 2010; Pandey y Mann, 2000). El proteoma tiene al menos 2 niveles de complejidad ausentes en el genoma. Aunque el genoma está definido por la secuencia de nucleótidos, el proteoma no puede estar limitado a la suma de secuencias de las proteínas presentes. El conocimiento del proteoma requiere conocer las estructuras, funciones e interacciones entre proteínas. Estas interacciones proteína-proteína son la clave de la expresión fenotípica (Pandey y Mann, 2000).

Aunque las especies de *Prunus* pueden tener miles de genes (27.852 genes estimados en melocotón por Sosinski y col., 2010), contienen cientos de miles de diferentes proteínas (estimadas por Peace y Norelly, 2009), incluyendo las enzimas con funciones fenotípicas. La tecnología para el análisis global del proteoma ha sido utilizada desde mediados de 1970 en especies de *Prunus*. Las isoenzimas fueron los primeros marcadores proteómicos (también llamados marcadores moleculares) ampliamente utilizados en *Prunus* (Martínez-Gómez y Rubio, 2012).

#### 1.2.5. Metabolómica

La metabolómica estudia las moléculas involucradas (metabolitos) en el metabolismo de las plantas y organismos vivos. Esta nueva disciplina está relacionada con el uso del análisis de la secuencia del genoma para determinar la capacidad de células, tejidos o todo el organismo para la síntesis extracelular de pequeñas moléculas o metabolitos (Fiehm, 2002).

Metabolómica y proteómica tienen un gran potencial para averiguar procesos biológicos, siendo incorporadas nuevas herramientas moleculares al respecto. Los modelos de rutas bioquímicas de regulación del genoma, indican que los genes abren y cierran diferentes rutas metabólicas involucradas en el crecimiento, formación del fruto, adaptación climática, resistencia a plagas y enfermedades y síntesis primaria (directamente involucrada con el crecimiento, desarrollo y reproducción) y secundaria (indirectamente involucrada en estos procesos) de metabolitos (Fridman y Pichersky, 2005; Schauer y Fernie, 2006).

En este momento, la cromatografía de gases junto con la espectrometría de masas son las herramientas más importantes en el análisis no específico de metabolitos. En cuanto al estudio del metabolismo en especies de *Prunus* hay que decir que se encuentra aún en fase de desarrollo (Peace y Norelli, 2009) (Martínez-Gómez y Rubio, 2012).

#### **1.2.6. Técnicas de secuenciación masiva de genomas y transcriptomas**

La secuenciación del ADN ha cambiado nuestra visión de la biología de las plantas y ha desempeñado un papel importante en la investigación biológica moderna. Sin embargo, pasaron más de 25 años desde el descubrimiento de la estructura del ADN (en los años 1950) hasta el desarrollo de métodos eficaces para la determinación de su secuencia en el genoma.

En los años 70 se inició la carrera de la secuenciación del ADN con el método Sanger, que usaba dideoxinucleótidos que interrumpían la polimerización del ADN dando lugar a fragmentos de diferente longitud a partir de los que se deducía la secuencia. Este método era caro, lento, tóxico y con una limitada capacidad de lectura de unas 80 bases. A finales de los 90 se emplearon dideoxinucleótidos marcados con diferentes colorantes lo que agilizó la lectura del ADN permitiendo leer secuencias de hasta 1000 bases.

Durante estos años aparecieron las técnicas de secuenciación de segunda generación, basadas en la generación de miles de reacciones de secuenciación en paralelo inmovilizadas en una superficie sólida lo que disminuye los requerimientos de reactivos y la necesidad de clonar los fragmentos de ADN, abaratando así los costes (National Human Genome Research Institute) permitiendo el inicio de las técnicas de secuenciación masiva.



Durante los últimos años, las llamadas metodologías de alto rendimiento para la secuenciación del ADN (DNA-Seq, en 2005) y ADNc proveniente del ARN (RNA-Seq, en 2008), están causando una revolución en la investigación biológica. Además, la tercera generación de estos ultra secuenciadores pretende ser capaz de determinar la composición de bases de ADN de una sola célula. En estos momentos disponemos de información precisa sobre la constitución de ADN o ARN de una planta sin necesidad de un clonaje previo. Las nuevas tecnologías de secuenciación están generando una enorme cantidad de datos cuyo manejo y almacenamiento son posibles mediante un desarrollo similar de los medios informáticos (McGettigan, 2013).

La secuenciación masiva del genoma se ha utilizado mayoritariamente para la identificación de Single nucleotide polymorphisms (SNPs). Ahmad y col. (2011), tras secuenciar dos genotipos de melocotonero identificaron 6.654 SNPs distribuidos por el genoma. Además, desde la plataforma de secuenciación Illumina se han desarrollado chips con numerosos SNPs obtenidos mediante secuenciación masiva del genoma. Un primer chip con 9.000 SNPs identificados mediante la secuenciación masiva de 56 genotipos de melocotonero fue desarrollado (peach 9K SNP array v1) para estudios de caracterización molecular (Verde y col., 2012). Posteriormente, Peace y col. (2012) verificaron otros 3.883 SNPs polimórficos en 24 genotipos de cerezo dulce y ácido (cherry 6K SNP array v1).

Estos SNPs se pueden asociar a caracteres agronómicos de interés mediante análisis de QTLs (Quantitative Trait Loci). En este sentido Pirona y col. (2013) han identificado SNPs ligados al gen que controla la época de maduración en melocotonero en el cromosoma 4 y Vendramin y col. (2014) el gen que controla el carácter de la vellosoidad de la piel (melocotón/nectarina, *G*) en el cromosoma 5. Además están comenzando los estudios de resecuenciación de diferentes genotipos de distintas especies de *Prunus* como almendro, melocotonero o cerezo, al objeto de comparar regiones del genoma de interés agronómico (Koepke y col., 2013).

Por otro lado, la secuenciación masiva del transcriptoma también está sirviendo para identificar SNPs en estas regiones exónicas, coincidiendo en muchos casos con genes que han sido anotados en el genoma de referencia del melocotonero, los cuales pueden ser asociados a caracteres agronómicos de interés mediante análisis de QTLs.

Koepke y col. (2012) identificaron 2.243 SNPs en cerezo y Wang y col. (2013) identificaron otros 9.587 SNPs en melocotonero. Es necesario indicar que la frecuencia de SNPs es mayor en el caso de regiones no codificantes (intrones y secuencias espaciadoras) (un SNP cada 390 pb) (Aranzana y col., 2012) que en las codificantes (exones), un SNP cada 598 pb (Wang y col., 2013).

Además, en el caso de especies del género *Prunus*, la secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq) ha sido aplicada en melocotonero para facilitar y aislar genes que controlan diferentes caracteres agronómicos del árbol y el fruto (Wang y col., 2013; Chen y col., 2014). También se ha utilizado para estudiar los genes implicados en la patogénesis de *Xanthomonas arboricola* en melocotonero (Socquet-Juglard y col., 2013). En otras especies, esta tecnología ha sido utilizada en el análisis de expresión génica de la dormancia de la yema en albaricoquero japonés (*P. mume* Sieb. et Zucc.) (Zhong y col., 2013) y el desarrollo del fruto en cerezo dulce (Alkio y col., 2014). Además nuestro equipo ha secuenciado transcriptomas de albaricoquero y melocotonero, estudiando la patogénesis a sharka (*Plum pox virus*) en melocotonero, y la expresión diferencial a la resistencia/susceptibilidad a sharka en albaricoquero.

La aplicación de técnicas de secuenciación masiva, tanto de genomas como de transcriptomas está cada vez más presente en los programas de mejora de frutales del género *Prunus* de todo el mundo, cuya finalidad es conocer las regiones del genoma responsables de los caracteres de interés agronómico y desarrollar estrategias de selección asistida por marcadores. A nivel genómico (ADN) esta aplicación está permitiendo la identificación de SNPs que pueden estar ligados a estos caracteres, permitiendo además la comparación de regiones del genoma que pueden ser las responsables de los caracteres de interés.

A nivel transcriptómico (ARN) estas técnicas de secuenciación masiva están sirviendo para identificar SNPs además de realizar estudios de expresión diferencial de genotipos conducentes a la identificación de los genes responsables de las diferencias observadas a nivel fenotípico (Martínez-Gómez y col., 2012).

### **1.3. Mejora genética del albaricoquero**

La mejora de los frutales de hueso puede estar orientada tanto a variedades como a portainjertos. Los principales objetivos de la mejora varietal en frutales, incluido el albaricoquero, se pueden agrupar en dos grandes grupos: mejora contra estreses bióticos (resistencia a plagas y enfermedades) y mejora de las características agronómicas (adaptabilidad al medio, mejora de la productividad y mejora de la calidad del fruto).

#### **1.3.1. Programas de mejora genética**

Uno de los problemas más importantes en los últimos años en albaricoquero ha sido la aparición y difusión del virus de la Sharka (PPV), que ha reducido los niveles de producción drásticamente. Esta situación se ha visto agravada por la inexistencia de métodos de lucha eficaces y la susceptibilidad de la mayor parte de los genotipos europeos. Esto impulsó la aparición de programas de mejora genética en Francia (Audergon, 1995), Italia (Bassi y col., 1995) y Grecia (Karayiannis y col., 1999) dirigidos todos ellos a la obtención de nuevas variedades resistentes.

En España también se pusieron en marcha programas públicos de mejora genética de albaricoquero a principios de los años 90. Los centros de investigación que están abordando estos programas están radicados en Murcia (CEBAS-CSIC) (Egea y col., 1999) y Valencia (IVIA) (Badenes y col., 2002), las dos regiones españolas con mayor producción de esta especie. Ambos programas han tenido desde un primer momento una clara orientación en el sentido de buscar variedades con resistencia a sharka y elevada calidad de fruto. Los programas del CEBAS-CSIC y el IVIA son los únicos que prestan especial atención a la problemática de la sharka. No obstante, en los últimos 20 o 30 años se ha llevado a cabo un trabajo notable de obtención de nuevas variedades a nivel internacional.

Destacan centros como la universidad de New Jersey (EE.UU.), el USDA en Fresno (California, EE.UU.) o los obtentores privados Zaiger y Bradford también en California. En Europa, el INRA de Avignon (Francia) y las universidades de Pisa, Bolonia y Nápoles (Italia) han desarrollado programas de mejora de la especie, aunque la atención a la sharka ha sido menor.

En Europa hay importantes empresas ofertando variedades que a veces son resultado de su propio esfuerzo investigador y otras son meros editores de otros obtentores. Es el caso de Cot International e IPS (Francia), o PSB (España), aunque como hemos señalado su oferta de resistencia a sharka es escasa o nula.

Los objetivos principales de los programas de mejora públicos del albaricoquero en Murcia (CEBAS-CSIC) y Valencia (IVIA) son la obtención de variedades resistentes a sharka, con bajas necesidades de frío, auto-compatibles y con una buena calidad del fruto. En todos los casos, la mejora se basa principalmente en la introgresión de genes mediante mejora tradicional. En el caso de la sharka, esta mejora se halla limitada en gran parte por la escasez de fuentes de resistencia.

Estos programas han estado buscando hasta la fecha la introducción de la resistencia al virus de la sharka mediante metodología convencional, realizando cruzamientos intervarietales a partir de variedades norteamericanas resistentes al virus, como 'Goldrich' y 'Orange Red'. Algunos de estos cultivares muestran problemas tales como altas necesidades de frío y auto-incompatibilidad floral, caracteres no deseables en los programas de mejora genética europeos.

Recientemente, el uso de herramientas moleculares adecuadas junto a la construcción de mapas de ligamiento genético desarrollados en especies del género *Prunus* han posibilitado un avance sustancial en el desarrollo de marcadores moleculares ligados a caracteres de interés para su utilización en mejora asistida en los programas de mejora genética. En el caso del virus de la sharka, se han desarrollado marcadores ligados a la resistencia al virus (Soriano y col., 2011 y 2012), los cuales se están validando para su utilización en mejora asistida en albaricoquero (Rubio y col., 2014).

Por otra parte, el desarrollo de un método de selección basado en la determinación de los alelos de compatibilidad mediante PCR alelo específica, ha simplificado enormemente el proceso de evaluación en especies del género *Prunus* (Sutherland y col., 2004), incluido el albaricoquero (Romero y col., 2003). En nuestro programa se han establecido mediante PCR las dotaciones alélicas de las nuevas variedades a fin de conocer cuáles son auto-compatibles, y en el caso de auto-incompatibilidad, cuáles pueden resultar inter-compatibles.

Desde el punto de vista de obtención de nuevas variedades, el programa de mejora del IVIA, liderado por la Dra. Badenes, ha generado 6 nuevas variedades de albaricoquero: 'Rafel', 'Belgida', 'Moixent', 'Dama Vermella', 'Dama Taronja' y 'Lucentus', caracterizadas las tres primeras por su resistencia al virus de la sharka (Martínez-Calvo y col., 2010 y 2011). El programa de mejora del CEBAS-CSIC, liderado por el Dr. Ruiz y Dr. Egea, ha registrado a nivel europeo hasta la fecha 13 nuevas variedades: 'Rojo Pasión', 'Murciana', 'Selene', 'Dorada', 'Toñi', 'Sublime', 'Estrella', 'Maravilla', 'Rosa', 'Valorange', 'Mirlo Blanco', 'Mirlo Anaranjado' y 'Mirlo Rojo' (Egea y col., 2004ab; 2005ab; 2009; 2010b; Ruiz y col., 2010a), que están teniendo una amplia comercialización en España.

Sus fechas de maduración van desde primeros de mayo hasta el 6-8 de junio, a excepción de Dorada que madura a finales de junio. Con ellas se trata de paliar las deficiencias que presentan las variedades tradicionales cultivadas. Estas nuevas variedades se caracterizan por su elevada calidad de fruto, cubrir el periodo productivo, resistencia a Sharka (*Plum pox virus*, PPV) ('Mirlo blanco', 'Mirlo anaranjado', 'Mirlo rojo', 'Rojo Pasión' y 'Murciana') y auto-compatibilidad (excepto Sublime, Estrella, Maravilla y Rosa).

En estos momentos el programa de mejora del CEBAS-CSIC trata de cubrir nuevos objetivos tales la obtención de nuevas variedades con bajas necesidades de frío y maduración extratemprana, carácter de gran importancia en áreas como la nuestra, así como la obtención de nuevos materiales de maduración tardía (finales de junio) con la finalidad de extender el periodo productivo. Además el otro gran objetivo es incrementar la calidad del fruto a nivel pomológico y organoléptico. Es precisamente dentro de este importante objetivo donde se centra el presente trabajo, mediante el desarrollo de las herramientas moleculares más adecuadas para la caracterización del genotipo y su relación con el fenotipo, avanzando así hacia lo que conocemos como mejora asistida por marcadores moleculares.

### **1.3.2. Mejora genética de la calidad del fruto**

La calidad del fruto es uno de los objetivos más importantes en todos los programas de mejora genética de la especie albaricoquero, aunque debemos destacar que la calidad es un concepto muy complejo que depende de muchos caracteres y factores que pueden ser distintos para cada variedad y para cada uso (Llácer y col., 2006).

En resumen, un fruto de calidad debe reunir una buena apariencia externa (tamaño, forma, color de piel, color de pulpa, presencia de chapa, etc.), elevada calidad gustativa (sabor, aroma, textura), un buen comportamiento poscosecha (grado de madurez y firmeza), seguridad alimentaria y valor nutritivo y nutracéutico. Lógicamente, estos atributos varían en función del destino de la fruta (consumo en fresco, conserva o deshidratados).

Los trabajos específicos en albaricoquero referidos a los caracteres que definen la calidad del fruto son bastante escasos. Souty y col. (1990) indicaron como criterios fundamentales el calibre, color, firmeza, resistencia a la manipulación, sabor, aroma y textura. La suma de azúcares, ácidos orgánicos, cantidad de compuestos volátiles, así como el color, tamaño y textura, son los determinantes de las propiedades sensoriales según Parolari y col. (1992). Por su parte, Gurrieri y col. (2001) consideran la firmeza, la apariencia y el sabor como los determinantes principales de la calidad en albaricoque.

En la especie albaricoquero existe una gran diversidad genética con respecto a los caracteres asociados a la calidad del fruto, fundamentalmente debido a los diferentes orígenes genéticos de las variedades cultivadas (Byrne y Littleton, 1989; Audergon y col., 1991a; Mehlenbacher y col., 1991; Ledbetter y col., 1996; Asma y Ozturk, 2005). Esto nos permite sin lugar a dudas la disponibilidad de una gran fuente de recursos fitogenéticos para la mejora de la calidad del fruto en albaricoquero.

La caracterización pomológica de selecciones o variedades de albaricoquero ha sido abordada por diversos autores (Lapins, 1957; Mehlenbacher y col., 1991; Souty y col., 1991; Audergon y col., 1990 y 1991a; Bassi y Negri, 1991; Guerriero y col., 1995; Ledbetter y col., 1996; Witherspoon y Jackson, 1996; Bassi y col., 1996; Badenes y col., 1998; Gäeteau, 1998; Gurrieri y col., 2001; Kazankaya, 2002; Azodanlou y col., 2003, Ruiz y Egea, 2008) con diferentes objetivos: avanzar en el proceso de selección en el marco de un programa de mejora varietal, descripción de las características del fruto de determinados cultivares, o bien con la finalidad de profundizar en la transmisión y expresión de diferentes caracteres pomológicos.

Ruiz y Egea (2008) estudiaron los atributos de calidad del fruto durante 2 años consecutivos en 43 selecciones y variedades de albaricoquero procedentes de diferentes orígenes genéticos y cultivadas en clima mediterráneo, describiendo una elevada diversidad fenotípica respecto a los diferentes caracteres pomológicos evaluados. Asimismo, se observó la alta correlación existente entre algunos atributos de calidad en albaricoquero y se establecieron grupos de genotipos similares dependiendo de sus características de calidad. La obtención de nuevos cultivares que mejoren la calidad del fruto de las variedades actuales conlleva una gran dificultad, especialmente debido a la gran cantidad de caracteres implicados (Audergon y col., 1990; Bailey y Hough, 1975; Bassi y Bartolozzi, 1993; Crossa-Raynaud y Audergon, 1991).

Hasta la fecha, la mejora genética de la calidad del fruto en albaricoquero ha sido abordada en los diferentes programas de mejora únicamente mediante la selección de los mejores fenotipos que reúnen las características deseadas. Para ello, es necesario diseñar previamente los cruzamientos intervarietales más idóneos con la utilización de parentales caracterizados por una elevada calidad del fruto (Egea y Burgos, 1996).

Posteriormente, un pilar clave en la mejora genética de cualquier frutal y particularmente en albaricoquero, es la realización de un buen fenotipado de las descendencias obtenidas con una exhaustiva evaluación de todos aquellos caracteres de tipo fenológico, físico y bioquímico de interés, aportando la máxima información posible sobre la calidad final del fruto que permita la selección de aquellos genotipos que reúnen todas las características deseables por productores y satisfagan las preferencias del consumidor.

La calidad del fruto de las nuevas selecciones fue uno de los objetivos prioritarios planteados en el programa de mejora varietal de la especie albaricoquero que se viene desarrollando en el CEBAS-CSIC de Murcia (Egea y Burgos, 1999), siendo conscientes que la satisfacción del consumidor, y por tanto la rentabilidad del agricultor y distribuidor, está íntimamente ligada a la oferta de un albaricoque de calidad.

Para lograr estas premisas, en la mayoría de los cruzamientos intervarietales desarrollados en el marco del programa de mejora se utilizaron parentales caracterizados por una elevada calidad gustativa de fruto (Egea y Burgos, 1996), como es el caso de 'Orange Red' y el grupo de variedades autóctonas de Murcia denominadas "Clases", al que pertenecen 'Moniquí', 'Pepito del Rubio', 'Gitano' o 'Colorao'. La finalidad es aunar en los descendientes todas las características positivas deseadas, siendo estas variedades autóctonas cruzadas con otros parentales que destacan por su gran atractivo y productividad, tales como 'Goldrich', o 'Bergeron'.

En los últimos años se está avanzando hacia el desarrollo de herramientas moleculares que permitan en un futuro la selección asistida por marcadores moleculares de cualquier carácter de calidad. Sin embargo, el carácter poligénico y herencia cuantitativa de la mayoría de los caracteres asociados a calidad del fruto dificulta notablemente estas líneas de trabajo.

### **1.3.3. Mapeo genético, análisis de QTLs y genes candidatos**

Diferentes estudios han sido realizados para identificar las regiones genómicas involucradas en caracteres de calidad del fruto, relacionando datos fenotípicos de diferentes progenies de *Prunus* con los correspondientes mapas genéticos.

La identificación de QTLs relacionados con estos caracteres constituye una primera aproximación tendente a identificar los locus ligados a la expresión de los caracteres de calidad y que permitan el desarrollo de marcadores específicos para dichos caracteres, lo que ofrece la oportunidad de optimizar los programas de mejora en *Prunus* para calidad de fruto mediante la selección asistida por marcadores (MAS). Estos estudios evidencian la complejidad de la regulación genética de estos caracteres y su naturaleza poligénica. Las líneas de investigación más recientes han sido enfocadas hacia la secuenciación completa de los genomas de *Prunus* para desarrollar marcadores moleculares más eficientes en la mejora de la calidad del fruto.

El mapeo de poblaciones segregantes para caracteres de interés ha sido la principal línea de investigación para el análisis de la relación carácter-marcador en *Prunus*. El análisis de la cosegregación entre caracteres y marcadores hace posible establecer en el mapa la posición de los genes y QTLs responsables de esta expresión.



Inicialmente, se obtuvo un mapa de ligamiento genético saturado en *Prunus*, usando una población F2 procedente del cruzamiento entre la variedad de almendro 'Texas' y el melocotonero 'Earlygold' ('T×E'), identificándose como mapa de referencia en *Prunus* (Arús y col., 1994).

El mapa de 'T×E' se ha mejorado progresivamente, añadiendo más marcadores relacionados con calidad de fruto (Aranzana y col., 2003). En estos momentos el mapa incluye 562 marcadores que cubren una distancia de 534 cM (0,92 cM/marcador) (Dirlewanger y col., 2004). Además, una estrategia reciente para localizar nuevos marcadores en un mapa de ligamiento genético establecido es el mapeo selectivo. Esta técnica permite mapear con submuestras de plantas de una población partiendo de un mapa ya disponible. La ventaja de esta estrategia es el mapeo en menos tiempo, mayor rentabilidad, y es adecuada para la construcción de mapas altamente saturados.

El mapa de referencia ha sido dividido en 67 regiones (8-25 cM) para localizar los futuros marcadores (Howad y col., 2005). Por ejemplo, estos autores han incorporado 151 marcadores microsatélites (SSRs) dentro del mapa de referencia de *Prunus* usando sólo 6 individuos procedentes de la población de 65 individuos 'Texas' × 'Earlygold'. De forma similar, los marcadores moleculares observados en diferentes mapas de especies de *Prunus* comparados con 'T×E' (Aranzana y col., 2003), sugieren un alto nivel de sintenia dentro del género *Prunus* (Jung y col., 2009). Esta sintenia ha sido también estudiada en especies de *Prunus* en relación con la familia *Rosaceae* (Dirlewanger y col., 2004; Arús y col., 2006).

Así pues, los SSRs están siendo utilizados ampliamente para el mapeo genético por su alto polimorfismo y sintenia entre especies del mismo género así como para la detección de QTLs en melocotonero, almendro, cerezo y albaricoquero (Yamamoto y col., 2001; Etienne y col., 2002; Verde y col., 2002; Quilot y col., 2004; Bliss y col., 2002; Dirlewanger y col., 2006 y 2009; Ogundiwin y col., 2009; Cantín y col., 2010; Fan y col., 2010; Eduardo y col., 2011; Sánchez-Pérez y col., 2007 y 2012; Dondini y col., 2007 y 2011; Wang y col., 2000; Zhang y col., 2010), siendo el melocotonero el cultivo de referencia (Infante y col., 2008).

En los últimos años, 25 genes monogénicos y QTLs ligados a calidad de fruto han sido mapeados (Dirlewanger y col., 1999; 2004; 2006; Abbot y col., 1998; Bliss y col., 2002; Etienne y col., 2002). Más recientemente, Ogundiwin y col. (2009) construyeron un mapa de ligamiento genético de 211 marcadores para una población intraespecífica de melocotonero, 'Pop-DG', derivada de un cultivar para conserva 'Dr. Davis' y un cultivar para el consumo en fresco, 'Georgia Belle'.

En el caso del albaricoquero, han sido desarrollados dos nuevos mapas de ligamiento genético ('Goldrich' × 'Moniquí' y 'Lito' × 'BO8164311') en el proyecto ISAFRUIT. Ambas poblaciones fueron caracterizadas durante 2 años consecutivos para los caracteres físicos y bioquímicos relacionados con la calidad del fruto, tales como fecha de floración y maduración, peso del fruto, firmeza, color, peso de la semilla, adhesión de la pulpa, acidez y sólidos solubles. Los mapas de ligamiento genético de cada población, fueron construidos usando 85 SSRs cubriendo aproximadamente 467 cM, y el análisis de QTLs fue realizado para todos los caracteres estudiados relacionados con la calidad del fruto (Ruiz y col., 2010b). Varios QTLs, distribuidos en todos los grupos de ligamiento fueron detectados en ambas poblaciones observando también una buena estabilidad entre años. En este trabajo se identificaron QTLs ligados a fecha de floración, fecha de maduración, peso del fruto, color de piel, peso de la semilla, acidez y contenido en sólidos solubles.

Para la obtención de mapas de ligamiento genético más saturados que nos permitan cubrir zonas más amplias del genoma se pueden emplear técnicas de PCR múltiple como es el caso de Hayden y col. (2008) en cebada o el caso de Campoy y col. (2010) en albaricoquero, obteniendo un mayor rendimiento en la caracterización de poblaciones. La optimización y uso de este tipo de técnicas abren sin duda alguna nuevas perspectivas en el uso de los marcadores tipo SSR para mejoradores y genetistas, multiplicando la eficiencia y reduciendo el coste de los análisis.

Sin embargo, los últimos avances tecnológicos en el genotipado de especies, fundamentalmente con el uso de los SNPs, han dado lugar a una importante disminución tanto del tiempo como de los costes del genotipado (Tavassolian y col., 2010; Ahmad y col., 2011; Dhanapal y col., 2012; Klagges y col., 2013; Martínez-García y col., 2013a, 2013b). Uno de los métodos de genotipado de alto rendimiento más actuales es la técnica SNPlex™ basada en el uso combinado de la PCR y el secuenciador capilar (De la Vega y col., 2005; Lijavetky y col., 2007) o la espectrometría de masas (Chen y col., 2012).

El estudio de los genes candidatos (CGs) está basado en la identificación y mapeo de secuencias de ADN que corresponden a genes estructurales o reguladores de funciones biológicas que han mostrado estar relacionados con caracteres de interés. Si la posición en el mapa de estas secuencias co-localizan con “major genes” o QTLs para este carácter, la relación causa-efecto de estas secuencias de genes con un fenotipo específico se puede demostrar mediante estudios adicionales de mapeo selectivo, asociaciones genéticas o complementación genética.

El uso de genes candidatos fue inicialmente enfocado para investigar genes relacionados con resistencia a enfermedades (Leister y col., 1996) y más tarde para muchos otros caracteres (Stevens y col., 2007; Costa y col., 2008; Remay y col., 2009). En *Prunus*, los genes candidatos han sido enfocados para identificar el locus de auto-incompatibilidad (Ushijima y col., 2003), el gen de la endopoligalacturonasa involucrado en la textura del fruto del melocotón (Lester y col., 1996; Peace y col., 2005) y también en la identificación de regiones del mapa involucradas con resistencia a enfermedades.

Otros trabajos interesantes que se han desarrollado en los últimos años con el objetivo de identificar genes candidatos potencialmente implicados en la expresión de caracteres de interés son Pirona y col. (2013) en melocotonero, donde se localizan importantes genes candidatos que controlan más del 90 % de la variación del carácter de fecha de maduración o Sooryapathirana y col. (2010) para el color de piel y pulpa de cerezo.

Sin embargo, sólo unos pocos estudios han sido desarrollados para determinar la expresión diferencial de genes durante la maduración en albaricoquero. Estos trabajos han hecho posible la identificación de genes candidatos que codifican una ACC oxidasa, la cual está involucrada en la biosíntesis de etileno (Mbéguié-A-Mbéguié y col., 1999), polifenol oxidasa (Chevalier y col., 1999), enzimas involucradas en modificaciones de la pared celular relacionadas con el proceso de ablandamiento del fruto (Mbéguié-A-Mbéguié y col., 2002), biosíntesis de carotenoides (Marty y col., 2005) y enzimas involucradas en el aroma del albaricoque (González-Agüero y col., 2009). Geuna y col. (2005) identificaron genes candidatos involucrados en la pared celular, azúcares, lípidos, ácidos orgánicos y el metabolismo de las proteínas, así como genes relacionados en la señalización y transducción de señales hormonales. Por otro lado, se generaron 13.006 ESTs (expressed sequence tags) a partir del estudio del transcriptoma de la maduración del fruto en albaricoque (Grimplet y col., 2005).

Por tanto, estas herramientas junto con la reciente secuenciación completa del genoma del melocotonero (International Peach Genome Initiative, IPGI) y a partir de la identificación de regiones del genoma relacionadas con la expresión de caracteres de interés (QTLs) nos permitirán avanzar en la identificación y desarrollo de marcadores moleculares asociados a genes implicados en la expresión de calidad del fruto, facilitando así el camino hacia la selección asistida por marcadores moleculares a nivel de plántula, lo que puede suponer un enorme beneficio desde el punto de vista de la eficiencia de los programas de mejora genética.

#### **1.4. Justificación del trabajo**

La mejora genética clásica consiste en el cruzamiento de variedades con la intención de aunar en un único genotipo aquellas características que más nos interesen. Para ello, tras los cruzamientos es necesario esperar periodos de al menos 3 años para poder llevar a cabo un primer fenotipado de la población de estudio, realizando este proceso durante 2 o 3 años más. Esto supone una espera de entre 5 y 6 años para obtener unos resultados robustos del fenotipo que nos permitan la selección de genotipos de interés y por tanto la obtención de nuevas variedades.

Además, el gran desconocimiento en cuanto al modo de herencia de caracteres de calidad del fruto en albaricoquero dificulta aún más esta labor de mejora, ya que son muy pocos los estudios en albaricoquero orientados en este sentido (Couranjou, 1995; Krska y col., 2009; Ruiz y col., 2012).

La calidad del fruto de las nuevas variedades es uno de los objetivos prioritarios planteados en los programas de mejora genética en *Prunus*, y muy particularmente en albaricoquero, siendo conscientes de que la creciente competitividad de los mercados y la necesidad de innovación varietal requieren de nuevos materiales caracterizados por su elevada calidad gustativa, aspecto atractivo y resistencia a la manipulación, además de la presencia de compuestos que afecten positivamente a la salud por su capacidad antioxidante como son el contenido en carotenoides y polifenoles (Infante y col., 2011; Kaulmann y col., 2014).

Sin embargo, hasta el momento las bases genéticas y moleculares de los caracteres implicados en la calidad del fruto en *Prunus* han sido estudiadas sobre todo en melocotonero, siendo muy escasos los trabajos en la especie albaricoquero. Por ello, y especialmente en esta especie, existe la necesidad de estudios adecuados de mapeo genético y detección de QTLs con la intención de localizar zonas específicas del genoma que nos permitan identificar genes relacionados con ciertos caracteres de calidad del fruto.

La identificación de estas regiones del genoma (QTLs) relacionadas con la expresión de caracteres de interés asociados a la calidad del fruto es un trabajo indispensable a fin de evaluar la co-localización de QTL/genes candidatos. Ello nos permitirá avanzar en la identificación y desarrollo de marcadores moleculares asociados a genes implicados en la expresión de la calidad del fruto en albaricoquero. La mejora asistida mediante marcadores moleculares se hace indispensable para aumentar la eficiencia de los programas de mejora, reduciendo el tiempo de obtención de nuevas variedades, lo que supondría una importante disminución en los costes de estos programas de mejora.

### 1.5. Objetivos del trabajo

El objetivo general del trabajo es el estudio de las bases genéticas y moleculares de los principales caracteres que conforman la calidad del fruto en albaricoquero, con el fin de avanzar en el desarrollo de herramientas adecuadas para el diseño de marcadores moleculares PCR específicos que permitan su utilización en selección asistida en vivero dentro de los programas de mejora genética de especies del género *Prunus*, y específicamente en albaricoquero. El trabajo de investigación tendrá dos niveles de estudio fundamentales:

1. El fenotipado y estudio del modo de herencia de los caracteres más importantes desde el punto de vista de la fenología y la calidad del fruto en albaricoquero, cuyos resultados además serán de gran utilidad para el diseño de futuros cruzamientos dentro del programa mejora.
2. La caracterización molecular mediante el mapeo genético de marcadores moleculares tipo SSRs y SNPs, construcción de mapas de ligamiento genético y detección de QTLs relacionados con fenología y calidad del fruto en tres poblaciones segregantes de albaricoquero.

Las fases para la consecución de los objetivos mencionados comprenden diversas etapas con unos objetivos específicos:

- a) Estudio del modo de herencia y transmisión de los principales caracteres fenológicos y de calidad del fruto tales como fecha de floración, fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto, peso del fruto, peso del hueso, calibre, color de fondo de piel, color de pulpa, color de chapa, firmeza, contenido en sólidos solubles y acidez.
- b) Realización de mapas de ligamiento genético mediante el uso de marcadores tipo SSRs e identificación de QTLs asociados a la expresión de estos caracteres de interés implicados en la fenología y calidad del fruto.

- c)** Identificación de SNPs y diseño de SNPlex mediante secuencias de ADNc procedentes del RNA-Seq de parentales relacionados con nuestras progenies y su aplicación a estudios de caracterización molecular y diversidad genética.
  
- d)** Construcción de mapas de ligamiento genético mediante el uso combinado de marcadores SSRs y SNPs, detección de QTLs y localización de posibles genes candidatos ligados a la calidad del fruto en el genoma de *Prunus*.





## ***2. Material vegetal y condiciones experimentales***



## 2. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

### 2.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado en este trabajo consta de tres poblaciones de albaricoquero F1 procedentes de los cruzamientos entre los parentales 'Z701-1' × 'Palsteyn' ('Z×P'), 'Goldrich' × 'Currot' ('G×C') y 'Bergeron' × 'Currot' ('B×C') (Figura 2.1). La población 'Z×P' fue obtenida en el año 2004, mientras que las poblaciones 'G×C' y 'B×C' se obtuvieron en el año 2009, con el objetivo de disponer de familias de albaricoquero altamente segregantes para los diferentes caracteres de calidad de fruto y necesidades de frío invernal.



**Figura 2.1.** Vista general de una de las poblaciones de albaricoquero situadas en la finca del CEBAS-CSIC en Cieza (Murcia).

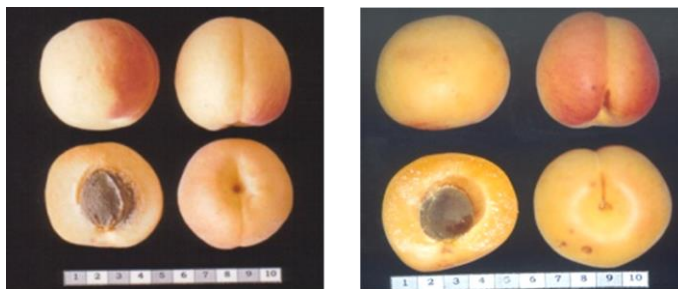
Estas tres familias se han utilizado para la realización de los estudios de caracterización fenotípica y modo de herencia de caracteres fenológicos y de calidad del fruto (Capítulo 3), la construcción de mapas de ligamiento genético mediante SSRs e identificación de QTLs asociados a calidad del fruto (Capítulo 4) y la construcción de mapas de ligamiento genético mediante el uso combinado de SSRs y SNPs e identificación de QTLs asociados a caracteres de calidad del fruto (Capítulo 6).

La generación de estas familias se llevó a cabo mediante el procedimiento clásico: los cruzamientos se realizaron mediante polinización manual, los frutos obtenidos fueron recolectados para posteriormente extraer sus semillas, las cuales fueron germinadas después de una estratificación en frío. Finalmente, las descendencias obtenidas fueron desarrolladas en vivero, aclimatadas y plantadas en campo a la primavera siguiente.

Asimismo, en el presente trabajo también se ha utilizado como material vegetal un conjunto de 37 variedades que reúnen una elevada diversidad genética, con orígenes de distintas áreas geográficas y características bien diferenciadas procedentes de la colección del CEBAS-CSIC (Murcia, España) y de la Facultad Agraria de la Universidad de Bolonia (Italia). Este material vegetal se ha utilizado para el genotipado de SNPs mediante la tecnología SNPlex, combinando secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-Seq) con amplificación mediante PCR oligoespecífica y análisis con espectrometría de masas (*Capítulo 5*).

### 2.1.1. Población 'Z701-1' × 'Palsteyn'

Esta población obtenida en 2004 está compuesta por 160 individuos procedentes del cruzamiento entre la selección del CEBAS-CSIC 'Z701-1' de floración intermedia y maduración temprana, y 'Palsteyn', variedad sudafricana que se caracteriza por su floración temprana y maduración intermedia. La variedad 'Palsteyn', originada del cruzamiento 'Blenhein' × 'Canino' es auto-compatible y muy productiva, presentando frutos de buen tamaño, coloración anaranjada y calidad gustativa media, con una acidez un tanto elevada (*Figura 2.2 y Tabla 2.1*).



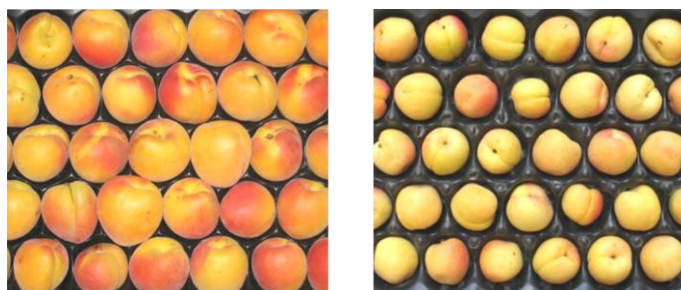
**Figura 2.2.** Detalle del fruto de los parentales utilizados 'Z701-1' (izquierda) y 'Palsteyn' (derecha).

'Z701-1' es una selección del CEBAS-CSIC de Murcia procedente del cruzamiento entre la variedad norteamericana 'Orange Red' (Barth®) y la variedad tradicional española 'Currot'. 'Orange Red' fue obtenida en New Jersey (EE.UU.) siendo conocida inicialmente como 'NJA-32'. Esta variedad resultó del cruzamiento entre el cultivar iraní 'Lasgerdi Mashhad' y 'NJA2', otra selección obtenida en New Jersey procedente de polinización libre del cultivar 'Morden 604' (Hough y Bailey, 1982).

‘Orange Red’ se caracteriza por sus elevadas necesidades de frío invernal, floración tardía y maduración intermedia. Es una variedad auto-incompatible y destaca por su buena calidad gustativa y aspecto muy atractivo, ya que presenta un color anaranjado intenso de piel y pulpa con chapa roja. La selección ‘Z701-1’, utilizada como parental en nuestro cruzamiento, se caracteriza por unas necesidades de frío medias, con fecha de floración y maduración intermedia. Presenta una coloración anaranjado claro, calibre medio y una elevada calidad gustativa (*Figura 2.2 y Tabla 2.1*).

### 2.1.2. Población ‘Bergeron’ × ‘Currot’

Esta población consta de 187 individuos procedentes del cruzamiento realizado en 2008 entre la variedad francesa ‘Bergeron’ y la variedad tradicional española ‘Currot’, siendo plantados en campo en 2009. ‘Bergeron’ es una variedad francesa obtenida en el INRA, caracterizada por ser auto-compatible, con elevadas necesidades de frío invernal así como floración y maduración tardía. La fruta es de buen tamaño, con atractiva coloración naranja y con cierta acidez, presentando alta productividad y buena aptitud industrial, con gran capacidad para la conservación en frío.



**Figura 2.3.** Detalle del fruto de los parentales utilizados ‘Bergeron’ (izquierda) y ‘Currot’ (derecha).

‘Currot’ es una variedad autóctona española, caracterizada por sus bajas necesidades de frío invernal que dan lugar a fechas de floración y maduración muy tempranas. Es auto-compatible y madura en los primeros días de mayo. En los primeros años ‘Currot’ no muestra una gran productividad, pero posteriormente su producción se ve incrementada y ésta se estabiliza. Sus frutos son de calibre pequeño y de color blanco cremoso-amarillo claro (*Figura 2.3 y Tabla 2.1*).

### 2.1.3. Población 'Goldrich' × 'Currot'

El cruzamiento entre 'Goldrich' y 'Currot' fue llevado a cabo en 2008, y tras la germinación de las semillas se obtuvieron un total de 200 individuos que fueron plantados en la finca experimental en el año 2009. 'Goldrich' es una variedad de origen estadounidense, obtenida en la Universidad de Washington del cruzamiento 'Sunglo' × 'Perfection'. Es auto-incompatible y muy productiva. Tiene medias-altas necesidades de frío invernal, con fecha de floración relativamente tardía y fecha de maduración media. Su fruto es grande, de elevada acidez, color anaranjado y presenta resistencia al virus de la sharka (*Figura 2.4 y Tabla 2.1*).



**Figura 2.4.** Detalle del fruto de los parentales utilizados 'Goldrich' (izquierda) y 'Currot' (derecha).

Por su parte, el parental 'Currot' tal como ya se ha descrito, presenta fechas de floración y maduración muy tempranas y características pomológicas significativamente diferentes a 'Goldrich' (*Figura 2.4*), al presentar una coloración blanca cremosa-amarillo ligera, un menor calibre, mayor contenido en azúcares y una significativa menor acidez (*Tabla 2.1*).

'Currot' es el parental común en ambas poblaciones, ya que además de aportar variabilidad con respecto a los caracteres de calidad del fruto, se pretende también conseguir una buena segregación en las descendencias en parámetros tales como necesidades de frío invernal, fecha de floración y maduración, mediante su cruzamiento con las variedades 'Goldrich' y 'Bergeron', significativamente diferenciadas en los mencionados caracteres.

**Tabla 2.1.** Resumen de los caracteres fenológicos y de la calidad del fruto de los parentales utilizados.

Caracteres fenológicos	Material vegetal				
	'Z701-1'	'Palsteyn'	'Bergeron'	'Currot'	'Goldrich'
Necesidades de frío	900 CU	600 CU	1200 CU	600 CU	1100 CU
Fecha de floración	Media	Temprana	Tardía	Muy temprana	Media-tardía
Intensidad de floración	Alta	Alta	Baja	Alta	Media
Fecha de maduración	Temprana	Intermedia	Tardía	Muy temprana	Media
Caracteres de calidad del fruto	Material vegetal				
	'Z701-1'	'Palsteyn'	'Bergeron'	'Currot'	'Goldrich'
Peso del fruto	Medio	Medio	Alto	Bajo	Alto
Color	Naranja claro	Naranja	Naranja	Amarillo crema	Naranja
Firmeza	Alta	Alta	Media-alta	Media	Alta
Contenido en azúcares	Alto	Medio	Medio	Medio	Medio
Acidez	Baja	Media	Media	Baja	Alta
Producción de etileno	Medio	Medio	Muy bajo	Alto	Bajo
Contenido en carotenoides	Medio	Alto	Alto	Bajo	Alto

#### 2.1.4. Colección de variedades

El conjunto de variedades utilizado para el genotipado de SNPs mediante la tecnología SNPlex combinando secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-Seq) con amplificación mediante PCR oligoespecífica y análisis con espectrometría de masas (*Capítulo 5*) consta de un total de 37 genotipos de los cuales 20 proceden de las colecciones del CEBAS-CSIC (Murcia, España), mientras que 17 de las variedades pertenecen a la colección de la Facultad de Agraria de la Universidad de Bolonia (Italia).

Entre las variedades utilizadas se incluyen las ya mencionadas 'Bergeron', 'Goldrich' y 'Currot', las nuevas variedades del CEBAS-CSIC tales como 'Sublime', 'Estrella', 'Rojo Pasión', 'Murciana', 'Mirlo Blanco', 'Mirlo Anaranjado' y 'Mirlo Rojo', la variedad griega 'Lito' y la variedad italiana 'BO81604311', así como diversas variedades con orígenes de diferentes áreas geográficas (*Tabla 2.2*).

Por tanto, se trata de un elenco varietal cuya procedencia abarca desde países de la Cuenca mediterránea como España, Francia, Italia y Grecia, así como orígenes tan diversos como Irán, Japón, EE.UU. o Canadá, reuniendo una elevada diversidad genética y una gran diversidad fenotípica en lo referente a caracteres como compatibilidad floral, necesidades de frío invernal, fecha de floración, fecha de maduración y características de calidad del fruto (*Tabla 2.2*)

**Tabla 2.2.** Origen y características agronómicas más interesantes de las variedades ensayadas (autocompatibilidad, floración, maduración y color de piel).

Cultivar	Pedigree	Origen	Autocomp.	Floración	Maduración	Color de piel
'Alterá'	Harcot × (San Castrese × R. Imola)	Italia	Si	Intermedia	Temprana	Naranja/Rojo
'Bergeron'	Desconocido	Francia	Si	Tardía	Muy tardía	Naranja claro
'BO81604311'	San Castrese × Reale de Imola	Italia	Si	Intermedia	Temprana	Naranja
'Búlida'	Desconocido	España	Si	Intermedia	Intermedia	Naranja claro
'Cornia'	NJA1 × Bella di Imola	Italia	No	Intermedia	Intermedia	Naranja/Rojo
'Currot'	Desconocido	España	Si	Muy temprana	Muy temprana	Amarillo claro
'Dorada'	Bergeron × Moniquí	España	Si	Tardía	Tardía	Amarillo
'Estrella'	Orange Red × Z211-18	España	No	Intermedia	Intermedia	Naranja/Rojo
'Gheysi'	Desconocido	Irán	No	-	-	-
'Goldrich'	Sunglo × Perfection	EE.UU	No	Tardía	Tardía	Naranja
'Harcot'	Morden 604 × NJA1	Canadá	No	Tardía	Intermedia	Naranja/Rojo
'Kioto'	Desconocido	Francia	Si	Tardía	Intermedia	Naranja
'Lito'	Stark Early Orange × Tyriothos	Grecia	Si	Tardía	Tardía	Naranja
'Lillycot'	Desconocido	EE.UU	No	Intermedia	Intermedia	Naranja
'Maravilla'	Orange Red × Z211-18	España	No	Intermedia	Intermedia	Naranja/Rojo
'Mauricio'	Desconocido	España	Si	Temprana	Temprana	Amarillo
'Mirlo Blanco'	Rojo Pasión × Búlida Precoz	España	Si	Temprana	Muy temprana	Naranja claro
'Mirlo Anaranjado'	Rojo Pasión × Búlida Precoz	España	Si	Temprana	Muy temprana	Naranja claro/Rojo
'Mirlo Rojo'	Rojo Pasión × Búlida Precoz	España	Si	Temprana	Temprana	Naranja claro/Rojo
'Murciana'	Orange Red × Currot	España	Si	Intermedia	Intermedia	Naranja claro
'Naderi'	Desconocido	Iran	No	-	-	-
'Ninfa'	Ouardi × Tyriothos	Italia	Si	Temprana	Temprana	Amarillo
'Orange Red'	Lasgerdi Mashad × NJA2	EE.UU	No	Tardía	Intermedia	Naranja/Rojo
'Palsteyn'	Blenhein × Canino	Sudáfrica	Si	Intermedia	Intermedia	Naranja
'Petra'	Goldrich × Pelese di Giovanniello	Italia	Si	Intermedia	Tardía	Naranja
'Pieve'	Harcot × Reale di Imola	Italia	Si	Intermedia	Tardía	Amarillo
'Pieve Tardiva'	Harcot × Reale di Imola	Italia	Si	Intermedia	Tardía	Naranja/Rojo
'Reale di Imola'	Desconocido	Italia	Si	Tardía	Tardía	Naranja claro
'Rojo Pasión'	Orange Red × Currot	España	Si	Intermedia	Temprana	Naranja claro/Rojo
'Rosa'	Orange Red × Palsteyn	España	No	Intermedia	Intermedia	Naranja/Rojo
'San Castrese'	Desconocido	Italia	Si	Intermedia	Tardía	Naranja claro
'Selene'	Goldrich × A2564	España	Si	Intermedia	Intermedia	Naranja
'Sublime'	Orange Red × Z211-18	España	No	Intermedia	Temprana	Naranja/Rojo
'Tardif de Valence'	Desconocido	Francia	Si	Tardía	Tardía	Naranja
'Toñi'	Orange Red × Palsteyn	España	Si	Temprana	Temprana	Naranja claro/Rojo
'Valorange'	Orange Red × Currot	España	Si	Intermedia	Intermedia	Naranja/Rojo
'Yamagata 3'	Desconocido	Japón	No	-	-	-



## 2.2. Condiciones experimentales

### 2.2.1. Localización y condiciones climáticas

El cultivo de las tres poblaciones de albaricoquero, así como la mayor parte de la colección de variedades se llevó a cabo en la finca experimental del CEBAS-CSIC, localizada en el sureste español entre los municipios de Cieza y Calasparra (Murcia) (lat. 37° N, long. 1° E). La finca se encuentra situada a 310 m de altitud, no muy cercana de la ribera del río Segura limitando al norte con un importante macizo montañoso (*Figura 2.5*). El resto de las variedades pertenecen a la colección de la Facultad de Agraria de la Universidad de Bolonia (Italia).



**Figura 2.5.** Detalle de la ubicación de la finca experimental del CEBAS-CSIC en Cieza (Murcia).

La pluviometría media en el área donde se encuentra ubicada la finca experimental se sitúa en torno a los 300 mm de lluvia anuales. En cuanto a las características climáticas, debemos indicar que este emplazamiento se caracteriza por una acumulación media-alta de frío invernal la mayoría de los años, suficiente para satisfacer las necesidades de frío de la mayoría de las variedades de albaricoquero favoreciendo una adecuada ruptura del letargo invernal. No obstante, las oscilaciones en cuanto a la cantidad de frío acumulado y los periodos de acumulación de frío son notables, lo que afecta notablemente a las fechas de floración y consiguientemente a las fechas de maduración.

En la *Tabla 2.3* se muestra la acumulación de frío invernal total y por periodos quincenales en los años considerados para este trabajo. Las heladas en floración en el plazo de los últimos diez años han sido prácticamente inexistentes.

**Tabla 2.3.** Acumulación de frío invernal parcial en Chill units y Horas <7 °C.

Periodo	Método	15-nov	30-nov	15-dic	31-dic	15-ene	31-ene	15-feb	28-feb	Total
2008-2009	Chill Units	160	168	210	252	246	167	200	171	1574
	Horas < 7 °C	0	71	194	142	235	249	249	114	1254
2009-2010	Chill Units	55	118	126	160	179	109	118	115	980
	Horas < 7 °C	7	48	123	149	157	109	156	66	815
2011-2012	Chill Units	8	96	175	193	141,5	223,5	192,5	117	1146,5
	Horas < 7 °C	1	53	70	128	95	123	189	116	775
2012-2013	Chill Units	81,5	109,5	202	145,5	194	125	146,5	139	1143
	Horas < 7 °C	20	15	161	103	134	77	74	90	674

### 2.2.2. Condiciones del cultivo

Las parcelas experimentales donde se encuentran las tres familias utilizadas en este estudio, así como la parcela donde se localizan la mayoría de las variedades de la colección del CEBAS-CSIC utilizadas, se encuentran ubicadas todas ellas en la misma finca experimental descrita en el apartado anterior. El suelo de la finca es de textura franco-arcillosa tanto en superficie como en profundidad, con niveles muy bajos de materia orgánica. El contenido de los macronutrientes fósforo y potasio asimilable es más bien bajo con altos niveles de sales totales, sobre todo de sulfato. Estos suelos se caracterizan además por su alto contenido en carbonato cálcico total y activo, lo que se traduce en un elevado poder clorosante. Todas estas deficiencias se corrigen con un adecuado abonado y riego, lo que propicia unas condiciones adecuadas para el cultivo de especies del género *Prunus* y concretamente albaricoquero.

Las descendencias de las tres familias utilizadas en este estudio fueron crecidas en sus propias raíces. Por su parte, las variedades utilizadas en el estudio se encuentran injertadas sobre patrones francos de albaricoquero. El cultivo se lleva a cabo mediante fertirrigación en riego por goteo, con agua de buena calidad. El manejo agronómico es el habitual del albaricoquero en la zona: formación en vaso, poda invernal ligera, y aclareo de frutos en los casos necesarios. Los tratamientos fitosanitarios son mínimos, limitándose a los estrictamente necesarios especialmente para pulgones y enfermedades fúngicas.





***3. Caracterización fenotípica y estudio del modo de herencia de caracteres fenológicos y de calidad del fruto***



### **3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y ESTUDIO DEL MODO DE HERENCIA DE CARACTERES FENOLÓGICOS Y DE CALIDAD DEL FRUTO**

#### **3.1. Introducción y Objetivos**

La evaluación fenotípica es sin duda alguna un requisito imprescindible a la hora de estudiar el modo de herencia de caracteres de interés en poblaciones segregantes, la correlación entre los diferentes caracteres evaluados, así como la correlación de éstos con el genotipo previa construcción de mapas de ligamiento genético (identificación de QTLs). Una caracterización fenotípica amplia y precisa es necesaria en la detección final de QTLs ligados a caracteres agronómicos en cualquier especie vegetal. En nuestro caso el trabajo está focalizado hacia caracteres fenológicos (floración, maduración y ciclo de desarrollo del fruto) y de la calidad del fruto, los cuales incluyen caracteres físicos (peso, calibre, color y firmeza del fruto) y caracteres bioquímicos (contenido en sólidos solubles y acidez).

En cuanto al estudio fenológico, hay que destacar que la floración es el carácter agronómico más estudiado en albaricoquero, encontrándose estrechamente relacionada con las necesidades de frío invernal de cada variedad (Ruiz y col., 2007). La fecha de floración por tanto está influenciada por la acumulación de frío durante el otoño y el invierno, lo que adelanta o retrasa la salida del letargo invernal, que junto con la acumulación de calor una vez producida la ruptura del letargo produce el crecimiento de las yemas florales (Bailey y col., 1978). Además, hay estudios que apuntan que en las especies de *Prunus* las necesidades de frío son un carácter intrínseco a cada variedad, siendo el factor más determinante sobre la fecha de floración en comparación con las necesidades de calor que presentan menos diferencias entre variedades (Alburquerque y col., 2008; Andrés y Durán, 1999; Couvillon y Erez, 1985; Egea y col., 2003; Okie y Blackburn, 2008; Ruiz y col., 2007).

Por su parte, la fecha de maduración es uno de los caracteres más importantes desde el punto de vista comercial. La maduración marca el final del ciclo de desarrollo del fruto, el cual puede variar entre distintas variedades, ya que se puede dar el caso de que variedades más tempranas en cuanto a floración tengan un ciclo más largo que otras variedades más tardías. Un caso particular es la variedad 'Orange Red', la cual se caracteriza por tener una fecha de floración muy tardía pero una fecha de maduración media, ya que posee un ciclo de desarrollo del fruto muy corto (Ruiz y Egea, 2008).

Con respecto a la calidad del fruto, tenemos que decir que son muchos los caracteres implicados en la misma (Bailey y Hough, 1975; Audergon y col., 1991b; Bassi y Selli, 1990). El tamaño del fruto, color, firmeza, resistencia a la manipulación, sabor, aroma y textura son considerados por Souty y col. (1990) como los atributos de calidad fundamentales en albaricoque. Según Parolari y col. (1992), las propiedades más importantes en albaricoque son principalmente el contenido en azúcares y ácidos orgánicos, compuestos volátiles, color, tamaño y textura del fruto.

La firmeza, aspecto externo (atractivo) y sabor son los principales parámetros que afectan a la calidad del fruto en albaricoque de acuerdo a Gurrieri y col. (2001). La firmeza junto con el color del fruto son parámetros indicadores del estado de madurez del mismo y de su momento óptimo de recolección. El color del fruto hace referencia al conjunto que forman el color de fondo de piel junto con la chapa (coloración rojiza) que presentan algunos frutos, proporcionando un mayor atractivo a los mismos.

Muchas de las variedades tradicionales cultivadas en el mediterráneo presentan en general un color de piel blanco, amarillo o naranja, mientras que variedades de reciente introducción procedentes de EE.UU. han sido seleccionadas por una coloración más anaranjada con tonalidades de rojo intenso (Ruiz y Egea, 2008; Ruiz y col., 2005). El color se asocia además con el contenido en carotenoides (Ruiz y col., 2005-2008) y la capacidad antioxidante (Drogoudi y col., 2008), jugando un papel importante en la percepción de la calidad del fruto para el consumidor.

El contenido en sólidos solubles da idea del contenido total de azúcares, siendo la sacarosa el azúcar principal en el fruto de albaricoque maduro, por lo que un aumento en el índice refractométrico está asociado con un mayor contenido en azúcar y mejor sabor. En cuanto a la acidez, el ácido málico es el predominante en albaricoque, que junto con los azúcares juegan un papel decisivo en el sabor final del fruto. Muchas variedades tradicionales cultivadas en Italia y España con largos ciclos de desarrollo del fruto y recolección tardía tienden a mostrar un contenido en azúcar más alto. Sin embargo, nuevas variedades introducidas procedentes de EE.UU. y variedades de maduración temprana muestran en general valores más altos de acidez (Bassi y Selli, 1990; Gurrieri y col., 2001; Bassi y col., 1996; Drogoudi y col., 2008; Badenes y col., 1998).



Desde el punto de vista del consumidor, la apariencia visual y estética del fruto es uno de los rasgos más importantes que demanda el mercado de fruta fresca. En España se valoran más el color claro de la piel y la presencia de la chapa roja, mientras que en el mercado europeo se valora más el calibre y los colores más intensos tanto de la piel como de la pulpa. En lo referente a la calidad gustativa, se valoran bien los frutos con un mínimo del 10 % de sólidos solubles y una acidez total máxima del 0,8 % (Badenes y col., 2006). Frutos con un contenido relativamente alto en azúcares (por encima de 12 °Brix en maduración temprana y por encima de 14 °Brix para variedades de maduración media y tardía) y con acidez moderada (1,2 - 2,1 g/l) tienen una valoración de sabor más alta (Ruiz y col., 2008), siendo los preferidos por los consumidores.

Las relaciones entre los parámetros de calidad deberían ser estudiadas a fin de optimizar la caracterización de la calidad del fruto. Esto puede ser usado en programas de mejora ya que haría posible reducir el número de caracteres pomológicos necesarios para una adecuada caracterización. En diferentes estudios llevados a cabo en melocotonero (Byrne y col., 1991; Génard y Bruchou, 1992; Génard y col., 1994; Esti y col., 1997) se han encontrado correlaciones entre algunos caracteres pomológicos. Sin embargo, son pocos los trabajos publicados en albaricoquero relativos a parámetros de calidad del fruto, siendo tan sólo unos pocos estudios los que incluyen relaciones entre caracteres pomológicos (Pérez-Gonzales, 1992; Badenes y col., 1998; Gurrieri y col., 2001; Asma y Ozturk, 2005; Ruiz y Egea, 2008).

El análisis multivariante es una herramienta útil que ha sido usada para establecer relaciones genéticas entre cultivares y estudiar correlaciones entre variables (Hilling e lezzoni, 1988; Brown y Walker, 1990; lezzoni y Pritts, 1991; Génard y Bruchou, 1992; Pérez y col., 1993; Esti y col., 1997; Badenes y col., 1998; Gurrieri y col., 2001). Por otro lado, una importante diversidad genética ha sido observada en la especie albaricoquero en cuanto a algunos caracteres de calidad, lo que se debe fundamentalmente a los diferentes orígenes genéticos de las distintas variedades cultivadas (Byrne y Littleton, 1989; Audergon y col., 1991a; Mehlenbacher y col., 1991; Ledbetter y col., 1996; Badenes y col., 1998; Hagen y col., 2002; Hormaza 2002; Asma y Ozturk, 2005; Ruiz y Egea, 2008).

La eficiencia de los cruzamientos en los programas de mejora para la calidad del fruto depende principalmente de la elección de los progenitores y el conocimiento en la transmisión de los caracteres que queremos mejorar. En cuanto al modo de herencia de los caracteres de calidad del fruto en albaricoque existe una gran falta de conocimiento, ya que pocos estudios han sido enfocados en esta dirección (Couranjou, 1995; Krska y col., 2009; Ruiz y col., 2012). Estos estudios previos, indicaron que la mayoría de los caracteres son ampliamente heredados cuantitativamente.

Couranjou (1995) estudió 15 progenies F1 de albaricoquero durante más de tres años procedentes de 6 parentales, mostrando una heredabilidad ( $h^2$ ) por encima de 0,9 en el caso de fecha de floración, fecha de maduración y jugosidad; entre 0,6 y 0,9 para rendimiento, tamaño del fruto, sabor y aroma; ligeramente inferior a 0,6 para color de fondo, color de pulpa y firmeza, mientras que para el color de piel  $h^2$  no llegó a 0,3. Aunque debemos destacar que algunos de los coeficientes de heredabilidad pudieron ser ligeramente sobreestimados, ya que fueron calculados a partir de los datos medios de las poblaciones.

Recientemente, la heredabilidad de algunos caracteres de calidad del fruto fueron estimados en la población de albaricoquero 'Minaret' × 'Betinka' (Krska y col., 2009). La heredabilidad estimada de peso del fruto, sobrecolor y consistencia de la pulpa fue aproximadamente de 0,9, mientras que la heredabilidad del color de pulpa, atractivo del fruto y sabor oscilaron entre 0,6 y 0,9. Además, las correlaciones mostraron una fuerte dependencia entre los parentales y los descendientes de la progenie sobre todo para atractivo y sobrecolor del fruto y una dependencia intermedia en el caso de sabor y color.

La precisión en la evaluación fenotípica es uno de los aspectos más importantes para llevar a cabo un mapeo de QTLs consistente. La evaluación fenotípica durante diferentes años puede ser usada para mejorar la precisión en el mapeo de QTLs reduciendo los errores experimentales. La obtención de datos fenotípicos precisos en cuanto a la calidad del fruto ha sido siempre uno de los mayores retos para la obtención de QTLs ligados a estos caracteres. Además, para caracteres con baja heredabilidad, una evaluación en diferentes años es necesaria para obtener una buena estimación del efecto de los QTLs (Xu y Crouch, 2008).

El objetivo de este capítulo es el fenotipado y estudio del modo de herencia y relaciones más importantes entre los caracteres fenológicos y de calidad del fruto descritos en las tres poblaciones de albaricoquero utilizadas en este estudio, lo que nos posibilitará posteriormente la detección de QTLs a partir de los mapas de ligamiento genético generados en estas poblaciones en capítulos posteriores.

### **3.2. Material vegetal**

El material vegetal empleado en la caracterización fenotípica consta de 160 descendientes de la población 'Z701-1' × 'Palsteyn' ('Z×P'), 187 descendientes de 'Bergeron' × 'Currot' ('B×C') y 200 descendientes de la población 'Goldrich' × 'Currot' ('G×C'). Los años de fenotipado fueron 2008, 2009 y 2010 para la población 'Z×P' y los años 2012 y 2013 en el caso de 'B×C' y 'G×C'.

### **3.3. Metodología**

#### **3.3.1. Toma de muestras**

La caracterización pomológica de los genotipos se realizó en el momento óptimo de madurez para cada uno de los descendientes y parentales examinados de 2008 a 2013. El color de fondo de la piel y la firmeza (Sims y Comin, 1963; Varady-Burguetti y col., 1983; Visagie y col., 1984) se utilizaron como criterio para determinar el momento óptimo de maduración y recolección de la muestra.

La toma de muestras se llevó a cabo manualmente en la parcela experimental, recolectando los frutos de diferentes puntos cardinales y posiciones en el árbol. Inmediatamente después de la recolección, los frutos fueron transportados en un vehículo con aire acondicionado hasta el laboratorio para su evaluación. El número de frutos muestreados por descendiente fue en torno a 40 frutos, si bien en el análisis pomológico se utilizaron un total de 12 frutos por genotipo que fueran representativos del mismo, evitando frutos sobremaduros o inmaduros. Las muestras fueron subdivididas en grupos de 4 frutos para tener 3 repeticiones de cada genotipo.

### 3.3.2. Fecha de floración y maduración

La evolución de la floración se evaluó cada 2-3 días en la finca experimental en los años 2008-2013. Se estableció como fecha de floración el momento en el que habían abierto el 50% de las flores (F50).

En cuanto a la fecha de maduración, esta fue considerada cuando el fruto presentaba una firmeza y color adecuados para su consumo en fresco. En ambos casos, tanto fecha de maduración como floración, se contabilizaron en días julianos. También se determinó la duración del ciclo de desarrollo del fruto como el periodo transcurrido en días entre fecha de floración y maduración.

### 3.3.3. Peso del fruto

Para la medida del peso medio de los frutos fue utilizada una balanza digital Blauscal modelo AH-600, con una precisión de 0,01 g (*Figura 3.1*). Se pesaron individualmente todos los frutos de las tres réplicas, para obtener posteriormente el valor medio. Los huesos procedentes de cada fruto también fueron pesados, obteniéndose el valor medio.

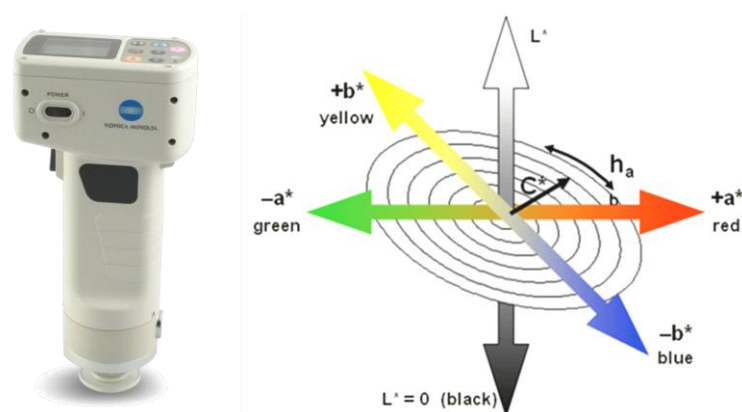


*Figura 3.1. Detalle de balanza digital utilizada para el peso del fruto.*

### 3.3.4. Color del fruto

El color de fondo de la piel y el color de la pulpa son de gran importancia en el proceso de caracterización varietal, ya que se encuentran íntimamente ligados a la percepción de una fruta atractiva por parte de los consumidores, así como con el estado de madurez (Abbott y col., 1999).

Además, la coloración anaranjada y rojiza está relacionada directamente con el contenido de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud como son los carotenoides (Ruiz y col., 2005). La presencia de chapa también es un parámetro que acentúa el atractivo del fruto. Los valores de color de fondo de piel y pulpa, fueron medidos con un colorímetro Minolta Chroma Meter (CR-300, Minolta, Ramsey, NJ, EE.UU.) (Figura 3.2), calibrado en una placa de referencia de porcelana blanca. Igualmente, el color de chapa fue determinado con este mismo colorímetro en aquellos frutos que la presentaron.



**Figura 3.2.** Detalle del colorímetro y el círculo cromático utilizados.

El colorímetro consta de un cabezal con una lámpara de xenón, la cual se coloca sobre el fruto y determina por reflexión el color de una región de 8 mm. Este colorímetro utiliza la escala CIELAB con el sistema de coordenadas espaciales de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  (Brown y Walker, 1990; McGuire, 1992; Minolta, 1994).  $L^*$  indica la luminosidad, desde negro ( $L=0$ ) a blanco ( $L=100$ ); la coordenada  $a^*$  ( $-100$  a  $+100$ ) toma valores negativos para el verde y positivos para el rojo, mientras que el rango de  $b^*$  ( $-100$  a  $+100$ ) se extiende desde valores negativos para el color azul hasta valores positivos para el amarillo.

A partir de estas coordenadas calculamos el ángulo de color ( $H^\circ$ ) y de intensidad ( $C^*$ ) (Hunter, 1942; Little, 1975), los cuales son más comprensibles para productores y consumidores (McGuire, 1992; Minolta, 1994). El ángulo de color ( $H^\circ$ ) es el parámetro que mejor refleja en el sistema espacial de coordenadas el color resultante de los valores de los ejes  $a^*$  y  $b^*$ , calculándose como  $H^\circ = \arctan(b^*/a^*)$ . Las medidas de color se realizaron en tres posiciones diferentes del fruto en la zona ecuatorial, ya que la lectura del colorímetro nos da el valor medio de tres medidas de cada fruto.

En el caso del color de fondo se evitaron las mediciones en las zonas con chapa. Finalmente, un total de 12 frutos por genotipo fueron utilizados para el muestreo, obteniéndose los valores medios de H° de color de fondo de la piel, color de pulpa y color de chapa.

### 3.3.5. Firmeza del fruto

La firmeza de la fruta es un indicador del estado de madurez del fruto y de su momento óptimo de recolección. Además, la firmeza del fruto tiene una gran importancia en los procesos de manipulación, aptitud industrial y en la aceptación por parte del consumidor. La evaluación de la firmeza se llevó a cabo mediante un sistema de compresión (no destructivo).

Este método no destructivo para la evaluación de la firmeza se basa en un test de compresión mediante una prensa Lloyd (modelo LR10K, Fareham Hants, Reino Unido) equipada con dos platos lisos (12 × 18 cm) (Figura 3.3). Con este sistema se midió la máxima fuerza requerida para deformar la fruta una extensión de 5 mm a una velocidad de 25 mm/min, midiéndose al mismo tiempo el diámetro del fruto. Se utilizaron un total de 12 frutos por genotipo, obteniéndose los valores medios de cada uno de ellos en Newton (N).



**Figura 3.3.** Detalle de la prensa Lloyd utilizada.

### 3.3.6. Contenido en sólidos solubles

El contenido en sólidos solubles se determinó mediante la medida del índice de refracción, triturando previamente el fruto de albaricoque con una licuadora. El índice de refracción representa la razón de la velocidad de un rayo de luz en el vacío respecto a la velocidad del rayo de luz a través de una sustancia. Este índice se encuentra ligado al contenido de azúcar del fruto, ya que el 80 % de la materia seca está constituida por azúcares. El contenido en azúcares se mide en °Brix, calibrado como el porcentaje de sacarosa a 20 °C, ya que este es el principal constituyente de los sólidos solubles presentes en el albaricoque y el más abundante de los azúcares.

Para la valoración se licuó el fruto troceado y el contenido de azúcares se cuantificó utilizando un refractómetro manual digital Optic Ivymen System modelo DR-101 (*Figura 3.4*) mediante el vertido de unas gotas del licuado obtenido de cada muestra sobre la lente del refractómetro, el cual nos proporciona de forma automática la medida. Al final, se obtuvieron tres valores de cada genotipo, uno por réplica. La media de las tres réplicas nos da el valor correspondiente al contenido en sólidos solubles de cada genotipo.



**Figura 3.4.** Detalle del refractómetro utilizado en la medición de °Brix.

### 3.3.7. Acidez y pH del fruto

Acidez y pH fueron determinados mediante un valorador automático (modelo 785 DMP Tinitro Metrohm Ltd CH-9101, Suiza), siendo la acidez obtenida por valoración ácido-base (Figura 3.5). Para ello se utilizaron 2 g de muestra del fruto licuado y diluido en 20 ml de agua destilada. El aparato realiza de forma automática la valoración neutralizando la acidez con NaOH 0,1N hasta alcanzar pH 8,1 y dándonos la lectura de pH y acidez en gramos de ácido málico, cítrico y tartárico por cada 100 ml de zumo. Igualmente que en el caso del contenido en azúcares, se obtuvieron tres medidas de acidez en cada genotipo, una correspondiente a cada réplica de 4 frutos, calculándose posteriormente el valor medio.



**Figura 3.5.** Detalle del valorador automático ácido-base empleado.

### 3.3.8. Análisis estadístico

El programa estadístico SPSS 13.0 ha sido utilizado para el tratamiento de los datos derivados de la caracterización fenotípica. Por una parte, se ha realizado un análisis estadístico descriptivo de los datos obtenidos en cada población (valores medios, desviación estándar y valores mínimos y máximos), así como la elaboración de histogramas que representan la distribución de frecuencias por año y carácter de cada población. En los histogramas se representan los valores medios de los descendientes y los parentales para cada carácter. Por otra parte, todos los caracteres en cada año se analizaron mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos se ajustaban a una distribución normal y poder aplicar así un análisis de la varianza entre genotipos (ANOVA) o análisis multivariante de 2 factores, evaluando las diferencias existentes entre genotipos, entre años y la interacción genotipo/año.



En los casos en los que no se cumplía la condición de normalidad los datos fueron transformados mediante transformaciones exponenciales del tipo Box-Cox, y para variables como fecha de floración, fecha de maduración y color del fruto que no se podían transformar se llevó a cabo el test no paramétrico Kruskal-Wallis. En todos los análisis estadísticos aplicados, las diferencias fueron determinadas a partir de un p valor de 0,05. Igualmente, SPSS 13.0 nos permitió establecer las correlaciones existentes entre los diferentes caracteres evaluados mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

### 3.4. Resultados y discusión

#### 3.4.1. Resumen de valores fenotípicos y análisis estadístico de las poblaciones evaluadas

Los datos descriptivos correspondientes a las tres poblaciones evaluadas y cada uno de los años estudiados se muestran en la *Tabla 3.1* (caracteres fenológicos), *Tabla 3.2* (caracteres físicos) y *Tabla 3.3* (caracteres bioquímicos) incluyendo los valores medios, desviación estándar (DE) y valores mínimo y máximo de cada carácter. Los valores descriptivos resumidos en estas tablas muestran la gran variabilidad fenotípica de los descendientes de las tres familias evaluadas.

**Tabla 3.1.** Resumen de valores descriptivos para los caracteres fenológicos evaluados.

Caracteres fenológicos	Familia	Año	Promedio	DE	Mínimo	Máximo
Fecha de floración	'Z×P'	2009	53,4	6,1	44	68
		2010	76,1	5,5	64	85
	'B×C'	2012	75,9	3,8	68	86
		2013	68,2	7,8	49	85
	'G×C'	2012	74,3	2,5	70	85
		2013	65,3	8,6	44	85
Fecha de maduración	'Z×P'	2009	153,0	6,6	141	167
		2010	162,4	7,4	151	183
	'B×C'	2012	163,6	6,3	151	180
		2013	166,6	8,4	148	188
	'G×C'	2012	155,8	5,8	147	172
		2013	158,7	6,9	145	174
Ciclo de desarrollo del fruto	'Z×P'	2009	99,6	8,4	76	118
		2010	86,3	7,4	68	103
	'B×C'	2012	87,6	5,4	75	100
		2013	98,4	6,7	76	116
	'G×C'	2012	81,4	5,5	68	97
		2013	93,4	7,0	77	113

**Tabla 3.2.** Resumen de valores descriptivos para los caracteres físicos evaluados.

Caracteres físicos	Familia	Año	Promedio	DE	Mínimo	Máximo
Peso del fruto (g)	'Z×P'	2009	60,6	11,4	22,5	88,6
		2010	59,0	13,0	30,9	99,9
	'B×C'	2012	51,1	10,0	28,3	106,6
		2013	45,7	9,4	27,7	72,9
	'G×C'	2012	57,1	10,6	32,4	85,2
		2013	53,1	13,0	26,5	106,7
Peso del hueso (g)	'Z×P'	2009	3,3	0,7	1,1	5,3
		2010	3,4	0,6	1,9	5,1
	'B×C'	2012	2,8	0,6	1,5	5,1
		2013	2,4	0,5	1,5	5,0
	'G×C'	2012	3,4	0,6	2,1	5,5
		2013	3,1	0,7	1,8	5,4
Calibre (mm)	'B×C'	2012	44,4	3,2	36,7	54,8
		2013	43,1	2,9	36,8	50,5
	'G×C'	2012	44,1	3,1	36,4	51,2
		2013	43,4	3,8	34,4	54,7
Color de piel (H°)	'Z×P'	2009	82,5	5,1	72,6	99,6
		2010	85,6	5,5	74,2	103,4
	'B×C'	2012	94,8	4,1	81,6	104,9
		2013	87,7	5,7	64,8	98,8
	'G×C'	2012	90,7	5,1	79,8	105,0
		2013	83,3	5,7	71,2	100,2
Color de chapa (H°)	'Z×P'	2009	69,5	7,0	49,1	83,9
		2010	71,1	7,6	51,7	94,5
	'B×C'	2012	74,0	7,5	48,3	90,0
		2013	61,3	9,3	32,4	79,6
	'G×C'	2012	74,0	6,25	53,1	91,1
		2013	63,1	6,53	46,6	79,4
Color de pulpa (H°)	'Z×P'	2009	80,4	4,24	73,5	97,5
		2010	81,6	4,92	74,9	98,5
	'B×C'	2012	90,1	4,19	77,1	98,1
		2013	80,1	4,15	68,6	88,9
	'G×C'	2012	86,7	4,60	76,8	99,5
		2013	77,6	4,12	67,7	87,6
Firmeza (N)	'Z×P'	2009	24,8	5,35	13,1	41,8
		2010	31,4	6,94	16,3	49,8
	'B×C'	2012	31,7	11,34	15,3	78,1
		2013	27,7	7,57	14,6	54,9
	'G×C'	2012	36,35	12,83	15,0	76,4
		2013	33,60	9,32	15,5	67,8

**Tabla 3.3.** Resumen de valores descriptivos para los caracteres bioquímicos evaluados.

Caracteres bioquímicos	Familia	Año	Promedio	DE	Mínimo	Máximo
Sólidos solubles (°Brix)	'Z×P'	2009	12,6	1,6	8,7	17,8
		2010	11,7	1,5	8,8	16,0
	'B×C'	2012	13,0	1,3	10,1	16,5
		2013	12,1	1,6	7,8	17,1
	'G×C'	2012	13,4	1,2	10,3	17,7
		2013	12,4	1,5	7,4	16,6
pH	'Z×P'	2009	3,5	0,2	3,2	4,0
		2010	3,6	0,2	3,3	4,2
	'B×C'	2012	3,6	0,1	3,3	4,0
		2013	3,5	0,1	3,2	4,0
	'G×C'	2012	3,5	0,1	3,1	3,9
		2013	3,4	0,1	3,1	3,7
Acidez (g ácido málico/100ml)	'Z×P'	2009	1,5	0,3	1,0	2,3
		2010	1,6	0,3	1,0	2,6
	'B×C'	2012	1,6	0,3	0,9	2,4
		2013	1,7	0,3	0,8	2,7
	'G×C'	2012	1,9	0,3	1,2	3,1
		2013	2,0	0,4	1,1	2,9

Estos resultados corroboran la importante segregación conseguida en las familias, objetivo perseguido en la generación de las mismas. Un ejemplo de esta variabilidad fenotípica es la importante diferencia entre los valores mínimos y máximos dentro de cada familia para todos los caracteres evaluados. Los rangos de valores obtenidos en los diferentes caracteres examinados coinciden con trabajos previos en albaricoquero (Souty y col., 1990; Visagie, 1985; Audergon y col., 1991b; Mehlenbacher y col., 1991; Egea y col., 1997; Gurrieri y col., 2001). Las importantes diferencias fenotípicas de los parentales utilizados para la generación de estas familias explican esta variabilidad en las descendencias. Así, las variedades utilizadas como parentales 'Z701-1', 'Palsteyn', 'Bergeron', 'Goldrich', y 'Currot' tienen unos orígenes genéticos muy distantes y consiguientemente unas características fenotípicas muy diferentes.

Esta elevada diversidad fenotípica dentro de la especie albaricoquero en relación con los parámetros de calidad, fundamentalmente debido a los diferentes orígenes genéticos de las variedades, ha sido descrita por diferentes autores (Byrne y Littleton, 1989; Mehlenbacher y col., 1991; Audergon y col., 1991b; Ledbetter y col. 1996; Asma y Ozturk, 2005; Ruiz y Egea, 2008).

Asimismo, los resultados obtenidos muestran importantes diferencias anuales en los caracteres analizados, lo que indica un importante efecto de las condiciones climáticas de cada año en la expresión de los caracteres fenológicos y de calidad del fruto (*Tablas 3.1, 3.2 y 3.3*).

En general, podemos decir que aparentemente las poblaciones 'Z×P' y 'G×C' presentan una fecha de maduración más temprana (principios de junio) que 'B×C' (mediados de junio) (*Tabla 3.1*), debido a la influencia del carácter tardío de 'Bergeron'. La población 'Z×P' presenta además un mayor peso del fruto en torno a 60 g, siendo la población 'B×C' la de menor peso (en torno a 50 g), obteniendo 'G×C' un peso intermedio a ambas (*Tabla 3.2*). Esta circunstancia, puede ser debida a la influencia del parental 'Currot' (bajo peso del fruto), que es común en las poblaciones 'B×C' y 'G×C'.

En cuanto al color de piel se aprecia también una mayor coloración hacia tonalidades más anaranjadas en los casos de las poblaciones 'Z×P' y 'G×C' con respecto a 'B×C', debido probablemente a la influencia del fondo genético de 'Z701-1' ('Orange Red') y el parental 'Goldrich' de tonalidades más anaranjadas. Con respecto a la firmeza del fruto, la población 'Z×P' presentó en general los valores más bajos (27 N), siendo 'G×C' la de mayor firmeza (35 N) (*Tabla 3.2*).

Finalmente, en cuanto al contenido en sólidos solubles y acidez, 'B×C' y 'G×C' parecen mostrar un contenido en sólidos solubles similar (12-13 °Brix), situándose ligeramente por encima de 'Z×P' (11,5-12,5 °Brix). Sin embargo, 'G×C' presentó los mayores valores de acidez (2 g ácido málico/100ml) debido a la influencia de 'Goldrich' que se caracteriza por su elevada acidez, mientras que 'Z×P' y 'B×C' mostraron valores de acidez similares (1,6 g ácido málico/100ml) (*Tabla 3.3*).

Además de la estadística descriptiva de las familias evaluadas, se procedió a determinar la existencia o no de diferencias significativas entre genotipos, entre años, así como la interacción genotipo/año en cada una de las familias y para todos los caracteres considerados. A partir de los análisis Kruskal-Wallis de fecha de floración, fecha de maduración y color del fruto (*Tabla 3.4*) y ANOVA de ciclo de desarrollo del fruto (*Tabla 3.5*), observamos que en fecha de floración no se dan diferencias significativas dentro de los genotipos, aunque si se obtienen diferencias entre años (datos no mostrados).

Igualmente, en el caso del ciclo de desarrollo del fruto, el ANOVA (Tabla 3.5) no mostró diferencias significativas entre genotipos en ninguna de las poblaciones, aunque igualmente que en fecha de floración si se dieron diferencias entre años (datos no mostrados). Esto podría deberse a la alta variabilidad entre años de estos caracteres debido a la influencia de las condiciones ambientales, especialmente temperatura, haciendo la diferencia entre genotipos más baja. Sin embargo, si se dan diferencias significativas entre genotipos y años para fecha de maduración y color del fruto (Tabla 3.4). Las diferencias significativas encontradas entre genotipos para todos los caracteres, a excepción de fecha de floración y ciclo de desarrollo del fruto, era predecible dado el carácter segregante en las descendencias de las poblaciones evaluadas.

**Tabla 3.4.** Análisis Kruskal-Wallis de muestras independientes para los caracteres fecha de floración, fecha de maduración y color del fruto en las poblaciones 'Z×P', 'B×C' y 'G×C'.

Hipótesis nula	Sig. P valor = 0,05			Decisión
	'Z×P'	'B×C'	'G×C'	
La distribución de <b>Fecha de floración</b> es la misma entre las categorías de genotipo	1	0,398	0,778	<u>Retener la hipótesis nula</u>
La distribución de <b>Fecha de maduración</b> es la misma entre las categorías de genotipo	0,020	0,000	0,000	Rechazar la hipótesis nula
La distribución de <b>Color de piel</b> es la misma entre las categorías de genotipo	0,000	0,000	0,000	Rechazar la hipótesis nula
La distribución de <b>Color de chapa</b> es la misma entre las categorías de genotipo	0,000	0,000	0,000	Rechazar la hipótesis nula
La distribución de <b>Color de pulpa</b> es la misma entre las categorías de genotipo	0,000	0,000	0,000	Rechazar la hipótesis nula

**Tabla 3.5.** ANOVA de factor genotipo para el carácter ciclo de desarrollo del fruto.

Población	Grupos	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
'Z×P'	Inter-grupos	15757,148	159	99,102	0,894	0,758
	Intra-grupos	16741,000	151	110,868		
	Total	32498,148	310			
'B×C'	Inter-grupos	11804,956	185	63,811	0,943	0,653
	Intra-grupos	12175,000	180	67,639		
	Total	23979,956	365			
'G×C'	Inter-grupos	12197,734	198	61,605	0,689	0,995
	Intra-grupos	17434,500	195	89,408		
	Total	29632,234	393			

En el análisis multivariante realizado a peso del fruto, peso del hueso, calibre, firmeza, sólidos solubles, pH y acidez, se puede observar que todos los caracteres mostraron diferencias significativas entre genotipos y años, así como también para la interacción entre genotipo y año en las tres familias evaluadas (Tablas 3.6, 3.7 y 3.8), a excepción del peso del hueso en el caso de la población 'Z×P'.

**Tabla 3.6.** Análisis multivariante para los años 2009 y 2010 en los diferentes caracteres pomológicos evaluados de la población 'Z701-1' × 'Palsteyn'.

	Carácter	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Genotipo	Peso del fruto	8178,308	159	51,436	15,084	0,000
	Peso del hueso	309,857	159	1,949	15,355	0,000
	Firmeza	268,192	159	1,687	4,831	0,000
	Sólidos solubles	1714,292	159	10,782	19,591	0,000
	pH	21,645	159	0,136	26,734	0,000
	Acidez	68,458	159	0,431	39,892	0,000
	Año	Peso del fruto	92,464	1	92,464	27,115
Peso del hueso		0,014	1	0,014	0,109	0,741
Firmeza		65,211	1	65,211	186,784	0,000
Sólidos solubles		163,649	1	163,649	297,357	0,000
pH		1,618	1	1,618	317,816	0,000
Acidez		0,126	1	0,126	11,648	0,001
Genotipo/Año		Peso del fruto	3807,819	139	27,394	8,034
	Peso del hueso	86,032	139	0,619	4,877	0,000
	Firmeza	143,201	139	1,030	2,951	0,000
	Sólidos solubles	382,039	139	2,748	4,994	0,000
	pH	2,860	139	0,021	4,040	0,000
	Acidez	7,523	139	0,054	5,015	0,000

**Tabla 3.7.** Análisis multivariante para los años 2012 y 2013 en los diferentes caracteres pomológicos evaluados de la población ‘Bergeron’ × ‘Currot’.

	Carácter	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Genotipo	Peso del fruto	29,318	184	0,159	16,227	0,000
	Peso del hueso	10,119	184	0,055	17,473	0,000
	Calibre	164,042	184	0,892	15,481	0,000
	Firmeza	73,638	184	0,400	8,897	0,000
	Sólidos solubles	1803,485	184	9,802	24,919	0,000
	pH	13,830	184	0,075	21,601	0,000
	Acidez	33,652	184	0,183	46,591	0,000
Año	Peso del fruto	3,688	1	3,688	375,644	0,000
	Peso del hueso	1,570	1	1,570	498,794	0,000
	Calibre	9,908	1	9,908	172,052	0,000
	Firmeza	2,957	1	2,957	65,729	0,000
	Sólidos solubles	174,646	1	174,646	444,012	0,000
	pH	3,019	1	3,019	867,593	0,000
	Acidez	0,805	1	0,805	204,985	0,000
Genotipo/Año	Peso del fruto	9,922	171	0,058	5,909	0,000
	Peso del hueso	1,833	171	0,011	3,406	0,000
	Calibre	54,016	171	0,316	5,485	0,000
	Firmeza	17,534	171	0,103	2,280	0,000
	Sólidos solubles	288,541	171	1,687	4,290	0,000
	pH	3,274	171	0,019	5,503	0,000
	Acidez	5,512	171	0,032	8,211	0,000

**Tabla 3.8.** Análisis multivariante para los años 2012 y 2013 en los diferentes caracteres pomológicos evaluados de la población ‘Goldrich’ × ‘Currot’.

	Carácter	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Genotipo	Peso del fruto	936,088	198	4,728	18,277	0,000
	Peso del hueso	28,402	198	0,143	11,943	0,000
	Calibre	9970,144	198	50,354	18,553	0,000
	Firmeza	97,510	198	0,492	6,567	0,000
	Sólidos solubles	1700,991	198	8,591	21,999	0,000
	pH	14,977	198	0,076	19,480	0,000
	Acidez	121,002	198	0,611	61,051	0,000
Año	Peso del fruto	43,743	1	43,743	169,105	0,000
	Peso del hueso	4,041	1	4,041	336,416	0,000
	Calibre	126,901	1	126,901	46,757	0,000
	Firmeza	0,505	1	0,505	6,729	0,010
	Sólidos solubles	310,788	1	310,788	795,834	0,000
	pH	2,464	1	2,464	634,455	0,000
	Acidez	1,213	1	1,213	121,178	0,000
Genotipo /Año	Peso del fruto	339,020	187	1,813	7,009	0,000
	Peso del hueso	12,067	187	0,065	5,373	0,000
	Calibre	3589,876	187	19,197	7,073	0,000
	Firmeza	26,516	187	0,142	1,891	0,000
	Sólidos solubles	405,763	187	2,170	5,556	0,000
	pH	3,205	187	0,017	4,413	0,000
	Acidez	15,454	187	0,083	8,256	0,000

En cuanto a los resultados obtenidos en otros estudios previos en albaricoquero, destacamos que Ruiz y col. (2008) no encontraron diferencias significativas entre años para el color de piel del fruto, aunque si se dieron diferencias con respecto al color de pulpa. Sin embargo, en otros trabajos sobre albaricoquero también se muestra la alta variabilidad entre variedades en cuanto a peso del fruto (Pérez-Gonzales, 1992; Ledbetter y col., 1996; Badenes y col., 1998), dándose variaciones interanuales significativas. Ruiz y Egea (2008) también indicaron diferencias significativas para firmeza entre genotipos y entre años mediante penetrómetro (método destructivo) y por compresión (método no destructivo).

En cuanto al contenido en sólidos solubles estos mismos autores observaron una gran variabilidad en el grupo de variedades y selecciones de albaricoque examinados. Con respecto a la acidez, Ruiz y Egea (2008) obtuvieron valores que oscilaron entre 0,92 ('Murciana') y 2,60 g ácido málico/100ml ('Z212/6') observándose diferencias significativas entre genotipos.

Sin embargo, Ruiz y Egea (2008) no observaron variaciones interanuales en el caso de la acidez. Todo esto indica una importante diversidad genética previamente descrita por otros autores (Souty y col., 1990; Egea y col., 1997; Audergon y col., 1991b; Gurrieri y col., 2001). Los resultados de este trabajo también mostraron las diferencias interanuales en prácticamente todos los caracteres asociados a calidad del fruto, al igual que otros trabajos previamente realizados en albaricoquero (Audergon y col., 1991b).

#### **3.4.2. Caracterización fenotípica y modo de herencia de caracteres fenológicos y de calidad del fruto**

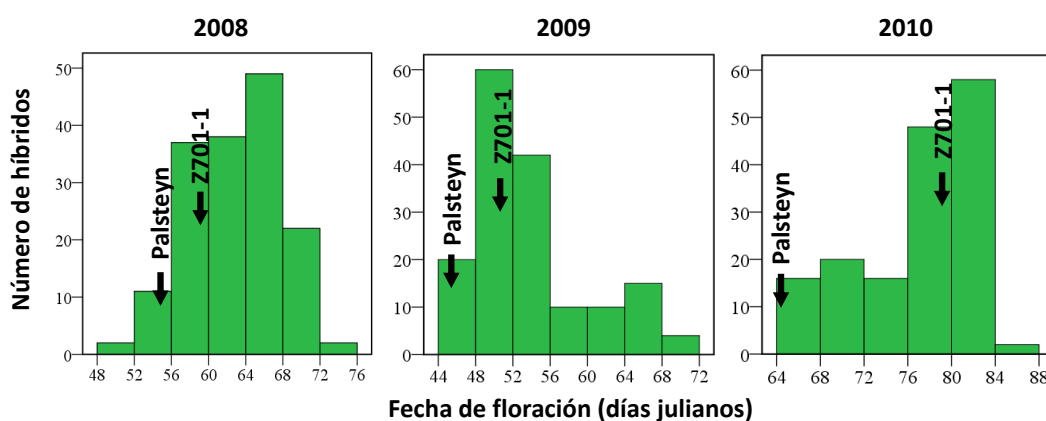
La completa caracterización fenotípica realizada a las tres familias evaluadas en diferentes años, ha permitido disponer de resultados que nos aportan una valiosa información respecto al modo de herencia de los caracteres fenológicos y de calidad del fruto examinados. Para todos los caracteres se han elaborado histogramas de frecuencias de cada población que representan los valores medios de los descendientes y también se ha incluido el valor medio de los parentales.



Para la mayoría de caracteres evaluados, se ha observado una distribución normal en las descendencias, a excepción de fecha de floración y maduración, que no cumplen con el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Esta distribución normal en prácticamente todos los caracteres evaluados corrobora el carácter poligénico y herencia cuantitativa de los mismos. A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada uno de los caracteres estudiados.

### 3.4.2.1. Fecha de floración

En los histogramas de fecha de floración de la población 'ZxP', observamos una distribución normal para el año 2008, mientras que en 2009 y 2010 tiende más a una distribución bi-modal y a un desplazamiento de la descendencia a hacia valores de floración más temprana en 2009 y más tardía en 2010 (*Figura 3.6*).



**Figura 3.6.** Distribución de frecuencias en la población 'ZxP' para fecha de floración.

Asimismo, se observa un elevado porcentaje de individuos mostrando valores transgresivos a los parentales, y más específicamente hacia valores de floración más tardía, probablemente debido a la influencia del fondo genético procedente de uno de los parentales de 'Z 701-1' ('Orange Red') de floración muy tardía. La fecha de floración para los años 2008 y 2009 fue similar oscilando entre 44 y 72 días julianos (13 febrero-12 marzo) siendo en general más temprana en 2009. Sin embargo, la fecha de floración en 2010 fue más tardía entre 64 y 85 días julianos (5-25 marzo). Estas diferencias en fecha de floración entre años son principalmente debidas a que la acumulación de frío es diferente cada año, tanto en valores totales como en el momento de acumulación de frío durante el periodo invernal (*Tabla 2.3, Capítulo 2*).

La mayor parte de los descendientes en 2008 y 2009 florecieron entre 50 y 70 días julianos (19 febrero-11 marzo), mientras en 2010 la floración osciló entre 75-85 (16-27 marzo) (Figura 3.6). Durante estos años ‘Palsteyn’ mostró un carácter más temprano que ‘Z701-1’, lo que sugiere que la selección ‘Z701-1’ no heredó el carácter de floración temprana procedente de ‘Currot’ (Badenes y col., 1998; Campoy y col., 2011a).

Además, ambos parentales retrasaron su floración entre 3 y 4 semanas en 2010 respecto a 2008 y 2009, siendo ‘Palsteyn’ de floración más temprana (finales de febrero a principios de marzo) que ‘Z701-1’ (finales de marzo). Un trabajo previo de Badenes y col. (1998), mostró que ‘Palsteyn’ presenta más bien floración tardía, en torno a mediados de marzo. Así pues, parece evidente la influencia del fondo genético en la expresión de caracteres poligénicos tales como fecha de floración. Estos resultados indican además una posible tendencia a la dominancia del carácter floración tardía sobre temprana.

En cuanto a las poblaciones ‘B×C’ y ‘G×C’ se observa en los histogramas correspondientes a 2012 como ambas descendencias se agrupan en un periodo bastante corto y similar, entre 68 y 88 días julianos (mes de marzo), mientras que en 2013 observamos una mayor variabilidad de los individuos con histogramas que cubren periodos de tiempo más amplios, de 44 a 88 días julianos (mediados de febrero a marzo) (Figura 3.7).

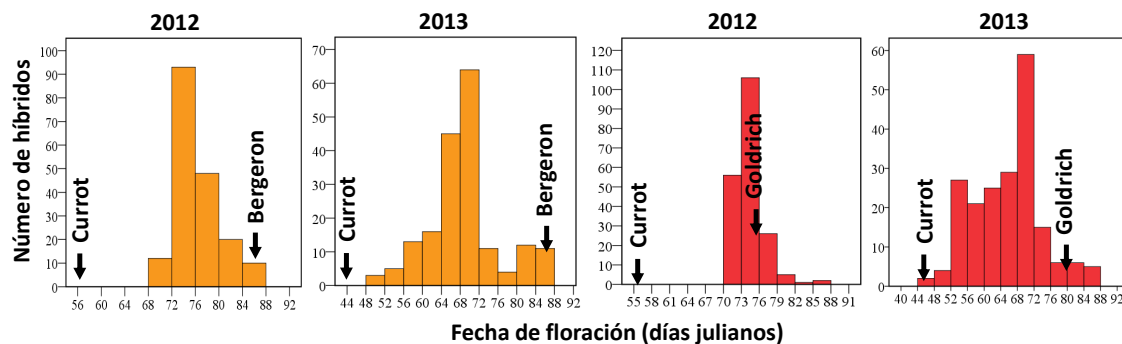


Figura 3.7. Distribución de frecuencias de las poblaciones ‘B×C’ y ‘G×C’ para fecha de floración.

Estas significativas diferencias entre ambos años se explican por la diferente acumulación de frío invernal producida en cada uno de ellos. En el año 2012 la acumulación de frío invernal se produjo tarde y de forma intensa en un periodo reducido de tiempo, entre el 1 de enero y el 15 de febrero (Tabla 2.3, Capítulo 2), lo que repercutió en una salida del letargo invernal más agrupada, dando lugar a floraciones tardías y más agrupadas en las poblaciones.

Por otra parte, el año 2013 fue un año más regular en cuanto a la acumulación de frío invernal (*Tabla 2.3, Capítulo 2*), y la salida del letargo de los descendientes se produjo según se satisfacían sus necesidades de frío invernal, lo que explica la mayor variabilidad de fechas de floración.

Estas diferencias de acumulación de horas frío se hacen más evidentes en el parental 'Currot', con una floración más temprana en el año 2013 en torno a mediados de febrero, siendo en 2012 a finales de febrero. En el caso de 'Bergeron' y 'Goldrich', al ser variedades más tardías, no muestran esa diferencia entre años, aunque si podemos destacar que 'Goldrich' con una floración en torno a mediados de marzo en ambos años muestra floración más temprana que 'Bergeron', que en general florece a finales de marzo (Ruiz y col., 2007).

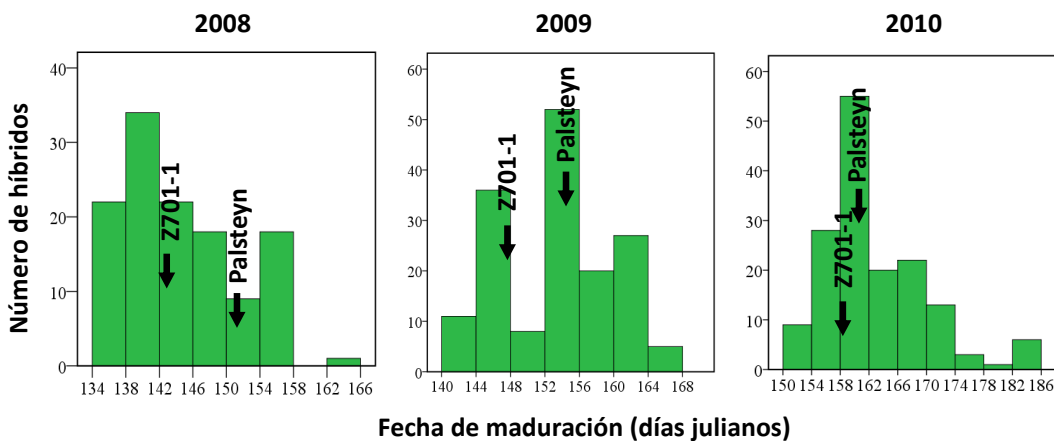
Las diferencias de fecha de floración entre años son muy habituales en nuestras condiciones climáticas y debemos destacar que no sólo se deben a las diferencias de acumulación de horas frío entre años, sino también a que no se da la misma tendencia de acumulación de las mismas durante el periodo invernal. Los resultados ponen de manifiesto la indudable influencia de las necesidades de frío invernal en los distintos genotipos y de la acumulación de frío en cada año para fecha de floración.

Además, observamos al igual que en la población 'Z×P' que los histogramas tienden a una distribución bi-modal en el año 2013, debido probablemente a las diferencias de frío invernal entre años y a una mayor influencia de la floración tardía en 'B×C' procedente de 'Bergeron' y de la floración intermedia-tardía en 'G×C' procedente de 'Goldrich'. Como se aprecia en los histogramas, la mayor parte de los descendientes de ambas poblaciones no heredan el carácter de floración temprana de 'Currot', y ninguno de los descendientes ha mostrado fechas de floración tan tempranas como este parental (*Figura 3.7*). Estos resultados sugieren una tendencia a la dominancia de la floración tardía sobre la temprana, si bien tanto el efecto de la juvenibilidad en las descendencias como las condiciones climáticas anuales también podrían influir en este desplazamiento de los híbridos hacia floraciones tardías.

### 3.4.2.2. Fecha de maduración

La fecha de maduración indica el momento de madurez y consumo óptimos para el mercado en fresco, indicando el final del ciclo de desarrollo del fruto. Como ya hemos visto para fecha de floración, las diferencias entre años originadas por una menor acumulación de horas frío sobre todo en el año 2010, provocan un periodo de latencia de las yemas florales más prolongado, lo cual influye retrasando la fecha de floración y consiguientemente la fecha de maduración.

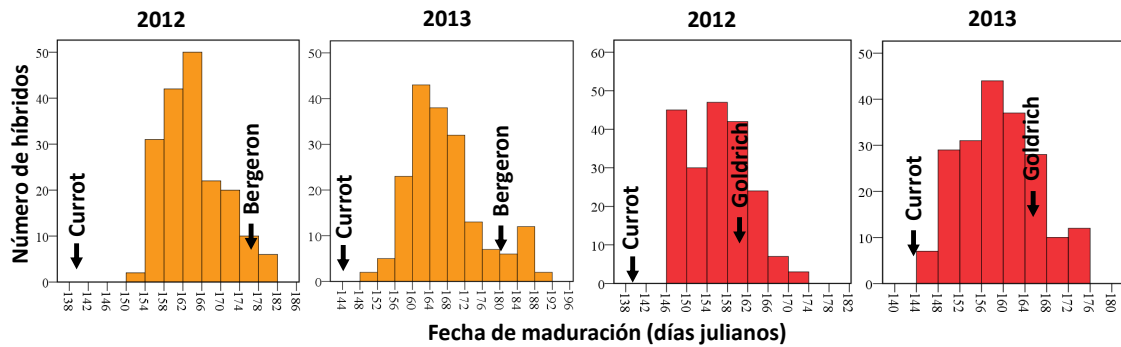
En el caso de fecha de maduración también se muestra una distribución tendente a bi-modal sobre todo en el año 2009, oscilando la fecha de maduración entre el 140 y 168 días julianos (mediados de mayo a mediados de junio), mientras que en 2010 osciló entre 151 y 183 días julianos (durante el mes de junio) y la distribución siguió una tendencia más próxima a la normalidad (Figura 3.8).



**Figura 3.8.** Distribución de frecuencias de la población 'ZxP' para fecha de maduración.

Debemos señalar que este tipo de distribuciones son muy comunes en fecha de floración y maduración, e incluso pueden llegar a darse distribuciones tri-modales como es el caso de las poblaciones de melocotonero estudiadas por Etienne y col. (2002) y Pirona y col. (2013). En 2008 y 2009 la mayoría de los individuos alcanzaron la fecha de maduración entre finales de mayo y primeros de junio, fechas similares a las indicadas por Ruiz y Egea, (2008) para las variedades 'Orange Red' y 'Z701-1', mientras que 'Palsteyn' maduró en la primera semana de junio, lo que coincide con la descripción de otros autores (Badenes y col., 1998). En 2010 la mayoría de los descendientes alcanzaron su fecha de maduración casi a mediados de junio coincidiendo ambos parentales en el mismo periodo.

En las poblaciones 'B×C' y 'G×C' se observa en general una distribución normal de las descendencias, aunque podemos observar que al igual que en el caso de fecha de floración, los histogramas muestran una mayor agrupación de las descendencias en 2012 que en 2013 (Figura 3.9), aunque estas diferencias entre años son menos evidentes para fecha de maduración que en el caso de fecha de floración.

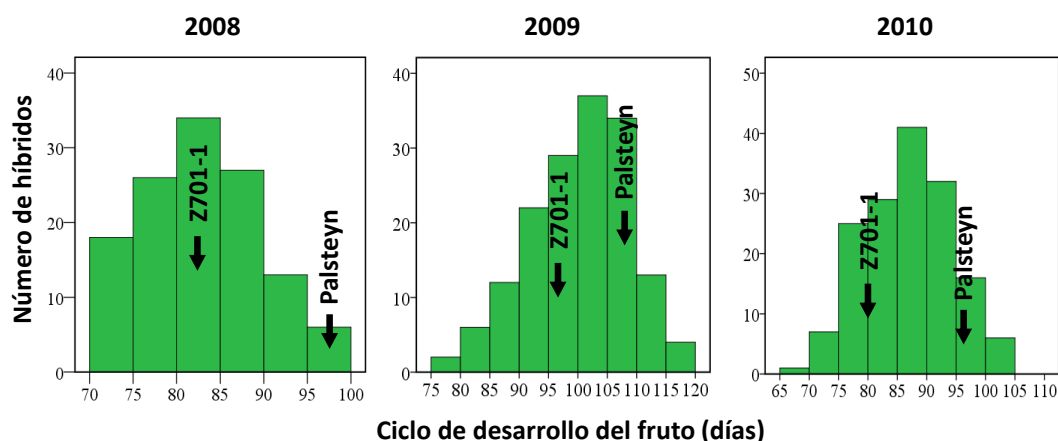


**Figura 3.9.** Distribución de frecuencias de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' para fecha de maduración.

La mayoría de individuos de la población 'B×C' alcanzaron su fecha de maduración entre 154 y 170 días julianos, es decir, durante las tres primeras semanas de junio en ambos años, mientras que en la población 'G×C' la fecha de maduración se situó entre 146 y 164 días julianos, lo que se corresponde con la última semana de mayo y las 2 primeras semanas de junio. Así pues, se da una diferencia de una semana entre ambas poblaciones, observando una mayor influencia de la maduración intermedia de 'Goldrich' (mediados de junio) en la población 'G×C' y la influencia de 'Bergeron' de maduración tardía de finales de junio sobre el carácter de maduración temprana procedente de 'Currot' en ambas poblaciones.

### 3.4.2.3. Ciclo de desarrollo del fruto

El ciclo de desarrollo del fruto comprende el periodo de tiempo transcurrido entre la fecha de floración y la fecha de madurez óptima del fruto, estando este parámetro relacionado con el grado de precocidad de cada individuo. Además, éste se ve influenciado igualmente por las condiciones ambientales de cada año, tanto por la acumulación de horas frío en el periodo invernal, como por las temperaturas que se dan después de floración durante el proceso de desarrollo y maduración del fruto.



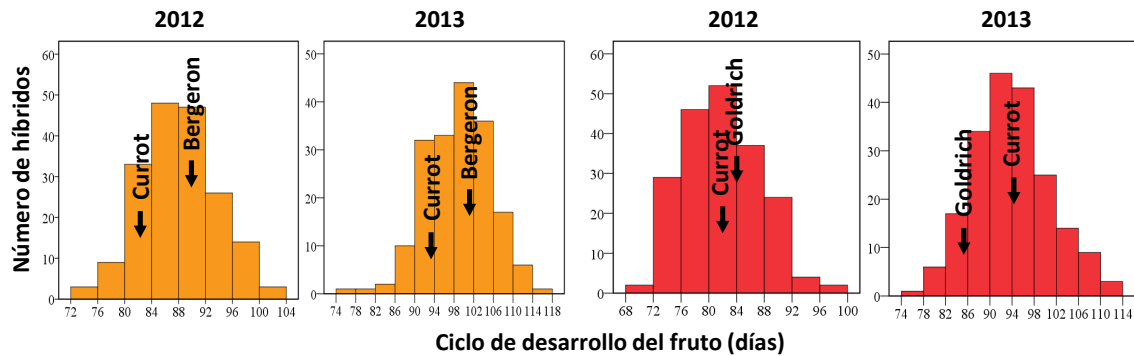
**Figura 3.10.** Distribución de frecuencias de la población 'ZxP' para ciclo de desarrollo del fruto.

En el caso de la población 'ZxP' los histogramas muestran una distribución normal de la población en los tres años (*Figura 3.10*), obteniendo la mayoría de descendientes un ciclo de desarrollo del fruto entre 75 y 95 días en 2008 y 2010. Sin embargo, en 2009 se dieron los mayores valores para este carácter (95-110) coincidiendo con el año de floración más temprana.

Los histogramas muestran que el ciclo de desarrollo del fruto para 'Z701-1' osciló entre 83 y 80 días en 2008 y 2010 respectivamente, mientras que en 'Palsteyn' fue de 97 días en ambos años. En 2009 se dieron mayores valores de ciclo de desarrollo del fruto, ya que 'Z701-1' necesitó 96 días para cubrir su ciclo de desarrollo, mientras que 'Palsteyn' lo hizo en 109 días. Como podemos ver, a pesar de que 'Palsteyn' muestra una floración más temprana, 'Z701-1' tiene un ciclo de desarrollo del fruto más corto que 'Palsteyn'. Esto puede deberse a que uno de los parentales de 'Z701-1' ('Orange Red') es una variedad caracterizada por un ciclo de desarrollo muy corto (Ruiz y Egea, 2008), por lo que algunos descendientes de la población muestran esta característica. Así pues, podemos observar una vez más la influencia del fondo genético en la expresión de este carácter.

En el caso de las poblaciones 'BxC' y 'GxC', también se aprecia una distribución normal de los histogramas, dándose en 2012 un ciclo ligeramente más corto, oscilando entre 72 y 104 días en 'BxC' y entre 68 y 100 en 'GxC' (*Figura 3.11*).

En 2013 algunos individuos alargan su ciclo probablemente debido a que este año fue de floración más temprana lo que motivó que los híbridos más precoces necesitaran más días para llegar a su estado de maduración óptimo. También observamos un elevado número de descendientes con valores transgresivos a los parentales en ambos años y en ambas poblaciones (*Figura 3.11*).



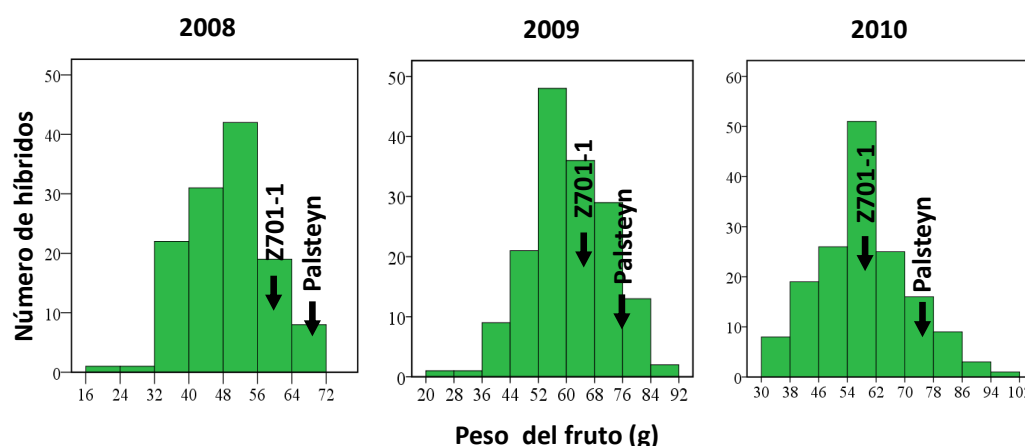
**Figura 3.11.** Distribución de frecuencias de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' para ciclo de desarrollo del fruto.

En cuanto a los parentales, observamos claramente como 'Currot' con 83 y 94 días en 2012 y 2013 respectivamente, muestra un ciclo de desarrollo del fruto bastante más corto que 'Bergeron', con 91 y 100 días respectivamente. Sin embargo, entre 'Currot' y 'Goldrich' observamos que no se da una misma tendencia, ya que en 2012 ambos muestran un ciclo de desarrollo de 83 y 84 días respectivamente, lo que nos hace pensar que ambos tienen un ciclo similar, sin embargo, en 2013 'Currot' con 94 días muestra un ciclo más largo que 'Goldrich' con 86 días.

Esto puede deberse a la diferente tendencia en la acumulación de horas frío entre años, ya que como se ha mencionado anteriormente 2012 fue un año en el que la acumulación del frío invernal fue muy tardía, siendo 2013 un año más proporcionado en cuanto a acumulación de frío, lo que produce un comportamiento diferente en el parental 'Currot', produciéndose una salida del letargo invernal más prematura lo que le lleva a alargar su ciclo frente a variedades de floración intermedia como es el caso de 'Goldrich'.

### 3.4.2.4. Peso del fruto

El tamaño del fruto se encuentra directamente vinculado al peso del mismo y por ello utilizamos el parámetro peso del fruto como medida orientativa del tamaño. Aunque en las poblaciones 'BxC' y 'GxC' también se evaluó el calibre del fruto, el cual está estrechamente correlacionado con el peso, hemos considerado el peso del fruto como referencia de tamaño en las tres poblaciones.



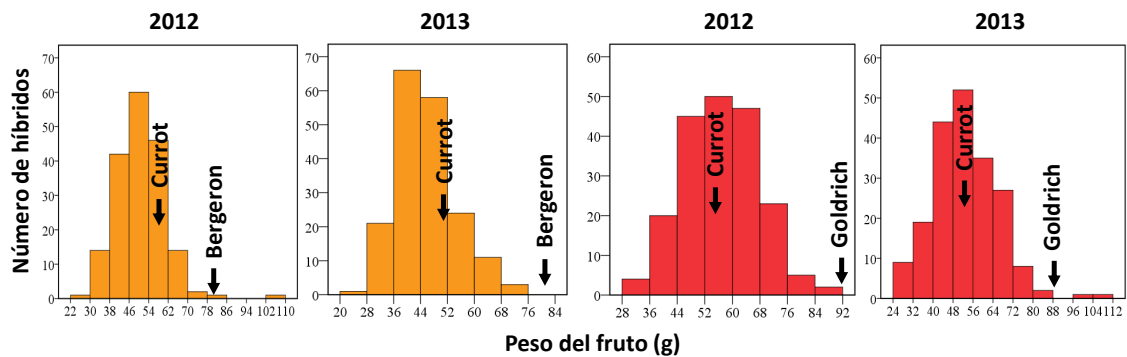
**Figura 3.12.** Distribución de frecuencias de la población 'ZxP' para peso del fruto.

Respecto al peso del fruto, en la población 'ZxP', los histogramas muestran una distribución normal de la población para los tres años. En el año 2008 la mayoría de los descendientes obtuvieron valores entre 32 y 56 g mientras que en 2009 y 2010 estos resultados fueron superados alcanzando valores de entre 46 y 70 g (Figura 3.12).

Estas diferencias pueden deberse a que 2008 fue el primer año de producción de esta población, dando lugar posiblemente a frutos de menor tamaño y por tanto de menor peso. Sin embargo, los parentales obtuvieron un peso medio similar cada año, oscilando entre 59 y 68 g en 'Z701-1' y entre 67 y 76 g en el caso de 'Palsteyn', siendo el peso obtenido por 'Palsteyn' ligeramente inferior al obtenido por Badenes y col. (1998). Por otro lado, los valores de peso medio obtenidos para 'Z701-1' (en torno a 60 g) fueron intermedios a los obtenidos por sus parentales 'Orange Red' y 'Currot' (Badenes y col., 1998; Benito y Díaz, 2010).



En las poblaciones 'BxC' y 'GxC' los resultados obtenidos para los parentales muestran que 'Currot' alcanzó el menor peso medio, en torno a 50 g, siendo 'Goldrich' el parental que obtuvo mayor peso en ambos años con valores en torno a los 90 g, superior también a 'Bergeron', el cual presentó valores cercanos a los 80 g de peso medio en los dos años (Figura 3.13). Los valores de peso del fruto de 'Currot' descritos por otros autores son ligeramente inferiores, en torno a los 40 g (Valero y col., 1998; Badenes y col., 1998; Ruiz y Egea, 2008). Sin embargo el peso medio de 'Bergeron' oscila entre 70 y 80 g según Ruiz y Egea (2008) y Benito y Díaz (2010), mientras que 'Goldrich' puede llegar a superar los 100 g (Benito y Díaz, 2010).



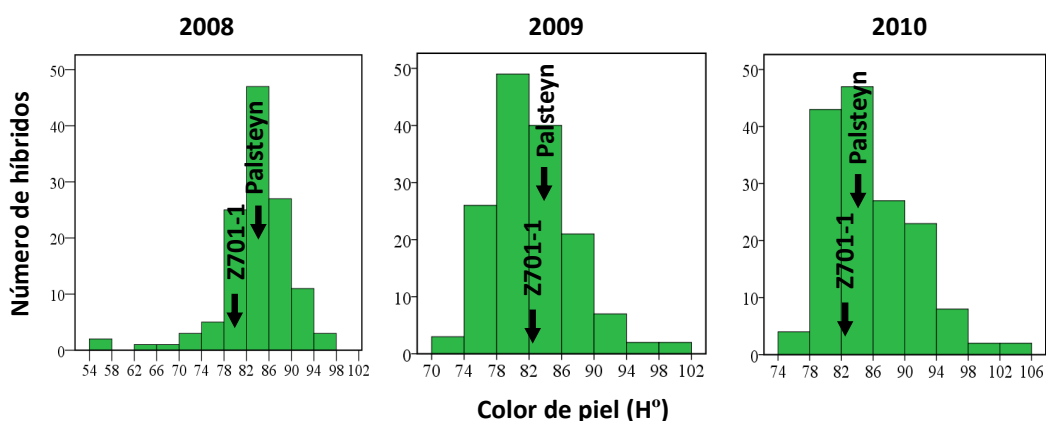
**Figura 3.13.** Distribución de frecuencias de las poblaciones 'BxC' y 'GxC' para peso del fruto.

En los histogramas de ambas poblaciones y en los dos años se observa una distribución normal, lo que indica el carácter poligénico del carácter peso del fruto (Figura 3.13). En la población 'BxC' el peso del fruto en la mayoría de individuos oscila entre 36 y 60 g en los dos años, mientras que en la población 'GxC' los valores varían entre 40 y 70 g, esta pequeña variación podría deberse a la influencia del parental 'Goldrich', caracterizado por su elevado tamaño y peso del fruto.

En ambas poblaciones se observa un elevado porcentaje de descendientes con valores transgresivos inferiores al valor del parental 'Currot' (Figura 3.13), lo que parece indicar la posible dominancia del bajo peso del fruto característico de 'Currot', sobre peso elevado de fruto que caracteriza a los otros parentales 'Goldrich' y 'Bergeron'.

### 3.4.2.5. Color de piel

El color de piel es representado por el ángulo  $H^\circ$  que resulta de la combinación de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  en el espacio de coordenadas. En la población 'ZxP' los histogramas muestran una distribución normal los tres años evaluados. El color de piel durante los tres años osciló para la mayoría de descendientes entre valores  $H^\circ$  de 78 y 86, lo que indica una mayor tendencia de la población hacia el color de fondo de piel amarillo-anaranjado claro (Figura 3.14).



**Figura 3.14.** Distribución de frecuencias de la población 'ZxP' para color de piel.

Los parentales 'Palsteyn' y 'Z701-1' obtuvieron valores muy similares entre ellos (81-85), observándose valores transgresivos a los parentales especialmente tendentes hacia valores más elevados de  $H^\circ$ , lo que indica tonalidades de color de piel amarillo o color crema (Figura 3.14).

Esto sugiere una mayor influencia del fondo genético del parental 'Z701-1', siendo uno de los parentales de éste la variedad 'Currot', la cual se caracteriza por una coloración amarillo-crema tal como describen Ruiz y Egea (2008). Además, el fondo genético procedente de 'Orange Red', con color de piel más anaranjado (Ruiz y Egea, 2008; Benito y Díaz, 2010), también se manifiesta en esta población aunque en menor medida, ya que se observan algunos descendientes con valores de  $H^\circ$  inferiores a los dos parentales, indicativo de coloración anaranjada (Figura 3.14).

En el caso de las poblaciones 'BxC' y 'GxC', 'Currot' con valores en torno a 90 (Ruiz y Egea, 2008) en ambos años, muestra un color de fondo de piel amarillo claro, mientras que los parentales 'Goldrich' y 'Bergeron' se sitúan en los extremos del histograma con valores muy similares entre ellos, que oscilan entre 75 y 80 (Figura 3.15) lo que indica un color de fondo anaranjado (Benito y Díaz, 2010).

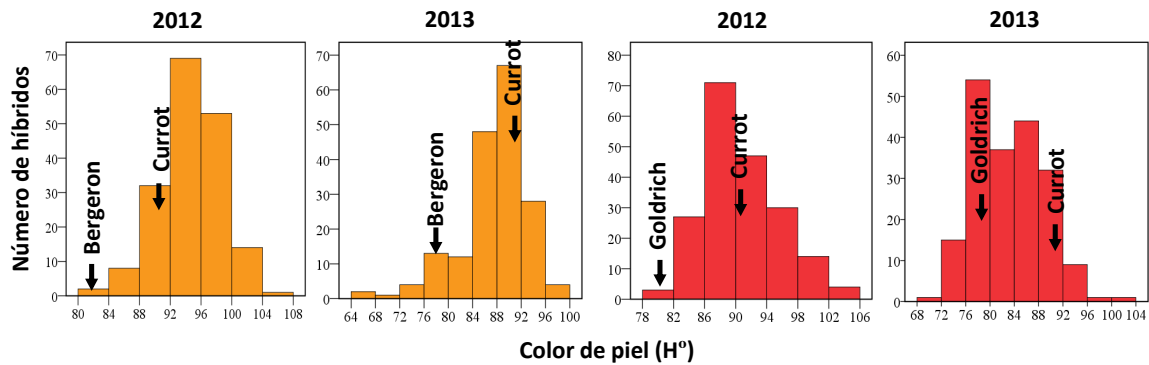
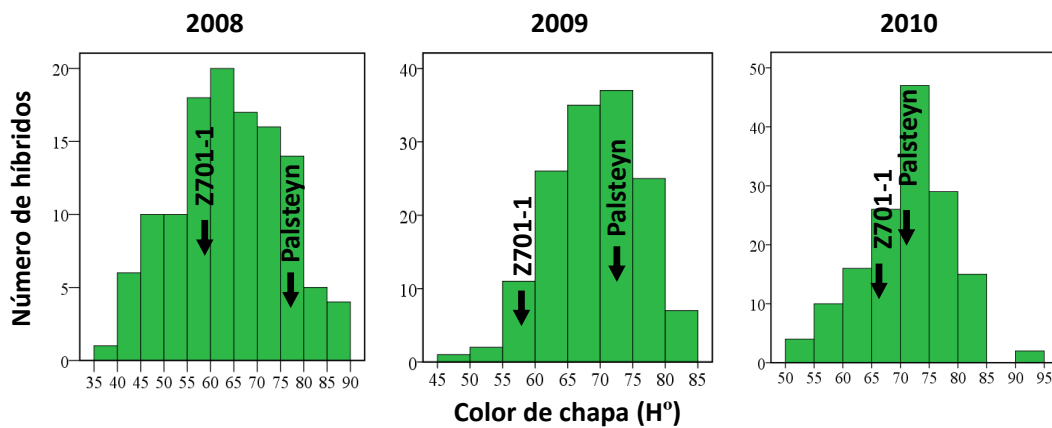


Figura 3.15. Distribución de frecuencias de las poblaciones 'BxC' y 'GxC' para color de piel.

En ambas poblaciones se evidencia una mayor influencia del parental 'Currot', ya que un porcentaje elevado de individuos presentan en ambos años valores de H° similares o incluso superiores a 'Currot', lo que indica una coloración de piel amarilla-blanco crema. Debemos destacar también la diferencia del color de piel entre años, ya que en 2013 se observa un mayor número de individuos con frutos de piel más anaranjada (Figura 3.15), lo cual puede deberse al efecto año motivado por diferentes factores tales como intensidad de radiación solar o la oscilación de temperaturas diurnas y nocturnas (Layne y col., 2001).

#### 3.4.2.6. Color de chapa

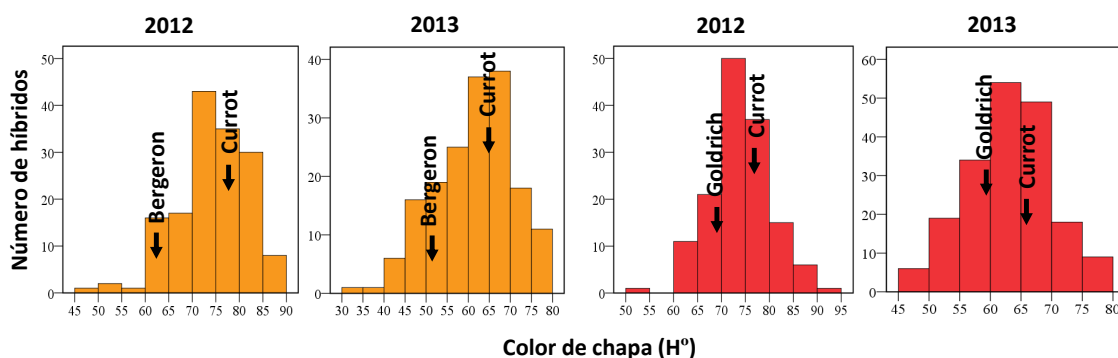
La chapa es una coloración naranja-rojiza muy característica presente en una región de la piel del fruto de algunas variedades, aportando al fruto un mayor atractivo y aspecto visual. En el caso de la población 'ZxP' durante los tres años examinados también se da una distribución normal en la población, dándose un rango de valores H° de coloración de chapa entre 35 y 95 (Figura 3.16), lo que indica valores de chapa que oscilan entre tonalidades muy rojizas a ligeramente amarillas.



**Figura 3.16.** Distribución de frecuencias de la población 'ZxP' para color de chapa.

Sin embargo, a pesar de esta gran variabilidad, la mayoría de los individuos muestran un color de chapa que tiende a tonalidades naranja-rojizas (55-75). En cuanto a los parentales, 'Z701-1' mostró en estos años un color de chapa medio entre 60-65 (tonalidades rojizas), resultados similares a los descritos por Ruiz y Egea (2008) para 'Orange Red', mientras que 'Palsteyn' mostró tonalidades de chapa más anaranjadas (70-75).

En las poblaciones 'BxC' y 'GxC' se aprecia también una distribución normal en las descendencias con valores H° que oscilan entre 30 y 95 (Figura 3.17) en ambas poblaciones, abarcando por tanto un abanico amplio de tonalidades de chapa al igual que en la población 'ZxP'.



**Figura 3.17.** Distribución de frecuencias de las poblaciones 'BxC' y 'GxC' para color de chapa.

En este caso, 'Bergeron' con un color de chapa similar a 'Goldrich' es el parental que presenta una chapa más rojiza en ambos años en torno a 50 y 60, mientras que 'Currot' presenta un color de chapa más anaranjado (65-80) (Figura 3.17).

Al igual que en color de piel podemos apreciar una diferencia entre años bastante notable, ya que para el año 2012 la mayoría de individuos en ambas poblaciones oscila en valores en torno a 65 y 85, mientras que en 2013 estos valores disminuyen a un intervalo de 55-70 (Figura 3.17). Este desplazamiento de los valores hacia la izquierda del histograma indica una tendencia a tonalidades más rojizas de chapa en el año 2013, debido probablemente a ciclos de desarrollo del fruto más largos, lo que redundaría en una mayor exposición a la radiación solar.

### 3.4.2.7. Color de pulpa

El color de pulpa junto con el color de fondo de piel es uno de los parámetros más importantes en relación a la percepción visual de la calidad del fruto. En la población 'ZxP' los histogramas muestran una distribución normal, si bien desplazada hacia valores bajos de H° especialmente en los años 2009 y 2010, indicativo de un elevado número de descendientes con coloración anaranjada, presentando ambos parentales un color de pulpa similar (Figura 3.18), ya que ambos se caracterizan por un color de pulpa ligeramente anaranjado.

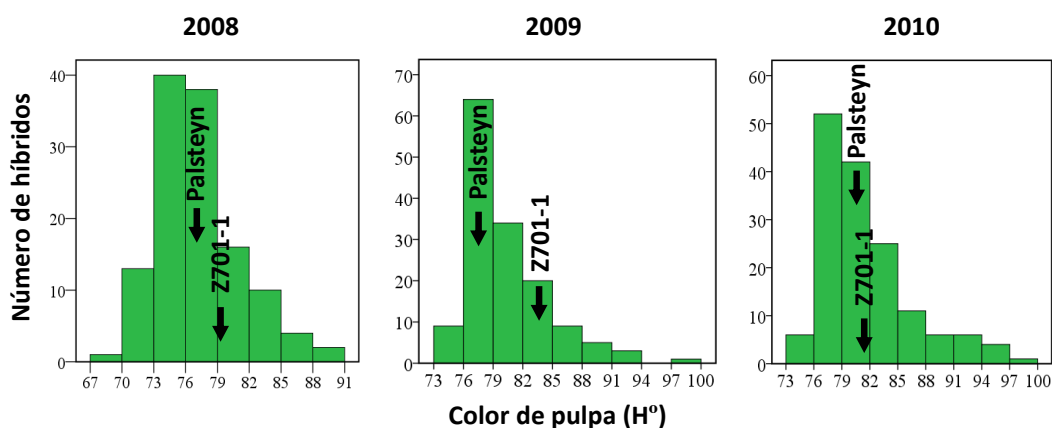
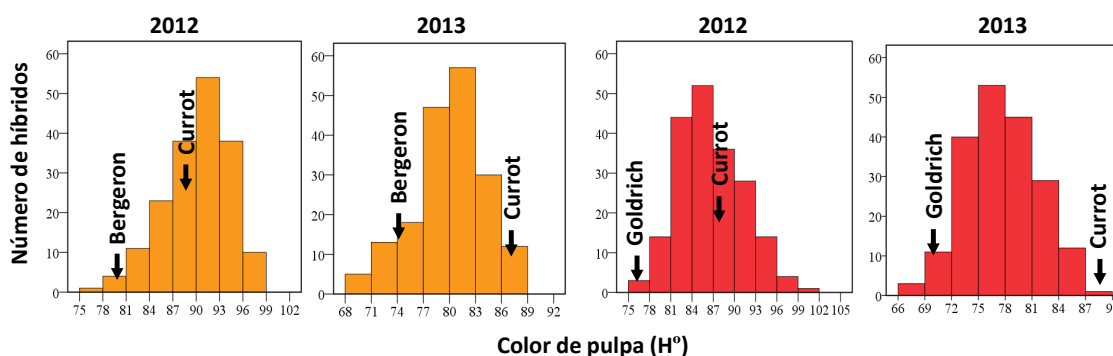


Figura 3.18. Distribución de frecuencias de la población 'ZxP' para color de pulpa.

La mayoría de los individuos presentaron valores H° para el color de pulpa entre 73 y 82, si bien un gran número de descendientes mostraron valores inferiores (anaranjados), probablemente influenciados por uno de sus ancestros ('Orange Red'), o valores más elevados probablemente debido al color crema-amarillo claro de la pulpa de 'Currot' (Ruiz y Egea, 2008; Benito y Díaz, 2010). Así pues, en este carácter también se manifiesta apreciablemente el efecto del fondo genético de los parentales sobre las descendencias.

Respecto a las poblaciones 'BxC' y 'GxC', 'Goldrich' es el parental que presenta un color de pulpa más anaranjado con valores de H° de 76 y 69 en 2012 y 2013 respectivamente. El parental 'Bergeron' presentó valores de H° algo superiores, lo que indica una coloración naranja claro, mientras que 'Currot' mostró valores de H° de 87 y 88 en ambos años, lo que indica una coloración amarillo claro.

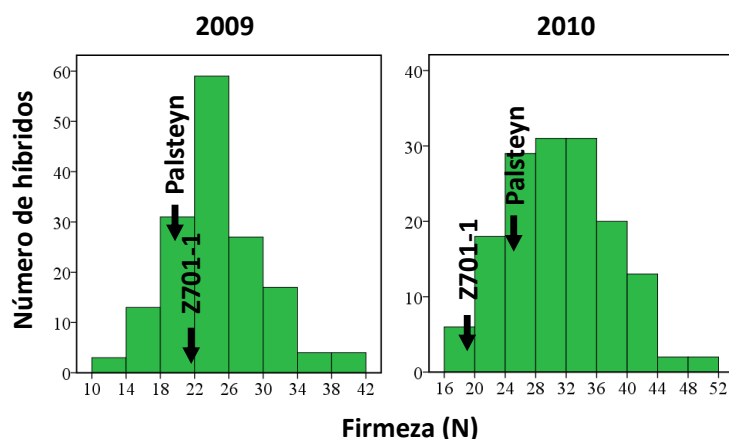


**Figura 3.19.** Distribución de frecuencias de las poblaciones 'BxC' y 'GxC' para color de pulpa.

Ambas poblaciones mostraron distribuciones normales en los dos años evaluados (Figura 3.19), corroborando el tipo de herencia cuantitativa de este carácter. Al igual que en el color de piel y chapa, observamos una mayor coloración de pulpa en el año 2013 donde la mayoría de descendientes mostraron valores H° entre 72 y 86, mientras que en 2012 se dieron valores H° superiores (entre 80 y 95), lo que parece indicar el efecto año sobre este carácter.

### 3.4.2.8. Firmeza del fruto

La firmeza del fruto es un parámetro de calidad de gran importancia ya que, junto con el color es el mejor indicador de la madurez del fruto y de su momento óptimo de recolección. Además, la firmeza determina en gran medida la aptitud de la variedad para los procesos de manipulación, comportamiento postcosecha, almacenado y transporte, que finalmente influirá notablemente en la aceptación del consumidor. En la población 'ZxP', los valores medios para los años 2009 y 2010 oscilaron entre 15 y 50 N (Figura 3.20), obteniéndose una distribución normal para ambos años.

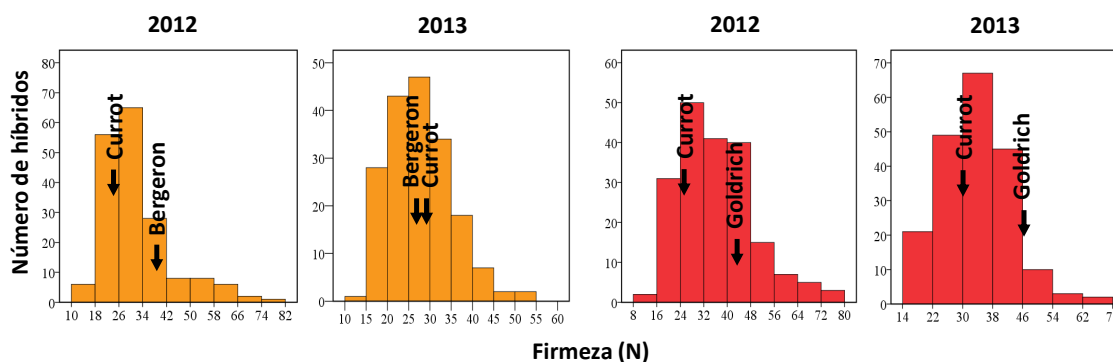


**Figura 3.20.** Distribución de frecuencias de la población 'ZxP' para firmeza del fruto.

La mayoría de los descendientes en 2009 alcanzaron unos valores de firmeza en torno a 18 y 30 N, mientras que en 2010 la firmeza osciló entre 24 y 36 N. Los resultados obtenidos por los parentales fueron muy similares oscilando entre 19 y 25 N. 'Z701-1' con un valor medio de 20 N en ambos años obtuvo valores por debajo de los obtenidos por Ruiz y Egea (2008). En cuanto a 'Palsteyn', los valores de firmeza fueron más altos que los obtenidos por Badenes y col. (1998).

Además, en general podemos apreciar que gran parte de los descendientes obtuvieron en ambos años valores muy superiores a los de sus parentales, probablemente debido a la influencia del fondo genético aportado por 'Orange Red' que es descrito por otros autores con una firmeza en torno a 40 N (Infante y col., 2007, Lo Bianco y col., 2010) o valores incluso de 60 N (Ruiz y Egea, 2008).

En el caso de las poblaciones 'BxC' y 'GxC', 'Currot' mostró valores de firmeza en torno a 25-30 N (Figura 3.21), coincidiendo con lo descrito previamente por otros autores (Valero y col., 1998). Los parentales 'Goldrich' y 'Bergeron' obtuvieron valores de firmeza superiores, siendo 'Goldrich' con una firmeza por encima de 40 N (Infante y col., 2007; Lo Bianco y col., 2010) el parental con valores de firmeza más elevada en ambos años, mientras que 'Bergeron' parece mostrar una dureza intermedia (25-35 N), tal y como describen Ruiz y Egea (2008) con una firmeza media de 33 N.

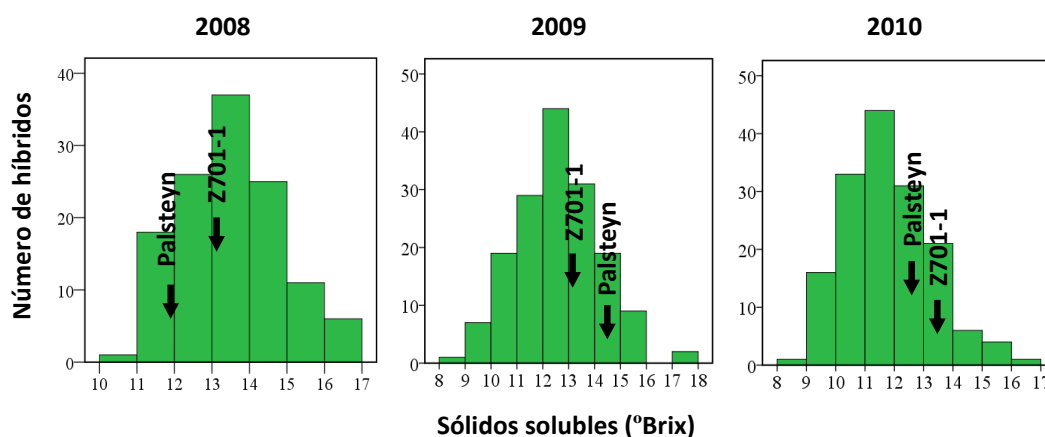


**Figura 3.21.** Distribución de frecuencias de las poblaciones 'BxC' y 'GxC' para firmeza.

En ambas poblaciones hay valores que oscilan entre 10 y 80 N, lo que indica la gran segregación obtenida en ambas familias y la influencia del fondo genético en ambas poblaciones, con valores transgresivos respecto a los parentales en buena parte de los descendientes. No obstante, en la población 'BxC' los valores más normales oscilaron en torno a 18 y 35 N, mientras que en 'GxC' fueron entre 24 y 48 N, apreciándose la influencia de 'Goldrich' en relación a éste parámetro (Figura 3.21).

### 3.4.2.9. Contenido en sólidos solubles

El contenido en sólidos solubles junto con la acidez son sin duda dos de los parámetros más importantes en la calidad organoléptica del fruto, lo que determina en buena medida el grado de aceptación por parte del consumidor. Los resultados obtenidos en la población 'ZxP' mostraron valores de sólidos solubles que oscilaron en los tres años entre 8 y 18 °Brix, dándose una distribución normal de la población y obteniendo la mayoría de individuos valores entre 11 y 14 °Brix (Figura 3.22).

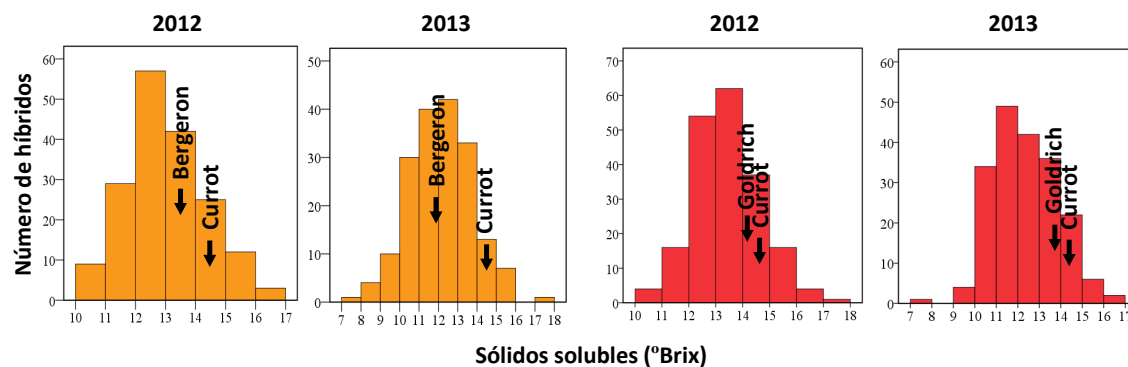


**Figura 3.22.** Distribución de frecuencias de la población 'ZxP' para sólidos solubles.



En los años 2008 y 2010, el parental 'Z701-1' con valores por encima de 13 °Brix mostró un mayor contenido en sólidos solubles que 'Palsteyn', el cual oscila entre 12 y 13 °Brix, valores cercanos a otros estudios previos (Badenes y col., 1998), mientras que 'Z701-1' llega a valores de 14,1 °Brix según Ruiz y Egea (2008), probablemente debido a la alta concentración de sólidos solubles de su parental 'Orange Red' (Ruiz y Egea, 2008; Infante y col., 2007). Los resultados muestran una amplia variabilidad en el contenido en sólidos solubles de los descendientes, poniendo de manifiesto el complejo modo de herencia de este carácter, sin duda poligénico y de herencia cuantitativa, e influenciado por el fondo genético de los parentales.

En las poblaciones 'B×C' y 'G×C' los valores de sólidos solubles oscilan entre 10 y 18 °Brix en el año 2012 y entre 7 y 18 °Brix para el año 2013 (Figura 3.23), por lo que se da una amplia diversidad en cuanto a la concentración de azúcares. En este caso, el parental 'Currot' con casi 14,5 °Brix es el que presenta un mayor nivel de azúcares, coincidiendo con los valores descritos por Badenes y col. (1998), presentando valores ligeramente superiores a 'Goldrich' (Infante y col., 2007; Llácer, 2000), mientras que 'Bergeron' presenta menor contenido en sólidos solubles en torno a 12 y 13 °Brix, similares a los descritos en trabajos previos (Ruiz y Egea, 2008).



**Figura 3.23.** Distribución de frecuencias de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' para sólidos solubles.

En ambas poblaciones y años los resultados revelan una distribución normal de los descendientes y una gran variabilidad respecto al contenido de azúcares, lo que confirma la buena segregación de este carácter en ambas poblaciones (Figura 3.23).

La mayor parte de individuos obtiene valores de sólidos solubles entre 11 y 14 °Brix, si bien se observan valores transgresivos sobre todo hacia niveles de azúcares inferiores a los parentales y en menor medida valores por encima de los parentales (Figura 3.23), debido en ambos casos a la influencia del fondo genético.

### 3.4.2.10. Acidez y pH del fruto

La acidez es uno de los parámetros organolépticos más importantes que junto al contenido en sólidos solubles conforman gran parte del sabor del fruto y por tanto un mayor o menor grado de aceptación por parte del consumidor. Un buen equilibrio de acidez y contenido en azúcares es indicativo de buen sabor y elevada calidad gustativa, mientras que valores muy elevados de acidez pueden conllevar una baja aceptación por parte del consumidor.

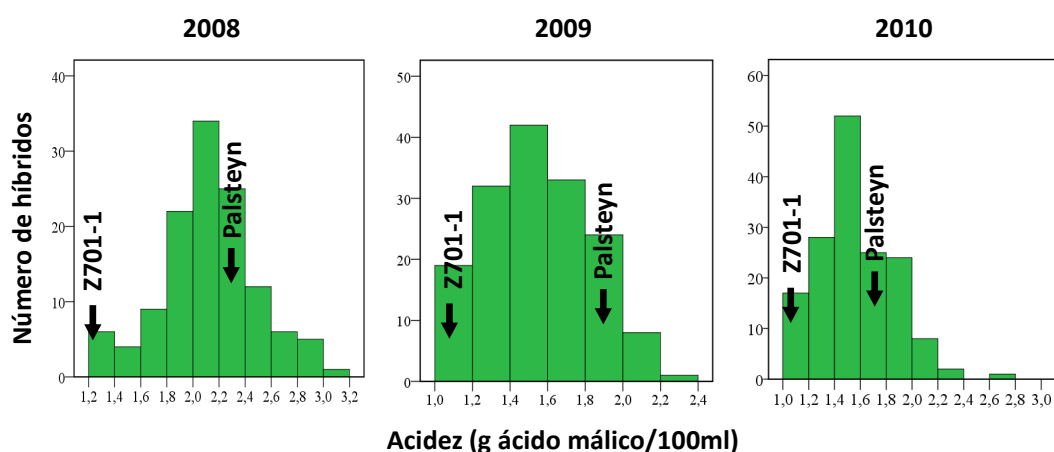


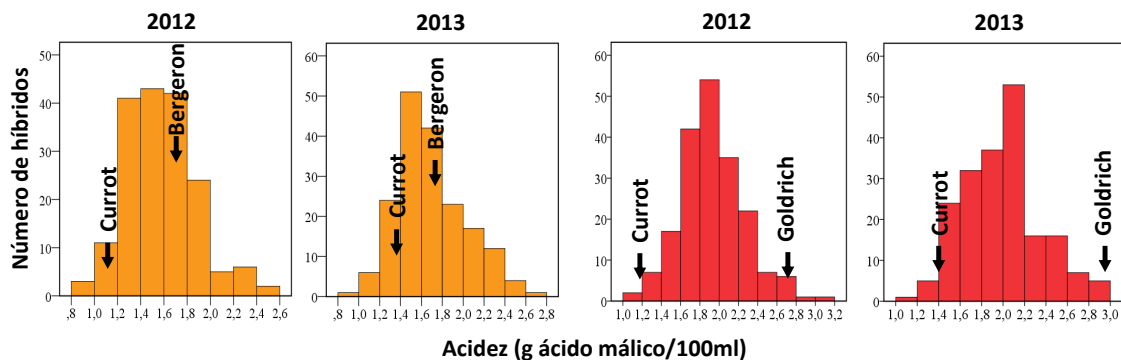
Figura 3.24. Distribución de frecuencias de la población 'ZxP' para acidez.

Los valores de pH y acidez se encuentran inversamente relacionados entre sí, siendo el ácido málico el predominante en albaricoque, seguido de cítrico y tartárico. En las tres poblaciones se da un intervalo de pH que oscila entre 3 y 4, siendo los histogramas muy similares a los de ácido málico (datos no mostrados), por ello en este trabajo se mostrarán únicamente los resultados relativos al ácido predominante.

En la población 'ZxP', durante los tres años de fenotipado la acidez osciló entre 1 y 2,8 g ácido málico/100 ml (Figura 3.24), observándose por tanto una amplia variabilidad y segregación en la descendencia que oscila entre niveles muy bajos de acidez y valores relativamente altos. Esta población mostró una distribución normal para este carácter, confirmando su modo de herencia de tipo cuantitativo.

Debemos destacar que la mayoría de individuos en 2009 y 2010 oscilaron en torno a valores de 1,2 y 1,8 mientras que en 2008 estos valores fueron más altos entre 1,8 y 2,4, probablemente debido a que 2008 fue el primer año de producción, dando lugar a frutos con mayor grado de acidez. Por tanto, podemos considerar que 2009 y 2010 fueron años más equilibrados en cuanto a este parámetro. Además, los elevados valores de acidez obtenidos para ‘Palsteyn’ son similares a los publicados por Badenes y col. (1998) y los valores más bajos de acidez de ‘Z701-1’ pueden ser debidos a que sus parentales ‘Orange Red’ y ‘Currot’ muestran valores de acidez en torno a 1,2 y 1,4 (Infante y col., 2007; Ruiz y Egea, 2008).

En cuanto a las poblaciones ‘B×C’ y ‘G×C’, podemos observar igualmente una distribución normal en los histogramas de frecuencias de las descendencias, con una amplia diversidad de valores que oscilan entre 0,8 y 2,8 en la población ‘B×C’ y entre 1 y 3,2 en la población ‘G×C’ (Figura 3.25).



**Figura 3.25.** Distribución de frecuencias de las poblaciones ‘B×C’ y ‘G×C’ para acidez.

El parental ‘Currot’ es el de menor contenido en ácido málico con valores entre 1,1 y 1,4, seguido por ‘Bergeron’ en torno a 1,7 y ‘Goldrich’ con valores que oscilan entre 2,7 y 2,9. Así pues, en este caso, podemos apreciar que en general la mayoría de individuos de la población ‘B×C’ obtiene en ambos años una acidez que oscila entre 1,2 y 1,8, mientras que en la población ‘G×C’ el grado de acidez se incrementa en torno a valores de 1,6 y 2,2.

Esta tendencia se debe al grado de acidez tan elevado de ‘Goldrich’ (Infante y col., 2007; Llácer, 2000) el cual aporta una mayor acidez a sus descendientes en comparación con ‘Bergeron’ que presenta niveles de acidez en torno a 1,7 (Ruiz y Egea, 2008).

Podemos destacar también la presencia de individuos transgresivos en la población 'BxC' que tienden a niveles de acidez más altos que los propios parentales, lo que indica la influencia del fondo genético de estos parentales. Como hemos visto, el nivel de ácido málico mostró en todas las poblaciones una gran variabilidad, lo que muestra el modo de herencia cuantitativo de este carácter. Además, en los histogramas de las 3 poblaciones se observa en general una herencia intermedia de los descendientes, obteniendo en la mayoría de los casos valores situados entre ambos parentales sobre todo en la población 'Goldrich' × 'Currot'.

### 3.4.3. Correlaciones entre caracteres fenológicos y de calidad de fruto

Las correlaciones anuales e interanuales fueron analizadas para los diferentes caracteres evaluados en 2009 y 2010 en la población 'ZxP' (Tabla 3.9) y para los años 2012 y 2013 en el caso de las poblaciones 'BxC' (Tabla 3.10) y 'GxC' (Tabla 3.11).

**Tabla 3.9.** Coeficiente de correlación de Pearson para 2009 y 2010 entre los diferentes caracteres evaluados de la población 'Z701-1' × 'Palsteyn'<sup>a b</sup>.

	Fecha de floración	Fecha de maduración	Desarrollo del fruto	Peso de fruto	Peso de hueso	Color de piel	Color de chapa	Color de pulpa	Firmeza	Sólidos solubles	pH	Acidez
Fecha de floración	<b>0,648**</b>	0,380**	-0,378**	-0,515**	-0,212**	0,135	-0,232**	0,187*	-0,216**	0,135	0,149	-0,028
Fecha de maduración	0,131	<b>0,826**</b>	0,713**	-0,204*	-0,065	-0,005	-0,077	-0,265**	-0,079	0,183*	0,012	0,088
Desarrollo del fruto	-0,682**	0,685**	<b>0,550**</b>	0,187*	0,096	-0,107	0,089	-0,406**	0,088	0,081	-0,100	0,110
Peso de fruto	-0,147	0,223**	0,345*	<b>0,280**</b>	0,657**	-0,072	0,314**	-0,207*	0,270**	-0,179*	-0,260**	0,080
Peso de hueso	0,037	0,254**	0,244	0,662**	<b>0,508**</b>	-0,107	0,253**	-0,175*	0,248**	-0,295**	-0,269**	0,139
Color de piel	0,212*	-0,057	-0,518**	-0,145	-0,060	<b>0,854**</b>	0,222**	0,709**	-0,075	0,032	0,113	-0,045
Color de chapa	0,000	0,159	0,114	0,084	0,005	0,271**	<b>0,434**</b>	-0,010	0,248**	-0,137	-0,281**	0,216**
Color de pulpa	0,339**	-0,211*	-0,674**	-0,122	-0,048	0,697**	-0,004	<b>0,833**</b>	-0,141	-0,026	0,192*	-0,153
Firmeza	0,072	0,067	0,113	0,125	0,146	-0,120	-0,013	-0,129	<b>0,265**</b>	0,075	-0,009	0,037
Sólidos solubles	0,239**	0,484**	0,074	-0,003	0,015	0,071	-0,076	-0,010	-0,286**	<b>0,573**</b>	0,160*	0,070
pH	0,076	0,040	-0,216	-0,146	-0,006	-0,004	-0,226**	0,079	-0,272**	0,128	<b>0,745**</b>	-0,852**
Acidez	-0,085	0,037	0,286	0,091	-0,023	0,014	0,182*	-0,169*	0,256**	0,150	-0,815**	<b>0,789**</b>

<sup>a</sup> \*\*La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral);\*La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

<sup>b</sup> Los valores de la diagonal corresponden a las correlaciones entre años para un mismo carácter. Valores por debajo de la diagonal corresponde a las correlaciones del año 2009. Valores por encima de la diagonal corresponde a las correlaciones del año 2010.

En la población 'ZxP', el coeficiente de correlación entre años para cada carácter evaluado superó el valor de 0,7 en fecha de maduración (0,83\*\*), color de piel (0,85\*\*), color de pulpa (0,83\*\*), pH (0,75\*\*) y acidez (0,79\*\*). Otras correlaciones significativas entre años fueron fecha de floración (0,65\*\*), ciclo de desarrollo del fruto (0,55\*\*), peso del hueso (0,51\*\*) y contenido en sólidos solubles (0,57\*\*), que mostraron valores de coeficiente de correlación superiores a 0,5 (*Tabla 3.9*).

Algunas de las correlaciones más importantes entre caracteres fueron fecha de floración/peso del fruto (-0,52\*\* año 2010), fecha de maduración/ciclo de desarrollo del fruto (0,69\*\* y 0,71\*\*), fecha de maduración/sólidos solubles (0,48\*\* año 2009), ciclo de desarrollo del fruto/peso del fruto (0,35\*\* año 2009), peso del fruto/peso del hueso (0,66\*\* y 0,66\*\*), ciclo de desarrollo del fruto/color de piel (-0,52\*\* año 2009), ciclo de desarrollo del fruto/color de pulpa (-0,67\*\* año 2009), color de piel/color de pulpa (0,70\*\* y 0,71\*\*), y pH/acidez (-0,82 y -0,85\*\*).

La correlación inversa entre fecha de floración y peso del fruto es sólo significativa para el año 2010 (-0,52\*\*). Esto puede deberse a que 2010 fue un año de floración muy tardía acortando el ciclo de desarrollo del fruto y por tanto reduciendo el peso final del mismo. Esto indica que una floración más tardía puede estar asociada con un peso y tamaño de fruto menor.

Al contrario, ciclo de desarrollo del fruto y peso muestran una correlación positiva para el año 2009 (0,35\*), tal como mostraron trabajos previos en melocotonero y albaricoquero para fecha de maduración y peso del fruto (Badenes y col., 1998; Dirlewanger y col., 1999; Quilot y col., 2004; Ruiz y col., 2008 y Eduardo y col., 2011), por lo que en general fechas de maduración tardías pueden dar lugar a un mayor peso del fruto. Sin embargo, en 2010 se da una relación inversa entre maduración y peso del fruto (-0,20\*). Esto puede deberse sin duda a la menor acumulación de horas frío de 2010, lo que retrasa la fecha de floración acortando el ciclo de desarrollo del fruto y disminuyendo el peso del mismo.

La correlación positiva en torno a 0,7 entre fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto es altamente significativa en los 2 años (*Tabla 3.9*), lo que indica que fechas de maduración más tardías están relacionadas con un ciclo de desarrollo del fruto más prolongado. Estos resultados se confirman en otros estudios previos en la población de melocotonero 'Ferjalou Jalusia' × 'Fantasia' (Etienne y col., 2002).

Fecha de maduración y contenido en sólidos solubles mostraron también una correlación positiva para 2009 (0,48\*\*), lo que indica la tendencia de que fechas de maduración más tardía llevan a obtener frutos con un mayor contenido en sólidos solubles (Etienne y col., 2002; Quilot y col., 2004; Ruiz y col., 2008; Eduardo y col., 2011). Este es el caso de muchas variedades tradicionales cultivadas en España e Italia con largos periodos de desarrollo del fruto y fecha de maduración tardía, las cuales tienden a altos contenidos en azúcares (Gurrieri y col., 2001; Drogoudi y col., 2008).

Sin embargo, variedades con fecha de maduración temprana generalmente muestran valores más altos de acidez (Gurrieri y col., 2001; Badenes y col., 1998) aunque esta correlación no fue encontrada en esta población. También se da una correlación inversa entre el ciclo de desarrollo del fruto y el índice H° de color de piel y pulpa, obteniendo la mayor correlación en 2009 (-0,52\*\* y -0,67\*\*), lo que sugiere que periodos de desarrollo del fruto más prolongados dan lugar a valores más bajos de H°, lo que indica frutos de color de piel y pulpa más anaranjada. Una correlación similar entre fecha de maduración y color de piel fue encontrada por otros autores en poblaciones de melocotonero (Quilot y col., 2004; Eduardo y col., 2011) y en la población de albaricoquero 'Goldrich' × 'Moniquí' (Ruiz y col., 2010b).

El color de piel y pulpa mostró una correlación media en los dos años en torno a 0,7 (Tabla 3.9). Esta correlación positiva indica que los frutos con un color de piel anaranjado se corresponden en la mayoría de los casos con un color de pulpa también anaranjado, lo que nos permite deducir el color de pulpa sin la aplicación de métodos destructivos (Ruiz y col., 2008; Sooriyapathirana y col., 2010). Además, podemos añadir que la combinación de fechas de maduración tardías y largos ciclos de desarrollo del fruto resultan en la mayoría de los casos en frutos con color de pulpa anaranjada, aunque debemos resaltar que esta correlación no es muy elevada aunque si significativa (Tabla 3.9).

En albaricoque, coloraciones naranjas y rojizas están más asociadas con mayor acidez del fruto pero no con un incremento de azúcares, así que la selección de variedades con más color puede incurrir en la pérdida de aromas y sabor (Ruiz y Egea., 2008). En la población 'Z×P', se dio durante los tres años una correlación inversa entre color de pulpa y acidez (Tabla 3.9), indicando que frutos con mayor coloración naranja-rojiza pueden corresponderse con un mayor nivel de acidez, si bien las correlaciones encontradas fueron relativamente bajas (-0,17\*).

En el caso de las poblaciones 'B×C' y 'G×C', las correlaciones interanuales entre los años 2012 y 2013 fueron bastante altas para la mayoría de los caracteres evaluados (Tablas 3.10 y 3.11). Las mayores correlaciones interanuales para 'B×C' y 'G×C' respectivamente fueron obtenidas para fecha de floración (0,77\*\* y 0,67\*\*), fecha de maduración (0,93\*\* y 0,87\*\*), ciclo de desarrollo del fruto (0,75\*\* y 0,59\*\*), color de piel (0,66\*\* y 0,67\*\*), color de pulpa (0,74\*\* y 0,73\*\*), sólidos solubles (0,72\*\* y 0,60\*\*) y acidez (0,69\*\* y 0,76\*\*). Las correlaciones obtenidas para el resto de parámetros superaron un coeficiente de correlación de Pearson de 0,5 a excepción del color de chapa (0,42\*\* y 0,37\*\*) (Tablas 3.10 y 3.11).

**Tabla 3.10.** Coeficiente de correlación de Pearson para 2012 y 2013 entre los diferentes caracteres evaluados de la población 'Bergeron' × 'Currot'<sup>a b</sup>.

	Fecha de floración	Fecha de maduración	Desarrollo del fruto	Peso de fruto	Peso de hueso	Calibre	Color de piel	Color de chapa	Color de pulpa	Firmeza	Sólidos solubles	pH	Acidez
Fecha de floración	<b>0,765**</b>	0,658**	-0,333**	-0,121	0,184*	-0,179*	-0,428**	-0,214**	-0,343**	0,296**	-0,328**	0,152*	-0,268**
Fecha de maduración	0,510**	<b>0,929**</b>	0,492**	0,117	0,386**	0,040	-0,391**	-0,047	-0,508**	0,548**	-0,199**	0,442**	-0,381**
Desarrollo del fruto	-0,096	0,808**	<b>0,746**</b>	0,288**	0,270**	0,255**	-0,009	0,180*	-0,235**	0,338**	0,129	0,373**	-0,165*
Peso de fruto	-0,077	0,013	0,068	<b>0,498**</b>	0,644**	0,915**	-0,044	-0,004	0,008	0,280**	0,000	0,127	-0,101
Peso de hueso	0,201**	0,362**	0,279**	0,573**	<b>0,772**</b>	0,515**	-0,260**	-0,066	-0,316**	0,387**	-0,101	0,121	-0,073
Calibre	-0,157*	-0,088	0,006	0,905**	0,437**	<b>0,491**</b>	0,297**	0,216**	0,391**	-0,172*	-0,168*	0,209**	-0,254**
Color de piel	-0,301**	-0,144	0,040	0,123	-0,061	0,060	<b>0,660**</b>	0,505**	0,645**	-0,343**	-0,051	0,034	0,052
Color de chapa	-0,178*	-0,027	0,090	0,183*	0,136	0,083	0,390**	<b>0,424**</b>	0,308**	-0,227**	-0,253**	0,154*	-0,179*
Color de pulpa	-0,123	-0,326**	-0,291**	0,208**	-0,070	0,143	0,722**	0,270**	<b>0,738**</b>	-0,259**	-0,014	-0,055	-0,038
Firmeza	0,377**	0,649**	0,490**	0,023	0,363**	0,176*	-0,201**	-0,002	-0,179*	<b>0,638**</b>	-0,114	-0,127	0,156*
Sólidos solubles	-0,235**	-0,148*	-0,01	-0,220**	-0,268**	-0,009	-0,098	-0,241**	-0,164*	0,056	<b>0,720**</b>	-0,018	0,197**
pH	-0,242**	-0,006	0,157*	0,193**	-0,006	0,150*	0,327**	0,045	0,176*	0,113	-0,202**	<b>0,590**</b>	-0,834**
Acidez	0,123	-0,007	-0,092	-0,235**	0,023	-0,143	-0,238**	-0,065	-0,165*	-0,076	0,434**	-0,798**	<b>0,687**</b>

<sup>a</sup> \*\*La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral);\*La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

<sup>b</sup> Los valores de la diagonal corresponden a las correlaciones entre años para un mismo carácter. Valores por debajo de la diagonal corresponde a las correlaciones del año 2012. Valores por encima de la diagonal corresponde a las correlaciones del año 2013.

En cuanto a las correlaciones más importantes entre caracteres para los años 2012 y 2013 en la población 'BxC' destacan fecha de floración/fecha de maduración (0,51\*\* y 0,66\*\*), fecha de maduración/ciclo de desarrollo del fruto (0,81\*\* y 0,49\*\*), fecha de maduración/firmeza (0,65\*\* y 0,55\*\*), ciclo de desarrollo del fruto/firmeza (0,49\*\* y 0,34\*\*), peso del fruto/peso del hueso (0,57\*\* y 0,64\*\*), color de piel/color de pulpa (0,72\*\* y 0,75\*\*), color de piel/color de chapa (0,39\*\* y 0,51\*\*) y acidez/pH (-0,90\*\* y -0,83\*\*) (Tabla 3.10).

**Tabla 3.11.** Coeficiente de correlación de Pearson para 2012 y 2013 entre los diferentes caracteres evaluados de la población 'Goldrich' x 'Currot' <sup>a b</sup>.

	Fecha de floración	Fecha de maduración	Desarrollo del fruto	Peso del fruto	Peso de hueso	Calibre	Color de piel	Color de chapa	Color de pulpa	Firmeza	Sólidos solubles	pH	Acidez
Fecha de floración	<b>0,667**</b>	0,613**	-0,631**	-0,342**	-0,350**	-0,300**	-0,106	-0,111	-0,145*	-0,108	-0,048	0,248**	-0,274**
Fecha de maduración	0,286**	<b>0,868**</b>	0,226**	-0,022	-0,129	0,021	0,001	0,003	-0,073	0,133	0,300**	0,407**	-0,326**
Desarrollo del fruto	-0,154*	0,903**	<b>0,588**</b>	0,407**	0,309**	0,398**	0,130	0,139	0,112	0,267**	0,334**	0,098	0,006
Peso de fruto	-0,004	0,132	0,147*	<b>0,515**</b>	0,757**	0,952**	-0,002	0,093	0,04	0,328**	0,082	-0,103	-0,002
Peso de hueso	0,110	0,011	-0,020	0,735**	<b>0,452**</b>	0,663**	-0,060	0,085	-0,062	0,435**	0,082	-0,202**	0,206**
Calibre	0,043	0,176*	0,165*	0,932**	0,628**	<b>0,542**</b>	0,208**	0,175*	0,246**	0,087	-0,200**	-0,037	-0,145*
Color de piel	-0,125	0,080	0,151*	0,118	-0,134	0,046	<b>0,670**</b>	0,550**	0,786**	-0,262**	0,012	-0,031	-0,007
Color de chapa	-0,137	-0,026	0,034	0,088	-0,112	0,128	0,542**	<b>0,371**</b>	0,378**	-0,052	-0,097	0,064	-0,032
Color de pulpa	-0,054	0,014	0,055	0,162*	-0,102	0,121	0,808**	0,374**	<b>0,733**</b>	-0,139	0,074	0,017	-0,044
Firmeza	0,243**	0,151*	0,045	0,142*	0,285**	0,278**	-0,232**	-0,225**	-0,179*	<b>0,583**</b>	-0,061	-0,199**	0,213**
Sólidos solubles	-0,085	0,186**	0,201**	-0,205**	-0,181*	0,069	-0,051	-0,176*	-0,041	0,287**	<b>0,603**</b>	0,078	0,182*
pH	-0,058	0,384**	0,432**	-0,050	-0,107	-0,052	0,055	0,018	-0,007	-0,178*	-0,080	<b>0,632**</b>	-0,812**
Ácidoz	-0,012	-0,296**	-0,312**	-0,119	0,055	-0,066	-0,101	-0,022	-0,063	0,218**	0,276**	-0,823**	<b>0,764**</b>

<sup>a</sup> \*\*La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral);\*La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

<sup>b</sup> Los valores de la diagonal corresponden a las correlaciones entre años para un mismo carácter. Valores por debajo de la diagonal corresponde a las correlaciones del año 2012. Valores por encima de la diagonal corresponde a las correlaciones del año 2013.



En 'G×C', son destacables las correlaciones de fecha de floración/fecha de maduración (0,61\*\* en 2013), fecha de maduración/ciclo de desarrollo del fruto (0,90\*\* en 2012), peso del fruto/peso del hueso (0,74\*\* y 0,76\*\*), color de piel/color de pulpa (0,81\*\* y 0,79\*\*), color de piel/color de chapa (0,54\*\* y 0,55\*\*) y acidez/pH (-0,82\*\* y -0,81\*\*) (Tabla 3.11). En ambas poblaciones destacamos también la lógica correlación entre calibre y peso del fruto, superando en ambos casos el valor de 0,9.

Debemos destacar que las mayores correlaciones entre caracteres se dieron obviamente entre ácido málico y pH, parámetros inversamente relacionados, y entre color de piel y color de pulpa, que mostraron una elevada correlación en torno a 0,7-0,75 en ambas poblaciones y años (Tablas 3.10 y 3.11), al igual que en la población 'Z×P'. Similares resultados fueron observados en trabajos previos en melocotonero y albaricoquero (Quilot y col., 2004; Ruiz y col., 2008; Sooriyapathirana y col., 2010). También podemos destacar que la correlación entre fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto fue mayor en ambas poblaciones para el año 2012 (0,81\*\* en 'B×C' y 0,90\*\* en 'G×C') lo que indica que periodos de desarrollo del fruto más largos se corresponden con una fecha de maduración más tardía (Etienne y col., 2002).

En el caso de fecha de floración y maduración, se da una correlación positiva, coincidiendo con los resultados obtenidos por Badenes y col. (1998), dándose las correlaciones más altas en 2013 (0,66\*\* y 0,61\*\* para 'B×C' y 'G×C' respectivamente), año en el que se dio una acumulación de frío más proporcionada, dando lugar a una floración más temprana. Sin embargo, en ambas poblaciones durante el año 2013 se da una correlación inversa entre floración y ciclo de desarrollo del fruto (-0,33\*\* en 'B×C' y -0,63\*\* en 'G×C') lo que nos indica que floraciones tempranas tienden a alargar el ciclo productivo del fruto, resultados similares a los de la población 'Z×P'.

Destacamos también la correlación positiva encontrada en la población 'B×C' entre fecha de maduración y firmeza (0,65\*\* y 0,55\*\* en 2012 y 2013 respectivamente) lo que indica que valores de firmeza más elevados se corresponden con fecha de maduración más tardía o ciclos de desarrollo del fruto más prolongados.

La explicación a esta correlación la podemos encontrar en que 'Bergeron' es una variedad de maduración tardía y ciclo desarrollo del fruto bastante largo que también se caracteriza por frutos de elevada firmeza, por lo que parte de los descendientes que mostraron maduración tardía se caracterizaron también con valores altos de firmeza.

Otras correlaciones significativas que podemos destacar, aunque con valores relativamente bajos de grado de correlación, son en el año 2013 entre ciclo de desarrollo del fruto y peso (0,29\*\* y 0,41\*\* en 'B×C' y 'G×C' respectivamente) o la correlación inversa entre ciclo de desarrollo del fruto y el índice H° de color de pulpa (-0,29\*\* en 'B×C' y -0,24\*\* en 'G×C'), lo que indica coloraciones de naranja más intenso en frutos con mayores ciclos de desarrollo del fruto.

La correlación del año 2012 en 'B×C' entre acidez y el índice H° de color de piel (-0,24\*\*), parece indicar la tendencia a un mayor grado de acidez en frutos con color de piel más anaranjado, tal como apuntaban trabajos previos (Ruiz y col., 2008). También es destacable la correlación inversa en ambas poblaciones para el año 2013 entre fecha de floración y acidez, lo que sugiere que genotipos de floración temprana están relacionados con valores de acidez más elevados (Badenes y col., 1998).

Finalmente, debemos indicar que las correlaciones observadas en las poblaciones 'B×C' y 'G×C' también fueron encontradas en mayor o menor medida en la población 'Z×P', tal y como hemos descrito anteriormente, corroborando que los caracteres evaluados correlacionan de forma similar incluso entre poblaciones diferentes.

### 3.5. Conclusiones

- I. Los resultados obtenidos en las tres poblaciones muestran una gran diversidad fenotípica respecto a todos los caracteres de calidad evaluados, confirmando el carácter segregante de las tres familias, condición necesaria para el presente trabajo.
- II. En todas las poblaciones evaluadas no se dan diferencias significativas entre genotipos para fecha de floración y ciclo de desarrollo del fruto, aunque si se obtienen diferencias entre años. Esto podría deberse a la alta variabilidad entre años de estos caracteres debido a la influencia de las condiciones ambientales haciendo la diferencia entre genotipos más baja. Sin embargo, para el resto de caracteres se dan diferencias significativas entre genotipos y entre años, así como la interacción de los mismos. Esto nos muestra la gran segregación y variabilidad fenotípica de cada una de nuestras poblaciones, así como las evidentes diferencias interanuales.
- III. Los diferentes histogramas de frecuencias revelan en las tres poblaciones una distribución normal de la mayoría de los caracteres evaluados, lo que confirma el carácter poligénico y herencia cuantitativa para todos ellos, a excepción de floración y maduración que se ven mucho más influenciados por las variaciones interanuales, especialmente por la acumulación de frío invernal.
- IV. En cuanto a transmisión de caracteres, parece que se da una mayor influencia de la floración tardía sobre la temprana, especialmente en el caso de la población 'Bergeron' × 'Currot', ya que 'Bergeron' es un parental de floración extremadamente tardía, así como también se observa la dominancia del carácter bajo peso del fruto procedente del parental 'Currot'.
- V. Debemos destacar también la presencia de valores transgresivos en muchos caracteres debido probablemente a la influencia del fondo genético de los parentales, el cual determina en gran medida la segregación obtenida en los descendientes estudiados. Es el caso del 'Z701-1' que parece transmitir ciclos de desarrollo del fruto más cortos debido a la influencia de uno de sus parentales 'Orange Red', al igual que en color de piel, transmitiendo colores de fondo bien amarillo crema ('Currot') o bien anaranjados ('Orange Red').

- VI.** Se manifiesta también la herencia intermedia de los descendientes con respecto a sus parentales en muchos de los caracteres, sobre todo en el caso de la acidez y de forma más evidente en la población 'Goldrich' × 'Currot', donde los parentales se sitúan en los extremos de los histogramas debido a la transmisión de genes co-dominantes.
- VII.** En cuanto a las correlaciones obtenidas, podemos decir que se da una elevada correlación entre años en todos los parámetros evaluados, especialmente en fecha de floración, fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto, color del fruto y acidez. Con respecto a la correlación entre distintos caracteres, destacan las correlaciones entre fecha de floración/fecha de maduración, fecha de maduración/ciclo de desarrollo del fruto, color de piel/color de pulpa o peso/calibre que se dan todos los años. Asimismo podemos destacar algunas correlaciones que se deben claramente a la influencia de los parentales, como es el caso de la correlación positiva entre maduración y firmeza en 'B×C', o correlaciones puntuales debido a las variaciones ambientales como la correlación inversa entre ciclo de desarrollo del fruto y el color de piel y pulpa en la población 'Z×P'.





***4. Caracterización molecular mediante el uso de marcadores tipo SSR, construcción de mapas de ligamiento genético y análisis de QTLs ligados a calidad del fruto***





#### **4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE EL USO DE MARCADORES TIPO SSR, CONSTRUCCIÓN DE MAPAS DE LIGAMIENTO GENÉTICO Y ANÁLISIS DE QTLs LIGADOS A CALIDAD DEL FRUTO**

##### **4.1. Introducción y Objetivos**

La caracterización genotípica mediante marcadores moleculares implica una serie de técnicas que permiten caracterizar los genotipos de interés en cualquier especie a nivel de su ADN. Estas metodologías generan patrones (polimorfismos) empleados para identificar especies, variedades o individuos. Asimismo se pretende asociar dichos polimorfismos de ADN a características de interés pomológico o agronómico, previa construcción de mapas de ligamiento genético, mediante el desarrollo de marcadores moleculares específicos que nos permitan la selección de genotipos de interés a nivel de vivero y por tanto acelerar y mejorar la eficiencia de los programas de mejora genética clásica. Es la denominada mejora asistida por marcadores moleculares (Moreno-González, 2000). Las características idóneas para un marcador son las siguientes:

- Económico, rápido, consistente, de fácil desarrollo y aplicación
- Aplicable sin conocer la secuencia a estudiar
- Detección a partir de muestras pequeñas
- Polimórfico y co-dominante
- Transferible en cruzamientos e introgresiones
- Ausencia de influencia ambiental, efectos epistáticos y pleiotrópicos

##### *Tipos de marcadores moleculares aplicados*

En sentido estricto podemos describir los marcadores moleculares como los dedicados al análisis del ADN, si bien al inicio de utilización de la técnica se incorporaron los marcadores de isoenzimas (proteínas) en esta denominación (Phillips y col., 1995; Kumar, 1999; Jiménez y Collada, 2000; Moreno-González, 2000; Dorado, 2001). Los marcadores de ADN presentan importantes ventajas frente a los proteicos (isoenzimas), ya que no se ven afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas del ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado y permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no.

Tras el proceso de extracción del ADN la separación de los fragmentos estudiados se realiza en geles de agarosa o acrilamida visualizándose con diferentes técnicas de tinción. Más recientemente se están utilizando secuenciadores de capilaridad para este análisis de polimorfismos. Podemos encontrar 2 grandes grupos de marcadores de ADN, los RFLPs y los basados en la técnica de la PCR.

#### *RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)*

El concepto de variaciones a nivel de ADN como marcadores genéticos comenzó con los RFLPs (Grodzicker y col., 1974). Cuando el ADN de diferentes individuos es digerido con enzimas de restricción, las diferencias de tamaño de los fragmentos de ADN pueden ser visualizadas mediante hibridación por sondas (Southern, 1975). Las diferencias son debidas a cambios en la evolución en secuencias de ADN de diferentes individuos. Estas diferencias genéticas pueden ser el resultado de mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, inversiones o translocaciones en los cromosomas (Maheswaran, 2004).

Se trata por tanto de marcadores co-dominantes que hacen posible determinar si caracteres relacionados están presentes en estado heterocigótico u homocigótico en un individuo (Winter y Kahl, 1995). Este tipo de marcadores se han aplicado fundamentalmente para la construcción de mapas de ligamiento (Viruel y col., 1995; Joobeur y col., 1998).

#### *Técnicas basadas en la PCR (Polymerase chain reaction)*

En 1971, Khorana describió una forma de replicar ADN doble usando cebadores de síntesis de ADN a partir de sus extremos 3' (Kleppe y col., 1971). Sin embargo, el concepto de amplificación como tal no fue concebido hasta 12 años más tarde por Kary Mullis, inventor de la PCR (McPherson y Moller, 2000).

La técnica PCR, está basada en la copia de fragmentos de ADN por la acción de una enzima termoestable llamada polimerasa, siendo esta capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos. Esta además requiere de la presencia de oligonucleótidos que actúen de cebadores (primers). Las copias obtenidas van aumentando de forma exponencial debido al carácter cíclico de la reacción, pudiendo obtener de esta manera millones de copias a partir de una cantidad muy pequeña de ADN.

Desde 1974 son muchos los tipos de marcadores diseñados hasta ahora, según Maheswaran y col. (2004) los marcadores moleculares se pueden clasificar en tres grandes grupos: marcadores de primera generación que incluyen los ya mencionados RFLPs, de segunda generación y los marcadores de nueva generación (Tablas 4.1, 4.2 y 4.3). Dentro de los marcadores basados en la técnica PCR se incluyen los marcadores de segunda generación y nueva generación. A continuación pasamos a describir algunos de ellos.

**Tabla 4.1.** Marcadores de ADN de primera generación.

Año	Acrónimo	Nomenclatura	Referencia
1974	RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	Grodzicker y col. (1974)
1985	VNTR	Variable Number Tandem	Jeffreys y col. (1985)
1986	ASO	Allele Specific Oligonucleotides	Saiki y col. (1986)
1988	AS-PCR	Allele Specific Polymerase Chain Reaction	Landegren y col. (1988)
1988	OP	Oligonucleotide Polymorphism	Beckmann (1988)
1989	SSCP	Single Stranded Conformational Polymorphism	Orita y col. (1989)
1989	STS	Sequence Tagged Site	Olsen y col. (1989)

**Tabla 4.2.** Marcadores de ADN de segunda generación basados en la PCR.

Año	Acrónimo	Nomenclatura	Referencia
1990	RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA	Williams y col. (1990)
1990	AP-PCR	Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction	Welsh y Mc Clelland (1990)
1990	STMS	Sequence Tagged Microsatellites Sites	Beckmann y Soller (1990)
1991	RLGS	Restriction Landmark Genome Scanning	Hatada y col. (1991)
1992	CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence	Akopyanz y col. (1992)
1992	DOP-PCR	Degenerate Oligonucleotide Primer – PCR	Telenius (1992)
1992	SSR	Simple Sequence Repeats	Akkaya y col. (1992)
1993	MAAP	Multiple Arbitrary Amplicon Profiling	Caetano-Anollés y col. (1993)
1993	SCAR	Sequence Characterized Amplified Region	Paran y Michelmore (1993)

**Tabla 4.3.** Marcadores de ADN de nueva generación.

Año	Acrónimo	Nomenclatura	Referencia
1994	ISSR	Inter Simple Sequence Repeats	Zietkiewicz y col. (1994)
1994	SAMPL	Selective Amplification Of Microsatellite Polymorphic Loci	Morgante y Vogel (1994)
1994	SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Jordan y Humphries (1994)
1995	AFLP (SRFA)	Amplified Fragment Length Polymorphism (Selective Restriction Fragment Amplification)	Vos y col. (1995)
1995	ASAP	Allele Specific Associated Primers	Gu y col. (1995)
1996	CFLP	Cleavase Fragment Length Polymorphism	Brow (1996)
1996	ISTR	Inverse Sequence Tagged-repeats	Rohde (1996)
1997	DAMD-PCR	Directed Amplification Of Minisatellite DNA-PCR	Bebeli y col. (1997)
1997	S-SAP	Sequence-specific Aplified Polymorphism	Waugh y col. (1997)
1998	REIP	Retrotransposon Based Insertional Polymorphism	Flavell y col. (1998)
1999	IRAP	Inter-transposon Amplified Polymorphism	Kalendar y col. (1999)
1999	REMAP	Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism	Kalendar y col. (1999)
2000	MITE	Miniature Iverted-repeat Transposable Element	Casa y col. (2000)
2000	TE-AFLP	Three Endonuclease AFLP	Van der Wurff y col. (2000)
2001	IMP	Inter-MITE Polymorphism	Chang y col. (2001)

Fuente: Maheswaran, (2004)

#### *RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA)*

Los marcadores RAPDs (Williams y col., 1990) considerados como marcadores de segunda generación, se basan en un método basado en la PCR mucho más rápido y económico que el análisis con RFLPs, utilizando cantidades mínimas de ADN. En lugar de cebadores complementarios a secuencias conocidas como en la PCR normal, como punto de partida para la polimerasa termoestable se utilizan oligonucleótidos de 9 a 12 pares de bases generados al azar (Welsh y Mc Clellad, 1990; Williams y col., 1990). Esta técnica produce de uno a diez fragmentos de un único cebador por reacción de PCR (Reiter y col., 1992) que son altamente polimórficos y pueden ser fácilmente detectados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Winter y Kahl, 1995).

### *AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism)*

En el caso de los AFLPs (Vos y col., 1995) incluidos por Maheswaran y col. (2004) como marcadores de nueva generación, se trata de una PCR múltiple basada en un método en el que un subconjunto de fragmentos de restricción son amplificados selectivamente usando cebadores (oligonucleótidos) complementarios a secuencias que han sido ligadas a cada extremo. Los análisis con AFLPs permiten la identificación con certeza de más de 50 loci en una reacción simple. Esta técnica combina la fiabilidad de los RFLPs y la facilidad de la PCR. Los marcadores tipo AFLP se utilizan como método de tipificación de nuevo ADN de cualquier origen o complejidad (Maheswaran, 2004).

### *SSRs (Simple Sequence Repeats)*

Los microsatélites también llamados Sequence Tagged Microsatellite Sites (STMS) o SSRs (Akkaya y col., 1992) son repeticiones en tandem de secuencias de ADN de 1 a 6 pares de bases como repeticiones imperfectas (interrumpidas) o juntas con otro tipo de repetición. Estos fragmentos de ADN repetidos están flanqueados por secuencias de copia única o simple, que proporcionan el punto de partida para la amplificación específica por PCR. Los cebadores complementarios a las secuencias únicas en las que flanquean regiones pueden ser designados para amplificar productos de copia única (Maheswaran, 2004). Los marcadores tipo microsatélite incluidos dentro de los marcadores de segunda generación son los más utilizados por los investigadores en las técnicas basadas en la PCR para el mapeo del genoma en plantas. Estos marcadores han sido descritos como los mejores marcadores de ADN para la evaluación de la diversidad genética entre especies de plantas (Campoy y col., 2010).

### *SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)*

Los SNPs (Jordan y Humphries, 1994) son marcadores bi-alélicos de nueva generación que desenmascaran polimorfismos entre individuos debido a variaciones de un solo nucleótido. Estas variaciones de un solo nucleótido surgen debido a mutaciones puntuales. La detección de SNPs requiere de algunos ensayos previos de automatización. Esta técnica está siendo usada en métodos basados en geles y sin gel para detectar abundantes polimorfismos.

Sin embargo, se requiere una adecuada información de la secuencia. En el caso de los métodos basados en geles, se diseñan cebadores específicos lo que da lugar a la amplificación de alelos positivos debido a la coincidencia exacta de imprimación. En el caso de los métodos basados en la ausencia de gel, las regiones más adecuadas son amplificadas siendo las diferencias detectadas por técnicas tales como la desnaturalización mediante “High Performance Liquid Chromatography (HPLC)” o “Matrix-Assisted” Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass spectrometry (MALDI TOF MS)”.

Ambas técnicas son extremadamente sensibles y son capaces de detectar diferencias de un solo nucleótido (Maheswaran, 2004). Los marcadores tipo SNP que presentan algunas ventajas con respecto a los marcadores tipo SSR, están siendo últimamente utilizados cada vez más en el mapeo y detección de QTLs en especies del género *Prunus*, tal y como se describe en los trabajos de Martínez-García y col. (2013a, 2013b, 2013c) o Eduardo y col. (2013) en diferentes poblaciones de melocotonero.

#### *Desarrollo de mapas de ligamiento genético en Prunus e identificación de QTLs*

Como ya hemos descrito, la construcción de mapas de ligamiento genético a través de poblaciones segregantes ha sido la principal línea de investigación para el análisis de la relación carácter-marcador en *Prunus*. La cosegregación entre algunos caracteres y marcadores nos permite establecer en un mapa genético la posición de genes y QTLs responsables de esta expresión. El mapa de ligamiento inicial de ‘Texas’ × ‘Earlygold’ (‘T×E’) es utilizado como mapa de referencia en *Prunus* (Arús y col., 1994; Dirlewanger y col., 2004). Otros mapas desarrollados más recientemente son el realizado por Ogundiwin y col. (2009) en una población intraespecífica de melocotonero, o en albaricoquero los mapas de ‘Lito’ × ‘Lito’ (Vilanova y col., 2003), ‘Polonais’ × ‘Stark Early Orange’ (Lambert y col., 2004), ‘Lito’ × ‘BO8164311’ (Dondini y col., 2007), ‘Goldrich’ × ‘Moniquí’ (Ruiz y col., 2010b) o ‘Z506-07’ × ‘Currot’ (Campoy y col., 2010).

Además, los diferentes marcadores moleculares observados en diferentes mapas del género *Prunus*, sugieren altos niveles de sintenia (Jung y col., 2009), lo que nos permite el uso de estos marcadores entre distintas especies del género *Prunus*. La mayoría de los caracteres de calidad del fruto son generalmente heredados cuantitativamente y controlados por varios genes (poligénicos).

Estos caracteres cuantitativos varían de forma continua y normalmente se rigen por un número de genes. La naturaleza de los caracteres cuantitativos es que su expresión está controlada por varios o decenas de loci cuantitativos (QTLs) que tienen un efecto pequeño sobre el carácter. Así pues, el objetivo del mapeo de QTLs es determinar los loci que son responsables de las variaciones de estos caracteres cuantitativos y encontrar los genes que los influyen. La determinación del número, localización e interacción de estos loci son el objetivo final junto con la identificación de los genes implicados y sus funciones.

En estos estudios moleculares, los marcadores SSR (Simple Sequence Repeat) han llegado a ser los más importantes para la mejora de plantas debido a su alta variabilidad, naturaleza multialélica, herencia co-dominante, reproducibilidad, abundancia relativa, cubren una zona extensa del genoma, localización específica en el cromosoma, automatización y genotipado de alto rendimiento (Campoy y col., 2010).

Uno de los objetivos más importantes en la aplicación de los marcadores moleculares en especies de interés agrícola ha sido la construcción de mapas de ligamiento genético y detección de QTLs. Estos mapas nos sirven para identificar diferentes regiones en los cromosomas que controlan caracteres simples (único gen) o caracteres cuantitativos (varios genes) usando el análisis de QTLs (Collard y col., 2005). Los estudios sobre identificación de QTLs relacionados con calidad del fruto en albaricoquero son escasos. Ruiz y col. (2010b) describieron el primer estudio identificando varios QTLs ligados a fecha de floración, fecha de maduración, peso del fruto, peso del hueso, color de fondo de piel, firmeza, contenido en azúcares y acidez. Más recientemente, Campoy y col. (2011b) identificaron un QTL asociado a fecha de floración y Socquet-Juglard y col. (2012) varios QTLs ligados al contenido en sólidos solubles, color de fondo de piel y forma de la fruta.

El objetivo de este capítulo es la construcción de un mapa de ligamiento genético en la población 'Z701-1' × 'Palsteyn' tratando de cubrir el máximo número de grupos de ligamiento mediante marcadores tipo SSRs, así como la detección de QTLs asociados a los caracteres fenológicos y de calidad del fruto previamente caracterizados en las descendencias del capítulo anterior. De esta manera se pretende de forma preliminar identificar posibles zonas del genoma relacionadas con estos caracteres para su posterior estudio.

## 4.2. Material vegetal

El material vegetal utilizado para la construcción de este mapa de ligamiento genético lo compusieron los 160 descendientes de la población F1 'Z701-1' × 'Palsteyn' previamente descrita (*Capítulo 3*).

## 4.3 Metodología

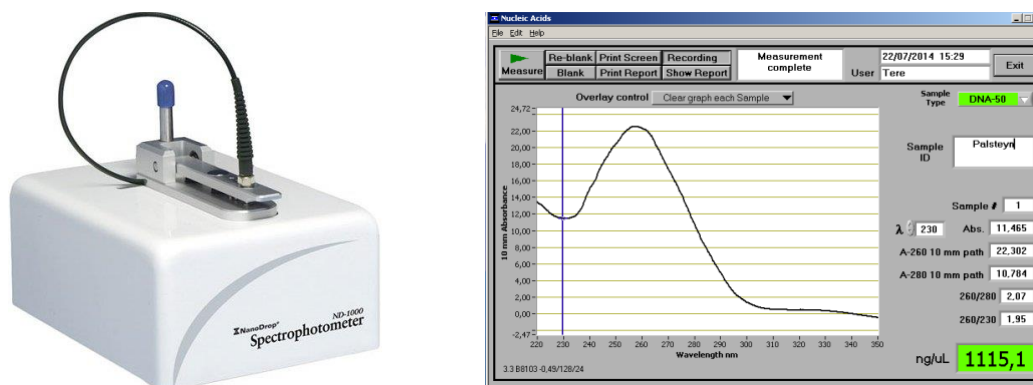
El proceso de caracterización molecular de los diferentes genotipos de la población consta de la toma de muestras de hoja, extracción y cuantificación previa del ADN, amplificación del ADN, y análisis del producto de PCR obtenido en geles de agarosa Metaphor®. Posteriormente se procedió al análisis estadístico para la construcción de los mapas de ligamiento genético y la detección de QTLs.

### 4.3.1. Toma de muestras, extracción y cuantificación del ADN

Las hojas para la extracción del ADN se recolectaron en mayo de los brotes más sanos y jóvenes, ya que esto nos garantiza una buena tasa de división celular aumentando el rendimiento de la extracción del ADN. La extracción del ADN se realizó según el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987). Para ello, se utilizaron aproximadamente 50 mg de hoja en polvo congelado, mezclándose con una solución de 750 µl de tampón de extracción CTAB a 65 °C y dejando incubar a la misma temperatura durante 5 minutos. Posteriormente la solución se mezcló con un volumen de 750 µl de cloroformo isoamilalcohol (24:1), centrifugando las muestras a 12.000 rpm durante 10 minutos.

A continuación se extrajo cuidadosamente la fase líquida superior y le añadimos 450 µl de isopropanol a -20 °C. Finalmente se centrifuga a 12.000 rpm durante 5 minutos para recuperar el precipitado de ADN, que es lavado con 400 µl de etanol al 70 % y resuspendido e incubado en 50 µl de TE con RNasa (10 µg/ml) a 37 °C. La concentración de ADN fue cuantificada mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) (230-280 nm) siendo cada muestra diluida a la concentración final de 30 ng/µl (*Figura 4.1*).





**Figura 4.1.** Espectrofotómetro utilizado para la cuantificación del ADN (izquierda) y curva patrón óptima de ADN (derecha.)

#### 4.3.2. Marcadores moleculares utilizados

El mapa de la población 'Z701-1' × 'Palsteyn' fue construido a partir de marcadores tipo SSRs. Para ello, tras la extracción del ADN se realizó un screening previo de un total de 292 marcadores SSRs desarrollados en diferentes especies de *Prunus* tales como melocotonero, almendro, albaricoquero o cerezo (*Anexos, Tablas suplementarias 3 y 4*). En el screening se utilizaron 6 individuos de la población (2 parentales y 4 descendientes). Una vez clasificados todos los marcadores que mostraban polimorfismos, fueron amplificados en todos los individuos mediante la técnica PCR y analizados mediante electroforesis para ser posteriormente mapeados en los diferentes grupos de ligamiento genético (linkage group, LG) y llevar a cabo el análisis de QTLs.

#### 4.3.3. Método de amplificación del ADN

El método de amplificación fue mediante la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (*polymerase chain reaction*), técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis, utilizando para ello termocicladores tipo Eppendorf. En la tabla 4.4 se describen el protocolo de PCR llevado a cabo, así como las condiciones de amplificación del ADN empleadas en los termocicladores.

**Tabla 4.4.** Protocolo (izquierda) y condiciones de PCR (derecha) empleadas en la amplificación de ADN

Reactivos	Volúmenes	Fases	T °C	Tiempo (35 ciclos)
Agua	13,8µl	Desnaturalización	95	2'
Buffer 10×	2µl	Desnaturalización	95	30''
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,4µl	Anillamiento	51-60	30''
dNTPs (10mM)	0,4µl	Extensión	72	1'20''
F (10mM)	0,4µl	Extensión	72	5'
R (10mM)	0,4µl			
Taq polimerasa	0,1µl			
ADN (30ng/µl)	2,5	Conservación	4	∞
<b>Total</b>	<b>20µl</b>			

#### 4.3.4. Análisis de los productos de PCR

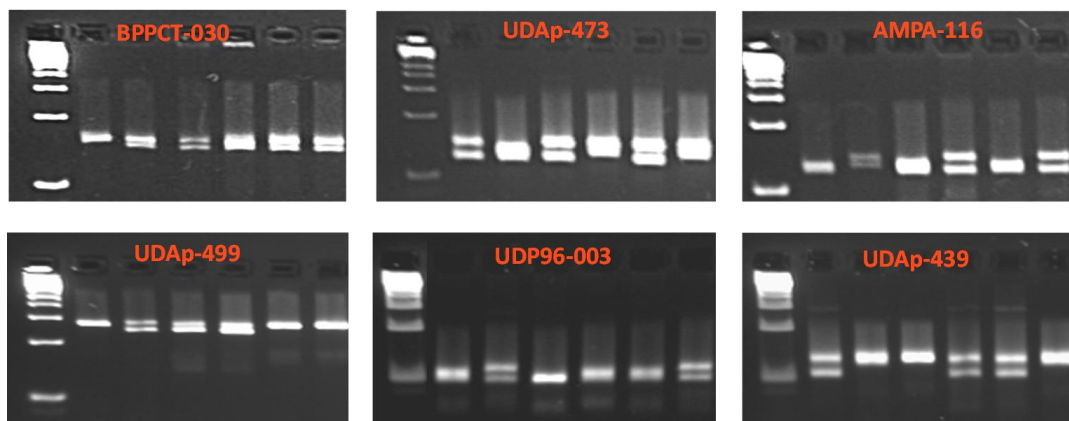
Para el análisis de los fragmentos de ADN obtenidos en la amplificación del screening de marcadores se utilizaron 2 técnicas de electroforesis diferentes. Un total de 101 marcadores fueron analizados mediante electroforesis a través del secuenciador capilar automático ABI PRISM (Applied Biosystems, California, EE.UU.) (Anexos, Tabla suplementaria 1).

El estándar utilizado en el secuenciador fue Gene Scan<sup>TM</sup> 500 Rox<sup>TM</sup> usando el software GeneScan 3.7 (Applied Biosystems) para la lectura de los polimorfismos. El resto de marcadores, un total de 191 SSRs, se analizaron en geles de agarosa Metaphor<sup>®</sup> al 3 % (MAGE) (Biowittaker) (Anexos, Tabla suplementaria 2) utilizando un marcador de tamaño 1kb Plus ADN Ladder (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies).

El análisis del ADN en geles de agarosa se realizó con un sistema compuesto por una videocámara con objetivo de alta luminosidad y resolución, un transiluminador de luz UV (303 nm), el cual se encontraba conectado a un ordenador PC Pentium IV de 1,6 Ghz con monitor SVGA 17'' y tarjeta digitalizadora para la adquisición de la imagen.

El gel fue analizado con el software Genetools de SYNGENE (Beacon House, Nuffield Road, Cambridge, UK). Mediante este sistema conseguimos identificar el tamaño de los fragmentos amplificados y los polimorfismos mostrados para cada uno de los descendientes (Figura 4.2).

Finalmente, partiendo del screening, se seleccionaron preferentemente aquellos marcadores que eran polimórficos en ambos parentales y cuyos polimorfismos eran fácilmente detectables en geles de agarosa Metaphor®, ya que fue el método utilizado para el análisis de las segregaciones genotípicas.



**Figura 4.2.** Visualización de fragmentos de ADN en geles de agarosa Metaphor®.

#### 4.3.5. Análisis estadístico

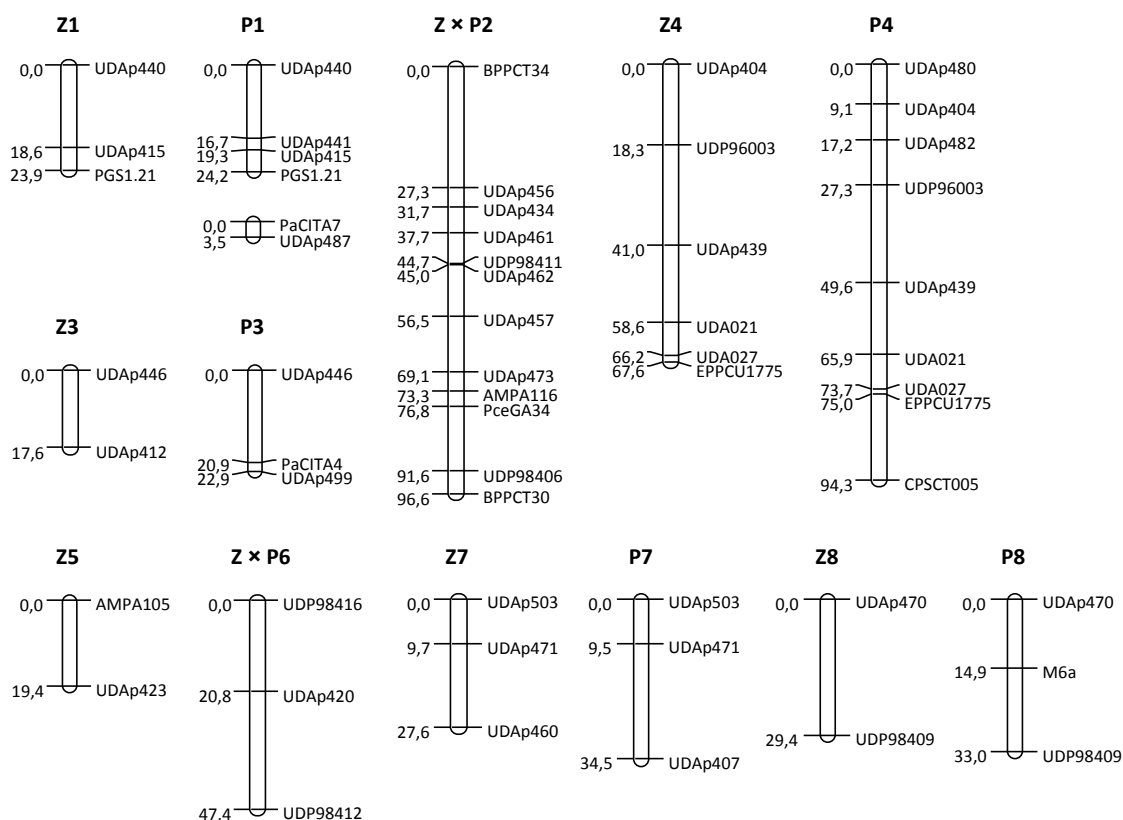
Los mapas de ligamiento genético y el análisis de QTLs fueron realizados mediante los programas bioinformáticos JoinMap.3 (Van Ooijen, 2006) y MAPQTL 4.0 respectivamente. Todos los grupos de ligamiento generados fueron calculados para un LOD mínimo de 3 y una frecuencia de recombinación de 0,4, usando en todos los casos valores de LOD superiores.

Para el análisis de QTLs los datos del fenotipo y genotipo fueron analizados mediante el análisis paramétrico ‘Interval mapping’, siendo este método el más utilizado para el mapeo de QTLs (Van Ooijen, 1999). El LOD de referencia ( $\text{LOG}_{10} H1/H0$ ) fue determinado mediante un análisis de 1000 permutaciones, fijando el valor significativo de LOD para un intervalo de confianza del 95 %. Además, el análisis no paramétrico ‘Kruskal-Wallis’ que es equivalente a un análisis de varianza unidireccional, fue también utilizado para analizar cada marcador de forma individual y establecer así la fuerza de unión de cada loci para cada carácter cuantitativo. Un  $p$  valor mayor o igual a 0,005 es considerado por Van Ooijen (2004) como significativo para este análisis. Los mapas de ligamiento genético junto con los QTLs fueron editados con el programa MapChart 2.1 (Voorrips, 2002).

## 4.4. Resultados y discusión

### 4.4.1. Mapas de ligamiento genético

Un total de 292 marcadores SSRs fueron evaluados, de los cuales 185 amplificaron y 42 fueron mapeados (*Anexos, Tablas suplementarias 3 y 4*). La mayoría de los marcadores mapeados fueron desarrollados a partir de ADN genómico de albaricoquero, concretamente el tipo UDAp, los cuales amplificaron en un 90 % de los casos. Los mapas de ligamiento genético obtenidos fueron construidos a partir de 160 descendientes de la población 'ZxP', mostrando los 8 grupos de ligamiento (LG) para cada parental, siendo los LG 2 y 6 integrados con los 2 parentales, ya que todos los marcadores utilizados en estos grupos son polimórficos en ambos (*Figura 4.3*).



**Figura 4.3.** Mapas de ligamiento genético construidos a partir de 160 descendientes de la familia 'Z701' x 'Palsteyn' mediante marcadores tipo SSR (Simple Sequence Repeat).

En el mapa de 'Z701-1' se cubre una extensión de 336,2 cM, mientras que en 'Palsteyn' es de 363,1 cM, con una distancia media entre marcadores de 10,5 y 9,5 cM respectivamente. En cuanto a la distribución de los marcadores, podemos decir que la mayoría de ellos se ubican en zonas similares descritas previamente por otros autores en otros mapas de albaricoquero (Dondini y col., 2007; Ruiz y col., 2010b). Los LG 2 y 4, son con diferencia los más saturados con 11 marcadores en el LG 2 (polimórficos en ambos parentales) y con 6 y 9 marcadores para el LG 4 de 'Z701-1' y 'Palsteyn' respectivamente (*Figura 4.3*).

Hay que destacar también que la baja saturación de los mapas se suple con el mapeo de marcadores que son mayoritariamente polimórficos en ambos parentales. Esto, a pesar de la baja densidad de marcadores en el mapa le proporciona mayor relevancia a los QTLs obtenidos, ya que la utilización de marcadores que generan hasta 4 segregaciones alélicas posibles en la población hace que estadísticamente sea más difícil encontrar una relación entre caracteres y marcadores, por lo que los QTLs obtenidos pueden llegar a tener mayor relevancia.

#### **4.4.2. Análisis e identificación de QTLs**

##### **4.4.2.1. Fecha de floración**

La fecha de floración es un carácter que se encuentra muy influenciado por las diferencias interanuales, fundamentalmente por la diferente acumulación de frío invernal, lo que puede dar lugar a la detección de QTLs de forma intermitente entre años. Así pues, para fecha de floración fueron identificados diferentes QTLs en los grupos de ligamiento (LG) 1, 4 y 7 (*Tabla 4.5*) de ambos parentales, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores (Wang y col., 2000; Quilot y col., 2004; Fan y col., 2010; Eduardo y col., 2011; Sánchez-Pérez y col., 2012) para melocotonero y almendro. En albaricoquero, un QTL asociado a fecha de floración fue identificado en el LG 5 por Campoy y col. (2011b), el cual no ha sido detectado en nuestros mapas de ligamiento.

En el caso del parental 'Z701-1' estos QTLs fueron localizados en los grupos 4 y 7, destacando sobre todo en el LG 4 los marcadores UDP96003, UDA021 y UDA027 que fueron significativos en ambos análisis estadísticos durante los 3 años, alcanzando un LOD de 6,87 y un porcentaje de explicación de la variación del carácter en torno al 20 % (UDA021) (*Tabla 4.5*).

Resultados similares fueron obtenidos en una población BC1 de melocotón (Verde y col., 2002). En el LG 7, el UDAp471 y UDAp460 también mostraron estar relacionados con este carácter, al igual que en otros estudios como Eduardo y col. (2011) y Sánchez-Pérez y col. (2012) coincidiendo con Fan y col. (2010) para el marcador UDAp460.

**Tabla 4.5.** Marcadores SSRs más importantes ligados a QTLs de fecha de floración mediante análisis ‘Interval-mapping’ (LOD) y ‘Kruskal-Wallis’ (KW) de los parentales ‘Z701-1’ (Z) y ‘Palsteyn’ (P). Los asteriscos representan el nivel de significación para el análisis KW (\*0,1, \*\*0,05, \*\*\*0,01, \*\*\*\*0,005, \*\*\*\*\*0,001, \*\*\*\*0,0005, \*\*\*\*\*0,0001). % expl se refiere al porcentaje de explicación de la variación fenotípica y LODmin es el valor de referencia para un nivel de significación de 0,05.

Fecha de floración ‘Z701-1’							Fecha de floración ‘Palsteyn’								
LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl	LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl
Z4	UDAp404	0,0	2008	7,771*	1,90	2,8	9,4	P1	UDAp487	0,0	2008	6,816**	2,29	2,8	7,2
			2009	12,613***	3,08	3,3	9,4				2009	6,652***	2,93	2,8	11,8
			2010	5,5	0,73	3,7	2,3				2010	2,870*	0,39	2,8	1,4
Z4	UDP96003	18,3	2008	17,964*****	4,62	2,8	15,1	P1	PaCITA7	3,5	2008	13,684****	3,15	2,8	9,1
			2009	23,269*****	5,22	3,3	15,1				2009	15,077****	5,24	2,8	16,5
			2010	17,812*****	3,93	3,7	11,4				2010	9,099**	1,13	2,8	3,8
Z4	UDAp439	41,0	2008	12,582***	3,04	2,8	8,1	P4	UDAp482	17,2	2008	10,163****	2,68	3	8,0
			2009	14,141****	2,61	3,3	8,1				2009	12,382*****	4,34	2,9	14,3
			2010	8,770**	1,69	3,7	5,1				2010	5,801**	1,27	3,3	4,3
Z4	UDA021	58,6	2008	20,909*****	3,82	2,8	20,5	P4	UDP96003	27,3	2008	17,964*****	4,75	3	13,0
			2009	33,677*****	6,87	3,3	20,5				2009	23,269*****	5,22	2,9	15,1
			2010	26,746*****	6,36	3,7	18,6				2010	17,812*****	3,97	3,3	11,5
Z4	UDA027	66,2	2008	14,131****	3,24	2,8	16,1	P4	UDAp439	49,6	2008	12,582***	3,04	3	8,8
			2009	25,922*****	5,49	3,3	16,1				2009	14,141****	2,60	2,9	8,1
			2010	11,896***	3,76	3,7	11,3				2010	8,770**	1,69	3,3	5,1
Z4	EPPCU1775	67,6	2008	2,095	2,97	2,8	17,8	P4	UDA021	65,9	2008	20,909*****	4,11	3	12,1
			2009	11,611****	5,83	3,3	17,8				2009	33,677*****	7,04	2,9	20,6
			2010	3,382	4,51	3,7	13,9				2010	26,746*****	6,48	3,3	18,7
Z7	UDAp503	0,0	2008	0,764	1,35	2,8	4,7	P4	UDA027	73,7	2008	14,131****	3,55	3	10,0
			2009	3,906	4,50	2,8	14,9				2009	25,952*****	5,69	2,9	16,2
			2010	4,152	2,67	2,8	8,7				2010	11,896***	3,85	3,3	11,3
Z7	UDAp471	9,7	2008	16,032****	3,42	2,8	9,5	P4	EPPCU1775	75,0	2008	2,095	2,73	3	8,3
			2009	20,951*****	5,49	2,8	15,5				2009	11,611****	5,42	2,9	16,5
			2010	20,822*****	4,87	2,8	13,9				2010	3,382	4,04	3,3	12,5
Z7	UDAp460	27,6	2008	11,693*****	3,48	2,8	13,0	P7	UDAp471	9,5	2008	16,032****	3,34	2,8	9,3
			2009	22,715*****	6,21	2,8	19,1				2009	20,951*****	5,50	2,8	15,5
			2010	25,715*****	6,79	2,8	20,5				2010	20,822*****	4,95	2,8	14,1

Para el parental ‘Palsteyn’, en el LG 1 el QTL se encuentra flanqueado por los marcadores PaCITA7 (LOD = 5,24) y UDAp487 (LOD = 2,93), siendo especialmente significativo en el año 2009, localizándose en la parte baja del cromosoma (Tabla 4.5). Resultados similares fueron obtenidos por Wang y col. (2000) en cerezo amargo o Quilot y col. (2004) en *Prunus davidiana*. Posteriormente, Fan y col. (2010) en melocotonero y Sánchez-Pérez y col. (2012) en una población de almendro ‘R-1000’ × ‘Desmayo Largueta’ indicaban la presencia de diferentes QTLs relacionados con fecha de floración en el LG 1.

Al igual que en el caso del mapa de 'Z701-1', los QTLs del LG 4 para 'Palsteyn' aparecen en torno a los marcadores UDP96003, UDA021 y UDA027, presentando valores de LOD similares a los del grupo de ligamiento de 'Z701-1', ya que los mapas de ambos parentales tienen muchos marcadores en común.

En el LG 7 destaca en este caso el UDAp471 con valores de LOD entre 3 y 5, siendo muy significativo durante los 3 años. En general, hemos utilizado de forma conjunta los análisis 'Interval mapping' (análisis paramétrico) y 'Kruskal Wallis' (análisis no paramétrico), ya que floración y maduración no cumplen el criterio de normalidad. El análisis conjunto de ambos estadísticos nos ayuda a confirmar la presencia o ausencia de ciertos QTLs.

#### **4.4.2.2. Fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto**

En cuanto a fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto, debemos destacar que se encuentran estrechamente vinculados entre sí y correlacionados en gran parte con la fecha de floración y por tanto influenciados por las variaciones interanuales. Por ello, en muchos casos los QTLs identificados de estos tres caracteres coinciden en zonas semejantes del genoma.

En nuestro estudio dicha afirmación se hace más evidente sobre todo en fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto en los LG 4 y LG 6 de ambos parentales (*Tabla 4.6*). Tal como muestran los resultados obtenidos, la mayoría de los marcadores utilizados para el LG 4 aparecen vinculados con ambos caracteres y en ambos parentales, así que podemos deducir que este cromosoma se encuentra estrechamente vinculado con fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto.

Entre los marcadores asociados a diferentes QTLs en el LG 4, podemos destacar como los más importantes el UDP96003, UDAp439, UDA021 y UDA027 que abarcan una zona aproximada para fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto de 50 cM (*Tabla 4.6 y Figura 4.4*). El QTL más importante de fecha de maduración parece situarse entre los marcadores UDP96003 y UDA021, con valores de LOD de 9,20 y 11,38 y porcentajes de la variación del carácter entre el 29 y 36 % respectivamente para el año 2008. Sin embargo, en cuanto al ciclo de desarrollo del fruto los valores máximos de LOD son alcanzados por el UDA021 y UDA027 (con LOD de 11,08 y 8,25 respectivamente) con un porcentaje de la variación del carácter entre el 26 y el 35 % (*Tabla 4.6*).

También debemos destacar la influencia al final del cromosoma 4 del marcador CPSCT005, el cual a pesar de presentar menores valores de LOD supera en el año 2008 el 70 % de la variación fenotípica, siendo ésta bastante menor en 2009 y 2010.

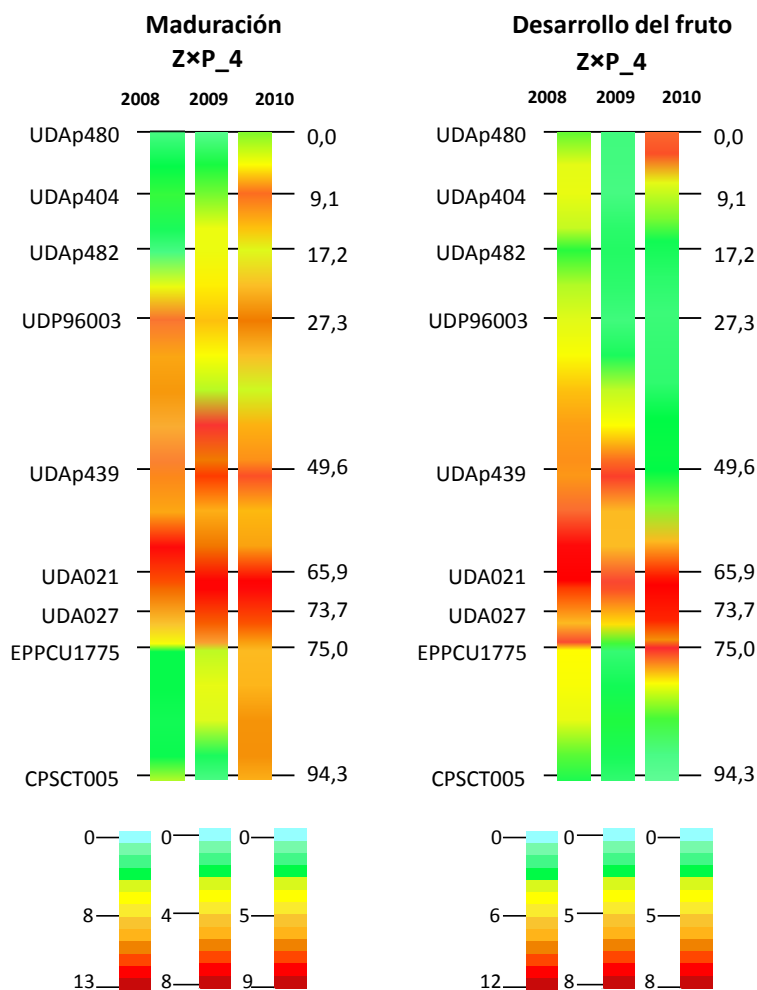
**Tabla 4.6.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Z701-1' (Z) y 'Palsteyn' (P). (1) Marcadores representados en un único grupo de ligamiento.

Fecha de maduración 'Z701-1'							Fecha de maduración 'Palsteyn'								
LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl	LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl
Z4	UDAp404	0,0	2008	32,261*****	6,19	3,2	21,6	P4	UDAp480	0,0	2008	11,011*****	3,88	5,6	18,1
			2009	16,161****	3,85	2,8	11,7				2009	4,385**	2,28	3	9,0
			2010	20,662*****	5,57	2,8	16,7				2010	10,041****	3,54	3,6	12,6
Z4	UDP96003	18,3	2008	36,040*****	9,20	3,2	29,4	P4	UDAp404	9,1	2008	22,261*****	5,25	5,6	18,7
			2009	17,925*****	4,29	2,8	12,6				2009	16,161****	3,26	3	9,9
			2010	29,036*****	7,27	2,8	20,6				2010	20,662*****	4,84	3,6	14,4
Z4	UDAp439	41,0	2008	34,391*****	8,78	3,2	28,6	P4	UDAp482	17,2	2008	14,001*****	3,95	5,6	14,7
			2009	27,767*****	7,06	2,8	19,8				2009	11,366*****	3,75	3	12,3
			2010	23,020*****	4,91	2,8	14,6				2010	14,637*****	4,06	3,6	12,3
Z4	UDA021	58,6	2008	40,968*****	11,38	3,2	35,9	P4	UDP96003	27,3	2008	36,040*****	9,27	5,6	29,6
			2009	29,235*****	7,73	2,8	21,7				2009	17,925*****	4,29	3	12,6
			2010	35,371*****	9,21	2,8	26,0				2010	29,036*****	7,12	3,6	20,2
Z4	UDA027	66,2	2008	30,405*****	7,81	3,2	25,6	P4	UDAp439	49,6	2008	34,391*****	8,77	5,6	28,6
			2009	20,460*****	5,39	2,8	15,4				2009	27,767*****	7,07	3	19,9
			2010	26,583*****	6,39	2,8	18,4				2010	23,020*****	4,90	3,6	14,6
Z4	EPPCU1775	67,6	2008	22,273*****	4,86	3,2	16,9	P4	UDA021	65,9	2008	40,968*****	11,36	5,6	35,9
			2009	17,363*****	3,39	2,8	10,1				2009	29,235*****	7,72	3	21,7
			2010	24,888*****	5,86	2,8	17,1				2010	35,371*****	9,16	3,6	25,8
ZxP6(1)	UDP98416	0,0	2008	16,248*****	4,74	4,5	22,2	P4	UDA027	73,7	2008	30,405*****	7,81	5,6	25,6
			2009	14,322*****	4,03	2,6	17,9				2009	20,460*****	5,38	3	15,4
			2010	16,438*****	4,74	2,7	16,6				2010	26,583*****	6,39	3,6	18,4
ZxP6(1)	UDAp420	20,8	2008	14,801****	3,87	4,5	14,9	P4	EPPCU1775	75,0	2008	22,273*****	4,91	5,6	17,1
			2009	19,141*****	4,52	2,6	13,8				2009	17,363*****	3,43	3	10,2
			2010	18,666*****	4,58	2,7	14,2				2010	24,888*****	5,85	3,6	17,0
ZxP6(1)	UDP98412	47,4	2008	24,039*****	5,31	4,5	18,9	P4	CPSCT005	94,3	2008	5,285**	6,06	5,6	73,3
			2009	34,350*****	8,58	2,6	25,5				2009	5,465**	2,38	3	14,0
			2010	33,551*****	7,62	2,7	25,9				2010	11,493*****	5,96	3,6	34,2

Ciclo de desarrollo del fruto 'Z701-1'							Ciclo de desarrollo del fruto 'Palsteyn'								
LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl	LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl
Z4	UDAp404	0,0	2008	19,104*****	4,66	2,8	16,6	P4	UDAp480	0,0	2008	5,474**	3,40	3	16,8
			2009	8,182**	2,01	2,7	6,4				2009	0,745	2,12	2,9	9,6
			2010	17,021*****	4,10	2,8	12,8				2010	12,339*****	5,26	2,8	20,1
Z4	UDP96003	18,3	2008	19,412*****	4,38	2,8	15,3	P4	UDAp404	9,1	2008	19,104*****	4,83	3	17,0
			2009	10,239**	2,13	2,7	6,5				2009	8,182**	1,99	2,9	6,3
			2010	9,666**	2,25	2,8	6,9				2010	17,021*****	4,14	2,8	12,7
Z4	UDAp439	41,0	2008	28,871*****	6,97	2,8	23,6	P4	UDAp482	17,2	2008	5,547**	3,19	3	13,7
			2009	20,345*****	4,93	2,7	14,4				2009	0,039	2,75	2,9	11,5
			2010	11,574***	3,00	2,8	9,4				2010	7,048***	2,77	2,8	9,8
Z4	UDA021	58,6	2008	43,590*****	11,08	2,8	34,5	P4	UDP96003	27,3	2008	19,412*****	4,39	3	15,3
			2009	22,070*****	4,81	2,7	14,3				2009	10,239**	2,13	2,9	6,5
			2010	33,467*****	7,54	2,8	21,4				2010	9,666**	2,15	2,8	6,6
Z4	UDA027	66,2	2008	34,630*****	8,25	2,8	26,8	P4	UDAp439	49,6	2008	28,871*****	6,94	3	23,6
			2009	16,898*****	3,52	2,7	10,6				2009	20,345*****	4,94	2,9	14,4
			2010	27,487*****	6,33	2,8	18,2				2010	11,574***	2,99	2,8	9,4
Z4	EPPCU1775	67,6	2008	29,318*****	6,01	2,8	20,4	P4	UDA021	65,9	2008	43,590*****	11,08	3	34,5
			2009	5,941*	2,62	2,7	8,5				2009	22,070*****	4,90	2,9	14,4
			2010	23,689*****	5,06	2,8	15,0				2010	33,467*****	7,55	2,8	21,4
ZxP6(1)	UDP98416	0,0	2008	23,496*****	6,07	2,8	22,7	P4	UDA027	73,7	2008	34,630*****	8,25	3	26,8
			2009	1,855	0,45	2,8	1,8				2009	16,898*****	3,66	2,9	10,9
			2010	17,915*****	4,11	2,8	13,9				2010	27,487*****	6,36	2,8	18,3
ZxP6(1)	UDAp420	20,8	2008	14,709****	3,64	2,8	14,4	P4	EPPCU1775	75,0	2008	29,318*****	6,03	3	20,5
			2009	4,228	0,90	2,8	2,9				2009	5,941*	2,36	2,9	7,5
			2010	19,697*****	4,72	2,8	14,4				2010	23,689*****	4,99	2,8	14,8
ZxP6(1)	UDP98412	47,4	2008	30,327*****	7,11	2,8	24,6	P4	CPSCT005	94,3	2008	6,368**	2,74	3	20,9
			2009	22,714*****	5,07	2,8	16,8				2009	0,794	2,31	2,9	23,6
			2010	42,735*****	11,32	2,8	31,6				2010	3,100*	1,40	2,8	9,7





**Figura 4.4.** Gradiente de LOD scores obtenidos para fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis 'Interval-Mapping' en el mapa integrado del grupo 4 de ligamiento de 'ZxP' para los años 2008, 2009 y 2010. El color azul representa los valores mínimos de LOD y el rojo los máximos.

También debemos de destacar que los resultados obtenidos en el LG 4 son muy similares entre los parentales porque casi todos los marcadores utilizados mapeaban en ambos. Son muchos los autores que localizan diferentes QTLs a lo largo del cromosoma 4 y en diferentes especies de *Prunus* (Dirlewanger y col., 1999; Quarta y col., 2000; Wang y col., 2000; Verde y col., 2002; Etienne y col., 2002; Sánchez-Pérez y col., 2007; Cantin y col., 2010; Ruiz y col., 2010b; Eduardo y col., 2011; Pirona y col., 2013). Además, el marcador UDP96003 es también relacionado con fecha de maduración por otros autores en poblaciones de melocotonero (Yamamoto y col., 2001; Quilot y col., 2004).

En el LG 6, los tres marcadores mapeados estuvieron ligados algún año a fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto, destacando sobre todo el marcador UDP98412, que obtuvo un valor máximo de LOD de 8,58 y 11,32 para fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto respectivamente (*Tabla 4.6*). El marcador UDP98416 es también relacionado con fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto por Verde y col. (2002) y Ruiz y col. (2010b) en diferentes poblaciones de melocotonero y albaricoquero.

Otros autores como Eduardo y col. (2011) también relacionan fecha de maduración con el LG 6 en una población F1 de melocotonero, aunque hay que destacar que este mismo autor señala al LG 4 como el más importante en cuanto a fecha de maduración del fruto, localizando un QTL en la zona media del cromosoma que llega a controlar hasta el 97 % de la variación de este carácter.

#### **4.4.2.3. Peso del fruto y peso del hueso**

En cuanto al peso del fruto y hueso, se localizaron diferentes QTLs en los LG 1, 2, 4, 5 y 7 de ambos parentales, lo que indica el carácter tan poligénico de estos caracteres (*Tabla 4.7*). En ambos parentales se localizan para el año 2010 QTLs de peso del fruto y hueso al final del LG 2, siendo el AMPA116 el marcador más cercano aunque con valores de LOD y de la variación del carácter no muy elevados. En 'Z701-1' y 'Palsteyn' se localizan diferentes QTLs en el LG 4, destacando claramente en el año 2010 la correlación de los marcadores UDP96003, UDA021, UDA027 o EPPCU1775 con peso del fruto.

También, al final del cromosoma 4 de 'Palsteyn' fue localizado otro QTL de peso del fruto para los años 2009 y 2010, siendo el marcador más significativo el CPSCT005 (LOD = 5,35) con un 30 % de la variación del carácter en el año 2010 (*Tabla 4.7*). Otros autores como Wang y col. (2000), Quilot y col. (2004), Cantin y col. (2010), Ruiz y col. (2010b) y Eduardo y col. (2011) relacionan el LG 4 con el peso del fruto.

**Tabla 4.7.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de peso del fruto y peso del hueso mediante análisis ‘Interval-mapping’ (LOD) y ‘Kruskal-Wallis’ (KW) de los parentales ‘Z701-1’ (Z) y ‘Palsteyn’ (P).

Peso del fruto ‘Z701-1’							Peso del fruto ‘Palsteyn’								
LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl	LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl
Z×P2(1)	AMPA116	88,9	2008	1,867	0,44	3	1,8	P1	UDAp487	0,0	2008	5,197**	1,16	2,8	4,7
			2009	1,845	0,59	3	1,9				2009	10,041****	3,37	2,8	10,5
			2010	12,948****	4,04	3,4	12,2				2010	6,982***	0,94	2,8	3,5
Z4	UDP96003	18,3	2008	11,231**	2,45	2,8	9,0	P1	PaCITA7	3,5	2008	8,182**	1,49	2,8	5,7
			2009	5,532	1,03	2,8	3,6				2009	14,872****	4,70	2,8	14,0
			2010	20,539*****	4,60	2,8	13,7				2010	15,501****	2,67	2,8	9,0
Z4	UDA021	58,6	2008	5,964	1,26	2,8	4,7	P4	UDP96003	27,3	2008	11,231**	2,44	3	8,9
			2009	5,569	1,01	2,8	3,1				2009	5,532	1,03	2,9	3,5
			2010	18,638*****	4,66	2,8	14,2				2010	20,539*****	4,70	3	13,8
Z4	UDA027	66,2	2008	4,375	0,99	2,8	3,7	P4	UDA021	65,9	2008	5,964	1,26	3	4,7
			2009	4,138	0,63	2,8	2,0				2009	5,569	0,99	2,9	3,1
			2010	20,472*****	4,74	2,8	14,2				2010	18,638*****	4,80	3	14,4
Z4	EPPCU1775	67,6	2008	4,29	0,89	2,8	3,4	P4	UDA027	73,7	2008	4,375	0,99	3	3,7
			2009	3,895	1,08	2,8	3,5				2009	4,138	0,54	2,9	1,7
			2010	8,861**	4,90	2,8	15,0				2010	20,472*****	4,91	3	14,5
Z5	UDAp423	19,4	2008	11,783*****	3,51	2,8	16,5	P4	EPPCU1775	75,0	2008	4,29	0,83	3	3,3
			2009	0,184	0,18	2,8	1,3				2009	3,895	0,92	2,9	2,9
			2010	3,020*	0,67	2,8	3,0				2010	8,861**	4,79	3	14,5
Z7	UDAp460	27,6	2008	0,063	0,76	2,8	8,8	P4	CPSCT005	94,3	2008	0,824	0,32	3	1,5
			2009	0,62	0,78	2,8	4,3				2009	6,484**	3,35	2,9	18,1
			2010	15,439*****	3,65	2,8	12,1				2010	2,02	5,35	3	30,9
Peso del hueso ‘Z701-1’							Peso del hueso ‘Palsteyn’								
Z×P2(1)	AMPA116	88,9	2008	8,881**	2,10	2,9	9,2	P1	UDAp487	0,0	2008	0,012	0,02	2,8	0,1
			2009	8,091**	2,41	2,9	7,3				2009	8,095****	2,43	2,8	8,1
			2010	11,518***	3,17	3	9,6				2010	7,736****	1,46	2,8	6,6
Z7	UDAp460	27,6	2008	9,827****	2,03	2,8	10,0	P1	PaCITA7	3,5	2008	0,847	0,37	2,8	1,9
			2009	21,005*****	5,39	2,8	17,9				2009	11,118**	2,91	2,8	8,8
			2010	1,187	1,22	2,8	7,0				2010	13,643****	3,34	2,8	10,5

En el LG 5 de ‘Z701-1’, el marcador UDAp423 parece mostrar cierta influencia sobre el peso del fruto aunque esto sólo se confirma para el año 2008 y con un valor de LOD muy bajo. El marcador UDAp460 del LG 7 de ‘Z701-1’ es relacionado en este caso tanto con peso del fruto como con el peso del hueso en 2010 y 2009 respectivamente. En el LG 1 de ‘Palsteyn’ fue localizado un QTL de peso del hueso para 2009 y 2010 siendo el marcador más cercano el PaCITA7 (Tabla 4.7).

En otros estudios como Abbot y col. (1998) y Eduardo y col. (2011) también se relaciona el LG 1 con el peso del fruto. Como hemos visto, peso del fruto y peso del hueso no se relacionan con QTLs de una forma más o menos fija entre años, debido en parte a las diferencias ambientales inter-anales y a la influencia de genes menores en diferentes grupos de ligamiento sobre estos caracteres.

#### 4.4.2.4. Color del fruto

En el caso del color de fruto fueron detectados algunos QTLs de color de piel, color de pulpa y chapa en los LG 1, 3 y 6. En el LG 1 de ambos parentales destacamos el QTL de color de pulpa flanqueado por los marcadores UDAp415 y PGS1.21, siendo este último significativo en los tres años y alcanzando un LOD máximo de 4,01 en 2009 (Tabla 4.8). Otros autores como Quilot y col. (2004) y Martínez-García y col. (2013b) también localizaron QTLs asociados con el color rojo y amarillo de la pulpa de melocotonero respectivamente en zonas muy similares a las descritas en el LG 1.

**Tabla 4.8.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de color del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Z701-1' (Z) y 'Palsteyn' (P).

Color de piel 'Z701-1'								Color de pulpa 'Palsteyn'							
LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl	LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl
Z3	UDAp412	17,6	2008	4,137**	0,78	2,8	5,3	P1	UDAp415	19,3	2008	12,305***	2,65	2,80	9,8
			2009	5,761**	3,17	2,8	16,3				2009	11,047**	1,60	2,80	5,5
			2010	9,852****	4,53	2,8	19,3				2010	11,135**	1,52	2,80	4,9
<b>Color de pulpa 'Z701-1'</b>															
Z1	UDAp415	18,6	2008	12,305***	2,63	2,8	9,8	P1	PGS1.21	24,2	2008	19,952*****	3,54	2,80	13,2
			2009	11,047**	1,62	2,8	6				2009	25,273*****	3,88	2,80	13,7
			2010	11,135**	1,46	2,8	5,5				2010	16,670*****	3,18	2,80	10,8
Z1	PGS1.21	23,9	2008	19,952*****	3,52	2,8	13,3								
			2009	25,273*****	4,01	2,8	14,0								
			2010	16,670*****	3,18	2,8	11,1								
ZxP6(1)	UDP98412	47,4	2008	11,969****	2,37	3,1	10,0								
			2009	11,246****	2,97	2,8	13,6								
			2010	27,210*****	8,30	4,3	24,4								
<b>Color de chapa 'Z701-1'</b>															
Z3	UDAp412	17,6	2008	2,493	1,06	2,8	4,6								
			2009	9,025****	3,92	2,8	16,0								
			2010	2,102	1,13	2,8	4,6								

En el LG 3, el marcador UDAp412 mostró tener alguna relación con el color de piel en los años 2009 y 2010, así como con color de chapa para el año 2009 (Tabla 4.8). Hay que destacar que este marcador fue sólo mapeado en 'Z701-1', siendo este grupo de ligamiento muy poco saturado, aunque podemos decir que el marcador UDAp412 es localizado por otros autores como Dondini y col. (2007) en la zona media del cromosoma 3, lo que nos indica una posible relación del color del fruto de albaricoquero en la zona media de este cromosoma.

Son varios los autores que relacionan el LG 3 con el color del fruto en distintas especies del género *Prunus*, tanto para el color de piel como el color de pulpa, en melocotonero (Warburton y col., 1996; Abbot y col., 1998; Quilot y col., 2004; Eduardo y col., 2011; Illa y col., 2011); en albaricoquero (Ruiz y col., 2010b; Socquet-Juglard y col., 2012) y en cerezo (Sooriyapathirana y col., 2010).

En cuanto al color de pulpa, se observa una mayor correlación en el LG 6 del marcador UDP98412, el cual nos revela sobre todo en el año 2010 la presencia de un QTL bastante significativo con un LOD de 8,3 y un porcentaje de la variación del carácter en torno al 25 % (Tabla 4.8). En el LG 6 son detectados diferentes QTLs de color de piel por otros autores como Verde y col. (2002) y Eduardo y col. (2011) en melocotonero o para cerezo dulce (Sooriyapathirana y col., 2010).

#### 4.4.2.5. Contenido en sólidos solubles

En cuanto al contenido en sólidos solubles, fueron identificados diferentes QTLs en los LG 3, 4 y 5, destacando como QTL más significativo el situado entre los marcadores UDAP439, UDA021 y UDA027 del LG 4. El marcador UDA021 parece ser el más vinculado con este carácter en ambos parentales, llegando a valores de LOD cercanos a 7 y con un porcentaje de la variación del carácter en torno al 20 % en el año 2009 (Tabla 4.9). En el LG 3 podemos destacar el marcador UDAp446 que es común en ambos parentales y presenta picos de LOD significativos en los años 2009 y 2010. En este mismo grupo destacamos los marcadores PaCITA4 y UDAp499 de ‘Palsteyn’ que llegan hasta el 35 % de la variación del carácter en 2010, siendo su nivel de significación más importante para el análisis ‘interval-mapping’. El marcador UDAp412 de ‘Z701-1’ alcanza valores significativos en los años 2009 y 2010 en ambos estadísticos.

**Tabla 4.9.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de contenido en sólidos solubles del fruto mediante análisis ‘Interval-mapping’ (LOD) y ‘Kruskal-Wallis’ (KW) de los parentales ‘Z701-1’ (Z) y ‘Palsteyn’ (P).

Sólidos solubles ‘Z701-1’							Sólidos solubles ‘Palsteyn’								
LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl	LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl
Z3	UDAp446	0,0	2008	4,398	0,61	2,8	2,5	P3	UDAp446	0,0	2008	4,398	0,88	2,8	3,5
			2009	16,249****	3,56	2,8	11,2				2009	16,249****	3,64	2,8	11,6
			2010	19,234*****	4,96	2,8	15,3				2010	19,234*****	4,94	2,8	15,4
Z3	UDAp412	17,6	2008	1,833	0,67	2,8	3,5	P3	PaCITA4	20,9	2008	0,621	0,70	2,8	4,6
			2009	14,844*****	4,15	2,8	15,8				2009	2,271	3,15	2,8	18,7
			2010	12,841*****	4,10	2,8	16,7				2010	3,969**	5,14	2,8	31,1
Z4	UDAp439	41,0	2008	20,593*****	4,89	2,9	17,1	P3	UDAp499	22,9	2008	0,783	0,61	2,8	4,5
			2009	14,817****	3,17	2,8	9,5				2009	2,275	3,10	2,8	21,2
			2010	12,075***	2,76	2,8	8,4				2010	3,540*	5,18	2,8	35,6
Z4	UDA021	58,6	2008	12,890****	3,25	2,9	11,7	P4	UDAp439	49,6	2008	20,593*****	4,88	3	17,0
			2009	23,211*****	6,82	2,8	19,8				2009	14,817****	3,17	2,9	9,5
			2010	9,464**	1,92	2,8	6,0				2010	12,075***	2,75	3,1	8,3
Z4	UDA027	66,2	2008	13,922****	3,42	2,9	12,3	P4	UDA021	65,9	2008	12,890****	3,29	3	11,8
			2009	24,249*****	6,69	2,8	18,8				2009	23,211*****	6,83	2,9	19,9
			2010	8,717**	1,87	2,8	5,8				2010	9,464**	1,94	3,1	6,1
Z5	AMPA105	0,0	2008	5,406	1,50	2,8	5,6	P4	UDA027	73,7	2008	13,922****	3,47	3	12,4
			2009	19,692*****	4,09	2,8	12,1				2009	24,249*****	6,73	2,9	18,9
			2010	10,982**	2,89	2,8	8,7				2010	8,717**	1,91	3,1	5,9
Z5	UDAp423	19,4	2008	2,056	0,95	2,8	6,1	P4	EPPCU1775	75,0	2008	7,961**	1,49	3	5,6
			2009	3,369*	2,93	2,8	18,6				2009	18,360*****	3,63	2,8	10,9
			2010	4,040**	2,21	2,8	12,1				2010	7,720**	0,92	3	3,1

En el LG 5, aunque sólo fueron mapeados 2 marcadores polimórficos en 'Z701-1', se localizó un QTL en torno a los marcadores UDAp423 y AMPA-105, siendo éste último el más vinculado a este carácter sobre todo en el año 2009 (Tabla 4.9).

Si analizamos los resultados obtenidos por otros autores, son muchos los QTLs ligados al contenido en sólidos solubles o sacarosa encontrados en diferentes grupos de ligamiento desde el 1 al 7 en diferentes especies del género *Prunus*. En cuanto a los LG 3, 4 y 5, Quilot y col. (2004) y Eduardo y col. (2011) en melocotonero y Ruiz y col. (2010b) en albaricoquero relacionan al LG 3 con éste carácter, mientras que Dirlewanger y col. (1999), Etienne y col. (2002), Quilot y col. (2004), Cantin y col. (2010), Illa y col. (2011) en melocotonero lo hacen para los LG 4 y 5. Eduardo y col. (2011) en melocotonero y Ruiz y col. (2010b) en albaricoquero también vinculan al LG 4 con sólidos solubles.

#### 4.4.2.6. Acidez del fruto

La acidez determinada en g ácido málico/100 ml fue asociada en este caso a los LG 2 y LG 4. En el LG 2 el contenido de ácido málico se encuentra estrechamente vinculado a los marcadores PceGA34 y UDAp473 (LOD = 5,49) durante al menos 2 años, aunque debemos destacar que el porcentaje de la variación del carácter no fue muy elevado (Tabla 4.10).

**Tabla 4.10.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de acidez del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Z701-1' (Z) y 'Palsteyn' (P).

Acidez 'Z701-1'								Acidez 'Palsteyn'							
LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl	LG	Marcador	Posición	Año	KW	LOD	LODmin	%expl
ZxP2(1)	UDAp473	79,6	2008	13,946****	3,09	3	11,1	Z4	UDP96003	27,3	2008	14,438****	2,97	2,8	10,7
			2009	22,027*****	5,49	3,3	15,8				2009	16,728****	3,54	2,8	10,6
			2010	13,925****	2,81	3,2	8,5				2010	15,082****	2,97	3	9,0
ZxP2(1)	PceGA34	83,7	2008	11,085**	3,04	3	10,9	Z4	UDAp439	49,6	2008	12,381***	3,16	2,8	11,6
			2009	15,079****	3,83	3,3	11,3				2009	14,660****	3,45	2,8	10,3
			2010	11,874***	2,89	3,2	8,7				2010	22,047*****	4,82	3	14,2
Z4	UDP96003	18,3	2008	14,438****	2,96	2,8	10,7	Z4	UDAp439	41,0	2008	12,381***	3,15	2,8	11,6
			2009	16,728****	3,54	2,8	10,6				2009	14,660****	3,45	2,8	10,3
			2010	15,082****	2,96	2,8	9,0				2010	22,047*****	4,82	2,8	14,2

En el LG 4 el mismo QTL se repite en los tres años en torno a los marcadores UDAp439 y UDP96003 (*Tabla 4.10*), siendo este último marcador relacionado con acidez por Quilot y col. (2004). También cabe resaltar que estos mismos marcadores ya han sido relacionados con fecha de floración, maduración o ciclo de desarrollo del fruto, por lo que estos QTLs pueden ser debidos a cierta correlación entre los mismos.

Otros autores como Quilot y col. (2004) localizan diferentes QTLs de ácido málico en el LG 2 en una población de melocotonero, así como también Ruiz y col. (2010b) describen cierta relación del carácter acidez con este grupo en albaricoquero. Cantín y col. (2010) y Eduardo y col. (2011) describen diferentes QTLs de acidez en el LG 4 para distintas poblaciones de melocotonero.

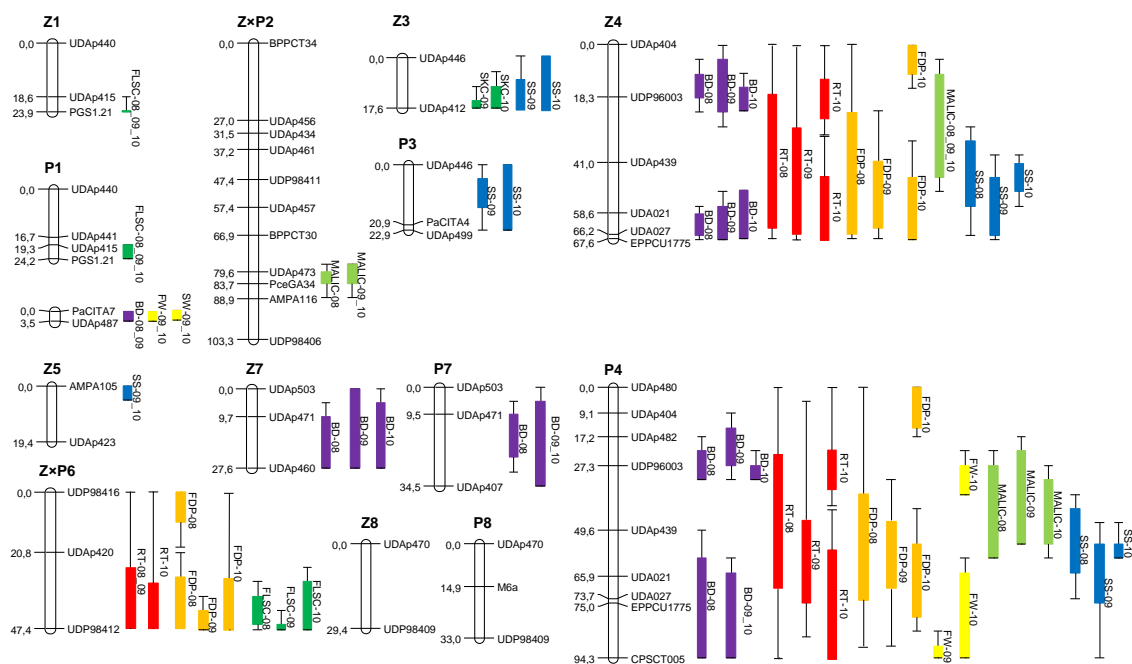
#### **4.4.2.7. Resumen de QTLs identificados**

A partir del análisis realizado, tras discutir todos y cada uno de los QTLs para cada uno de los caracteres, en la *Figura 4.5* sintetizamos los resultados más relevantes teniendo en cuenta sólo aquellos QTLs que eran significativos al menos en 2 años.

Como hemos visto, los resultados más relevantes que podemos destacar son fundamentalmente la gran influencia del LG 4 en cuanto a la fenología y calidad del fruto en albaricoque, sobre todo en lo que respecta a fecha de floración, fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto, contenido en sólidos solubles y acidez, así como los QTLs de fecha de floración del LG 7, QTLs para fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto y color de pulpa del LG 6 y los QTLs identificados para sólidos solubles y color de piel en el LG 3 (*Figura 4.5*).

Además, debemos señalar que la aplicación de nuevos marcadores moleculares no ubicados en el mapa de referencia de *Prunus* aporta nueva información sobre zonas del genoma antes no descritas, así como también señalan la presencia de QTLs similares a los de otros autores en las mismas zonas. Por otro lado, el estudio de genes candidatos puede ser un enfoque apropiado para continuar con esta línea de investigación.

Algunos de los autores que han trabajado en este sentido son Etienne y col. (2002) que identifican genes candidatos y QTLs relacionados con el contenido en azúcares y ácidos orgánicos en melocotonero; Silva y col. (2005) que describen varios genes candidatos ligados a fecha de floración en una población F1 intraespecífica de almendro × melocotonero en los LG 1, 4, 5, 6 y 7; Ogundiwin y col. (2009) para maduración del fruto en melocotonero; Sánchez-Pérez y col. (2010) para el amargor de la semilla en el LG 5 de una población de almendro; Sooryapathirana y col. (2010) relaciona diferentes genes candidatos con el color del fruto en los grupos 3 y 6 de cerezo; Illa y col (2011) para el crecimiento, madurez, textura, acidez, azúcares, aroma y color del fruto; y más recientemente destacan los genes candidatos relacionados con fecha de maduración del fruto en melocotón identificados por Pirona y col. (2013).



**Figura 4.5.** QTLs más representativos de la población 'Z701-1' (Z) × 'Palsteyn' (P) (al menos en 2 años) para un LOD superior a 3. El color violeta representa fecha de floración; rojo, fecha de maduración (RT); naranja, ciclo de desarrollo del fruto (FDP), amarillo, peso del fruto y peso del hueso (FW y SW); verde oscuro, color del fruto (color de piel (SKC), chapa (BLSC) y color de pulpa (FLSC)); verde claro, acidez (MALIC); azul, contenido en sólidos solubles (SS).



Los resultados obtenidos revelan que estudios futuros podemos focalizarlos en la búsqueda de genes candidatos de caracteres tales como fecha de maduración, acidez o sólidos solubles en aquellas zonas en las que ya se han obtenido importantes QTLs, sobre todo en los grupos de ligamiento 4 y 6. Hemos de resaltar que como hemos señalado anteriormente, un buen número de autores localizan diferentes QTLs de fecha de maduración, acidez y sólidos solubles en el LG 4, siendo además un cromosoma relacionado con floración y ciclo de desarrollo del fruto.

Por tanto, el LG 4 se perfila como uno de los más importantes en lo que respecta a la calidad del fruto en albaricoquero y en otras especies del género *Prunus*. Otra posibilidad para avanzar en este sentido puede derivarse de la reciente secuenciación del genoma completo del melocotonero [*Prunus persica* (L.), Batsch] llevada a cabo por International Peach Genome Initiative (IPGI) ([www.rosaceae.org/peach/genome](http://www.rosaceae.org/peach/genome)).

#### 4.5. Conclusiones

- I. A partir de los resultados obtenidos, podemos considerar el trabajo de mapeo genético realizado con marcadores tipo SSRs como preliminar, ya que no se trata de mapas muy saturados. Sin embargo, el fenotipado de 3 años y el hecho de que muchos marcadores mapeados sean polimórficos en ambos parentales le da mayor robustez y relevancia a los QTLs detectados.
- II. En la población 'ZxP' fueron mapeados un total de 42 SSRs procedentes la mayoría de ellos de ADN genómico de albaricoquero (UDAp), lo que nos ha permitido la construcción de los correspondientes mapas de ligamiento genético. En el mapa de 'Z701-1' se cubre una extensión de 336,2 cM, mientras que en 'Palsteyn' es de 363,1 cM. La distancia media entre marcadores fue de 10,5 cM para 'Z701-1' y 9,5 cM para 'Palsteyn'.
- III. El hecho de detectar y asociar QTLs con algunos marcadores tipo SSRs en algunos caracteres previamente descritos por otros autores y en especies diferentes, nos confirma la elevada homología y sintenia existente entre especies dentro del género *Prunus*.
- IV. El carácter fecha de floración a pesar de su intermitencia entre años, parece estar más relacionado con los LG 4 y LG 7. Esta intermitencia de QTLs de algunos caracteres como fecha de floración y peso del fruto revela el carácter poligénico y la influencia de las diferencias ambientales entre años de la mayoría de los caracteres evaluados.
- V. Los resultados obtenidos muestran sin lugar a dudas la gran influencia del LG 4 en la calidad del fruto, sobre todo en el caso de fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto, así como también en el caso del contenido en sólidos solubles. El contenido en ácido málico, también es relacionado de forma consistente en los LG 2 y LG 4, así como el peso del fruto al final del LG 4.
- VI. El LG 6 también muestra QTLs importantes en cuanto a fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto aunque se da una menor influencia que en el caso del LG 4. Asimismo se observa cierta relación en este grupo con el color de pulpa del fruto, mientras que los LG 1 y LG 3 son relacionados con el color de piel.

- VII.** Estos datos aunque preliminares nos ayudan a enfocar estudios dirigidos hacia zonas más concretas del genoma en la búsqueda de QTLs que controlen un mayor porcentaje de la variación del carácter, saturando las zonas de interés y diseñando marcadores específicos que nos aporten información de la expresión fenotípica de determinados caracteres en cada uno de los descendientes de una población.



***5. Caracterización molecular de genotipos de albaricoquero mediante marcadores tipo SNP desarrollados a partir de la secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq) y analizados mediante la tecnología SNPlex***



## **5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE ALBARICOQUERO MEDIANTE MARCADORES TIPO SNP DESARROLLADOS A PARTIR DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA DE ARN (RNA-Seq) Y ANALIZADOS MEDIANTE LA TECNOLOGÍA SNPlex**

### **5.1. Introducción y Objetivos**

Los primeros estudios sobre caracterización de ADN y diversidad genética en albaricoquero se llevaron a cabo mediante marcadores tipo RFLPs (Restriction fragment length polymorphism) (De Vicente y col., 1998; Geuna y col., 2003). Sin embargo, los marcadores tipo SSRs (Simple sequence repeat) han llegado a ser los marcadores de PCR más utilizados por su alto nivel de polimorfismo, abundancia y carácter co-dominante (Hormaza, 2002; Messina y col., 2004, Sánchez-Pérez y col., 2005, Dondini y col., 2007). También han sido utilizados marcadores moleculares del tipo SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions) usando la información disponible tras la secuenciación de fragmentos de ADN (Mariniello y col., 2002).

Los marcadores tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) están adquiriendo cada vez más relevancia debido a que presentan una elevada abundancia en el genoma de las plantas, siendo estimado 1 SNP por cada 1000 pb (Rafalski, 2002). Otras ventajas de los SNPs con el resto de marcadores de ADN incluyen su amplia distribución por todo el genoma (aunque su presencia y distribución varía entre especies), la posibilidad de usar muestras de ADN extremadamente degradado, así como el uso de forma simultánea de cientos de marcadores en un solo chip mediante multiplex.

Además, los SNPs aparecen en regiones codificantes y no codificantes de genes, lo que puede conllevar a consecuencias funcionales influenciando sobre la función de los genes y determinando cambios en los aminoácidos codificados. Estos cambios funcionales son la causa biológica de la asociación de SNPs con diferentes caracteres agronómicos en plantas (Martínez-Gómez y col., 2012; Vendramin y col., 2014).

Sin embargo, los SNPs tienen la desventaja frente a otros marcadores como los SSRs de ser bi-alélicos y a menudo se requiere una compleja y costosa tecnología para los ensayos (Rafalski, 2002). Por otro lado, la alta eficiencia ofrecida por las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento de ADN (DNA-Seq) y ARN a través de ADNc (RNA-Seq) ha hecho posible el desarrollo de un gran número de SNPs.

En las especies de *Prunus*, Ahmad y col. (2011) describieron la aplicación de las tecnologías de DNA-Seq resecuenciando dos genotipos de melocotonero [*P. persica* (L.) Batsch] ( $2n=2x=16$ ) para identificar una alta frecuencia de SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma. Descubrieron un total de 6.654 SNPs distribuidos en diferentes grupos del genoma del melocotonero. Koepke y col. (2012), también identificaron 2.243 SNPs filtrando los transcriptomas del RNA-Seq de dos genotipos de cerezo dulce (*P. avium* L.) ( $2n=2x=16$ ). Además, la eficiencia de aplicación de estos marcadores puede ser mejorada gracias a la facilidad de automatización del genotipado con SNPs. La principal ventaja de los chips de SNPs para el desarrollo de marcadores moleculares es el análisis simultáneo de miles de marcadores en un único experimento, permitiéndonos una automatización más fácil aunque esto requiere de una tecnología de microarrays rentable.

En los últimos años, herramientas de alto rendimiento para el genotipado de SNPs han sido utilizadas en diferentes especies de *Prunus* (Peace y col., 2012; Verde y col., 2012). Peace y col. (2012) verificaron 3.883 SNPs polimórficos en 24 cultivares de cerezos dulces y amargos (*P. cerasus* L.) ( $2n=4x=32$ ) usando DNA-Seq e incluyendo estos SNPs en RosBREED cherry 6K SNP array v1. Además, un grupo de 9.000 SNPs fue seleccionado en 56 genotipos de melocotonero usando DNA-Seq para incluirlos en el chip de genotipado (peach 9K SNP array) para estudios de variabilidad, mapeo de grupos de ligamiento genético y análisis de asociación de mapas (Verde y col., 2012). Además, el alto nivel de sintenia entre genomas (Jung y col., 2009) y transcriptomas del género *Prunus* (Martínez-Gómez y col., 2011) hace posible la transferibilidad de los marcadores, aunque los SNPs (y por tanto los chips) son más polimórficos dentro de las especies en las que han sido desarrollados que en otras especies.

Para superar estos límites han sido desarrollados métodos de genotipado de alto rendimiento como la técnica SNPlex™ basada en el uso combinado de la PCR y el secuenciador capilar (De la Vega y col., 2005; Lijavetky y col., 2007) o la espectrometría de masas (Chen y col., 2012). Estos enfoques aportan mayor flexibilidad en el diseño experimental, permitiendo el análisis de un elevado número de SNPs sin necesidad de una tecnología de microarrays en todas aquellas especies en las que los datos de re-secuenciación estén disponibles y en un gran número de individuos (Tobler y col., 2005).



Aunque no se han realizado estudios en albaricoquero, los SNPs están siendo aplicados en diferentes especies de *Prunus*, incluyendo mei (*P. mume* Sieb. Et Zucc.;  $2n=2x=16$ ), almendro (*P. amygdalus* Batsch syn. *P. dulcis* (Mill.) Webb;  $2n=2x=16$ ), melocotonero y cerezo dulce y amargo para la identificación de variedades y evaluación de la genealogía y diversidad genética (Li y col., 2010; Fang y col., 2006, Wu y col., 2010; Aranzana y col., 2012; Fernandez i Martí y col., 2012; Sun y col., 2013; Rosyara y col., 2014). Recientemente, Bielsa y col. (2014) usaron marcadores tipo SNP procedentes de repeticiones de regiones invertidas de los cloroplastos para caracterizar 48 patrones de *Prunus*.

Además, debido a la abundancia y polimorfismo de estos marcadores, están llegando a ser los marcadores de elección para el mapeo genético y análisis de QTLs (Quantitative Trait Loci). En almendro, Wu y col. (2009) y Tavassolian y col. (2010) construyeron el primer mapa genético combinando SNPs y otros marcadores como los RAPDs o SSRs. Posteriormente, Eduardo y col. (2013) y Martínez-García y col. (2013a y 2013b) han identificado los primeros SNPs ligados a QTLs en mapas de melocotonero con grupos de ligamiento altamente saturados usando sólo marcadores tipo SNP, aunque con referencias de mapas previamente desarrollados con SSRs. Estudios similares han sido realizados en cerezo dulce analizando diferentes progenies intraespecíficas (Klagges y col., 2013). Además, Martínez-García y col. (2013a) analizaron el efecto de predicción de los SNPs identificados y ligados con QTLs de calidad del fruto y daños por frío en melocotonero.

En melocotonero la flexibilidad que permite el Sequenom ha sido utilizada para un mapeo de mayor precisión de la región que controla la fecha de maduración en el LG 4 (Pirona y col., 2013) y del locus G (vellosidad de melocotón y nectarina) en el LG 5 (Vendramin y col., 2014), identificando genes candidatos responsables de estos caracteres.

El objetivo de este trabajo ha sido la mejora de la eficiencia y flexibilidad de la metodología de desarrollo y análisis de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) combinando RNA-Seq y la técnica SNPlex para el genotipado de diferentes variedades de albaricoquero. Además, los SNPs diseñados son aplicados en la caracterización molecular y estudio de relaciones y diversidad genética en variedades de albaricoquero como aplicación previa al mapeo genético de poblaciones.

## 5.2. Material vegetal

El material vegetal utilizado en el análisis del RNA-Seq proviene de dos genotipos de albaricoquero relacionados: ‘Rojo Pasión’ y ‘Z506-7’, ambos procedentes del cruzamiento entre la variedad norte americana ‘Orange Red’ y la variedad española ‘Currot’. Además, para la caracterización molecular y el análisis de diversidad genética se utilizaron 37 variedades de albaricoquero de la colección del CEBAS-CSIC (Murcia, España) y de la Facultad de Agraria de la Universidad de Bolonia (Italia), procedentes de diversos orígenes y países incluyendo Francia, España, Irán, Italia, EE.UU. o Japón, nuevas obtenciones procedentes de los programas de mejora de Italia, Francia, España, EE.UU, Sudáfrica o Canadá, así como variedades tradicionales de origen desconocido (*Tabla 2.2, Capítulo 2*).

## 5.3. Metodología

### 5.3.1. Extracción de ARN, secuenciación e identificación de SNPs

El ARN total fue extraído usando RNeasy Plant Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad del ARN total de las muestras fue evaluado usando el espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EE.UU.) y normalizado a la misma concentración (200 ng/μl). Posteriormente 5 μl de cada muestra fueron enviadas al Centro de Regulación Genómica (CRG, Barcelona, España) para la preparación de las librerías y secuenciación del ARN. El ARNm fue obtenido usando Sera-mag® (Thermo Scientific, Wilmington, EE.UU.). Las librerías de ADNc fueron preparadas de acuerdo con los protocolos de Illumina. Fragmentos de alrededor de 300 pb fueron extraídos de geles de agarosa previamente enriquecidos con PCRs de 16 ciclos. Finalmente las librerías de ADNc fueron secuenciadas usando el secuenciador Illumina HiSeq2000 (100 PE, Paired end).

Previamente, para filtrar y eliminar las regiones de baja calidad se utilizó el programa Fastx-Toolkit, una herramienta desarrollada por la empresa aScidea®. Las lecturas o ‘reads’ de alta calidad que pasaron por el filtro fueron alineadas con *P. persica* genome v1.0 disponible en la base de datos de *Rosaceae* (GDR) (Verde y col., 2013) usando Tophat 1.4.0 (Trapnell y col., 2009) y Bowtie 0.12.7 (Lindner y Friedel, 2012). El análisis de las variaciones en los archivos de mapeo de las lecturas fue realizado usando Samtools 0.1.18 (Li y col., 2009). Después del filtrado de SNPs se obtuvieron diferencias de alta calidad con resultados de calidad superiores a 20 y en el caso de los INDEL superiores a 50.

### 5.3.2. 'Target sequences', diseño de cebadores y genotipado de SNPs

Las lecturas en formato BAM obtenidas después del RNA-Seq fueron organizadas en 7 librerías diferentes (4 procedentes de 'Rojo Pasión' y 3 de 'Z506-7') que han sido procesadas por SAMtools ([samtools.sourceforge.net](http://samtools.sourceforge.net)) con el fin de mostrar su alineamiento con el genoma del melocotonero mediante Tablet (Milne y col., 2013).

La información de estas librerías de 'Rojo Pasión' y 'Z506-7' ha sido usada para recuperar las secuencias circundantes a los SNPs procedentes de los datos de re-secuenciación, llevando a cabo una selección manual de las mismas para mejorar la caracterización del genoma del albaricoquero. El consenso de secuencias fue obtenido mediante Lasergene SeqMan Pro (DNASTar, Madison WI, EE.UU.) y BLASTed comparando con el genoma del melocotonero ([http://www.rosaceae.org/tools/ncbi\\_blast](http://www.rosaceae.org/tools/ncbi_blast)) para seleccionar sólo aquellos SNPs que eran únicos en el genoma del *Prunus*.

Cada secuencia flanqueante ha sido también visualizada en Gbrowse, herramienta disponible en la web de Phytozome (<http://www.phytozome.net/cgi-bin/gbrowse/peach/>) para recuperar información sobre las anotaciones del transcriptoma y excluir todas las secuencias con dominios repetidos (LTR finder, Repeats consensus, RepBase, Repeat prediction). Las regiones de 'Target sequence' de alrededor de 200 pb fueron seleccionadas para reducir la posibilidad de la presencia de intrones desconocidos en las secuencias seleccionadas y maximizar la posibilidad de obtener polimorfismos de SNP.

El ADN genómico fue extraído de brotes de hojas jóvenes usando el protocolo con CTAB descrito por Doyle y Doyle (1987) y cuantificado mediante el espectrofotómetro NanoDrop® 2000. El genotipado fue realizado mediante tecnología DNA Mass Array (Jurinke y col., 2002) usando la plataforma Sequenom (Gabriel y col., 2009). Tres SNPlex independientes de 36, 34 y 31 SNPs fueron diseñadas por el software Mass ARRAY Assay Design 3.1 (disponible en la plataforma Sequenom) lo que supuso el análisis de 101 SNPs de los 136 diseñados.

### 5.3.3. Análisis de datos y relaciones genéticas

La heterocigosidad (H) de cada SNP fue calculada como el número de cultivares de albaricoquero heterocigóticos dividido por el número total de cultivares ensayados. El poder de discriminación (PD) de cada marcador fue calculado como  $PD = 1 - \sum g_i^2$ , donde  $g_i$  es la frecuencia del genotipo  $i^{th}$ . Además, la heterocigosidad de cada cultivar de albaricoquero fue calculada como el número de marcadores heterocigóticos para un cultivar dividido por el número total de SNPs ensayados.

También fueron calculadas las diferencias de las distancias de caracteres medios mediante comparaciones pareadas con el software MEGA 6.06 (Tamura y col., 2013) (*Anexos, Tabla suplementaria 7*), que se utilizó para construir los dendrogramas que representan las relaciones fenéticas entre los genotipos. El soporte relativo a las ramas de cada dendrograma fue evaluado con 2000 repeticiones (bootstrapping). Finalmente, la estimación de distancias genéticas fue realizada a través del método Maximum Composite Likelihood (MCL).

## 5.4. Resultados y discusión

### 5.4.1. Identificación de SNPs a partir de los datos del RNA-Seq

Un total de 1.034 millones de 'reads' de 100 pb de longitud fueron generadas de las 7 librerías analizadas. Estas 'reads' brutas fueron filtradas eliminando 'reads' vacías y secuencias de baja calidad. El resultado final fue de 994 millones de 'reads' de alta calidad (96 % del total) que fueron designadas como 'reads' limpias en el experimento (*Tabla 5.1*). Por alineamiento iterativo un promedio del 70 % de las 'reads' limpias (694 millones) fueron alineadas con éxito en el genoma de referencia del melocotonero v1.0 ([www.rosaeae.org](http://www.rosaeae.org)) (Verde y col., 2013), mientras que el 30 % restante no mapeó en ninguno de los 8 mega-grupos del genoma del melocotonero.

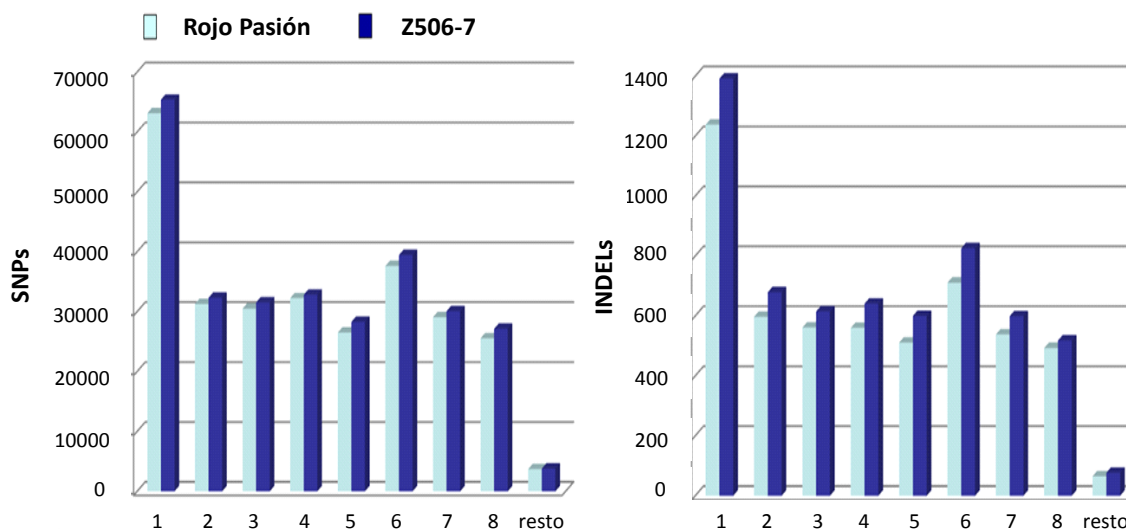
**Tabla 5.1.** Características del mapeo genético y variantes totales (SNPs e INDELs) identificadas mediante RNA-Seq en los genotipos de albaricoquero, ‘Rojo Pasión’ y ‘Z506-7’.

Parámetros evaluados	‘Rojo Pasión’	‘Z506-7’	Total
Nº de ‘reads’ 100 pb	495.594.198	539.282.364	1.034.876.562
‘Reads’ filtradas	476.076.038 (96,1 %)	518.907.557 (96 %)	994.983.595 (96,1 %)
‘Reads’ mapeadas en el genoma de referencia	329.239.352 (69,1 %)	363.691.551 (70 %)	692.930.903 (69,1 %)
Nº de variantes identificadas	282.977	293.574	576.551
Nº de SNPs identificados	277.703 (98,2 %)	287.627 (98 %)	565.530 (98 %)
Nº de INDELs identificados	5.274 (1,8 %)	5.947 (2 %)	11.221 (2 %)
Nº de SNPs diseñados	113	23	136
Nº de SNPs ensayados	83	16	99

Estos porcentajes de alineamiento para el genoma de referencia del melocotonero son similares al 70 % de lecturas mapeadas en un ensayo previo en albaricoquero (Martínez-Gómez y col., 2011), pero como era de esperar más bajos del 89 % obtenido en melocotonero por Wang y col. (2013). Estos porcentajes son similares a los obtenidos para cerezo dulce, en torno al 66 % de ‘reads’ mapeadas (Alkio y col., 2014), y más altos que los datos obtenidos en mei (50 %) (Zhong y col., 2013).

Estos resultados confirman la elevada sintonía entre genomas de *Prunus* (Dondini y col., 2007; Jung y col., 2009) y la utilidad de las secuencias del genoma del melocotonero (Verde y col., 2013) como referencia en estudios de RNA-Seq de diferentes especies de *Prunus*. Las ‘reads’ limpias del RNA-Seq de los 2 genotipos fueron usadas para la identificación de SNPs e INDELs en regiones transcritas usando el genoma del melocotonero como referencia. Un total de 282.977 y 293.574 variaciones fueron identificadas en ‘Rojo Pasión’ y ‘Z506-7’ respectivamente. Entre estas variaciones, 277.703 y 287.627 fueron SNPs (98 %) respectivamente, mientras que 5.274 y 5.947 eran INDELs (2 %) (Tabla 5.1). El mayor número de variaciones de SNPs e INDELs fue encontrado en el LG 1, con 65.140 y 67.402 en ‘Rojo Pasión’ y ‘Z506-7’ respectivamente, seguido por el LG 6 con 38.432 y 39.459 respectivamente (Figura 5.1) reflejando perfectamente la diferencia de longitud entre grupos.

Otros autores utilizaron los datos del RNA-Seq para el desarrollo de 9.587 SNPs en melocotonero (Koepke y col., 2012) así como también Wang y col. (2013) identificaron 2.243 SNPs en genotipos para cerezo dulce. La densidad de SNPs calculada en el presente trabajo fue de un SNP por cada 850 pb (1,17 SNPs/Kb). Estos datos distan mucho de los publicados por Verde y col. (2012) que describió una densidad global de 4,4 SNPs/Kb mediante la secuenciación de 56 genotipos de melocotonero. En este caso la frecuencia de SNPs fue calculada a partir de secuencias de ADN genómico que son mucho más altas que las que fueron observadas solo en regiones transcritas. De hecho, en melocotonero fue observada una frecuencia de SNPs de uno por cada 390 o 1.850 pb en regiones no codificantes y codificantes respectivamente (Aranzana y col., 2012).



**Figura 5.1.** Número de SNPs e INDELS mapeados a partir del RNA-Seq de los genotipos de albaricoquero ‘Rojo Pasión’ y ‘Z506-7’.

Teniendo en cuenta sólo los datos relacionados con regiones codificantes, la densidad de SNPs observada en albaricoquero es más alta que la calculada en melocotonero debido al nivel más alto de auto-compatibilidad entre especies de melocotonero con respecto a albaricoquero.

#### 5.4.2. Diseño de SNPlex y polimorfismos

Un total de 101 SNPs han sido analizados en 3 ensayos de SNPlex de 36, 34 y 31 SNPs. Entre ellos, 2 no amplificaron y de los 99 restantes 95 (con excepción de S2\_16631751, S2\_23012822, S3\_8465286 y S3\_17297604) resultaron ser polimórficos en alguno de los 37 genotipos (97 %), los cuales fueron usados para el análisis de diversidad genética (*Anexos, Tabla suplementaria 5*). En la tabla suplementaria 5 también se indica la posición de los SNPs y la anotación del gen correspondiente. Además, todos los marcadores SNPs mostraron buenos polimorfismos en los genotipos ensayados.

Los SNPs ensayados identificaron un total de 267 combinaciones alélicas en los 37 genotipos. Para la mayoría de los SNPs (77) se dieron 3 combinaciones alélicas, mientras que para el resto de SNPs (18) fueron 2 combinaciones alélicas, dándose una media de 2,8 por locus. La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) para estos marcadores osciló entre 0,06 (S4\_3867486) y 0,65 (S5\_1627140 y S7\_19379420) con un valor medio de 0,38. Además, el poder de discriminación osciló entre 0,12 (S2\_21073478) y 0,66 (S4\_568071) con un valor medio de 0,51 (*Anexos, Tabla suplementaria 6*).

En cualquier caso, corroborando la solidez de este estudio, casi todos los SNPs validados y diseñados en las secuencias de 'Rojo Pasión' fueron polimórficos (sólo en 2 casos el análisis del SEQUENOM falló para S2\_21073478 y S4\_3867486). Todos aquellos marcadores que no fueron polimórficos en 'Rojo Pasión' fueron diseñados a partir de las secuencias del genotipo 'Z506-7'.

Como era de esperar, debido a la naturaleza bi-alélica de los SNPs, la media del número de alelos por locus, la media observada de heterocigosidad y el poder de discriminación mostraron valores más bajos que en el caso de los SSRs. De hecho, la variabilidad y polimorfismo más alto de los SSRs en comparación con los SNPs prevé mejores perspectivas para la identificación de cultivares y análisis de la evaluación de diversidad genética (Sánchez-Pérez y col., 2006). Estos autores encontraron un gran número de alelos (3 a 10) en los cultivares ensayados, con un nivel de heterocigosidad de 0,27 a 0,83 y un poder de discriminación más alto por marcador (0,08 a 0,91).

Esta situación fue también confirmada en estudios comparativos entre SSRs y SNPs en cerezo dulce (Fernandez i Martí y col., 2012). Por otro lado, estos resultados muestran la gran flexibilidad de los SNPs, haciéndolos los marcadores de elección para el genotipado de alto rendimiento (Tobler y col., 2005), o para trabajos de mapeo con mayor precisión e identificación de QTLs (Pirona y col., 2013, Salazar y col., 2014). De hecho, la disponibilidad de un alto número de SNPs en regiones específicas es fundamental, acotando e identificando genes concretos (Eduardo y col., 2013; Klagges y col., 2013; Martínez-García y col., 2013a, 2013b y 2013c; Vendramin y col., 2014).

El uso de regiones codificantes de ADN para el desarrollo de SNPs a partir de RNA-Seq representa una ventaja adicional porque las funciones de los genes son a menudo conocidas. Este hecho facilitará en gran medida el aislamiento de genes ligados con QTLs en diferentes especies de *Prunus* utilizando como modelo el genoma del melocotonero (Salazar y col., 2014).

#### **5.4.3. Diversidad genética de variedades de albaricoquero**

Los 95 SNPs polimórficos fueron utilizados para el análisis de la diversidad genética de 37 genotipos de albaricoquero. La heterocigosidad observada en estos cultivares osciló entre 0,19 de 'Yamagata3' y 0,95 de 'Rojo Pasión' (sólo 5 marcadores desarrollados en 'Z506-7' fueron monomórficos en esta variedad), valores que llegarían a 1 si sólo tuviéramos en cuenta los marcadores procedentes de 'Rojo Pasión' (Tabla 5.2).

Como era de esperar, el alto nivel de heterocigosidad de 'Rojo Pasión' se debió a que la mayoría de marcadores fueron desarrollados a partir de transcriptomas resecuenciados de esta variedad (79 de los 95 validados). Por esta misma razón los niveles de heterocigosidad de varios cultivares ('Yamagata 3', 'Bergeron', 'Harcot' y 'Kioto') fueron más bajos que los observados en variedades relacionadas con 'Rojo Pasión' ('Mirlo Anaranjado', 'Valorange', 'Murciana' y 'Mirlo Blanco') (Tabla 5.2).

Estos resultados coinciden con otros trabajos descritos en cultivares de albaricoquero utilizando marcadores SSRs (Sánchez-Pérez y col., 2006). Estos autores observaron un rango de heterocigosidad de 0,24 a 0,65 en los parentales usados en los programas de mejora, así como el aumento de la heterocigosidad en el caso de los descendientes procedentes de los cruces complementarios.



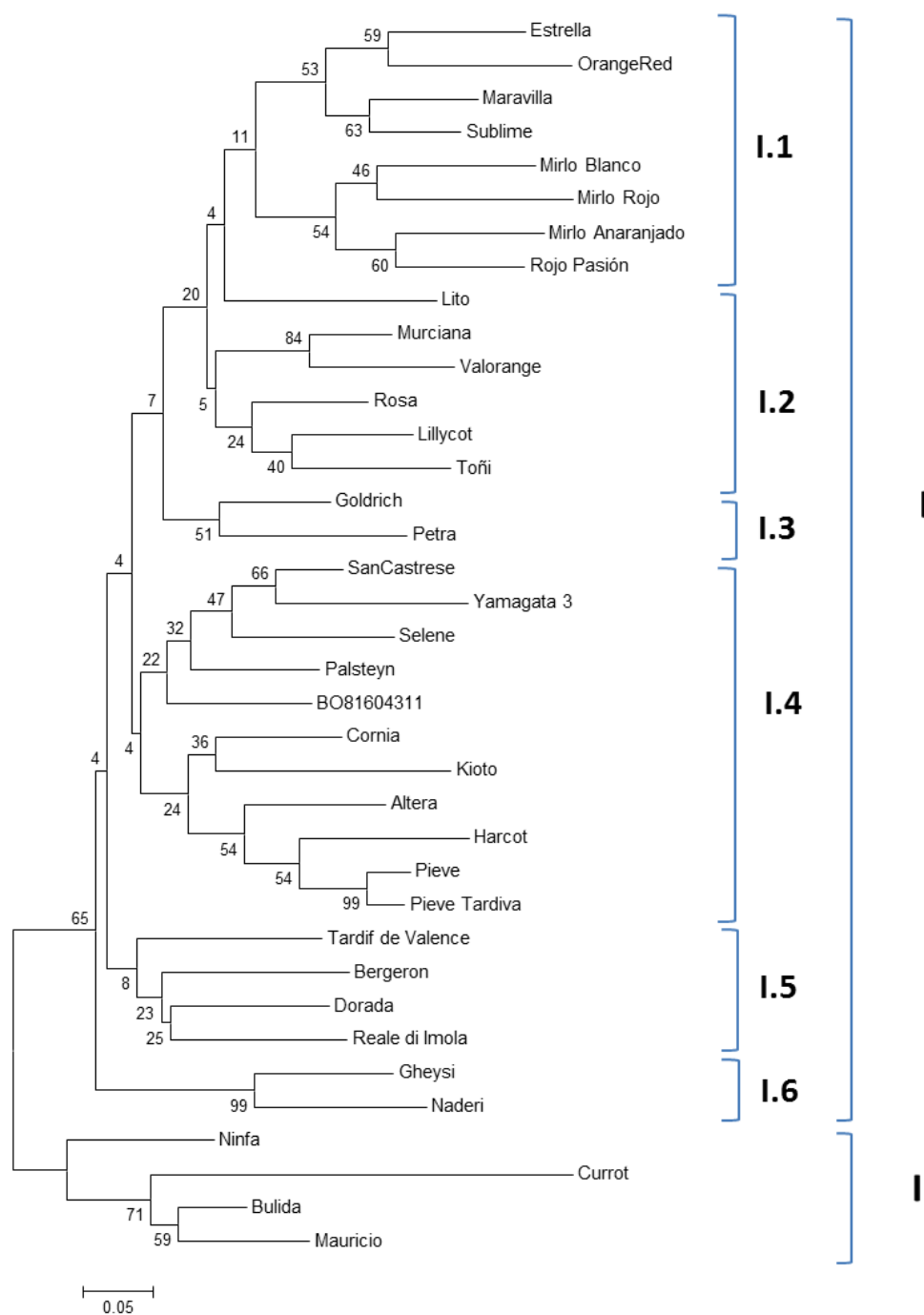
**Tabla 5.2.** Nivel de heterocigosidad de los cultivares de albaricoquero ensayados. Entre paréntesis se indica la heterocigosidad sólo para los SNPs diseñados a partir de secuencias de ‘Rojo Pasión’.

Cultivar	Heterocigosidad	Cultivar	Heterocigosidad
‘Altera’	0,37 (0,36)	‘Murciana’	0,54 (0,51)
‘Bergeron’	0,28 (0,26)	‘Naderi’	0,22 (0,26)
‘BO81604311’	0,39 (0,37)	‘Ninfa’	0,35 (0,38)
‘Búlida’	0,35 (0,35)	‘Orange Red’	0,37 (0,37)
‘Cornia’	0,24 (0,26)	‘Palsteyn’	0,31 (0,31)
‘Currot’	0,36 (0,35)	‘Petra’	0,37 (0,36)
‘Dorada’	0,41 (0,39)	‘Pieve’	0,28 (0,27)
‘Estrella’	0,40 (0,35)	‘Pieve Tardiva’	0,30 (0,31)
‘Gheysi’	0,26 (0,25)	‘Reale di Imola’	0,29 (0,27)
‘Goldrich’	0,36 (0,33)	‘Rojo Pasión’	0,95 (1,00)
‘Harcot’	0,27 (0,31)	‘Rosa’	0,39 (0,38)
‘Kioto’	0,22 (0,21)	‘San Castrese’	0,39 (0,39)
‘Lito’	0,43 (0,42)	‘Selene’	0,21 (0,20)
‘Lillycot’	0,44 (0,42)	‘Sublime’	0,45 (0,43)
‘Maravilla’	0,37 (0,37)	‘Tardif de Valence’	0,36 (0,35)
‘Mauricio’	0,33 (0,31)	‘Toñi’	0,36 (0,37)
‘Mirlo Blanco’	0,55 (0,62)	‘Valorange’	0,62 (0,58)
‘Mirlo Anaranjado’	0,65 (0,69)	‘Yamagata 3’	0,19 (0,22)
‘Mirlo Rojo’	0,46 (0,48)	<b>Promedio</b>	<b>0,38 (0,38)</b>

El uso de nuevos cultivares de diferentes localizaciones podría incrementar notablemente la heterocigosidad genética en los programas de mejora en cultivares españoles, lo que supone la ampliación de la variabilidad genética de los cultivares locales. Los resultados son similares a los obtenidos con otros marcadores de ADN, los cuales revelan unos niveles de heterocigosidad genética intermedia en cultivares de albaricoquero, mostrando aquellos cultivares no europeos de polinización cruzada (auto-incompatibles) una mayor variabilidad que los cultivares predominantemente europeos (De Vicente y col., 1998; Hagen y col., 2002), debido probablemente a la auto-compatibilidad de muchos de estos cultivares o a la base genética reducida de su germoplasma.

#### 5.4.4. Dendrograma de asociación de variedades

Las relaciones fenéticas entre los diferentes cultivares ensayados se muestran en la *Figura 5.2*. El dendrograma de SNPs mostró dos grupos claramente diferenciados, un gran grupo (I) con la mayoría de los cultivares y otro grupo (II) con las variedades tradicionales españolas, incluyendo ‘Mauricio’, ‘Búlida’, ‘Currot’, y la variedad italiana ‘Ninfa’.



**Figura 5.2.** Dendrograma obtenido mediante el software MEGA6 basado en las distancias genéticas obtenidas entre las variedades ensayadas.

El primer grupo está dividido en 6 subgrupos, lo que incluye la mayoría de selecciones y cultivares analizados aunque con una gran dispersión del origen genético de los cultivares y selecciones. En el grupo I.1 las variedades 'Estrella', 'Maravilla' y 'Sublime' evidencian su origen genético común, ya que uno de sus parentales fue 'Orange Red'. Esto era de esperar puesto que 'Rojo Pasión' ('Orange Red' × 'Currot') fue usado para desarrollar el 80 % de los marcadores siendo los restantes diseñados a partir del descendiente 'Z506-7'.

En este mismo grupo (I.1), se observa como 'Mirlo Blanco', 'Mirlo Anaranjado' y 'Mirlo Rojo' (procedentes del cruzamiento 'Rojo Pasión' × 'Búlida precoz') están agrupados con uno de sus parentales ('Rojo Pasión'). Por tanto, las variedades de este grupo son más similares a 'Rojo Pasión' que a 'Búlida', evidenciando que la mayoría de los marcadores polimórficos parecen derivar de 'Orange Red' en vez de 'Currot', encontrándose esta variedad muy alejada genéticamente de 'Rojo Pasión' (Figura 5.2)

La misma tendencia parecen mostrar 'Pieve', 'Pieve Tardiva' y 'Alterá' que están agrupadas más cerca de 'Harcot' que 'Reale di Imola', las cuales están involucradas en su pedigree (Tabla 2.2, Capítulo 2). Con respecto a estas 2 variedades, el presente dendrograma evidenció una distancia genética más grande con el análisis de SNPs que la estimada con AFLPs (Geuna y col., 2003). La razón de esta aparente discrepancia puede ser debido a las diferentes características de los 2 tipos de marcadores y porque los SNPs han sido diseñados a partir de un fondo genético peculiar (descendientes de 'Orange Red' × 'Currot').

En el caso de 'Harcot' y 'Reale di Imola', varios de estos marcadores, 25 y 27 respectivamente son polimórficos, pero sólo hay 6 polimorfismos en común entre los 2 genotipos. Algunos resultados que aportan una mayor solidez a este trabajo son los genotipos iraníes 'Gheisi' y 'Naderi' (0,26 y 0,22 de heterocigosidad respectivamente; Tabla 5.2) que fueron agrupados juntos por su origen común procedente de Irán.

Las distancias genéticas entre los 37 genotipos evaluados calculados mediante el método MCL presentan un valor total de 0,413 (*Anexos, Tabla suplementaria 7*). Estas distancias genéticas en general confirmaron las relaciones fenéticas mostradas en la *Figura 5.2*. Los valores más bajos fueron para cultivares relacionados como 'Pieve' y 'Pieve Tardiva' (0,058; ambos procedentes de 'Harcot' × 'Reale di Imola') o 'Sublime' y 'Maravilla' (0,141; ambos procedentes de 'Orange Red' × 'Z211-18'). Las variedades tradicionales españolas 'Mauricio' y 'Búlida' cuyo pedigree es desconocido también mostraron valores bastante bajos, indicando orígenes genéticos similares.

Las mayores distancias genéticas observadas fueron entre 'Currot' y 'Orange Red' (0,998). Además la variedad española 'Currot' junto con 'Búlida' y 'Mauricio' fueron genéticamente las más distantes en comparación con el resto de variedades como podemos ver también en el dendrograma (*Figura 5.2*).

Estos resultados confirman una vez más la idoneidad de los marcadores tipo SNP para el análisis de discriminación de variedades y evaluación de diversidad genética en albaricoquero como ha sido descrito previamente en mei (Li y col., 2002; Fang y col., 2006) almendro (Wu y col., 2010), melocotonero (Aranzana y col., 2012) y cerezo (Fernandez i Martí y col., 2012). Además, los marcadores tipo SNP son de gran utilidad en la identificación del pedigree de variedades como muestra Rosyara y col. (2014).

## 5.5. Conclusiones

- I. A partir de los resultados del análisis de variaciones de secuencia de nucleótidos (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) en el genoma de albaricoquero basado en la secuenciación de alto rendimiento de ARN (RNA-Seq), y combinando la técnica SNPlex para el genotipado de SNPs, fueron utilizados 101 SNPs organizados en 3 SNPlex para su aplicación en el análisis de diversidad genética y mapeo genético en albaricoquero.
- II. Este enfoque proporciona alta flexibilidad, reproducibilidad y precisión en los ensayos, lo que nos hace considerar la secuenciación de ARN como una forma eficiente para generar marcadores moleculares de alta calidad en albaricoquero, suponiendo una herramienta sólida para detectar diversidad de nucleótidos en regiones codificantes del genoma.
- III. El uso de regiones codificantes de ADN para el desarrollo de SNPs a partir del RNA-Seq representa una ventaja adicional, ya que las funciones de muchos de los genes identificados en el genoma del melocotonero son a menudo conocidas.
- IV. La media de heterocigosidad observada y el poder de discriminación con los SNPs son mucho más bajos que en el caso de los marcadores tipo SSRs. Esto se debe fundamentalmente a la naturaleza bi-alélica de los SNPs, haciendo posible 2 o 3 combinaciones alélicas por marcador.
- V. Se mostraron relaciones fenéticas y de distancia genética lógicas entre los cultivares de albaricoquero ensayados acorde con la procedencia de cada uno de ellos, siendo 'Orange Red' y 'Currot' dos de las variedades más alejadas genéticamente, mientras que las variedades tradicionales españolas 'Búlida', 'Mauricio' y 'Currot', así como también la variedad italiana 'Ninfa' tienen orígenes genéticos similares. En el otro extremo del dendrograma se encuentran los 'Mirlos' muy cercanos a 'Rojo Pasión'.



***6. Caracterización molecular mediante el uso combinado de marcadores tipo SSR y SNP, construcción de mapas de ligamiento genético y análisis de QTLs ligados a calidad del fruto***





## **6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE EL USO COMBINADO DE MARCADORES TIPO SSR Y SNP, CONSTRUCCIÓN DE MAPAS DE LIGAMIENTO GENÉTICO Y ANÁLISIS DE QTLs LIGADOS A CALIDAD DEL FRUTO**

### **6.1. Introducción y Objetivos**

En el mapeo genético debemos considerar 2 factores fundamentales, uno sería el número de marcadores a mapear en función del nivel de saturación que pretendamos obtener, y el tipo de marcadores a emplear (Ball y col., 2010), ya que dependiendo del marcador empleado podemos tener una mayor o menor precisión e información en el genotipado. Como ya mencionamos en el Capítulo 4, a lo largo de los años han sido utilizados numerosos tipos de marcadores partiendo de las isoenzimas (marcadores proteicos) hasta llegar a los marcadores de ADN entre los que destacan RFLPs, RAPDs, AFLPs, SSRs y SNPs, mostrando todos y cada uno de ellos diferentes ventajas e inconvenientes en el mapeo genético o en estudios de variabilidad y diversidad genética.

Los marcadores SSRs han sido utilizados de forma extensiva en diversos estudios de mapeo genético en varias especies de la familia *Rosaceae* dentro del género *Prunus* (Koeppel y col., 2012), así como para la detección de QTLs por diversos autores en melocotonero, almendro, cerezo y albaricoquero (Yamamoto y col., 2001; Etienne y col., 2002; Verde y col., 2002; Quilot y col., 2004; Dirlewanger y col., 1999; Dirlewanger y col., 2009; Dirlewanger y col., 2012; Cantín y col., 2010; Fan y col., 2010; Eduardo y col., 2011; Sánchez-Pérez y col., 2007; Sánchez-Pérez y col., 2012; Sooriyapathirana y col., 2010; Dondini y col., 2011; Wang y col., 2000; Zhang y col., 2010; Ruiz y col., 2010b; Socquet-Juglard y col., 2012; Pirona y col., 2013).

A partir de todos los trabajos de detección de QTLs mencionados, junto con la reciente secuenciación del genoma del melocotonero por el IPGI (International Peach Genome Initiative) (Arús y col., 2012) y la alta sintenia entre especies del género *Prunus*, se facilita la caracterización de genes responsables de importantes caracteres agronómicos (genes candidatos) y de calidad del fruto dentro de la familia *Rosaceae* (Klagges y col., 2013). Recientemente, son muchos los autores que concluyen que el estudio de genes candidatos para el desarrollo de microsatélites no es la mejor estrategia. Sin embargo, la identificación y validación de SNPs ha mejorado en los últimos años debido principalmente a la reducción de costes de secuenciación (Koeppel y col., 2012).

Los últimos avances tecnológicos en el genotipado de especies fundamentalmente con el uso de los SNPs han dado lugar a una importante disminución tanto del tiempo como de los costes del genotipado (Tavassolian y col., 2010; Ahmad y col., 2011; Dhanapal y col., 2012; Klagges y col., 2013; Martínez-García y col., 2013a; 2013b y 2013c).

En el caso de Martínez-García y col. (2013b) en las poblaciones de melocotonero Pop-DF y Pop-DG logran mapear 1037 y 738 SNPs respectivamente, localizando importantes QTLs asociados a textura harinosa y tonalidades rojizas de la pulpa en el LG 4, pardeamiento de pulpa en el LG 5, así como también susceptibilidad a daños por frío. La alta densidad de estos mapas nos da una idea del potencial que llegan a tener las plataformas de alto rendimiento para el mapeo genético de SNPs, lo que supone sin duda alguna una herramienta muy potente para la detección de QTLs y genes candidatos ligados a caracteres de calidad del fruto en cualquier especie del género *Prunus*.

Por tanto, se está produciendo un incremento en el uso de los SNPs, los cuales a pesar de su naturaleza bialélica (proporcionando menos información por locus) pueden cubrir amplias zonas del genoma, ya que la abundancia de los mismos es bastante alta pudiendo utilizar un gran número de SNPs en el mapeo (Ball y col., 2010). Las principales características de los marcadores SSRs y SNPs son definidas en la *Tabla 6.1*.

**Tabla 6.1.** Principales ventajas e inconvenientes de los marcadores tipo SSRs (*Simple sequence repeat*) y SNPs (*Single nucleotide polymorphism*) (Dhanapal y col., 2012; Ball y col., 2010).

SSRs	SNPs
a) Alta variabilidad (+ información de la meiosis)	a) Baja variabilidad (- información de la meiosis)
b) Abundancia relativa	b) Mayor abundancia (mayor nº de marcadores)
c) Ubicación poco específica	c) Ubicación muy específica en el genoma
d) Elaboración de mapas de baja densidad	d) Elaboración de mapas de alta densidad
e) Mayor tasa de error en el genotipado	e) Menor tasa de error en el genotipado

Paralelamente, surge la posibilidad de construir mapas combinando la baja densidad y alta variabilidad de los SSRs con la alta densidad y baja variabilidad de los SNPs. Entre los primeros mapas que combinan SSRs y SNPs para la detección de QTLs y genes candidatos destacan los elaborados por Dhanapal y col. (2012) que identificaron 142 genes candidatos relacionados con la susceptibilidad a daños por frío en melocotonero, y Eduardo y col. (2013) en otra población de melocotonero identifican importantes QTLs relacionados con compuestos orgánicos volátiles.

El fundamento de este enfoque es que los SSRs pueden actuar como un marco de referencia de los SNPs siendo mapeados de forma conjunta en cada grupo de ligamiento. Esto da lugar a mapas de mayor densidad y precisión, siendo más apropiados para la detección de QTLs. Las actuales y modernas plataformas de genotipado de SNPs que son casi totalmente automatizadas hacen que la tasa de error sea mucho menor que en el caso de los SSRs, aunque cabe destacar que es necesaria una mayor densidad de SNPs para tener igual o mayor precisión que en el caso de los SSRs.

Sin embargo, se ha demostrado que cuando las tasas de error en el genotipado son bajas, se pueden construir mapas muy precisos tanto con SSRs como con SNPs, por lo que en algunos casos tenemos que eliminar aquellos marcadores que muestren errores de genotipado antes de proceder con el análisis de los grupos de ligamiento (Ball y col., 2010). El sistema de genotipado de poblaciones mediante la técnica SNPlex combinando la técnica PCR y la espectrometría de masas, se trata de uno de los métodos más eficientes, ya que nos aporta precisión en el genotipado, flexibilidad en el diseño de los ensayos, mapas altamente saturados (en una única reacción de PCR se llegan a amplificar hasta 48 SNPs) y costes no muy elevados (De la Vega y col., 2005).

Así pues, el objetivo de este capítulo es combinar los marcadores tipo SSRs y SNPs para el mapeo genético de 2 poblaciones de albaricoquero, así como la identificación de QTLs y posibles genes candidatos asociados a caracteres fenológicos y de calidad del fruto.

## 6.2. Material vegetal

El material vegetal empleado para la construcción de los mapas de ligamiento genético proviene de 130 descendientes de la población 'Bergeron' × 'Currot' ('B×C') y 166 descendientes de la población 'Goldrich' × 'Currot' ('G×C'), siendo estas poblaciones previamente descritas y fenotipadas en el Capítulo 3.

## 6.3. Metodología

### 6.3.1. Toma de muestras, extracción y cuantificación del ADN

El material vegetal utilizado procede de muestras de hoja de diferentes genotipos de las poblaciones 'B×C' y 'G×C'. La toma de muestras, extracción de ADN (Doyle y Doyle, 1987) y cuantificación (NanoDrop®), se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que en el Capítulo 4, recolectando hojas de los brotes más sanos y jóvenes. En este caso las muestras fueron diluidas a 50 ng/μl para realizar un screening previo en acrilamida y a 10 ng/μl para trabajar en el secuenciador y obtener las segregaciones de cada marcador en nuestras 2 poblaciones.

### 6.3.2. Marcadores moleculares utilizados

Los mapas de las poblaciones 'B×C' y 'G×C' fueron construidos a partir de marcadores tipo SSRs y SNPs, tratando de elaborar un mapa marco mediante SSRs para posteriormente saturar los grupos de ligamiento (linkage group, LG) con SNPs.

#### 6.3.2.1. Simple sequence repeats (SSRs)

En el caso de los microsatélites, tras la extracción del ADN se llevó a cabo un screening previo utilizando el ADN de los 3 parentales. Una vez clasificados todos los marcadores que mostraban polimorfismos en uno u otro parental (*Anexos, Tabla Suplementaria 8*) fueron amplificados en todos los individuos de las poblaciones mediante la técnica PCR, siendo analizados en secuenciador para ser posteriormente mapeados en los diferentes grupos de ligamiento genético y llevar a cabo el análisis de QTLs.

### 6.3.2.2. Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

También se llevó a cabo el diseño de SNPs a partir de los transcriptomas de 'Rojo Pasión' y 'Z506-7', 2 individuos procedentes del cruzamiento entre 'Orange Red' y 'Currot'. La mayoría de los SNPs diseñados fueron validados en el genoma de 'Lito' y en ambos transcriptomas, así como también algunos de estos SNPs coincidían con el genoma del melocotonero (Genome Database Rosaceae, GDR). La evaluación de marcadores tipo SNP realizada en las poblaciones 'BxC' y 'GxC' mediante la técnica SNPlex se muestra en la *Tabla Suplementaria 9 (Anexos)*.

Mediante el uso de los SNPs para el mapeo en estas poblaciones de albaricoquero, pretendemos llevar a cabo mapas de ligamiento genético más saturados y al mismo tiempo identificar QTLs relacionados con genes concretos. La metodología en el diseño de SNPs es descrita en el Capítulo 5 y la técnica SNPlex fue realizada mediante tecnología Mass Array (Jurinke y col., 2002) usando la plataforma Sequenom (Gabriel y col., 2009).

### 6.3.3. Método de amplificación del ADN

El método de amplificación de los fragmentos de ADN fue mediante PCR (*polymerase chain reaction*), llevándose a cabo 3 tipos de PCR diferente (*Tabla 6.2*). Una PCR convencional de 35 ciclos de amplificación, otra PCR que comprende una primera fase de 20 ciclos específicos del marcador a amplificar (PCR convencional) y una segunda fase de 20 ciclos en la que actúan cebadores genéricos como tagF (marcado con los fluorocromos VIC, FAM, NED o PET) y tagR (sin marcar).

El tercer tipo de PCR (SNPlex) es una reacción múltiple de SNPs, llevada a cabo en la plataforma SEQUENOM MassARRAY que consiste en una reacción de PCR locus específica inicial de hasta 48 SNPs de forma simultánea, seguida por una reacción de extensión de una sola base mediante el uso de dideoxynucleótidos (con el grupo 3' hidroxilo ausente) como terminadores y utilizando cebadores de oligonucleótidos que hibridan inmediatamente aguas arriba del polimorfismo de interés (Gabriel y col., 2009).

**Tabla 6.2.** Protocolos empleados para PCR convencional y PCR marcada con fluorescencia (izquierda). Condiciones de amplificación de ADN para PCR convencional y PCR marcada con fluorescencia (derecha). \*tag marcado con fluorescencia (VIC, FAM, NED y PET).

Reactivos	PCR convencional	PCR-tail	Tipo de PCR	Fases	T °C	Tiempo	Ciclos
Agua	9,05 µl	4,95 µl	PCR convencional	Desnaturalización	95	2'	35
Buffer 10x	1,7 µl	1 µl		Desnaturalización	95	30''	
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,8 µl	0,6 µl		Annealing	51-55	30''	
dNTPs (10 mM)	0,3 µl	0,2 µl		Extensión	72	2'	
Primer F+R (10 mM)	1 µl	1 µl		Extensión	72	5'	
tagF (10 mM)*	-	0,077 µl	PCR-tail	Conservación	4	∞	20
tagR (10 mM)	-	0,077 µl		Desnaturalización	95	10'	
Taq polymerasa	0,15 µl	0,1 µl		Desnaturalización	92	30''	
Total	15 µl	10 µl		Annealing	51-55	90''	
				Extensión	72	60''	
				Desnaturalización	92	15''	
				Annealing	45	30''	
			Extensión	72	60''		
			Extensión	72	10'	40	
			Conservación	4	∞		

### 6.3.4. Análisis de los productos de PCR

Los fragmentos de ADN obtenidos en la amplificación fueron analizados mediante tres técnicas diferentes que detallamos a continuación.

#### 6.3.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Este tipo de electroforesis fue realizada en geles de poliacrilamida al 5 % con un marcador de tamaño 100 pb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Una vez finalizada la electroforesis se utilizaron diferentes soluciones para el revelado final de los geles. Estos se sumergían en una solución de ácido acético al 10 %, para posteriormente teñirlos con nitrato de plata y finalmente en una solución de carbonato de sodio para su revelado (Beidler y col., 1982; Bassman y col., 1991; Sanguinetti y col., 1994). Por último se toma la imagen mediante un escáner (Figura 6.1).



**Figura 6.1.** Visualización de fragmentos de ADN en geles de poliacrilamida.

### 6.3.4.2. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI Prism 3730 de 96 capilares (Hospital de Sant Orsola, Bolonia, Italia) (Figura 6.2) mezclando las reacciones de PCR marcadas previamente con los cuatro fluorocromos (VIC, FAM, NED y PET) en la proporción 1:1:1:2, diluyendo 4 µl del producto final con 5,8 µl de formamida y 0,2 µl de Liz (Gen Scan 500 LIZ-250) obteniendo un volumen final de 10 µl de producto para analizar en el secuenciador. Los fragmentos fueron evaluados usando el software Peak Scanner versión 1.0. El set de microsatélites fue organizado en grupos de marcadores con la misma temperatura de annealing y por diferencia de tamaño para intentar hacer lecturas múltiples de hasta 8 marcadores.



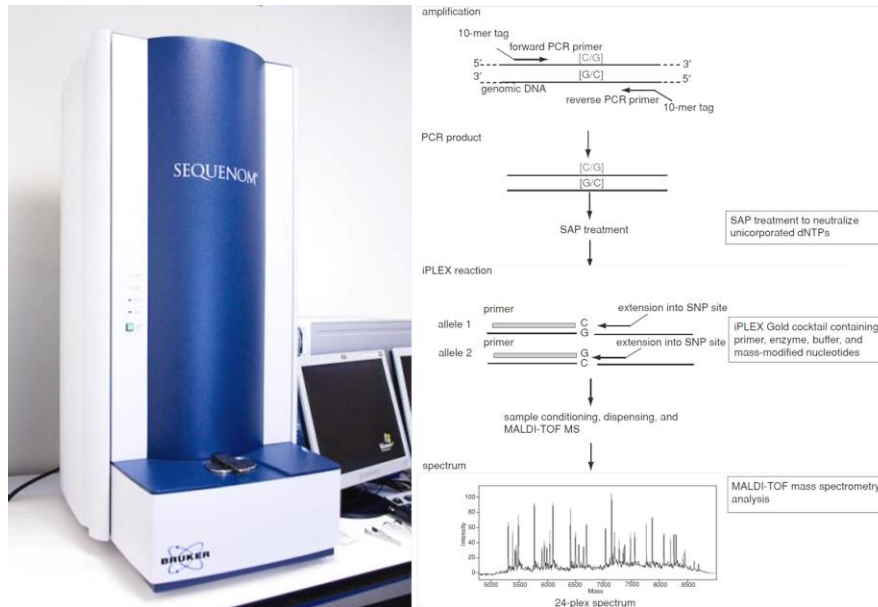
**Figura 6.2.** Secuenciador automático ABI Prism-3730 de 96 capilares y visualización de fragmentos de ADN en el software Peak Scanner 1.0.

### 6.3.4.3. Espectrometría de masas

La lectura y detección de los polimorfismos amplificados en la plataforma del SEQUENOM (Figura 6.3) fue llevada a cabo mediante la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF), la cual identifica el SNP por diferencia de masas. Se trata de una técnica de análisis cualitativo a partir de la cual podemos distinguir polimorfismos de una sola base (A, T, C y G) por diferencia de masas en las muestras previamente amplificadas (Gabriel y col., 2009).

Debemos de tener en cuenta que la espectrometría de masas tiene muy poco en común con las técnicas clásicas de espectrofotometría, ya que no se trata de un método espectroscópico. En la espectrometría de masas no se utiliza ningún tipo de radiación, por lo que básicamente no puede ser considerada como una técnica espectroscópica.

A diferencia de las espectroscopías clásicas, en la espectrometría de masas durante la obtención del espectro tienen lugar procesos químicos, con lo que la muestra utilizada se destruye y no puede recuperarse; este hecho no es un inconveniente grave, ya que la cantidad de muestra necesaria para la obtención de un espectro de masas es pequeñísima (del orden del  $\mu\text{g}$ ).



**Figura 6.3.** Plataforma Sequenom IPLEX Mass Array utilizada y esquema resumen de la reacción de extensión IPLEX (Gabriel y col., 2009).

#### 6.3.4.4. Análisis estadístico

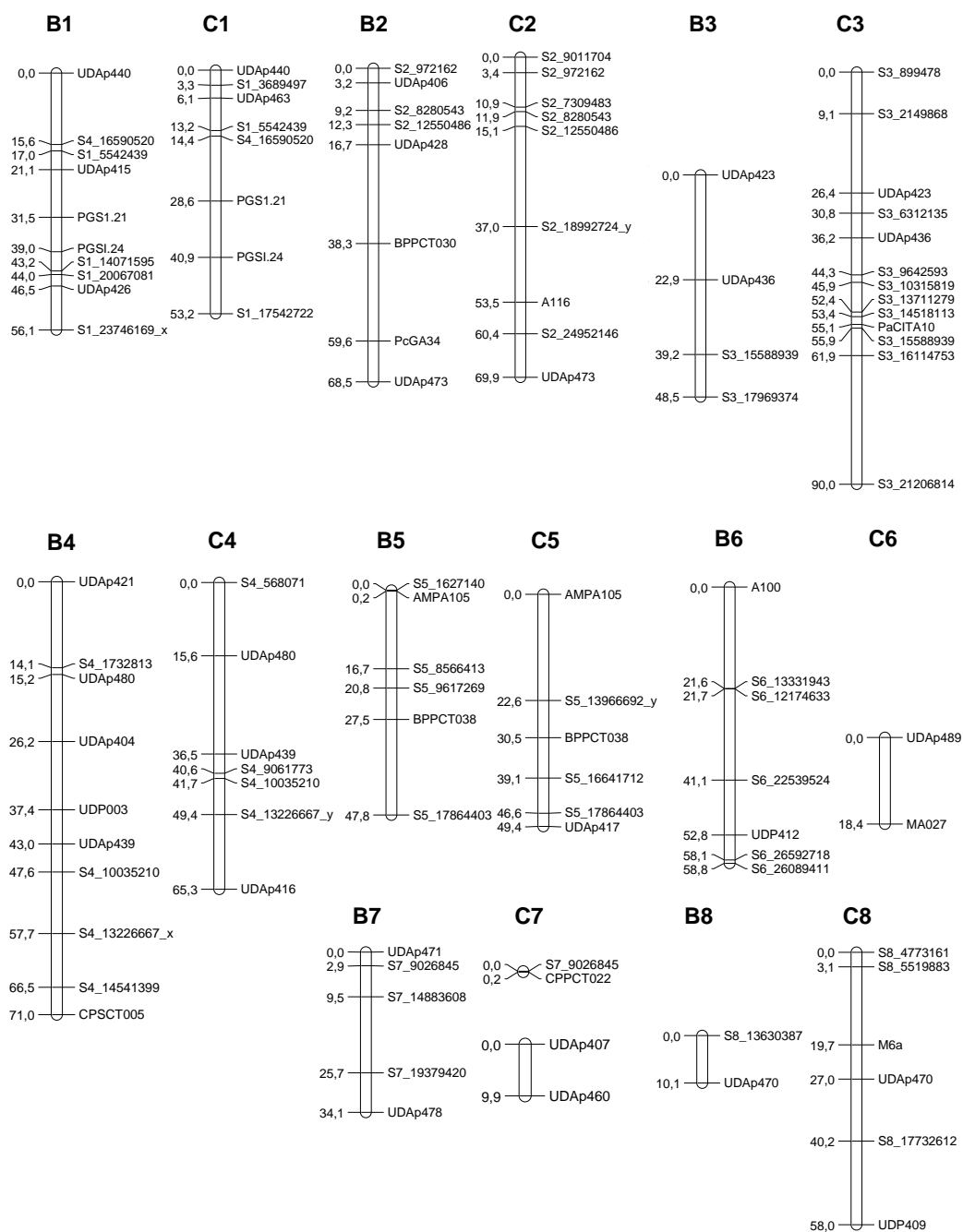
Los mapas de ligamiento genético y el análisis de QTLs fueron realizados mediante los programas bioinformáticos JoinMap.3 (Van Oijen, 2006) y MAPQTL 4.0 respectivamente. Los mapas se construyeron utilizando un LOD mínimo de 3 para la construcción de los grupos de ligamiento con una frecuencia de recombinación de 0,4. El análisis de QTLs fue llevado a cabo mediante 'Interval-Mapping' y 'Kruskal-Wallis' al igual que en el Capítulo 4. Los mapas de ligamiento genético junto con los QTLs fueron editados con el programa MapChart 2.1 (Voorrips, 2002) y el software Harry Plotter fue utilizado para la realización de las figuras de los grupos de ligamiento con QTLs más consistentes.



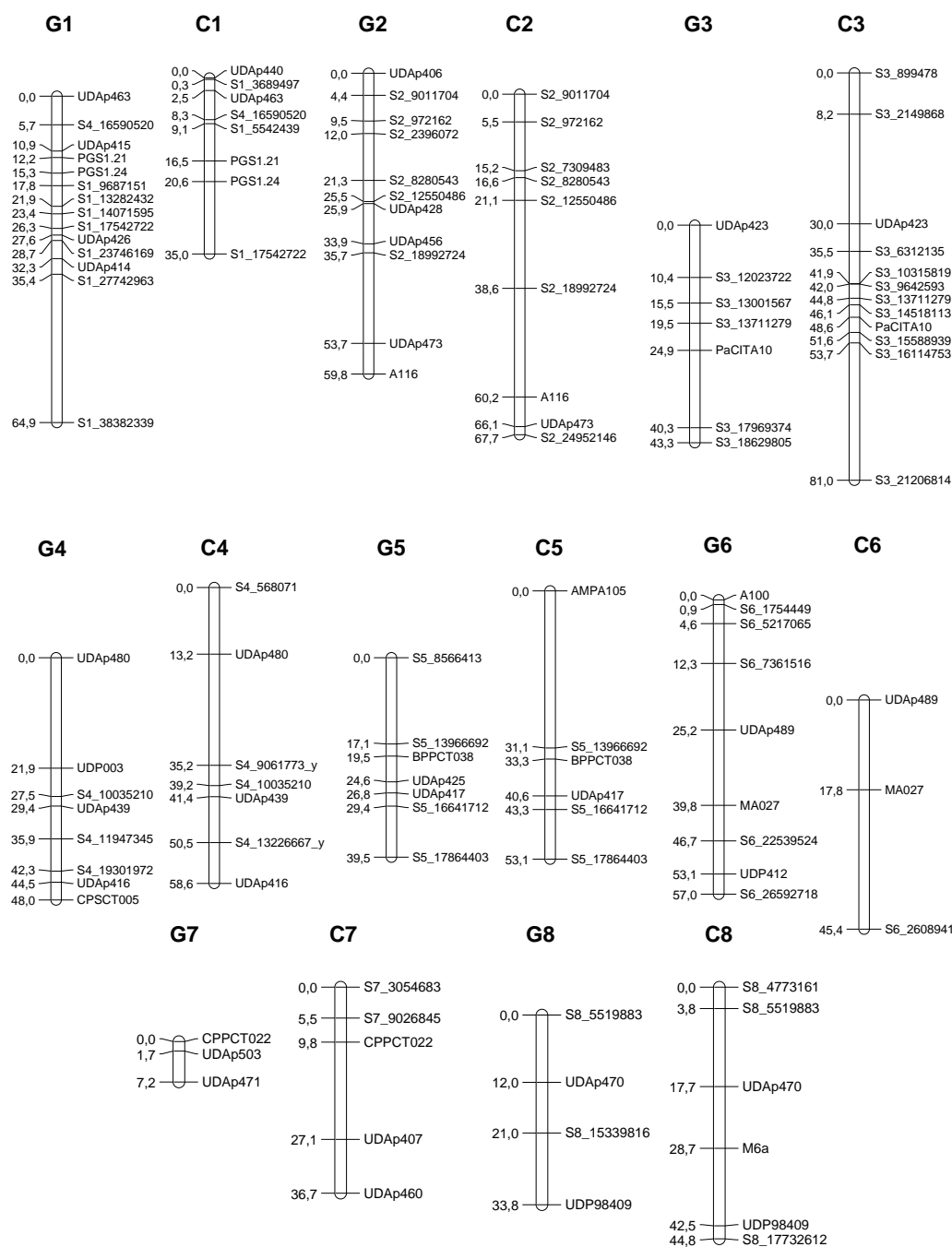
## 6.4. Resultados y discusión

### 6.4.1. Mapas de ligamiento genético

Los mapas de ligamiento genético de las poblaciones ‘Bergeron’ × ‘Currot’ (Figura 6.4) y ‘Goldrich’ × ‘Currot’ (Figura 6.5), fueron construidos utilizando 130 y 166 descendientes de cada población respectivamente.



**Figura 6.4.** Mapas de ligamiento genético construidos a partir de 130 descendientes de la familia ‘B×C’ utilizando marcadores tipo SSR (Simple sequence repeat) y SNPs (Single nucleotide polymorphism).



**Figura 6.5.** Mapas de ligamiento genético construidos a partir de 166 descendientes de la familia 'G×C' utilizando marcadores tipo SSR (Simple sequence repeat) y SNPs (Single nucleotide polymorphism).

El diseño de los SNPs se realizó a partir de los transcriptomas de 'Rojo Pasión' y 'Z506-7' procedentes de la familia 'Orange Red' × 'Currot' por tener un parental común en nuestras poblaciones, mientras que los SSRs mapeados fueron descritos por otros autores en diferentes especies del género *Prunus*.

En la construcción de los mapas de ligamiento se utilizaron un total de 193 marcadores moleculares, de los cuales 57 eran SSRs y 136 SNPs. Un total de 101 SNPs fueron finalmente organizados en 3 SNPLex a través de la plataforma SEQUENOM. En la población 'Bergeron' × 'Currot' se mapearon un total de 87 marcadores diferentes (37 SSRs y 50 SNPs) (Figura 6.4), mientras que en la población 'Goldrich' × 'Currot' se mapearon 89 marcadores (35 SSRs y 54 SNPs) (Figuras 6.5) (Anexos, Tablas suplementaria 8 y 9).

En los mapas de ligamiento genético obtenidos se representan los 8 grupos de ligamiento (LG) descritos en albaricoquero, cubriendo una extensión de 394,9 y 414,3 cM en 'Bergeron' y 'Currot' respectivamente, mientras que en 'Goldrich' y 'Currot' de la segunda población fue de 353,5 y 422,3 cM respectivamente. Por tanto, en la población 'B×C' se da una distancia media entre marcadores de 7,59 cM para 'Bergeron' y 7,53 cM en 'Currot', mientras que en la población 'G×C' fue de 5,6 cM en 'Goldrich' y 7,5 cM en 'Currot'.

En cuanto al posicionamiento de los marcadores en los mapas de ambas poblaciones, se observan en algunos casos pequeñas variaciones en la posición de los mismos, aunque en general el orden de los SSRs se corresponde al descrito por otros autores y la mayoría de los SNPs mapeados se ubican en las posiciones en las que han sido diseñados. Destacamos que el marcador UDAp423 que es mapeado al principio del LG 3 es ubicado por otros autores en el LG 5 (Campoy y col., 2011b). También cabe destacar que el S4\_16590520 que debería aparecer al final del LG 4 es mapeado al principio del LG 1, así como el S2\_9011704 mapea al principio del LG 2 aguas arriba del S2\_972162, dándose esta situación en ambas poblaciones. Por tanto, podemos deducir que en algunos casos ciertas zonas de algunos cromosomas son intercambiadas mediante recombinación genética, lo que justifica estas inversiones o cambios de grupo de ligamiento.

Debemos resaltar también, que al tener un parental común ('Currot'), los mapas obtenidos para el mismo son casi idénticos, aunque se dan algunas inversiones debidas probablemente a la presencia de pocos marcadores en ciertas zonas de los LG 5, 7 y 8 o probablemente debido a la influencia de los parentales no comunes 'Bergeron' y 'Goldrich'. Además, debemos indicar que en un principio se pretendía que los 'gaps' entre marcadores no fueran superiores a 15 cM, ya que los SNPs fueron diseñados a distancias no superiores a 2 Mpb. Sin embargo, en algunas zonas de ciertos cromosomas se dan mayores distancias de 15 cM entre marcadores.

Esto se debió a que de los 99 SNPs evaluados 62 fueron polimórficos y pudieron ser mapeados, el resto fueron monomórficos o a pesar de mostrar el polimorfismo no mapearon. Por tanto, los 37 SNPs no mapeados dejaron algunas distancias entre marcadores más grandes de lo previsto. Esto se debió a que el diseño de los SNPs se basó en secuencias de ADNc que no provenían directamente de los parentales de nuestras poblaciones, si no de genotipos emparentados. Sin embargo, este resultado muestra que un 62 % de los SNPs utilizados fueron mapeados con éxito, lo que indica un porcentaje bastante elevado a pesar de haber sido diseñados a partir de secuencias diferentes a las de nuestros parentales.

#### **6.4.2. Detección, localización de QTLs e identificación de genes candidatos**

##### **6.4.2.1. Fecha de floración**

La fecha de floración como ya hemos visto es un parámetro de expresión compleja, puesto que las variaciones anuales de acumulación del frío invernal influyen en la expresión de este carácter. Debemos destacar que QTLs de floración han sido detectados por otros autores prácticamente en todos los grupos de ligamiento de diferentes especies del género *Prunus*, en melocotonero en los LG 1, 5 y 6 (Quilot y col., 2004), LG 2 (Dirlewanger y col., 1999), LG 4 (Quarta y col., 2000), LG 7 en melocotonero y almendro (Fan y col., 2010; Sánchez-Pérez y col., 2012), LG 5 en albaricoquero (Campoy y col., 2011b) o en cerezo en los LG 1 y 2 (Wang y col., 2000). En nuestro estudio, diferentes QTLs de floración han sido detectados en los LG 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 8 de las familias evaluadas. En el caso de la población 'BxC' se identificaron distintos QTLs en los LG 2, 3, 5, 7 y 8, considerando los más significativos en el LG 7 de ambos parentales (Tabla 6.3).

En el mapa del parental ‘Bergeron’, mediante análisis ‘Interval-Mapping’, destacamos que los valores de LOD no llegan en la mayoría de los casos a la significación de 0,05, pero en el análisis no paramétrico (Kruskal-Wallis) los marcadores S7\_14883608 y S7\_19379420 (21-27 % expl. en 2012) son altamente significativos en ambos años, mientras que en el mapa del parental ‘Currot’ un QTL similar fue detectado a la altura de S7\_9026845 y CPPCT022 (18 % expl. en 2012) aunque este último no es significativo mediante análisis Kruskal-Wallis (Tabla 6.3). Este mismo marcador es también relacionado con floración por Fan y col. (2010).

Además, en el mapa de ‘Currot’ aparecen QTLs al final del LG 2 en torno a los marcadores S2\_18992724 (18-23 % expl.) y S2\_24952146 (12-15 % expl.) siendo consistentes en ambos años. También se observa cierta influencia sobre floración en el LG 8 de ‘Currot’ en torno al SNP S8\_17732612 (32,1 % expl.) en el año 2012 (Tabla 6.3).

**Tabla 6.3.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de fecha de floración mediante análisis ‘Interval-mapping’ (LOD) y ‘Kruskal-Wallis’ (KW) de los parentales ‘Bergeron’ (B) y ‘Currot’ (C) para los años 2012 y 2013.

<b>‘Bergeron’ × ‘Currot’</b>										
<b>Fecha de floración</b>										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
B3	UDAp423	0,0	13,564****	2,64	3,1	10	14,264****	2,85	2,6	10,4
B5	S5_8566413	16,7	1,279	3,60	3,4	25,6	0,667	1,95	2,8	14,1
B7	UDAp471	0,0	11,597*****	4,89	6	24,7	3,765*	2,30	3,5	8,2
B7	S7_9026845	2,9	11,750****	3,08	6	11,1	0,662	1,68	3,5	6,4
B7	S7_14883608	9,5	19,083*****	5,24	6	27,4	5,421**	2,95	3,5	12,5
B7	S7_19379420	25,7	21,179*****	5,16	6	21,4	11,841*****	3,49	3,5	12,7
B7	UDAp478	34,1	10,176****	4,50	6	24,1	6,265**	1,81	3,5	10,3
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C2	S2_18992724_y	37	16,685*****	3,31	5,1	18,5	12,716*****	3,25	2,9	23,5
C2	S2_24952146	60,4	14,784*****	3,56	5,1	12,5	7,042***	3,76	2,9	15,4
C2	UDAp473	69,9	11,912***	1,69	5,1	6,2	10,632**	2,17	2,9	8,1
C3	UDAp423	26,4	13,564****	2,22	5,6	8,1	14,264****	2,64	3,3	9,6
C3	S3_6312135	30,8	8,384****	2,58	5,6	9,6	6,050**	2,68	3,3	10,1
C5	BPPCT038	30,5	10,421***	2,03	2,7	10	4,810*	1,61	2,5	6,7
C7	S7_9026845	0,0	11,750****	5,52	2,5	18,9	0,662	2,14	2,5	8,6
C7	CPPCT022	0,2	1,534	5,52	2,5	18,9	0,195	2,14	2,5	8,6
C8	S8_17732612	40,2	11,357***	4,49	5,4	32,1	5,962**	1,96	2,8	9,3

Los asteriscos representan el nivel de significación para el análisis KW (\*0,1, \*\*0,05, \*\*\*0,01, \*\*\*\*0,005, \*\*\*\*\*0,001, \*\*\*\*0,0005, \*\*\*\*\*0,0001). % expl se refiere al porcentaje de explicación de la variación fenotípica y LODmin es el valor de referencia para un nivel de significación de 0,05 para los años 2012 y 2013.

En cuanto a la población ‘Goldrich’ × ‘Currot’, diferentes QTLs fueron detectados en los LG 1, 2 y 4. En el caso del mapa de ‘Goldrich’ se identificó un QTL de floración al final del LG 1 (S1\_38382339) con un LOD máximo de 5,43 en 2013 y un porcentaje de explicación de la variación del carácter del 26 % en 2012 y del 31 % en 2013, siendo igualmente significativo mediante análisis ‘Kruskal-Wallis’. Sin embargo, debemos destacar que los QTLs más importantes para este parental, aparecen en el LG 4 en torno a los SNPs S4\_11947345 (25-26 % expl.) y S4\_19301972 (20-23 % expl.) con valores de LOD entre 8 y 10, así como los marcadores UDAp416 y CPSCT005 para el año 2012 (Tabla 6.4).

En el caso del mapa de ‘Currot’ también se detectaron QTLs en los LG 1 y 2, si bien no llegan al nivel de significación de 0,05 (‘Interval-mapping’). Destacamos sobre todo los QTLs del LG 4 en torno a los SNPs S4\_9061773 (30-35 % expl.) y S4\_10035210 (17-19 % expl.) aunque no llegan a ser significativos mediante Kruskal-Wallis. Sin embargo, el UDAp416 (30-35 % expl.) es significativo en ambos estadísticos y años (Tabla 6.4).

**Tabla 6.4.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de fecha de floración mediante análisis ‘Interval-mapping’ (LOD) y Kruskal-Wallis (KW) de los parentales ‘Goldrich’ (G) y ‘Currot’ (C) para los años 2012 y 2013.

‘Goldrich’ × ‘Currot’										
Fecha de floración										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
G1	S1_38382339	64,9	4,305**	3,78	5	26,0	15,863*****	5,43	3,1	31,1
G2	UDAp428	25,9	8,273****	1,82	3,8	5,9	6,391**	1,61	3	4,7
G2	UDAp456	33,9	5,962**	2,65	3,8	8,6	5,846**	2,12	3	7
G2	S2_18992724	35,7	12,712****	3,29	3,8	9,1	11,60****	2,61	3	7,1
G2	AMPA116	59,8	14,466****	2,35	3,8	7,6	9,965**	2,48	3	8,2
G4	UDP003	21,9	7,907****	1,32	2,8	4,1	9,930****	2,25	2,9	8,3
G4	UDAp439	29,4	14,378****	3,07	2,8	8,9	15,584****	3,53	2,9	10,3
G4	S4_11947345	35,9	32,842*****	10,41	2,8	26,9	37,848*****	10,31	2,9	25,4
G4	S4_19301972	42,2	30,691*****	8,91	2,8	22,9	31,49*****	8,01	2,9	20,4
G4	UDAp416	44,5	28,335*****	3,55	2,8	10,1	22,337*****	1,64	2,9	4,7
G4	CPSCT005	48,0	22,025*****	4,02	2,8	12,3	17,531*****	2,04	2,9	6,1
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C1	S1_3689497	0,3	10,721****	2,09	3,7	5,8	5,317**	1,26	2,6	3,5
C1	S4_16590520	8,3	13,405****	2,77	3,7	7,7	6,447**	1,66	2,6	4,7
C1	S1_5542439	9,1	8,577****	2,93	3,7	12,5	5,803**	1,81	2,6	7,8
C2	S2_18992724	38,6	12,712****	2,97	5,4	8,2	11,060****	3,58	2,7	14,2
C2	AMPA116	60,1	14,466****	2,48	5,4	8,4	9,965**	2,33	2,7	7,8
C4	S4_9061773_y	35,2	0,872	6,67	2,7	30,5	0,245	6,74	2,9	35,5
C4	S4_10035210	39,2	4,105	4,75	2,7	17,9	10,209***	5,03	2,9	18,9
C4	UDAp439	41,4	14,378****	2,13	2,7	5,9	15,584****	1,64	2,9	4,7
C4	UDAp416	58,6	28,335*****	5,51	2,7	16,4	22,337*****	3,15	2,9	9,9

Como podemos ver los parentales ‘Goldrich’ y ‘Currot’ coinciden con los QTLs ligados a fecha de floración en las mismas zonas del cromosoma 4, es decir, en la zona intermedia y final del mismo (Tabla 6.4). Los posibles genes candidatos relacionados con este carácter son descritos en la Tabla 6.22, indicando su posición y función en el genoma del melocotonero.

### 6.4.2.2. Fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto

Los caracteres fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto son estudiados de forma conjunta, ya que ambos se encuentran muy relacionados entre sí, siendo fecha de floración el carácter que más los condiciona, a su vez influenciada por las fluctuaciones inter-anales en cuanto a acumulación de horas frío. En este caso, para estos caracteres han sido localizados diferentes QTLs en los grupos LG 1, 3 y 4, considerando la influencia del cromosoma 4 como la más importante, ya que los QTLs detectados son muy significativos en todos los parentales y años (Tabla 6.5).

**Tabla 6.5.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y Kruskal-Wallis (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

'Bergeron' × 'Currot'										
Fecha de maduración										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
B3	UDAp423	0	18,927*****	4,08	3,10	14,2	16,797*****	3,76	2,7	13,2
B4	UDAp480	15,2	19,155*****	3,56	3,5	13,7	23,669*****	4,98	3	19,0
B4	UDAp439	43,0	30,268*****	8,78	3,5	29,1	30,251*****	8,33	3	27,8
B4	S4_10035210	47,6	19,209*****	9,57	3,5	30,2	12,507****	9,12	3	28,7
B4	S4_13226667_x	57,7	0,049	9,45	3,5	46,1	0,202	8,87	3	38,8
B4	S4_14541399	66,5	3,797*	9,69	3,5	52,4	7,807***	9,62	3	45,9
B4	CP SCT005	71,0	2,284	9,62	3,5	58,7	5,910**	8,26	3	45,8
Ciclo de desarrollo del fruto										
B1	PGS1.21	31,5	8,87**	3,79	2,80	13	12,136***	2,93	2,9	10,1
B3	UDAp423	0	11,732***	2,45	2,70	8,6	7,968**	1,76	2,8	6,2
B4	UDAp480	15,2	22,906*****	4,80	3	17,6	19,738*****	3,50	2,9	13,0
B4	UDAp439	43,0	45,201*****	12,77	3	38,1	31,148*****	7,86	2,9	26,0
B4	S4_10035210	47,6	26,275*****	14,22	3	41,0	17,895*****	9,10	2,9	29,1
B4	S4_13226667_x	57,7	0,001	13,63	3	54,0	0,117	10,28	2,9	48,0
B4	S4_14541399	66,5	3,850**	13,25	3	57,5	0,266	10,58	2,9	54,0
B4	CP SCT005	71,0	2,269	13,26	3	59,5	0,342	10,11	2,9	54,9
Fecha de maduración										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C1	S1_3689497	3,3	6,424**	4,06	3,5	30,7	5,511**	2,23	2,8	16,9
C1	UDAp463	6,1	5,170**	5,39	3,5	36,4	4,348**	3,39	2,8	24,5
C1	S1_5542439	13,2	2,131	4,25	3,5	20,9	1,738	4,21	2,8	21,4
C3	UDAp423	26,4	18,927*****	3,61	3,8	12,1	16,797*****	3,20	3	10,8
C3	S3_6312135	30,8	10,199****	3,50	3,8	12,9	12,472*****	3,87	3	13,5
C4	UDAp480	15,6	19,155*****	2,68	3,4	10,4	23,669*****	4,16	2,8	16,4
C4	UDAp439	36,5	30,268*****	10,10	3,4	31,1	30,251*****	9,48	2,8	29,5
C4	S4_9061773	40,6	24,551*****	11,73	3,4	34,6	20,952*****	10,59	2,8	32
C4	S4_10035210	41,7	19,209*****	10,50	3,4	31,6	12,507****	9,30	2,8	28,6
C4	S4_13226667_y	49,4	46,603*****	11,77	3,4	34,5	36,563*****	9,24	2,8	28,7
C4	UDAp416	65,3	27,724*****	8,24	3,4	27,7	28,321*****	8,01	2,8	27
Ciclo de desarrollo del fruto										
C1	S1_5542439	13,2	3,924	4,82	2,8	22,6	2,988	3,26	2,9	15,2
C1	S4_16590520	14,4	3,101	4,56	2,8	20,5	2,915	2,83	2,9	12,8
C1	PGS1.21	28,6	13,780****	3,63	2,8	12,8	12,136***	2,84	2,9	9,9
C3	UDAp423	26,4	11,732**	2,36	3,1	8,1	7,968**	1,74	3,1	6,1
C4	UDAp480	15,6	22,906*****	3,66	3	12,8	19,738*****	3,30	3	11,5
C4	UDAp439	36,5	45,201*****	13,81	3	39,8	31,148*****	7,79	3	25
C4	S4_9061773	40,6	37,152*****	16,32	3	45,3	19,579*****	9,80	3	31,9
C4	S4_10035210	41,7	26,675*****	16,05	3	44,9	17,895*****	10,84	3	35
C4	S4_13226667_y	49,4	56,153*****	14,52	3	40,7	27,526*****	6,39	3	20,3
C4	UDAp416	65,3	32,293*****	9,54	3	30,9	17,638*****	4,06	3	14,6

Debemos destacar también que son muchos los autores que han obtenido QTLs significativos en el grupo de ligamiento 4 dentro del género *Prunus*. En melocotonero destacan el trabajo de Dirlewanger y col. (1999 y 2012), Etienne y col. (2002) que también relacionan el ciclo de desarrollo del fruto con la maduración, Quilot y col. (2004), Cantín y col. (2010) o Eduardo y col. (2011) que obtienen valores de LOD por encima de 120 con un porcentaje de explicación de la variación del carácter del 97 % en 2 años. En almendro (Sánchez-Pérez y col., 2007) y cerezo (Wang y col., 2000) también localizan QTLs en el LG 4. En albaricoquero son muy escasos los estudios al respecto, destacando los QTLs ligados a fecha de maduración identificados por Ruiz y col (2010b) en los LG 1, 2, 4 y 6. Los resultados mostrados en el Capítulo 4 relativos a la población 'Z701-1' × 'Palsteyn' también destacaban los QTLs de maduración y ciclo de desarrollo del fruto localizados en este mismo grupo entre los marcadores UDAp439 y UDA021 durante tres años consecutivos (*Tabla 4.6, Figura 4.4*).

En la población 'B×C' son muchos los marcadores del LG 4 implicados en ambos caracteres, pero destacamos fundamentalmente en el caso de 'Bergeron' el UDAp439 y el S4\_10035210 con un LOD que oscila entre 8 y 10, y un porcentaje de explicación de la variación del carácter en torno al 30 % para fecha de maduración, siendo la influencia de estos marcadores más grande en el caso del ciclo desarrollo del fruto con valores de LOD entre 12 y 14 y un porcentaje de la variación del carácter entre el 38 y 41 % en ambos años. Destacamos también los marcadores S4\_14541399 y CPSCT005 situados al final del LG 4 de 'Bergeron', los cuales se encuentran igualmente implicados en el ciclo de desarrollo del fruto y fecha de maduración, explicando entre el 52,4 y el 58,7 % de la variación de este carácter en 2012, aunque éstos son sólo significativos mediante 'interval-mapping' (*Tabla 6.5*). En el LG 3 destacamos la influencia del marcador UDAp423 en cuanto a fecha de maduración (*Tabla 6.5*), siendo este mismo marcador relacionado por Campoy y col. (2011b) con fecha de floración para el parental 'Z506-07' ('Orange Red' × 'Currot').

En el parental 'Currot', el marcador S4\_9061773 (LOD = 10-12 y 32-35 % expl.) y el S4\_13226667\_y (LOD = 9-12 y 28-35 % expl.) parecen los más significativos para fecha de maduración junto a los ya mencionados UDAp439 y S4\_10035210 en ambos años. Estos mismos marcadores como ya ocurría en el caso de 'Bergeron' muestran incluso una mayor influencia en el ciclo de desarrollo del fruto con valores de LOD en torno a 16 y un porcentaje de explicación de la variación del carácter entre el 35 y el 45 % para el S4\_9061773 y S4\_10035210 (*Tabla 6.5*).



Con respecto a la población 'G×C' en cuanto a fecha de maduración, en el parental 'Goldrich' encontramos los mayores picos de LOD en el LG 4 torno al S4\_11947345 (20,62 y 23,17 en 2012 y 2013 respectivamente) explicando un 50 % de la variabilidad de este carácter en ambos años. También se encuentran muy implicados los marcadores UDAp439 y el S4\_10035210 ya mencionados anteriormente. En esta población los valores de LOD para fecha maduración son más elevados que los de ciclo desarrollo del fruto, probablemente debido a que en la población 'B×C' hay una mayor influencia de periodos de desarrollo del fruto más largos. En el caso de 'Currot', S4\_9061773, S4\_10035210 y UDAp439 son los marcadores más ligados a fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto con valores máximos de LOD, en torno a 18 y 19 para el SNP S4\_9061773 (54,4 % expl.) (Tabla 6.6).

**Tabla 6.6.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y Kruskal-Wallis (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

'Goldrich' × 'Currot'										
Fecha de maduración										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
G1	S1_38382339	64,9	3,263*	3,38	3,4	58,5	7,365***	3,97	2,9	32,4
G4	UDP003	21,9	22,605*****	17,30	2,9	51,8	23,592*****	17,95	2,8	57,2
G4	S4_10035210	27,5	61,476*****	18,12	2,9	39,7	67,635*****	18,60	2,8	40,8
G4	UDAp439	29,4	47,490*****	14,48	2,9	35,2	48,76*****	14,07	2,8	34,3
G4	S4_11947345	35,9	41,387*****	20,62	2,9	49,4	62,474*****	23,17	2,8	51,0
G4	S4_19301972	42,2	37,019*****	17,76	2,9	43,5	51,760*****	17,36	2,8	40,6
G4	UDAp416	44,5	48,789*****	13,36	2,9	33,9	44,120*****	10,19	2,8	27,6
G4	CPST005	48,0	25,819*****	13,26	2,9	36,7	33,682*****	11,11	2,8	32,1
Ciclo de desarrollo del fruto										
G3	S3_17969374	40,3	11,249*****	2,54	2,5	6,9	6,446**	2,65	2,5	11,2
G3	S3_18629805	43,3	12,263*****	2,83	2,5	7,9	7,140***	2,51	2,5	10,6
G4	UDP003	21,9	13,929*****	12,99	2,9	42,9	2,332	4,05	2,8	16,6
G4	S4_10035210	27,5	52,316*****	14,33	2,9	33,5	23,500*****	5,67	2,8	14,8
G4	UDAp439	29,4	45,149*****	13,56	2,9	32,8	33,106*****	7,61	2,8	20,3
G4	S4_11947345	35,9	17,340*****	15,61	2,9	41,9	0,049	7,28	2,8	23,3
G4	S4_19301972	42,2	15,917*****	13,46	2,9	36,3	0,176	6,45	2,8	19,9
G4	UDAp416	44,5	37,846*****	11,26	2,9	29,4	24,89*****	5,19	2,8	15,3
G4	CPST005	48,0	10,017****	11,37	2,9	32,7	0,844	5,44	2,8	17,9
Fecha de maduración										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C4	S4_9061773_y	35,2	36,659*****	17,81	3,1	49,9	28,378*****	19,28	2,8	54,4
C4	S4_10035210	39,2	61,476*****	18,16	3,1	39,8	67,235*****	19,08	2,8	42,0
C4	UDAp439	41,4	47,490*****	14,00	3,1	33,5	48,076*****	11,39	2,8	29,2
C4	S4_13226667_y	50,5	47,120*****	15,82	3,1	39,4	38,044*****	14,34	2,8	38,3
C4	UDAp416	58,6	48,789*****	13,58	3,1	35,8	44,012*****	10,79	2,8	30,2
Ciclo de desarrollo del fruto										
C4	S4_9061773_y	35,2	45,078*****	15,73	3	42,6	38,337*****	8,75	2,6	22,2
C4	S4_10035210	39,2	52,316*****	15,72	3	37,6	23,500*****	7,60	2,6	21,4
C4	UDAp439	41,4	45,149*****	14,94	3	34,6	33,106*****	10,69	2,6	26,2
C4	S4_13226667_y	50,5	55,091*****	14,98	3	35,2	32,880*****	9,02	2,6	22,6
C4	UDAp416	58,6	37,846*****	11,94	3	30,2	24,089*****	7,56	2,6	20,0

En el parental ‘Goldrich’ observamos una pequeña influencia en cuanto a fecha de maduración en el LG 1, así como al final del LG 3 para el ciclo de desarrollo del fruto (Tabla 6.6). Sin embargo, en ‘Currot’ no aparecen estos mismos QTLs, lo que indica un modo distinto de transmisión de sus caracteres. Por tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos debemos destacar la elevada influencia del cromosoma 4 en fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto en todos los parentales y todos los años, lo que indica la presencia de genes mayores entre las posiciones S4\_9061773, S4\_10035210 y S4\_11947345 (Tabla 6.5 y 6.6), tal y como indica Pirona y col. (2013) en 2 poblaciones de melocotonero.

Como hemos visto, resulta complicado localizar una región más específica relacionada con fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto, por ello hemos decidido integrar el LG 4 para los dos parentales de ambas poblaciones (Tablas 6.7 y 6.8; Figuras 6.6 y 6.7), tratando así de definir una región más concreta del genoma del albaricoquero asociada a estos caracteres. En el mapa integrado del LG 4 de la población ‘BxC’ son mapeados 14 marcadores que cubren una extensión de 71 cM (Tabla 6.7). Los mayores valores de LOD para ambos caracteres se sitúan en torno al S4\_9061773, S4\_10035210 y S4\_13226667, abarcando alrededor de 9 cM (Tabla 6.7, Figura 6.6).

**Tabla 6.7.** Mapa integrado del LG 4 en la población ‘BxC’, indicando los marcadores más significativos en cuanto a fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis ‘Interval-mapping’ (LOD y %expl.) para 2 años de fenotipado. (\*)Indica el nivel de significación para el análisis ‘Kruskal-Wallis’.

Posición (cM)	Locus	Fecha de maduración		Ciclo de desarrollo del fruto	
		Lod 12/13	%expl 12/13	Lod 12/13	%expl 12/13
0,0	UDAp421	3,06*/4,36	12/16,9	2,67/0,64	10,8/2,7
5,0		3,21/4,64	11,9/15,9	2,61/0,63	9,5/2,4
5,4	S4_568071	3,21****/4,66*****	11,7/15,8	2,6***/0,62	9,3/2,4
9,7	UDAp404	2,07/3,5*	12/21	1,17/0,11	6,9/0,5
14,7		1,9/3,13	18,3/30,3	2,76/2,81	23,5/24
19,7		3,23/5,12	12,4/20	4,27/3,97	17,7/19
20,2	S4_1732813	3,35**/5,23**	12,1/18,9	4,28/3,85	16,1/16,5
21,0	UDAp480	2,09*****/3,09*****	7,7/11,8	3,44*****/3,17*****	11,9/11
26,0		0,47/1,41	2,8/11,7	0,81/1,28	5,5/10,7
31,0		2,5/2,36	38,8/27,6	2,72/0,77	36,6/14,2
34,0	UDP003	6,34/5,54	47,4/38,4	7,34/3,85	47,8/32,9
39,0		11,76/10,56	54,6/49,4	12,86/7,54	50,2/37
42,2	UDAp439	10,5*****/9,93*****	32,1/30,6	14,21*****/8,04*****	40,7/26,1
46,2	S4_9061773	12,19*****/11,04*****	35,7/33	16,69*****/9,8*****	45,4/30,6
47,1	S4_10035210	10,96*****/9,71****	32,7/29,6	16,41*****/10,75*****	44,8/33,2
52,1		12,47/10,23	38,6/33,4	17,87/10,44	51,4/37,3
55,1	S4_13226667_y	11,49*****/8,75*****	33,4/26,7	14,4*****/6,43*****	40/20,4
55,4	S4_13226667_x	11,57/8,89	34,2/27,7	14,45/6,49	40,6/20,9
60,4		12,25/10,41	40,1/35,5	15,21/6,98	49,7/26,6
64,1	S4_14541399	11,87*/10,89***	40,2/36,9	14,82**/6,71	51/27,2
68,7	CPST005	9,62/9,29**	33,8/32,8	12,43/5,27	47,4/22,4
71,0	UDAp416	8,14*****/8,06*****	26,2/25,9	9,56*****/3,97*****	29,9/13,7

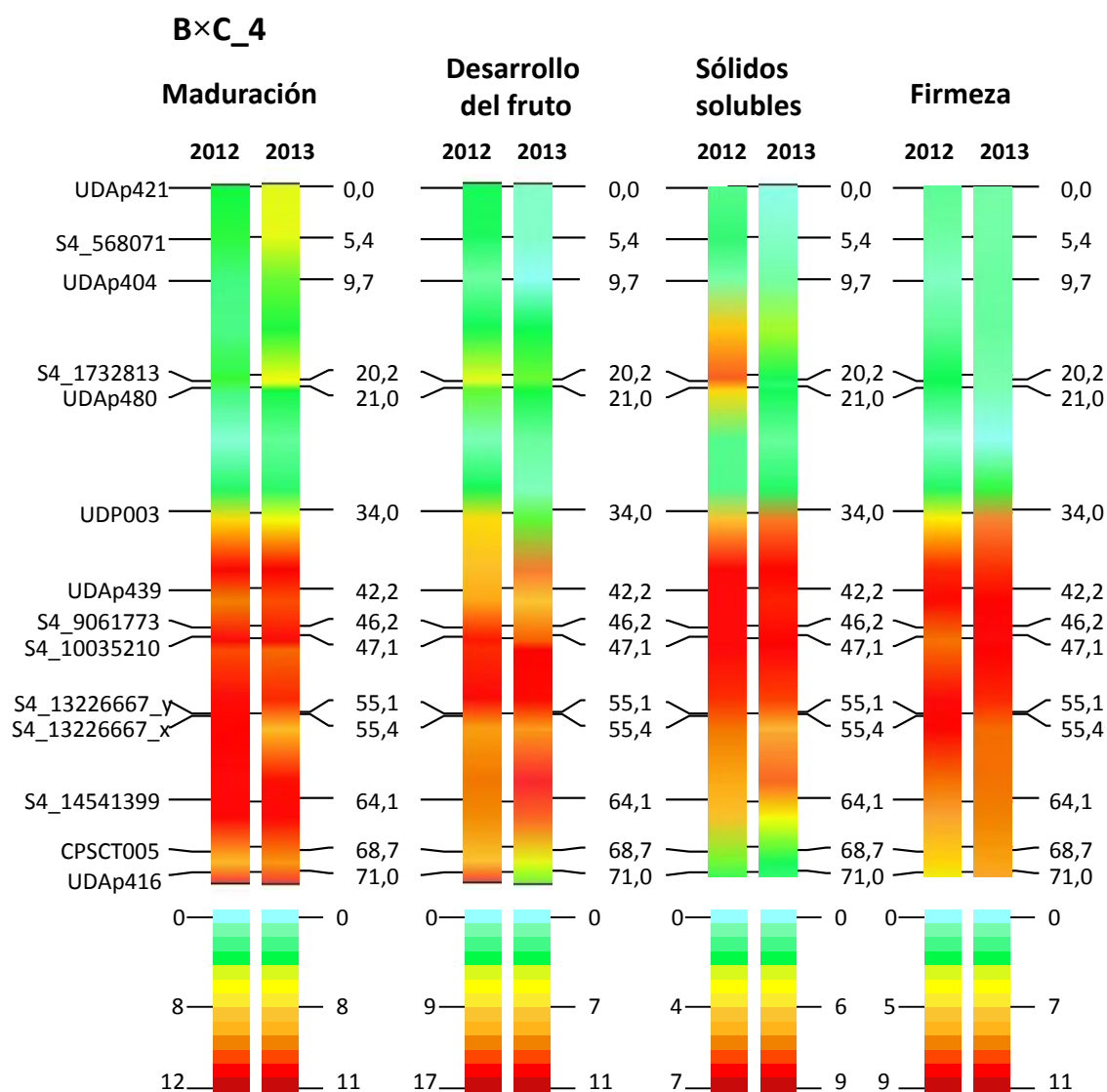
En la población ‘G×C’ son mapeados un total de 11 marcadores que cubren 61,1 cM (Tabla 6.8), localizando la región más importante del QTL entre los marcadores S4\_11947345 y S4\_13226667\_y (Figura 6.7), llegando a controlar casi el 70 % de la variación de fecha de maduración. Esta región abarca aproximadamente 2 cM (1.200.000 pb), aunque debemos indicar que casi todos los marcadores circundantes se encuentran relacionados con ambos caracteres (Tabla 6.8). En una región similar, Pirona y col. (2013) localizaron en 2 poblaciones de melocotonero, ‘Contender’ × ‘Ambra’ (‘C×A’) y ‘Nj weeping’ × ‘Bounty’ (‘W×By’), el locus MD situado entre las posiciones 10,97 y 11,19 Mpb identificado por 2 recombinantes de ‘W×By’ y describiendo un total de 25 genes candidatos, siendo el más importante el ppa008301m que codifica factores de transcripción de la familia NAC.

**Tabla 6.8.** Mapa integrado del LG 4 en la población ‘G×C’, indicando los marcadores más significativos en cuanto a fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto mediante análisis ‘Interval-mapping’ (LOD y % expl.) para 2 años de fenotipado. (\*)Indica el nivel de significación para el análisis ‘Kruskal-Wallis’.

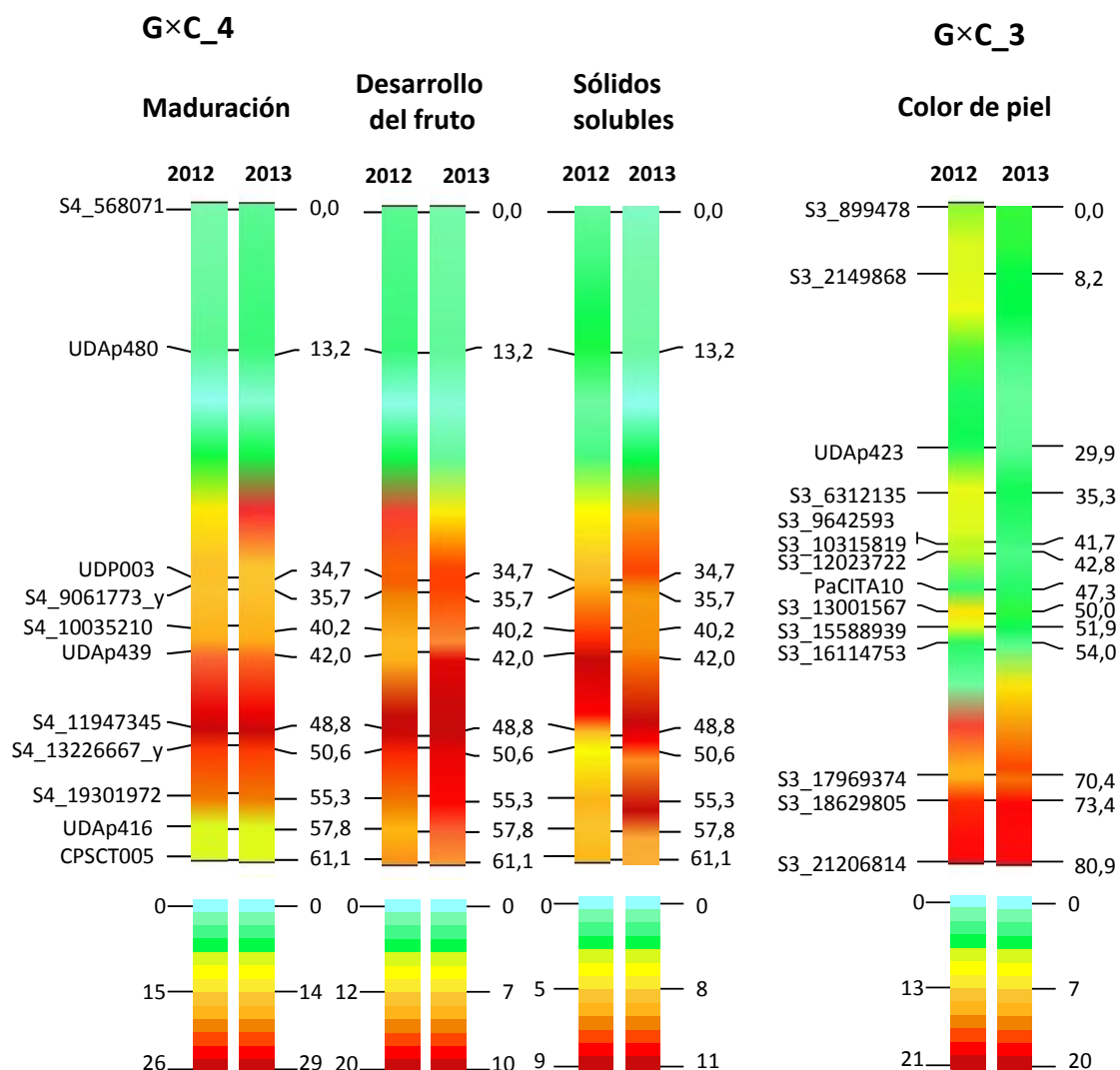
Posición (cM)	Locus (cM)	Fecha de maduración		Ciclo de desarrollo del fruto	
		Lod_12/13	%expl_12/13	Lod_12/13	%expl_12/13
0,0	S4_568071	1,96/1,54	8,6/6,6	1,62/1,05*	7,2/5,1
5,0		2,18/1,9	8,5/7,2	1,88/1,38	7,3/5,8
10,0		2,43/2,32	8,5/7,9	2,17/1,7	7,5/6
13,2	UDAp480	2,61*****/2,53****	8,4/7,8	2,39*****/1,9****	7,6/5,9
18,2		0,25/0,5	2,2/4,3	0,23/0,46	1,6/3,8
23,2		4,62/5,27	44,3/49,6	4,41/1,87	43,4/18,8
28,2		13,17/14,1	60,6/68	12,51/6,55	53,7/34
33,2		17,28/16,66	48,8/49,5	16,51/9,04	48,1/31,3
34,7	UDP003	17,4*****/16,35****	44,2/41,9	16,6*****/9,1	43,2/26,6
35,7	S4_9061773_y	17,16*****/16,75****	39,7/39,8	16,03*****/8,98****	37,3/22,5
40,2	S4_10035210	18,14*****/19,12****	39,7/42	15,4*****/7,32****	35,8/19,4
42,0	UDAp439	15,85*****/13,68****	38,4/34,9	15,54*****/10,27****	36,5/25,8
47,0		25,45/26,77	57,3/58,3	20,12/10,58	47,9/29,1
48,8	S4_11947345	26,05*****/29,07****	54,7/58,1	19,9*****/10,89	46,3/28,6
50,6	S4_13226667_y	22,7*****/21,96****	68,9/64	17,96*****/10,23****	54,1/38
55,3	S4_19301972	20,31*****/20,13****	45,5/45,5	16,11*****/9,9	38,6/26,6
57,8	UDAp416	12,04*****/9,15****	30,7/24,6	11,66*****/7,19****	29/19
61,1	CPST005	12,02*****/9,92****	33,1/28,1	11,76*****/7,38	32/21,6

En nuestro caso, no podemos precisar con tanta exactitud una zona de influencia tan concreta. En ‘B×C’ los posibles genes candidatos ligados a maduración oscilan entre 9,06 y 14,54 Mpb, mientras que en ‘G×C’ es entre 9,06 y 13,22 Mpb. Sin duda alguna, se trata de regiones mucho más amplias que albergan cientos de genes incluyendo posiblemente los 25 descritos por Pirona y col. (2013).

Esto nos indica que los genes que controlan mayoritariamente la maduración tardía en melocotonero y albaricoquero se sitúan en zonas similares del LG 4, aunque debemos de destacar que el mayor pico de LOD y explicación de la variación fenotípica se encuentra en 'GxC' en torno a las posiciones 12 y 13 Mpb, fuera del intervalo anteriormente descrito para melocotonero, aunque podría tratarse de los mismos genes. En la *Tabla 6.22* son descritas las funciones de los genes de melocotonero que se corresponden con las posiciones de los SNPs mapeados dentro de los QTLs.



**Figura 6.6.** Gradiente de LOD scores obtenidos para fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto, sólidos solubles y firmeza mediante análisis 'Interval-Mapping' en el mapa integrado del LG 4 de 'BxC' para los años 2012 y 2013. El color azul representa los valores mínimos de LOD y el rojo los máximos.



**Figura 6.7.** Gradiente de LOD scores obtenidos para fecha maduración, ciclo de desarrollo del fruto y sólidos solubles para el LG 4 (izquierda), así como para el color de piel en el LG 3 (derecha) mediante análisis ‘Interval-Mapping’ de la población ‘G×C’ para los años 2012 y 2013. El color azul representa los valores mínimos de LOD y el rojo los máximos.

#### 6.4.2.3. Peso del fruto y peso del hueso

En cuanto al peso del fruto y hueso, para la población ‘B×C’, en el caso de ‘Bergeron’ se localizaron diferentes QTLs en los LG 5 y 6. Quilot y col. (2004) y Eduardo y col. (2011) localizan diferentes QTLs de peso del fruto en los LG 5 y 6 respectivamente. En ‘Bergeron’ los QTLs más importantes se encuentran en torno a los marcadores AMPA105 y S5\_1627140 del LG 5 con valores de LOD entre 4-5 y un porcentaje de explicación del carácter que oscila en torno al 16 % (año 2012) (Tabla 6.9).

En el LG 6 se localizan diferentes QTLs de peso del fruto en ambos años en torno a los marcadores S6\_26592718 y UDP98412 (Tabla 6.9), siendo éste último relacionado previamente con peso del fruto por Eduardo y col. (2011) en la población de melocotonero ‘Contender’ × ‘Ambra’, así como también es vinculado al peso de la semilla en almendro (Fernandez i Marti y col., 2012), aunque debemos destacar que los valores de LOD en nuestro análisis no son muy elevados (3-4) en 2012. En torno a los marcadores S6\_22539524 y UDP98412 parece darse una mayor relación con el peso del hueso en ambos años sobre todo mediante análisis ‘Kruskal-Wallis’ (Tabla 6.9).

**Tabla 6.9.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de peso del fruto y peso del hueso mediante análisis ‘Interval-mapping’ (LOD) y ‘Kruskal-Wallis’ (KW) de los parentales ‘Bergeron’ (B) y ‘Currot’ (C) para los años 2012 y 2013.

‘Bergeron’ × ‘Currot’										
Peso del fruto										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
B5	S5_1627140	0,0	6,012**	4,69	2,8	16,3	0,083	0,67	3,1	2,6
B5	AMPA105	0,2	18,512*****	4,68	2,8	16,2	3,147	0,67	3,1	2,6
B6	S6_22539524	41,1	9,670****	2,20	2,9	8,1	8,303****	2,43	3,4	10,2
B6	UDP98412	52,8	20,089*****	4,32	2,9	14,8	5,255**	0,87	3,4	3,2
B6	S6_26592718	58,1	14,866*****	3,70	2,9	12,5	10,993*****	2,57	3,4	8,7
B6	S6_26089411	58,8	5,616*	3,69	2,9	12,6	2,773	2,57	3,4	8,9
Peso del hueso										
B5	S5_1627140	0,0	0,399	4,69	2,6	16,3	0,283	0,47	2,5	1,9
B5	AMPA105	0,2	8,217**	4,68	2,6	16,2	1,704	0,47	2,5	1,9
B6	S6_13331943	21,6	19,368*****	0,59	2,8	14,8	17,837*****	5,14	2,5	22,9
B6	S6_12174633	21,7	19,138*****	0,59	2,8	14,8	18,329*****	5,14	2,5	22,9
B6	S6_22539524	41,1	24,697*****	2,20	2,8	8,1	21,5*****	5,61	2,5	20,8
B6	UDP98412	52,8	18,259*****	4,32	2,8	14,8	8,259****	2,16	2,5	8,4
B6	S6_26592718	58,1	8,209****	3,70	2,8	12,5	7,308***	3,14	2,5	10,7
B6	S6_26089411	58,8	4,103	3,69	2,8	12,6	0,66	3,15	2,5	10,9
Peso del fruto										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C2	S2_24952146	60,4	0,966	0,15	3	0,6	7,342***	1,73	3,5	6,3
C4	UDAp439	36,5	1,035	0,20	2,9	0,7	8,824**	2,15	3,4	7,7
C4	S4_9061773	40,6	0,127	0,43	2,9	1,6	11,240*****	2,62	3,4	9
C4	S4_10035210	41,7	0,655	0,39	2,9	1,4	11,300****	2,28	3,4	7,8
C4	S4_13226667_y	49,4	0,943	0,34	2,9	1,5	9,094****	2,91	3,4	11,4
C5	AMPA105	0,0	18,512*****	4,12	2,6	14,5	3,147	0,52	2,5	1,9
C5	S5_13966692_y	22,6	11,599*****	2,34	2,6	9,2	4,349**	0,85	2,5	3,4
C6	MA027	18,4	2,153	1,17	2,4	9	3,975**	3,34	3,2	35,5
C7	UDAp460	9,9	1,017	0,50	2,5	1,9	12,144*****	3,07	2,5	11,3
Peso del hueso										
C2	S2_18992724_y	37	0,019	0,44	2,9	5,2	6,663***	3,54	3	22,2
C5	AMPA105	0,0	8,217**	1,73	2,5	6,7	1,704	0,38	2,5	1,5
C5	S5_13966692_y	22,6	6,942***	1,35	2,5	5,9	1,485	0,18	2,5	1,1
C6	UDAp489	0	9**	2,19	2,4	9,3	15,651*****	4,19	2,4	18,3

En el caso del parental ‘Currot’, sólo fue identificado un QTL significativo para peso del fruto al inicio del LG 5 en torno al marcador AMPA105 en el año 2012 (Tabla 6.9). Los QTLs localizados en el LG 6 tienen una menor consistencia probablemente debido a la baja saturación de este grupo, destacando un QTL significativo en torno al marcador UDAp489 (LOD = 4,19 y 18,3 % de expl.) para peso del hueso en el año 2013 (Tabla 6.9).

Debemos destacar también que probablemente las importantes diferencias ambientales entre 2012 y 2013 hayan afectado en la transmisión de estos caracteres, ya que como podemos ver, algunos QTLs importantes por su significación son localizados mediante análisis no paramétrico (‘Kruskal-Wallis’), indicando una distribución de los datos diferente cada año como ya hemos visto para fecha de floración.

**Tabla 6.10.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de peso del fruto y peso del hueso mediante análisis ‘Interval-mapping’ (LOD) y ‘Kruskal-Wallis’ (KW) de los parentales ‘Goldrich’ (G) y ‘Currot’ (C) para los años 2012 y 2013.

‘Goldrich’ x ‘Currot’										
Peso del fruto										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
G1	UDAp463	0,0	11,121**	3,32	3	10,6	6,194	2,16	3,5	6,3
G1	S1_14071595	23,4	8,007****	2,49	3	10,2	8,957****	3,14	3,5	16,4
G1	S1_27742963	35,4	4,175**	1,41	3	6,2	11,496****	3,16	3,5	14,4
G1	S1_38382339	64,9	4,335**	1,87	3	19,0	28,178*****	7,41	3,5	28,8
G7	CPPCT022	0,0	8,229**	2,38	2,5	8,6	14,535****	2,13	2,2	6,7
G7	UDAp503	1,7	6,250**	2,36	2,5	8,9	12,758*****	2,16	2,2	6,8
Peso del hueso										
G1	S1_38382339	64,9	0,089	0,83	3,2	11,6	12,296*****	5,38	4,9	38,7
G2	S2_2396072	12,0	0,686	1,22	2,9	13,0	10,403****	3,81	3,5	21,6
G2	S2_8280543	21,3	3,309	1,16	2,9	3,2	9,789***	3,94	3,5	12,5
G2	S2_12550486	25,5	1,361	0,68	2,9	2,0	7,737**	4,57	3,5	13,9
G2	UDAp428	25,9	0,95	0,60	2,9	2,1	22,869*****	4,99	3,5	14,8
G2	UDAp456	33,9	0,173	0,71	2,9	3,2	21,52*****	7,58	3,5	22,5
G2	S2_18992724	35,7	1,124	0,45	2,9	1,4	30,139*****	9,08	3,5	23,0
G2	UDAp473	53,7	2,241	0,69	2,9	2,4	20,976*****	3,41	3,5	11,1
G2	A116	59,8	3,226	0,64	2,9	2,3	23,467*****	4,32	3,5	13,9
G5	S5_8566413	0,0	4,839**	1,24	3	5,7	11,963****	2,37	4,5	7
Peso del fruto										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C1	UDAp440	0,0	3,879**	4,03	2,8	12,1	0,579	1,00	2,8	3,2
C2	S2_18992724	38,6	0,921	3,23	2,9	13,8	8,539**	2,54	3,3	9,0
C2	A116	60,1	6,827*	2,32	2,9	7,6	9,768**	3,16	3,3	10,5
C4	S4_13226667_y	50,5	10,182****	1,75	2,8	5	7,341***	1,31	2,6	3,7
C5	BPPCT038	33,3	13,386****	2,69	2,7	17,1	3,673	1,33	2,8	4,1
C7	CPPCT022	9,8	8,229**	2,18	2,6	8,6	14,535****	2,52	2,8	8,8
Peso del hueso										
C2	S2_8280543	16,6	3,309	1,34	2,8	3,8	9,789***	5,09	3,6	13,9
C2	S2_12550486	21,1	1,361	0,79	2,8	2,3	7,737**	4,58	3,6	14,3
C2	S2_18992724	38,6	1,124	3,10	2,8	13,4	30,139*****	8,19	3,6	20,7
C2	A116	60,1	3,226	1,19	2,8	3,7	23,467*****	5,34	3,6	16,9
C2	UDAp473	66,1	2,241	0,95	2,8	3,2	20,976*****	3,51	3,6	10,8
C7	CPPCT022	9,8	10,473**	2,68	2,6	10,1	10,444**	2,19	3,9	7,5

En el caso de la población 'G×C' observamos una mayor intermitencia en cuanto a la localización de los QTLs, sobre todo destacamos en el caso del peso del fruto los LG 1 y 7 de 'Goldrich' y los LG 1, 2, 4, 5 y 7 de 'Currot' (*Tabla 6.10*). En 'Goldrich', localizamos en 2013 un QTL de peso del fruto al final del LG 1 en torno al SNP S1\_38382339 (LOD = 7,41) explicando un 28,8 % de la variación del peso del fruto y llegando casi al 40 % para el peso del hueso. También destacamos la mayor influencia sobre el peso del hueso al final del LG 2 (año 2013) en torno a los marcadores UDAp456 y S2\_18992724 con un valor máximo de LOD de 9,08 y un 23 % de la variación del carácter (*Tabla 6.10*).

En el parental 'Currot' se localizan diversos marcadores ligados a estos caracteres aunque con bajos niveles de significación, dándose al final del LG 2 una situación similar a la de 'Goldrich' con QTLs significativos sobre todo en cuanto a peso del hueso. Una vez más, vemos como las variaciones interanuales anteriormente mencionadas dan lugar a la aparición de QTLs diferentes cada año (*Tabla 6.10*).

De Franceschi y col. (2013) identificaron en el genoma del melocotonero a lo largo de los 8 grupos de ligamiento 23 genes FW2.2/CNR (Cell number regulator) que están implicados en el tamaño del fruto, localizando en cerezo 2 de estos genes CNR (PavCNR12 y PavCNR20) en el intervalo del QTL de los grupos 2 y 6. En nuestro caso también localizamos los QTLs más importantes en cuanto a estos caracteres en el LG 2 y LG 6 en posiciones similares a las de los genes CNR descritos por De Franceschi y col. (2013). Los genes situados en las posiciones de los SNPs más importantes ligados a estos caracteres son descritos en la *Tabla 6.22*, describiendo aquellos que tienen funciones conocidas en el genoma del melocotonero.

#### **6.4.2.4. Calibre del fruto**

El calibre o diámetro ecuatorial del fruto se encuentra directamente relacionado con peso del fruto, ya que ambos caracteres están ligados al tamaño de fruto. Por tanto, algunos de los QTLs localizados para calibre del fruto coinciden con zonas similares a las descritas anteriormente. En el caso de la población 'B×C' no se localizan muchos QTLs para este parámetro, destacando sobre todo el LG 5 en torno al marcador AMPA105 en 'Bergeron' y 'Currot' en 2012 o la débil influencia del LG7 en torno al marcador UDAp460 para el año 2013 (*Tabla 6.11*).



**Tabla 6.11.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de calibre del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

'Bergeron' × 'Currot'										
Calibre del fruto										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
B5	S5_1627140	0,0	3,917**	3,98	2,70	14,3	0,32	1,25	2,8	4,8
B5	AMPA105	0,2	17,755*****	3,98	2,70	14,2	4,438	1,25	2,8	4,7
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C5	AMPA105	0,0	17,755*****	3,51	2,6	12,8	4,438	1,02	2,6	3,8
C5	S5_13966692_y	22,6	8,995****	2,05	2,6	8,9	4,190**	0,61	2,6	2,5
C7	UDAp460	9,9	0,382	0,20	2,5	0,8	8,840****	2,27	2,5	8,4

En la población 'G×C' se observa una mayor transmisión de este carácter probablemente debido a una mayor influencia del parental 'Goldrich', detectando diferentes QTLs en ambos parentales a lo largo de los LG 1, 3 y 7 (Tabla 6.12).

**Tabla 6.12.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de calibre del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

'Goldrich' × 'Currot'										
Calibre del fruto										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
G1	UDAp463	0,0	13,143****	4,09	3,1	12,6	4,86	2,25	3	6,6
G1	S4_16590520	5,7	11,130****	2,76	3,1	7,6	3,214	0,94	3	2,7
G1	S1_9687151	17,8	5,432**	1,99	3,1	5,8	8,623****	3,14	3	9,6
G1	S1_13282432	21,9	10,210****	2,67	3,1	8,6	12,268*****	3,81	3	16,8
G1	S1_14071595	23,4	12,878*****	3,61	3,1	12,5	13,500*****	4,27	3	18,5
G1	S1_17542722	26,3	7,314**	3,21	3,1	9,0	9,459***	3,76	3	10,4
G1	UDAp426	27,6	7,487***	2,68	3,1	8,6	10,673****	3,50	3	10,2
G1	S1_23746169	28,7	8,296****	3,05	3,1	10,7	13,783*****	3,53	3	10,4
G1	UDAp414	32,3	4,498**	3,26	3,1	13,9	7,454***	3,50	3	13,1
G1	S1_27742963	35,4	6,338**	2,65	3,1	11,7	18,32*****	4,28	3	15,0
G1	S1_38382339	64,9	4,734**	3,89	3,1	45,8	33,854*****	9,48	3	29,4
G7	CPPCT022	0,0	14,565****	4,18	2,5	15,0	20,989*****	3,94	2,5	12,3
G7	UDAp503	1,7	12,951*****	4,18	2,5	15,6	20,788*****	4,07	2,5	12,9
G7	UDAp471	7,2	8,883****	3,19	2,5	14,8	16,22*****	3,02	2,5	10,3
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C1	UDAp440	0,0	4,005**	4,94	2,8	15,2	0,229	1,27	2,7	4,1
C1	S1_3689497	0,3	4,351**	2,93	2,8	9,4	0,168	1,17	2,7	3,9
C1	UDAp463	2,5	13,143****	2,36	2,8	7,3	4,86	1,37	2,7	4,1
C1	S4_16590520	8,3	11,130****	2,81	2,8	7,7	3,214	1,93	2,7	5,6
C1	S1_17542722	35,0	7,314**	2,14	2,8	6,3	9,459***	2,69	2,7	7,9
C3	S3_899478	0,0	4,451**	3,74	2,9	33,1	2,950*	1,01	2,7	4,8
C3	S3_2149868	8,2	6,311**	2,93	2,9	15,5	6,692***	1,58	2,7	5,1
C3	S3_6312135	35,5	6,542**	3,52	2,9	15,9	2,806*	0,62	2,7	2,3
C3	S3_9642593	41,9	6,828***	1,81	2,9	11,6	0,001	0,09	2,7	0,7
C3	S3_16114753	53,7	3,606*	3,07	2,9	11,6	0,362	1,28	2,7	4,9
C7	S7_3054683	0,0	1,271	3,56	2,4	20,9	4,166**	5,11	2,4	28,3
C7	S7_9026845	5,5	0,97	3,64	2,4	16,5	3,054*	4,79	2,4	19,6
C7	CPPCT022	9,8	14,565****	3,84	2,4	14,6	20,989*****	4,37	2,4	14,7
C7	UDAp407	27,1	0,635	3,40	2,4	27,8	0	4,27	2,4	34,1
C7	UDAp460	36,7	1,155	4,21	2,4	45,6	0,001	4,34	2,4	40,4

En 'Goldrich' destacamos el marcador S1\_38382339 (LOD de 3,89 en 2012 y 9,48 en 2013) ubicado al final del LG 1 con un porcentaje de la explicación de la variación del carácter que llega al 45,8 % en 2012. También se observa cierta influencia del LG 7 en torno a los SSRs CPPCT022, UDAp503 y UDAp471 (*Tabla 6.12*).

Además, debemos añadir que aunque hay diversos estudios orientados a la transmisión del carácter peso del fruto, son menos los estudios en cuanto al diámetro del mismo, citando los QTLs detectados por Abbot y col. (1998) en los LG 1 y 8 o Cantín y col. (2010) en el LG 4 para diferentes poblaciones de melocotonero. También Zhang y col. (2010) describen QTLs relacionados con el calibre del fruto en los grupos LG 2 y 6 de cerezo. En el parental 'Currot', localizamos también QTLs en los LG 1, 3 y 7, pero de forma más dispersa y con una menor significación. Destacamos el marcador UDAp440 del LG 1 con un LOD de 4,94 en 2012, el CPPCT022 del LG 7 que es significativo en ambos años o el UDAp460 en el mismo grupo con uno LOD en torno a 4, sin embargo, sólo el CPPCT022 es significativo en ambos estadísticos y años (*Tabla 6.12*).

En resumen, en cuanto a este parámetro, el QTL más importante se encuentra al final del LG 1 en la posición del SNP S1\_38382339, que además es también altamente significativo en el caso de peso del fruto y peso del hueso de 'Goldrich', coincidiendo con la posición del transcrito ppa001375m identificado en melocotonero (*Tabla 6.22*).

#### **6.4.2.5. Color del fruto**

En cuanto al color del fruto, abordaremos este apartado hablando de los tres caracteres de forma simultánea (color de piel, color de chapa y color de pulpa). En la población 'B×C' fueron localizados diferentes QTLs de color a lo largo de los LG 1, 2, 3, 6 y 8 (*Tabla 6.13*). En el caso de 'Bergeron' no se encuentran importantes QTLs en cuanto a color de piel, destacando la influencia del marcador UDAp426 en el LG 1 sobre todo en el año 2012 con un 20 % de la variación del carácter. Sin embargo, se da una mayor influencia del LG 1 sobre el color de chapa especialmente en 2013 en torno al S1\_14071595 (LOD= 7,09 y 29% expl.), S1\_20067081 (LOD = 7,34 y 30,9 % expl.) y UDAp426 (LOD = 6,47 y 29,4 % expl.) lo que nos indica que en esta zona puede haber genes implicados en el color rojo del fruto (*Tabla 6.13*). Otros autores como Quilot y col. (2004), Dirlewanger y col. (2004) y Martínez-García y col (2013b) localizan QTLs asociados con el color rojo y amarillo de la pulpa en el LG 1.

**Tabla 6.13.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de color del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

'Bergeron' × 'Currot'										
Color de piel										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
B1	UDAp426	46,5	3,355*	3,05	2,9	20,1	7,560***	1,64	2,9	10
B3	S3_17969374	48,5	0,124	3,12	2,6	23,7	0,68	0,51	2,4	5,7
Color de chapa										
B1	S1_14071595	43,2	8,879****	2,96	3	12,6	17,498*****	7,09	3	29
B1	S1_20067081	44	10,161****	2,85	3	12,3	22,83*****	7,34	3	30,9
B1	UDAp426	46,5	6,541**	1,47	3	7,3	19,149*****	6,47	3	29,4
Color de pulpa										
B6	S6_13331943	21,6	7,246***	3,48	3,1	20,3	10,615****	3,50	2,9	18,3
B6	S6_12174633	21,7	6,971***	3,48	3,1	20,3	11,27****	3,50	2,9	18,3
B6	S6_22539524	41,1	10,481****	4,77	3,1	20,7	16,944*****	4,32	2,9	14,6
B6	UDP98412	52,8	11,813*****	5,26	3,1	19,4	18,478*****	3,47	2,9	11,8
B6	S6_26592718	58,1	5,957**	3,26	3,1	11,6	13,769*****	3,24	2,9	10,9
B6	S6_26089411	58,8	11,844****	3,26	3,1	11,4	8,779**	3,25	2,9	11
B8	S8_13630387	0,0	8,813****	3,27	2,2	20,1	14,719*****	3,27	2,4	13,2
Color de piel										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C3	S3_899478	0,0	12,371*****	2,47	3	9,6	5,010**	0,82	2,8	4,2
C3	S3_2149868	9,1	13,408*****	3,17	3	15,3	4,142**	0,51	2,8	2
C3	S3_9642593	44,3	10,907*****	2,92	3	10,4	2,915*	0,47	2,8	1,8
C3	S3_10315819	45,9	12,841*****	3,14	3	11	2,032	0,40	2,8	1,6
C3	S3_13711279	52,4	12,092*****	2,80	3	9,8	3,564*	0,55	2,8	2,4
C3	S3_14518113	53,4	11,237*****	2,76	3	9,7	3,262*	0,58	2,8	2,6
C3	PaCITA10	55,1	11,404*****	3,36	3	16,6	2,009	0,19	2,8	1,2
C3	S3_16114753	61,9	8,366****	2,98	3	14,5	2,161	0,27	2,8	1,2
C6	MA027	18,4	6,634**	2,95	2,4	29,4	4,637**	0,60	2	2,7
Color de chapa										
C1	PGS1.21	28,6	4,885	0,92	3	4,1	14,555****	3,69	3	13,8
C1	PGSI.24	40,9	3,98	0,81	3	3,9	11,396****	3,49	3	14,1
C2	S2_12550486	15,1	5,53*	1,18	3,1	5	6,189**	3,76	3,1	14,3
Color de pulpa										
C2	S2_7309483	10,9	10,07****	2,35	3	8,9	3,039*	0,64	2,9	2,3
C2	S2_18992724_y	37,0	6,521**	3,77	3	31,7	7,342***	2,27	2,9	9,2
C3	S3_2149868	9,1	6,826***	2,24	3,3	9,3	2,978*	2,76	3,1	18,3
C3	S3_9642593	44,3	3,569*	1,70	3,3	7,2	6,018**	3,09	3,1	15
C3	S3_10315819	45,9	4,393**	2,16	3,3	10,2	5,786**	3,92	3,1	21,9

Respecto al color de pulpa, destaca sobre todo el LG 6 en torno a los marcadores S6\_22539524 y UDP98412 con un porcentaje de la explicación de la variación del carácter en torno al 20 % en el caso del S6\_22539524 en 2012, siendo obtenido un valor similar en el LG 8 en la posición del SNP S8\_13630387 (Tabla 6.13). Los resultados mostrados en el Capítulo 4 relativos a la población 'Z701-1' × 'Palsteyn' también relacionan el color de pulpa con el marcador UDP98412 en el LG 6 (Capítulo 4). En 'Currot' destacamos diferentes QTLs en los LG 3 y 6 ligados a color de piel, dándose valores significativos para K-W en el LG 3 aunque con valores de LOD muy pequeños, al igual que ocurre para color de pulpa. Con respecto al color de chapa se localizan algunos QTLs para 2013 en los LG 1 y 2 en torno a los marcadores PGS1.21, PGSI.24 y S2\_12550486 (Tabla 6.13).

En general, como hemos visto, la presencia de QTLs asociados a color del fruto en esta población no es muy significativa, probablemente debido a la falta de variabilidad en cuanto a este carácter en esta población. Sin embargo, destacamos el QTL de color de chapa obtenido en el LG 1 sobre todo en 2013, pudiendo relacionar los SNPs ligados al QTL con genes previamente descritos en el genoma del melocotonero (Tabla 6.22).

En cuanto a la población 'G×C', se localizan diferentes QTLs de color del fruto en los grupos 1, 2 y 3 de ambos parentales. En el LG 1 de 'Goldrich' no se dan QTLs especialmente significativos para color de piel, observándose una mayor influencia en el año 2013, aunque la mayoría de los marcadores no llegan a ser significativos mediante análisis 'Interval mapping' (Tabla 6.14).

**Tabla 6.14.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de color del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

'Goldrich' × 'Currot'										
Color de piel										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
G1	PGS1.21	12,2	10,129**	2,02	4,7	6	17,434*****	2,97	4,9	9,3
G1	PGS1.24	15,3	7,729*	2,66	4,7	8,4	18,644*****	3,64	4,9	10,3
G1	S1_9687151	17,8	3,578*	2,11	4,7	8,6	10,229****	3,06	4,9	10,6
G1	S1_23746169	28,7	3,478*	1,54	4,7	6,3	11,308*****	2,95	4,9	8,6
G1	UDAp414	32,3	2,499	1,14	4,7	4,5	10,123****	2,91	4,9	10,4
G3	S3_12023722	10,4	16,629*****	4,43	2,5	13,0	4,616**	1,64	2,6	5,4
G3	S3_13001567	15,5	27,056*****	7,05	2,5	19,4	12,437*****	3,46	2,6	9,7
G3	S3_13711279	19,5	8,835**	8,80	2,5	27,3	2,345	3,61	2,6	12,3
G3	PaCITA10	24,9	23,987*****	4,60	2,5	16,2	19,530*****	4,32	2,6	13,6
G3	S3_17969374	40,3	71,315*****	19,60	2,5	49,5	61,161*****	17,72	2,6	41,6
G3	S3_18629805	43,3	79,783*****	21,62	2,5	50,4	69,440*****	21,31	2,6	48,3
Color de chapa										
G1	UDAp414	32,3	2,371	0,72	3	3,1	10,334****	2,88	2,9	10,6
G2	S2_2396072	12	0,059	0,07	2,9	1	11,295*****	2,8	2,8	18,1
G3	S3_17969374	40,3	15,193*****	4,63	2,3	22,5	9,103****	2,36	2,4	7,1
G3	S3_18629805	43,3	13,790*****	4,04	2,3	20,1	11,523*****	2,99	2,4	9,6
Color de pulpa										
G1	UDAp463	0,0	7,250*	1,64	3,7	5,3	16,131****	4,06	3,3	12,2
G1	PGS1.24	15,3	11,810***	2,78	3,7	7,9	20,595*****	4,79	3,3	13,2
G1	S1_9687151	17,8	8,879****	2,44	3,7	8,1	19,73*****	4,47	3,3	14,6
G1	S1_13282432	21,9	13,810*****	2,87	3,7	8,7	19,18*****	4,89	3,3	17,0
G1	S1_14071595	23,4	14,315*****	3,36	3,7	11,4	21,89*****	5,40	3,3	16,4
G1	S1_17542722	26,3	11,012****	3,01	3,7	8,5	17,32*****	4,63	3,3	12,7
G1	UDAp426	27,6	6,584**	2,70	3,7	8,6	12,721*****	4,32	3,3	12,4
G1	S1_23746169	28,7	13,079*****	2,73	3,7	7,9	24,286*****	5,21	3,3	14,4
G1	UDAp414	32,3	9,630****	2,85	3,7	11,1	17,460*****	4,66	3,3	15,2
G1	S1_17742963	35,4	11,815*****	2,61	3,7	9,3	17,448*****	4,65	3,3	15,2
G1	S1_38382339	64,9	9,297****	3,52	3,7	33,3	10,930*****	5,97	3,3	49,0
G3	S3_12023722	10,4	14,515*****	4,68	2,5	14,1	2,988*	1,90	2,5	6,9
G3	S3_13001567	15,5	25,811*****	7,48	2,5	20,4	9,605****	3,22	2,5	9,8
G3	PaCITA10	24,9	17,972*****	4,05	2,5	13,6	13,809****	2,98	2,5	9,2
G3	S3_17969374	40,3	60,897*****	19,28	2,5	50,0	42,329*****	12,16	2,5	33,4
G3	S3_18629805	43,3	64,418*****	19,28	2,5	48,9	51,152*****	15,35	2,5	41,5

**Tabla 6.14 (continuación).** Marcadores más importantes ligados a QTLs de color del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y Kruskal-Wallis (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

Color de piel										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C1	UDAp463	2,5	9,663**	2,64	2,9	8,3	15,166****	2,92	2,8	9,3
C1	S4_16590520	8,3	0,773	3,19	2,9	9,7	5,879*	4,46	2,8	13,6
C1	PGS1.21	16,5	10,129**	1,95	2,9	5,9	17,434*****	3,75	2,8	11,3
C1	PGS1.24	20,6	7,729*	1,44	2,9	4,7	18,644*****	3,71	2,8	11,1
C1	S1_17542722	35,0	3,639	0,73	2,9	2,1	13,376****	3,11	2,8	8,6
C3	S3_899478	0,0	0,301	4,70	3,6	40,1	0,657	3,71	3,8	32,4
C3	S3_2149868	8,2	0,03	5,25	3,6	36,5	0,021	3,28	3,8	24,9
C3	UDAp423	30,0	11,632***	3,85	3,6	11,9	9,517**	2,66	3,8	9,1
C3	S3_6312135	35,5	1,591	4,97	3,6	22,4	3,627*	3,07	3,8	14,4
C3	S3_13711279	44,8	8,835**	10,62	3,6	26,6	2,345	5,88	3,8	15,8
C3	S3_14518113	46,1	2,911*	4,67	3,6	20,2	6,010**	3,69	3,8	19,1
C3	PaCITA10	48,6	23,987*****	6,51	3,6	17,8	19,530*****	4,88	3,8	13,9
C3	S3_15588939	51,6	2,115	6,70	3,6	20,4	3,947**	4,13	3,8	13,2
C3	S3_16114753	53,7	2,492	6,72	3,6	22,0	4,369**	4,14	3,8	14,5
C3	S3_21206814	81,0	0,025	5,74	3,6	40,7	0,021	6,71	3,8	66,5
Color de pulpa										
C1	UDAp463	2,5	7,250*	0,81	2,8	2,5	16,131****	3,42	2,8	10,5
C1	S4_16590520	8,3	5,922*	2,17	2,8	6,5	10,332****	3,67	2,8	10,5
C1	PGS1.21	16,5	11,604***	2,39	2,8	7,1	17,485*****	3,60	2,8	10,7
C1	PGS1.24	20,6	11,810***	2,04	2,8	6,1	20,595*****	4,30	2,8	12,6
C1	S1_17542722	35,0	11,012****	2,19	2,8	6,2	17,032*****	3,92	2,8	10,8
C3	S3_2149868	8,2	0,296	3,58	3,3	27,3	1,46	1,14	3	8,5
C3	UDAp423	30,0	7,619*	3,04	3,3	9,6	4,955	0,69	3	2,4
C3	S3_6312135	35,5	4,690**	4,52	3,3	18,7	7,177***	2,18	3	7,7
C3	S3_10315819	41,9	6,915***	3,38	3,3	14,6	7,113***	2,44	3	12,3
C3	S3_9642593	41,9	7,507***	3,38	3,3	14,6	7,640***	2,44	3	12,3
C3	S3_13711279	44,8	2,661	9,80	3,3	25,2	1,397	4,20	3	11,8
C3	S3_14518113	46,1	7,327***	4,93	3,3	21,7	7,728***	3,13	3	14,2
C3	PaCITA10	48,6	17,972	5,12	3,3	14,1	13,809*****	3,19	3	9,2
C3	S3_15588939	51,6	5,740**	5,21	3,3	15,6	6,227**	2,94	3	9,0
C3	S3_16114753	53,7	4,857**	5,08	3,3	16,3	6,722***	3,01	3	9,7
C3	S3_21206814	81,0	0,697	4,26	3,3	33,5	0,006	2,48	3	38,4

En el LG 1 de 'Goldrich' podemos destacar la presencia de LODs significativos para color de pulpa sobre todo en el año 2013. Sin embargo, debemos destacar que el LG 3 es sin lugar a dudas el más importante en cuanto a color de piel, ya que en la posición de los SNPs S3\_17969374 y S3\_18629805 se dan valores de LOD que oscilan entre 18 y 21 con un porcentaje de explicación del carácter del 48 al 50 %, siendo altamente significativos en ambos estadísticos y años. Los mismos SNPs son relacionados también con el color de chapa y pulpa aunque con valores de LOD inferiores (Tabla 6.14). Con respecto a 'Currot', observamos la influencia de los marcadores PGS1.21 y PGS1.24 del LG 1 sobre color de piel y pulpa con LODs que oscilan entre 3 y 4 sobre todo en 2013. En este caso no aparecen QTLs de color de chapa debido probablemente a la influencia del parental 'Currot' de piel color crema.

Al igual que ocurre en 'Goldrich' el LG 3 parece ser el más implicado en el color de piel, pero en este caso parece haber 2 locus relacionados, uno en la zona media del cromosoma en torno al SNP S3\_13711279 (LOD = 10,62) y el SSR PaCITA10 (LOD = 6,51) en 2012, el cual es significativo en ambos estadísticos, y otro al final del cromosoma en la posición del S3\_21206814 (LOD = 5-6) que sólo muestra significación mediante 'interval-mapping'. Debemos destacar que la menor influencia del parental 'Currot' en cuanto a tonalidades de color más rojizas puede dar lugar a QTLs de menor significación en comparación con el parental 'Goldrich' (Tabla 6.14).

Como hemos visto, pueden ser varios los grupos de ligamiento implicados en estos caracteres, lo que nos indica su carácter poligénico y modo de transmisión de la herencia diferente entre parentales. Esta tendencia es común en diferentes especies del género *Prunus* donde se pueden localizar QTLs de color de piel en diferentes grupos de ligamiento como es el caso de Quarta y col. (2000) en el LG 2, Verde y col. (2002) en los LG 2 y 6, Quilot y col. (2004) en el LG 5, Eduardo y col. (2011) en los LG 3, 4, 6 y 7 o Illa y col. (2011) en el LG 5 de melocotonero, en cerezo Sooryapathirana y col. (2010) localizan QTLs de color de piel en los LG 3 y 6.

Igualmente, para color de pulpa son varios los autores que localizan diversos QTLs en melocotonero como Abbot y col. (1998) en el LG 3, Bliss y col. (2002) sobre el LG 1, Quilot y col. (2004) en los LG 1 y 3, Illa y col. (2011) en el LG 3 o Martínez-García y col. (2013b) que localizan SNPs al principio del LG 1 ligados a este carácter en la población de melocotonero 'Dr. Davis' × 'Georgia Belle'. En cerezo, Sooryapathirana y col. (2010) detectan QTLs de color de pulpa en los LG 3 y 8. Aunque es patente la falta de estudios orientados en este sentido en el caso de albaricoquero, destacamos autores como Socquet-Juglard y col. (2012) que localizan diferentes QTLs de color de piel en el LG 3, así como Ruiz y col. (2010b) al final del LG 3 en la población 'Goldrich' × 'Moniquí' coincidiendo con el parental 'Goldrich' de nuestra población.

Debido a la importancia de los QTLs de color obtenidos en el LG 3 de la población 'G×C', hemos decidido integrar ambos parentales en un mismo mapa para intentar definir una zona más específica del genoma relacionada con el color del fruto (Tabla 6.15 y Figura 6.7).

**Tabla 6.15.** Mapa integrado del LG 3 en la población ‘G×C’, indicando los marcadores más significativos en cuanto a color de piel y color de pulpa mediante análisis ‘Interval-mapping’ (LOD y % expl.) para 2 años de fenotipado. (\*)Indica el nivel de significación para el análisis ‘Kruskal-Wallis’.

Posición (cM)	Locus	Color de piel		Color de pulpa	
		Lod_12/13	%expl_12/13	Lod_12/13	%expl_12/13
0,0	S3_899478	4,62/3,49	40,6/28,5	3,37/0,71	39,1/9,4
5,0		5,04/3,42	39,7/27,9	3,78/1,19	35,6/11,8
8,2	S3_2149868	5,07/3,1	36,9/23,9	4,08/1,51	31,3/11,7
13,2		5,5/3,01	49,3/49,9	4,01/1,63	31,9/22,6
18,2		4,37/1,96	47,5/23,2	3,47/1,26	21,3/31,3
23,2		3,56/1,34	13,8/5,8	3,09/0,63	12,5/3,5
28,2		3,8/1,58	12,4/6	3,08/0,59	10,4/2,2
29,9	UDAp423	3,66***/1,61**	10,9/5,5	2,92*/0,55	9,1/1,9
34,9		5,38/2,75	18,7/9,5	5,53/2,3	18,3/7,7
35,3	S3_6312135	5,37/2,75*	17,8/8,8	5,5**/2,27***	17,3/6,7
40,3		5,02/2,25	14,9/6,8	5,41/2,08	15,8/6,1
41,7	S3_10315819	4,87*/2,11**	13,6/6	5,24***/1,98***	14,5/5,6
41,7	S3_9642593	4,87*/2,11**	13,6/6	5,24***/1,98***	14,5/5,6
42,8	S3_12023722	4,9*****/1,91**	15,6/7,2	5*****/1,69*	16,5/7,1
47,3	PaCITA10	3,26*****/2,46*****	11,8/8,6	1,67*****/1,36*****	5,8/4,4
50,0	S3_13001567	6,93*****/3,42*****	21,4/10,8	7,02*****/2,31*****	23/8,7
51,9	S3_15588939	5,33/2,83**	16,8/9,3	6,03**/2,73**	18,3/8,8
54,0	S3_16114753	3,46/1,63**	13,7/6,3	3,99**/2,03***	14,9/6,9
59,0		2,23/6,13	33/63,3	1,73/3,82	12,3/47,5
64,0		13,61/16,57	62/65,3	11,92/11,82	56,6/57
69,0		18,05/18,11	49,2/51,1	16,46/11,83	44,3/41,3
70,4	S3_17969374	18,11*****/17,2*****	40,3/39,3	16,97*****/10,61*****	38,5/26,9
73,4	S3_18629805	20,22*****/20,34*****	43,8/44,3	17,25*****/13,12*****	39/31,7
78,4		21,35/20,78	54,5/55,2	18,39/13,6	50,4/43,1
80,9	S3_21206814	21,05/20,98	55,3/59,2	18,22/13,83	51,8/47,6

Como podemos ver en la *Tabla 6.15*, en el mapa integrado del LG 3 de la población ‘G×C’ se mapean un total de 14 marcadores que cubren unos 80,9 cM. Los valores más significativos para el color de piel y pulpa los encontramos en torno a los marcadores S3\_17969374 y S3\_18629805 con valores de LOD en torno a 20 y un porcentaje de la variación fenotípica que supera el 50 % en el caso del S3\_21206814 (*Tabla 6.15*). Con respecto a los genes candidatos involucrados en este carácter, en las posiciones de los SNPs más significativos, localizamos algunos genes previamente descritos en el genoma del melocotonero (*Tabla 6.22*), ya que por homología entre especies deben estar muy relacionados con albaricoquero.

Es de destacar que en estudios previos de genes candidatos, más concretamente en el trabajo de Sooriyapathirana y col. (2010) se detecta el gen *PavMYB10* homólogo en manzano al *MdMYB10* y en *Arabidopsis* al *AtPAP1* dentro de un QTL mayor al final del LG 3, lo que sugiere que este gen puede ser uno de los principales determinantes del color de piel y pulpa en cerezo. Más recientemente, Frett y col. (2014) detectaron un QTL mayor ( $R^2 > 25\%$ ) para la coloración rojiza de la piel en melocotón en la población 'Zin Dai' × 'Crimson Lady', siendo genotipada a través del International Peach SNP Consortium (IPSC) 9K peach SNP array v1 (Verde y col., 2012).

En la *Tabla 6.22* en torno al SNP S3\_18629805 se da la presencia de genes *MYB* situados a la misma altura que en cerezo, encontrándose por tanto dentro del QTL de color de piel de la población 'G×C'. Esto nos confirma la homología y sintenia entre especies de igual o distinto género dentro de la familia *Rosaceae*, donde todo parece indicar que existe una fuerte presencia de genes que controlan el color del fruto al final del LG 3. En el caso del manzano, el factor de transcripción *MdMYB10* parece controlar el color rojo de la pulpa (Espley y col., 2007; Chagné y col., 2007), mientras que un segundo gen *MYBA/MYB1* controla el color rojo de la piel (Tako y col., 2006; Ban y col., 2007), estos factores de transcripción están también relacionados con la síntesis de antocianos (Allan y col., 2008).

#### 6.4.2.6. Firmeza del fruto

En nuestro estudio, como ya comentamos en el Capítulo 3, en la población 'B×C' se da una correlación positiva entre fecha de maduración y firmeza del fruto. Esto nos lleva a la hipótesis de que el carácter fecha de maduración tardía y alto nivel de firmeza de 'Bergeron' se podrían heredar de forma conjunta haciendo que la mayoría de los descendientes que muestran maduración tardía también tengan niveles altos de firmeza. Por tanto, de esta manera se podrían explicar los QTLs de firmeza identificados en torno al marcador UDAp439 tanto en 'Bergeron' como en 'Currot', los cuales coinciden con los QTLs de fecha de maduración localizados en el mismo grupo (*Tabla 6.16* y *Figura 6.6*).



**Tabla 6.16.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de firmeza del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

'Bergeron' x 'Currot'										
Firmeza										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
B4	UDP003	37,4	1,095	6,46	2,60	33,3	0,122	8,21	3,1	39,1
B4	UDAp439	43,0	34,382*****	8,31	2,60	26,7	37,046*****	9,65	3,1	30,4
B4	S4_10035210	47,6	26,413*****	7,74	2,60	25,1	25,019*****	9,85	3,1	30,1
B4	S4_13226667_x	57,7	6,246**	8,42	2,60	32,1	0,808	9,42	3,1	40,1
B4	S4_14541399	66,5	0,898	5,67	2,60	28,6	0,416	8,69	3,1	44,1
B4	CPSC005	71,0	0,715	5,58	2,60	30,1	0,919	8,80	3,1	47,1
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C4	UDAp439	36,5	34,382*****	8,41	2,5	26,8	37,046*****	10,97	3,3	32,8
C4	S4_9061773	40,6	26,513*****	7,23	2,5	23,5	34,798*****	12,02	3,3	35
C4	S4_10035210	41,7	26,413*****	7,31	2,5	23,7	25,019*****	11,06	3,3	32,7
C4	S4_13226667_y	49,4	35,8*****	7,49	2,5	24,1	36,921*****	8,88	3,3	27,3
C4	UDAp416	65,3	11,943*****	3,12	2,5	15,3	18,826*****	6,03	3,3	22,9

**Tabla 6.17.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de firmeza del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

'Goldrich' x 'Currot'										
Firmeza										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
G1	UDAp415	10,9	9,142****	3,26	3,9	10,7	7,851***	3,34	3,2	12,1
G1	PGS1.21	12,2	17,873*****	3,45	3,9	10,2	18,008*****	3,51	3,2	10,2
G1	PGS1.24	15,3	19,030*****	3,24	3,9	9,0	12,697***	2,50	3,2	7,0
G1	S1_9687151	17,8	8,013****	3,58	3,9	10,4	5,298**	2,47	3,2	7,1
G1	S1_13282432	21,9	15,396*****	4,21	3,9	12,7	9,435****	2,51	3,2	7,5
G1	S1_14071595	23,4	11,973*****	3,35	3,9	10,5	9,270****	2,49	3,2	7,8
G1	S1_17542722	26,3	2,468	4,23	3,9	11,7	3,615	2,98	3,2	8,3
G1	UDAp426	27,6	12,298*****	3,82	3,9	10,8	8,680****	2,81	3,2	7,9
G1	S1_23746169	28,7	10,292****	3,43	3,9	9,7	4,649**	2,61	3,2	7,6
G1	UDAp414	32,3	10,846*****	3,20	3,9	10,4	7,730***	2,81	3,2	9,7
G1	S1_27742963	35,4	10,652****	3,66	3,9	11,8	17,601*****	4,19	3,2	11,5
G1	S1_38382339	64,9	4,334**	2,55	3,9	17,8	7,411***	3,25	3,2	20,1
G2	UDAp406	0,0	1,086	0,74	3,2	2,7	8,299****	3,33	2,9	10,6
G2	S2_9011704	4,4	0,693	0,60	3,2	2,5	9,270**	3,56	2,9	11,2
G2	S2_972162	9,5	2,907	0,58	3,2	1,7	14,394*****	4,26	2,9	12,4
G2	S2_2396072	12,0	2,467	1,25	3,2	10,8	15,835*****	4,27	2,9	15,5
G2	S2_8280543	21,3	3,853	1,16	3,2	3,3	13,598****	4,94	2,9	15,8
G2	S2_12550486	25,5	4,24	1,00	3,2	2,9	12,213****	5,24	2,9	15,4
G2	UDAp428	25,9	1,322	1,80	3,2	6,3	23,570*****	5,04	2,9	15,1
G2	UDAp456	33,9	3,161*	1,63	3,2	6,6	23,785*****	7,12	2,9	21,0
G2	S2_18992724	35,7	6,421**	1,49	3,2	4,4	22,388*****	7,65	2,9	21,5
G3	UDAp423	0,0	13,052****	4,05	2,6	12,1	6,763*	1,84	2,5	5,8
G3	S3_12023722	10,4	14,203*****	4,45	2,6	13,1	4,404**	2,82	2,5	9,5
G3	S3_13001567	15,5	21,883*****	5,97	2,6	16,5	7,408***	3,85	2,5	11,8
G3	S3_13711279	19,5	5,516*	6,78	2,6	20,9	2,422	4,01	2,5	13,0
G3	PaCITA10	24,9	18,588*****	3,75	2,6	12,0	14,628****	3,54	2,5	10,3
G3	S3_17969374	40,3	30,972*****	8,38	2,6	23,5	5,812**	3,89	2,5	19,2
G3	S3_18629805	43,3	26,270*****	7,46	2,6	22,8	7,164***	4,20	2,5	21,5
G6	S6_1754449	0,9	6,735***	5,07	2,8	31,4	3,234*	2,82	2,9	14,7
G6	S6_5217065	4,6	5,857**	5,23	2,8	33,6	4,186**	3,47	2,9	15,6
G6	S6_7361516	12,3	6,428**	3,72	2,8	16,8	4,312**	3,18	2,9	12,2

**Tabla 6.17 (continuación).** Marcadores más importantes ligados a QTLs de firmeza del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C1	PGS1.21	16,5	17,873*****	4,40	3,1	12,5	18,008*****	3,64	2,6	11,2
C1	PGS1.24	20,6	19,030*****	1,85	3,1	6,2	12,697***	2,6	2,6	7,7
C2	S2_972162	5,5	2,907	1,37	3,2	4,0	14,394*****	4,17	2,9	11,4
C2	S2_8280543	16,6	3,853	1,23	3,2	3,5	13,598****	7,45	2,9	19,2
C2	S2_12550486	21,1	4,24	1,03	3,2	3,0	12,213****	7,64	2,9	21,8
C2	S2_18992724	38,6	6,421**	1,67	3,2	5,6	22,388*****	5,82	2,9	17,7
C3	UDAp423	30,0	13,052****	3,31	3,5	10,1	6,763*	2,24	2,8	6,8
C3	S3_6312135	35,5	5,051**	3,61	3,5	13,9	3,158*	3,53	2,8	26,5
C3	S3_10315819	41,9	6,596**	2,45	3,5	11,4	9,232****	5,31	2,8	28,3
C3	S3_9642593	41,9	6,501**	2,44	3,5	11,4	9,672****	5,31	2,8	28,3
C3	S3_13711279	44,8	5,516*	7,40	3,5	19,4	2,422	4,25	2,8	11,7
C3	S3_14518113	46,1	6,193**	4,05	3,5	17,4	11,531*****	3,93	2,8	14,9
C3	PaCITA10	48,6	18,588*****	4,83	3,5	13,2	14,628****	2,97	2,8	8,6
C3	S3_15588939	51,6	4,228**	5,58	3,5	16,3	7,928****	3,58	2,8	10,1
C3	S3_16114753	53,7	2	4,67	3,5	14,9	5,867**	2,61	2,8	7,7
C3	S3_21206814	81,0	1,829	4,01	3,5	28,5	2,974*	2,75	2,8	19,2
C4	S4_9061773_y	35,2	7,177***	2,68	3	12,9	8,361****	2,32	2,6	7,7
C4	S4_10035210	39,2	16,072*****	3,19	3	8,7	3,781	2,76	2,6	10,7
C4	UDAp439	41,4	10,342**	2,29	3	6,5	12,619***	2,77	2,6	7,7

En los mapas de la población 'G×C', se detectaron QTLs de firmeza a lo largo de los LG 1, 2, 3, 4 y 6 (Tabla 6.17). En este caso la influencia del LG 4 sobre este carácter es mucho menor debido probablemente al distinto modo de herencia de ambos parentales. En 'Goldrich' podemos destacar que en el LG 1 casi todos los marcadores están implicados en este carácter con valores de LOD en torno a 3 y 4 en ambos años. Mientras tanto, al final del LG 2 en la posición del SNP S2\_18992724 se llega a un LOD máximo de 7,65, siendo significativo sólo en 2013. En el LG 3 los QTLs ligados a firmeza parecen más estables entre años, coincidiendo en zonas similares a los QTLs detectados previamente para color de piel, situándose los valores de LOD más altos en torno a la zona media (S3\_13001567 y S3\_13711279) y final (S3\_17969374 y S3\_18629805). También en el LG 6 fueron localizados QTLs en torno a los SNPs S6\_1754449, S6\_5217065 y S6\_7361516 (Tabla 6.17).

En 'Currot', podemos destacar la influencia en el LG 1 de los marcadores PGS1.21 y PGS1.24 sobre la firmeza del fruto, mientras que en la zona media del LG 2 se corresponde con los S2\_8280543 y S2\_12550486 y al final con el S2\_18992724 para el año 2013. En el LG3 como hemos descrito con anterioridad se obtienen diversos QTLs en ambos años sobre todo en la zona media del cromosoma en torno a los SNPs S3\_9642593, S3\_13711279 y S3\_14518113 (Tabla 6.17).

En este caso no son muchos los autores que indican QTLs de firmeza del fruto, destacando sólo los trabajos publicados en melocotonero por Cantín y col. (2010) y Ogundiwin y col. (2009), que identificaron QTLs en los LG 1, 4, 5, 7 y 8 de melocotonero, lo que indica su carácter poligénico.

#### 6.4.2.7. Contenido en sólidos solubles

El contenido en azúcares es un parámetro de especial relevancia en la calidad del fruto, que junto con su acidez aportan un mayor o menor equilibrio al sabor de la pulpa, influyendo por tanto en la percepción gustativa del consumidor. La mayoría de los autores citados previamente, describen QTLs asociados al contenido de sólidos solubles totales, sacarosa, fructosa o glucosa desde el LG 1 al 8 en melocotonero (Abbot y col., 1998; Dirlewanger y col., 1999; Quarta y col., 2000; Verde y col., 2002; Etienne y col., 2002; Quilot y col., 2004; Cantín y col., 2010; Illa y col., 2011 y Eduardo y col., 2011). En el caso de otras especies como el cerezo, Wang y col. (2000) detectan QTLs en los LG 6 y 7, mientras que en albaricoquero Ruiz y col. (2010b) lo hacen en los LG 3 y 4. Por nuestra parte, el análisis de QTLs realizado en este trabajo en la población 'Z701-1' × 'Palsteyn' (Capítulo 4) reveló QTLs ligados a sólidos solubles en los LG 3, 4 y 5.

**Tabla 6.18.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de sólidos solubles mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C).

'Bergeron' × 'Currot'										
Sólidos solubles										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
B4	UDP003	37,4	0,268	6,47	2,80	32,6	2,185	8,91	2,9	42,7
B4	UDAp439	43,0	25,124*****	7,32	2,80	24,2	34,555*****	8,22	2,9	26,6
B4	S4_10035210	47,6	13,689****	7,84	2,80	25,6	30,863*****	9,93	2,9	30,8
B4	S4_13226667_x	57,7	0,086	7,34	2,80	31,8	1,195	9,74	2,9	41,6
B4	S4_14541399	66,5	0,158	7,14	2,80	36,6	0,625	9,03	2,9	44,1
B4	CPST005	71,0	0,004	6,59	2,80	38,4	0	8,50	2,9	45,3
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C4	UDAp439	36,5	25,124*****	7,25	2,7	23,9	34,555*****	8,07	2,8	26,2
C4	S4_9061773	40,6	15,461*****	7,03	2,7	23	24,05*****	8,65	2,8	27,3
C4	S4_10035210	41,7	13,689****	6,95	2,7	22,8	30,863*****	9,07	2,8	28
C4	S4_13226667_y	49,4	20,281*****	5,08	2,7	17	28,087*****	6,95	2,8	22,7

A partir de los resultados obtenidos en las poblaciones 'B×C' y 'G×C', el carácter contenido en sólidos solubles parece encontrarse estrechamente influenciado mayoritariamente por el LG 4.

En la población 'BxC', tanto en 'Bergeron' como en 'Currot' destacan sobre todo los marcadores UDAp439 y S4\_10035210 con valores de LOD entre 7 y 10 siendo muy significativos en ambos años. Además también se observa la influencia de otros SNPs situados en zonas próximas como son el S4\_9061773 y S4\_13226667\_y de 'Currot' con valores de LOD similares (Tabla 6.18 y Figura 6.6).

**Tabla 6.19.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de sólidos solubles mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Goldrich' (G) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

'Goldrich' × 'Currot'										
Sólidos solubles										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
G2	S2_9011704	4,4	8,334**	2,08	2,9	6,8	1,549	2,68	2,9	9,7
G2	S2_972162	9,5	7,658**	1,79	2,9	5,2	13,579****	3,93	2,9	10,8
G2	UDAp456	33,9	0,72	2,55	2,9	9,1	12,148*****	3,62	2,9	11,8
G2	S2_18992724	35,7	3,975	1,50	2,9	4,3	10,351***	3,25	2,9	9,4
G3	S3_17969374	40,3	3,124*	2,21	2,6	12,3	3,455*	3,22	2,5	15,9
G3	S3_18629805	43,3	3,578*	2,24	2,6	13,2	5,364**	3,56	2,5	18,3
G4	UDAp480	0,0	17,644*****	2,93	2,8	9,3	13,002****	1,29	2,7	4,3
G4	UDP003	21,9	11,757*****	6,34	2,8	23,3	14,878*****	9,98	2,7	32,4
G4	S4_10035210	27,5	36,124*****	7,59	2,8	19,5	38,815*****	9,04	2,7	22,7
G4	UDAp439	29,4	32,402*****	7,21	2,8	23,7	31,820*****	7,29	2,7	20,8
G4	S4_11947345	35,9	18,734*****	6,38	2,8	19,1	18,403*****	8,69	2,7	25,6
G4	S4_19301972	42,2	19,578*****	6,23	2,8	17,3	17,830*****	8,89	2,7	25,6
G4	UDAp416	44,5	26,824*****	6,56	2,8	21,0	26,359*****	7,41	2,7	20,7
G4	CPST005	48,0	9,610****	5,01	2,8	19,8	12,122*****	7,43	2,7	23,2
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl13
C2	S2_972162	5,5	7,658**	2,85	2,9	8,1	13,579****	4,04	3	11,0
C2	S2_7309483	15,2	13,843*****	4,16	2,9	12,5	13,488*****	3,21	3	9,2
C2	S2_8280543	16,6	3,36	3,03	2,9	8,6	2,134	4,17	3	11,6
C2	S2_12550486	21,1	1,678	2,65	2,9	8,8	2,065	3,49	3	10,4
C2	S2_18992724	38,6	3,975	3,07	2,9	11,9	10,351***	2,44	3	6,8
C3	S3_10315819	41,9	4,653**	1,33	3	4,1	15,495*****	4,20	2,9	19,6
C3	S3_9642593	41,9	4,683**	1,33	3	4,1	14,498*****	4,20	2,9	19,6
C3	S3_13711279	44,8	2,725	1,25	3	3,5	7,742**	4,00	2,9	10,9
C3	S3_14518113	46,1	3,931**	1,05	3	3,8	15,941*****	3,98	2,9	13,5
C3	S3_15588939	51,6	2,515	0,74	3	2,2	14,278*****	3,77	2,9	10,4
C3	S3_16114753	53,7	3,288*	0,83	3	2,4	13,257*****	3,31	2,9	9,3
C4	UDAp480	13,2	17,644*****	3,11	2,9	9,5	13,002****	1,09	2,8	3,4
C4	S4_9061773_y	35,2	18,606*****	6,35	2,9	20,8	25,415*****	8,51	2,8	26,2
C4	S4_10035210	39,2	36,124*****	7,78	2,9	20,1	38,815*****	9,55	2,8	24,4
C4	UDAp439	41,4	32,402*****	7,91	2,9	22,4	31,820*****	8,85	2,8	23,3
C4	S4_13226667_y	50,5	10,825****	5,81	2,9	17,8	18,198*****	7,21	2,8	20,4
C4	UDAp416	58,6	26,824*****	6,67	2,9	20,0	26,359*****	8,37	2,8	23,1

En la población 'GxC', los LG 2 y 3 también parecen estar implicados en este carácter, aunque debemos destacar que la mayoría de los marcadores para estos grupos obtuvieron valores de LOD poco relevantes, siendo igualmente el LG 4 el de mayor influencia en este carácter (Tabla 6.19 y Figura 6.7).

Así pues, podemos confirmar que todos los SNPs circundantes al marcador UDAp439 presentan una estrecha relación con sólidos solubles como los ya mencionados S4\_9061773\_y, S4\_10035210 o el S4\_11947345 con valores de LOD que oscilan entre 6 y 9 y un porcentaje de la variación del carácter en torno al 20 % (Tabla 6.19 y Figura 6.7). Además, debemos resaltar que aguas arriba y abajo de la posición del S4\_9061773 son localizados los transcritos ppa001122m y ppa000854m, los cuales se caracterizan por su función en la unión de di-glucosas dentro del retículo endoplasmático de melocotonero (Tabla 6.22), lo que puede justificar la presencia de este QTL.

#### 6.4.2.8. Acidez del fruto

En cuanto a la acidez, al igual que en la mayoría de los caracteres evaluados, diversos autores localizan QTLs en prácticamente todos los grupos de ligamiento en melocotonero (Dirlewanger y col., 1999; Etienne y col., 2002; Quilot y col., 2004; Cantín y col., 2010 y Eduardo y col., 2011). En albaricoquero, Ruiz y col. (2010b) localizan QTLs de acidez en los LG 6, 7 y 8. El análisis de QTLs de la población 'Z701-1' × 'Palsteyn' de este trabajo (Capítulo 4) mostró varios QTLs asociados a acidez en los LG 1, 2 y 4. En el caso de la población 'B×C' se detectaron diferentes QTLs ligados a acidez en los LG 1 y 8 (Tablas 6.20).

**Tabla 6.20.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de acidez del fruto mediante análisis 'Interval-mapping' (LOD) y 'Kruskal-Wallis' (KW) de los parentales 'Bergeron' (B) y 'Currot' (C) para los años 2012 y 2013.

'Bergeron' × 'Currot'										
Acidez										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl,13
B1	UDAp440	0,0	9,535**	2,63	3,1	10,2	11,789***	2,68	3,3	9,4
B1	S4_16590520	15,6	7,205**	2,80	3,1	15,6	3,403	2,98	3,3	14,3
B1	S1_5542439	17	8,142**	2,86	3,1	15,5	1,963	3,01	3,3	15,2
B1	UDAp415	21,1	9,847****	3,58	3,1	17,2	8,987****	3,11	3,3	12,8
B8	S8_13630387	0,0	9,778****	3,47	3,5	33,2	13,029*****	4,71	3,1	45,8
B8	UDAp470	10,1	1,737	4,91	3,5	25	0,557	5,02	3,1	26,1
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl,13
C1	UDAp440	0,0	9,535**	2,62	3,3	9,6	11,789***	2,92	3,4	10,1
C8	S8_4773161	0,0	5,818**	1,49	3,8	9,9	6,518**	4,10	3,6	59,4
C8	S8_5519883	3,1	6,858***	1,68	3,8	9,6	8,655****	3,46	3,6	59
C8	S8_17732612	40,2	5,710**	2,19	3,8	13,1	9,243****	2,35	3,6	9,8

En ‘Bergeron’ destaca sobre todo el QTL situado al principio del LG 1 en torno al UDAp415 que es significativo en ambos años, aunque sin duda el más importante se encuentra en torno al SNP S8\_13630387 del LG 8 llegando a explicar el 45,8 % de la variación del carácter en 2013. En ‘Currot’ observamos también la influencia de los LG 1 y 8 sobre este carácter, destacando sobre todo los SNPs S8\_4773161 y S8\_5519883 en el año 2013, que llegan a explicar casi el 60 % de la variación del mismo (Tabla 6.20).

En la población ‘G×C’, al igual que en ‘B×C’, se observan diferentes QTLs cuyo grado de significación varía según las variaciones interanuales. En este caso, encontramos QTLs en los grupos 2, 4, 5 y 8 (Tabla 6.21), destacando como los más importantes los obtenidos en los LG 2 y 8 de ambos parentales. En el caso de ‘Goldrich’, los marcadores UDAp456 y S2\_18992724 son los más significativos con valores de LOD entre 6 y 7 en 2013 y un porcentaje de la variación del carácter de un 20 %, resultados similares fueron obtenidos en el caso de ‘Currot’ para el S2\_18992724. En el LG 8, de ‘Goldrich’ destacan los marcadores S8\_5519883, UDAp470, S8\_15339816 y UDP98409 para el año 2013, obteniendo valores de LOD superiores a 5 en el caso del S8\_15339816, mientras que en ‘Currot’ destacamos sobre todo el S8\_17732612 situado al final del cromosoma con un LOD entre 5 y 7 en ambos años (Tabla 6.21).

**Tabla 6.21.** Marcadores más importantes ligados a QTLs de acidez del fruto mediante análisis ‘Interval-mapping’ (LOD) y ‘Kruskal-Wallis’ (KW) de los parentales ‘Goldrich’ (G) y ‘Currot’ (C) para los años 2012 y 2013.

‘Goldrich’ × ‘Currot’										
Acidez										
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl,13
G2	S2_12550486	25,5	7,744**	1,89	3	5,3	12,493****	3,15	2,9	9,1
G2	UDAp428	25,9	2,635	1,64	3	5,9	15,497*****	3,50	2,9	11,5
G2	UDAp456	33,9	9,261****	3,61	3	13,8	28,332*****	6,92	2,9	21,2
G2	S2_18992724	35,7	7,254**	3,07	3	9,3	20,232*****	7,35	2,9	20,3
G4	UDAp416	44,5	14,750****	3,26	2,7	10,2	5,18	1,69	2,8	5,4
G5	S5_13966692	17,1	12,365****	3,25	2,9	10,7	4,438	3,43	2,6	16,3
G8	S8_5519883	0,0	8,284**	2,95	2,6	8,9	18,308*****	4,74	2,5	16,1
G8	UDAp470	12,0	7,580*	1,36	2,6	4,4	17,783*****	3,42	2,5	11,3
G8	S8_15339816	21,0	0,958	3,75	2,6	18,0	6,631**	5,34	2,5	22,4
G8	UDP98409	33,8	14,603****	2,85	2,6	9,9	19,538*****	3,42	2,5	12,2
LG	Marcador	Posición (cM)	KW12	LOD12	LODmin12	%expl12	KW13	LOD13	LODmin13	%expl,13
C2	S2_8280543	16,6	5,009*	2,52	2,8	7,2	10,967****	7,01	2,9	18,4
C2	S2_12550486	21,1	7,744**	2,87	2,8	8,5	12,493****	7,17	2,9	20,7
C2	S2_18992724	38,6	7,254**	2,42	2,8	7,4	20,232*****	6,06	2,9	18,3
C4	S4_13226667_y	50,5	9,117****	2,41	2,8	7,5	9,200****	2,14	2,9	6,3
C4	UDAp416	58,6	14,750****	2,52	2,8	8,9	5,018	1,33	2,9	4,1
C5	S5_13966692	31,1	12,365****	2,86	3	7,9	4,438	1,48	2,9	5,5
C8	S8_4773161	0,0	8,571****	2,84	2,6	8,6	11,410*****	4,19	2,7	12,6
C8	S8_5519883	3,8	8,284**	2,74	2,6	7,6	18,308*****	4,44	2,7	11,9
C8	UDAp470	17,7	7,580*	1,63	2,6	6,0	17,783*****	3,52	2,7	12,9
C8	UDP98409	42,5	14,603****	4,92	2,6	13,6	19,538*****	7,27	2,7	19,5
C8	S8_17732612	44,8	24,097*****	5,64	2,6	15,4	30,779*****	7,86	2,7	20,8

Como hemos visto es difícil precisar una zona más específica del LG 8 relacionada con la acidez del fruto, por lo que sería necesario en este y otros casos saturar con un mayor número de marcadores estas zonas del genoma, intentando así localizar locus más específicos que nos aporten una mayor información del carácter, aunque todo parece indicar que el LG 8 es uno de los más importantes implicados en la acidez de albaricoquero. Así pues, tal como revelan los resultados relativos a la identificación de QTLs, los LG 2 y LG 8 se perfilan como los más implicados en cuanto al contenido en ácido málico en albaricoquero. En la *Tabla 6.22* a partir de la secuencia conocida del melocotonero se describen los genes que ocupan las posiciones más próximas a los SNPs ligados con este carácter.

**Tabla 6.22.** Posición de los SNPs ligados con los QTLs más importantes de calidad del fruto en las poblaciones de albaricoquero 'BxC' y 'GxC' y funciones descritas en los genes de melocotonero circundantes a estas posiciones.

Locus	QTL relacionado	Transcrito de melocotonero más cercano	Longitud (Mpb)	Características funcionales
S1_14071595	BLSC	ppa017701m	14060290 - 14062417	BED zinc finger/hAT family C-terminal dimerisation region
		ppa001589m	14069528 - 14079983	HIRAN domain
		ppa025266m	14082918 - 14084264	Plant organelle RNA recognition domain
S1_20067081	BLSC	ppa017754m	20045598 - 20049412	DNA-damage-inducible protein F/Multidrug resistance protein
		ppa003218m	20062602 - 20070471	Sas10/Utp3/C1D family/Sas10 C-terminal domain
		ppa013515m	20072068 - 20074512	Mitochondrial ribosomal protein L51 / S25 / CI-B8 domain
S1_38382339	BD, FW, SW y CAL	ppa017996m	38377286 - 38380565	Phospholipase/Carboxylesterase
		ppa001375m	38381947 - 38386983	Tesmin/TSO1-like CXC domain, cysteine-rich domain
		ppa020390m	38389458 - 38393842	D-mannose binding lectin/Protein tyrosine kinase/PAN-like domain
S2_12550486	SW y MALIC	ppa014988m	12547893 - 12548501	Información no disponible
		ppa014758m	12549892 - 12551602	NPH3 family/BTB/POZ domain
		ppa021714m	12552596 - 12553117	Información no disponible
S2_18992724	SW y MALIC	ppa021542m	18983585 - 18986089	Protein of unknown function (DUF1221)/Protein tyrosine kinase
		ppa014569m	18987355 - 18993528	Protein kinase domain/WD domain, G-beta repeat
		ppa007790m	18995535 - 18999459	Mitochondrial carrier protein
S3_17969374	SKC y FIRM	ppa011873m	17966204 - 17967408	Plastid and cyanobacterial ribosomal protein (PSRP-3 / Ycf65)
		ppa002941m	17969344 - 17973001	Oxidoreductase NAD-binding domain/Flavodoxin/FAD binding domain
		ppa024851m	17985113 - 17986498	F-box domain/F-box associated
S3_18629805	SKC y FIRM	ppa010548m	18619188 - 18623759	SRF-type transcription factor (DNA-binding and dimerisation domain)
		ppa026503m	18629652 - 18630269	Información no disponible
		ppa016385m	18630946 - 18633249	Myb-like DNA-binding domain
S3_21206814	SKC y FIRM	ppa005942m	21204448 - 21206649	Transcription factor GT-2 and related proteins
		Región intergénica	21206814	Información no disponible
		ppa22368m	21207369 - 21209521	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Fuente: [www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)

QTL relacionado: BD (Fecha de floración), RT (Fecha de maduración), FDP (ciclo de desarrollo del fruto), FW (peso del fruto), SW (peso del hueso), CAL (calibre), SKC (color de piel), BLSC (color de chapa), FLSC (color de pulpa), FIRM (firmeza), SS (sólidos solubles) y MALIC (acidez).

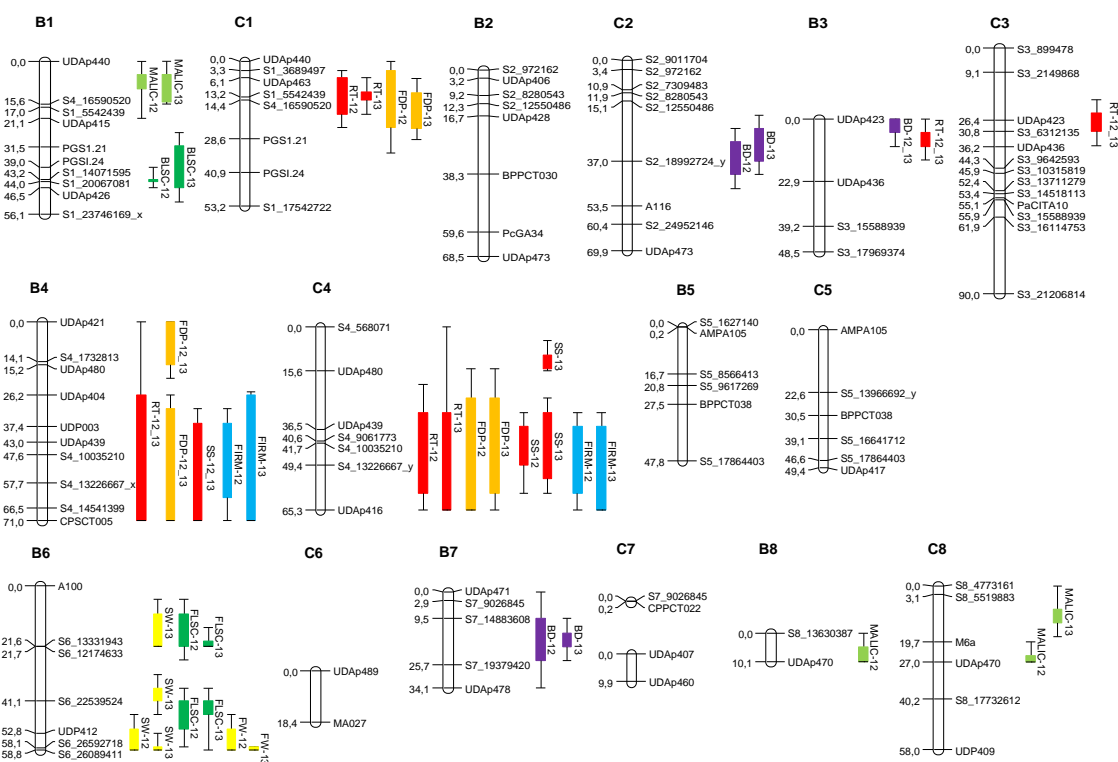
**Tabla 6.22 (continuación).** Posición de los SNPs ligados con los QTLs más importantes de calidad del fruto en las poblaciones de albaricoquero 'BxC' y 'GxC' y funciones descritas en los genes de melocotonero circundantes a estas posiciones.

Locus	QTL relacionado	Transcrito de melocotonero más cercano	Longitud (Mpb)	Características funcionales
S4_90617773	BD, RT, FDP y SS	ppa001122m	9049348 - 9057059	Di-glucose binding within endoplasmic reticulum
		Región intergénica	90617773	Información no disponible
		ppa000854m	9063942 - 9070864	Di-glucose binding within endoplasmic reticulum
S4_10035210	BD, RT, FDP y SS	ppa5857m	10031313 - 10034794	RNA recognition motif. (a.k.a. RRM, RBD, or RNP domain)
		Región intergénica	10035210	Información no disponible
		ppa002347m	10040041 - 10044831	Putative Fiber Fb32-like protein isoform 3 (Rice gaas)
S4_11947345	BD, RT, FDP y SS	ppb017674m	11941734 - 11942033	Hypothetical protein (Rice gaas)
		ppb001660m	11946401 - 11949741	PAN-like domain/D-mannose binding lectin
		ppa014995m	11950657 - 11953401	PAN-like domain/Protein tyrosine kinase
S4_13226667	BD, RT, FDP y SS	ppa007580m	13215524 - 13216670	Información no disponible
		ppa001697m	13226283 - 13231115	Hsp70 protein
		ppa024431m	13231904 - 13235323	Putative uncharacterized protein (Rice gaas)
S4_14541399	RT, FDP y SS	Región intergénica	14541399	Información no disponible
		ppa008138m	14552382 - 14555701	SWIB/MDM2 domain/DEK C terminal domain
		ppa009618m	19295670 - 19301964	NAD dependent epimerase/dehydratase family
S4_19301972	BD, RT, FDP y SS	Región intergénica	19301972	Información no disponible
		ppa004631m	19320304 - 19321864	Lipase (class 3)
		ppa018852m	12163079 - 12164904	Información no disponible
S6_12174633	SW y FLSC	ppa006299m	12173500 - 12175671	DnaJ C terminal domain/DnaJ central domain/DnaJ domain
		ppa009205m	12176708 - 12182357	Protein tyrosine kinase
		ppa017999m	13327555 - 13330212	NB-ARC domain
S6_13331943	SW y FLSC	ppa008870m	13330802 - 13334753	Nse1 non-SMC component of SMC5-6 complex/RING-like domain
		ppa011041m	13344667 - 13349077	Información no disponible
		ppa014793m	22530457 - 22531065	Información no disponible
S6_22539524	FW, SW, y FLSC	ppa020794m	22536185 - 22539655	Protein of unknown function (DUF3741)
		ppa015372m	22546621 - 22549793	Protein kinase domain/Leucine Rich Repeat
		ppa1027138m	26588870 - 26589472	C2 domain
S6_26592718	FW, SW, y FLSC	ppa000687m	26590512 - 26595211	PWWP domain
		ppa002406m	26597166 - 26603335	Acyl CoA binding protein/Kelch motif
		ppa006842m	14872826 - 14874322	Exostosin (Heparan Sulfate Glycosyl Transferase)-Related
S7_14883608	BD	ppa024044m	14881427-14884144	PPR repeat
		ppa000451m	14885315 - 14895639	E3 ubiquitin protein ligase. Acid-amino acid ligase activity
		ppa004267m	19365490 - 19370784	Protein kinase C terminal domain. Protein kinase domain
S7_19379420	BD	ppa004524m	19377810 - 19379508	Predicted transposase
		ppa011566m	19384218 - 19385525	Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase superfamily
		ppa022734m	4770134 - 4771864	PPR repeat
S8_4773161	MALIC	ppb009745m	4772535 - 4774941	Fatty acid hydroxylase superfamily
		ppa024206m	4777511 - 4778185	Sterol desaturase/ Sur2 hydrolase desaturase
		ppa024189m	5482363 - 5484048	PPR repeat
S8_5519883	MALIC	ppa000155m	5514026 - 5522452	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase
		ppa017716m	5523267 - 5523914	Protein of unknown function (DUF679)
		ppa007583m	13622033 - 13625164	Tetratricopeptide repeat/Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans
S8_13630387	MALIC	ppa005336m	13627785 - 13631045	Uncharacterized conserved protein
		ppa026021m	13633149 - 13633945	Plastocyanin-like domain
		ppa009746m	15337407 - 15339680	Interferon-related developmental regulator (IFRD)
S8_15339816	MALIC	Región intergénica	15339816	Información no disponible
		ppb014229m	15343438 - 15344109	UEV domain
		ppa008449m	17728807 - 17730539	CRS1 / YhbY (CRM) domain
S8_17732612	MALIC	Región intergénica	17732612	Información no disponible
		ppa012572m	17737096 - 17737822	Subfamily not named



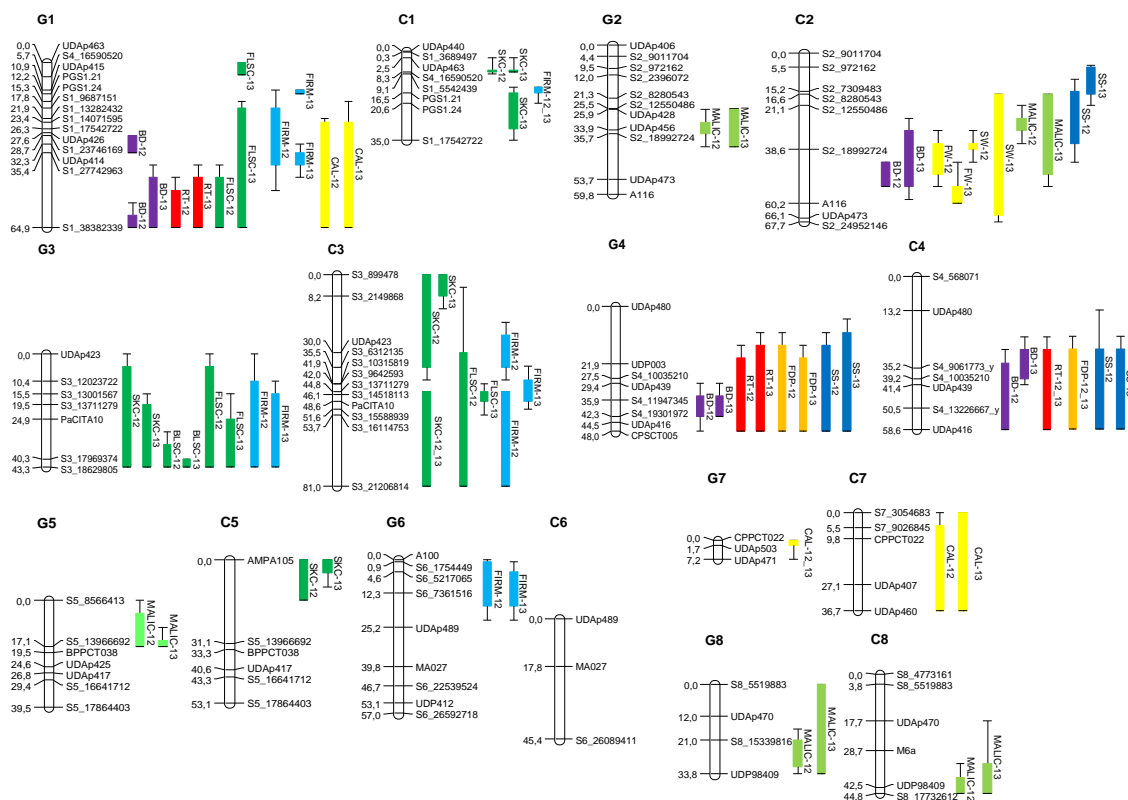
### 6.4.2.9. Resumen de QTLs identificados

Finalmente, una vez analizados todos los QTLs obtenidos a lo largo del genoma de las 2 poblaciones de albaricoquero ‘Bergeron’ × ‘Currot’ y ‘Goldrich’ × ‘Currot’, podemos concluir que los QTLs más importantes se obtienen en el LG 4, destacando fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto y contenido en sólidos solubles en ambas poblaciones, al igual que ocurría en la población ‘Z×P’ en el Capítulo 4 (Figuras 6.8 y 6.9). Otros QTLs importantes en la población ‘B×C’ están relacionados con fecha de floración en los LG 2 y 7, color de pulpa en el LG 6 al igual que en la población ‘Z×P’, así como la influencia sobre el peso del fruto en este mismo grupo y población (Figura 6.8).



**Figura 6.8.** QTLs más representativos (en 2 años de fenotipado) para un LOD superior a 3 en la población ‘Bergeron’ (B) × ‘Currot’ (C). El color violeta indica fecha de floración (BD); rojo, fecha de maduración (RT); naranja, ciclo de desarrollo del fruto (FDP); amarillo, peso del fruto, peso del hueso y calibre (FW, SW y CAL); verde oscuro, color del fruto (color de piel (SKC), chapa (BLSC) y color de pulpa (FLSC)); verde claro, acidez (MALIC); azul oscuro, contenido en sólidos solubles (SS); azul claro, firmeza (FIRM).

Además, en la familia 'GxC' se observan también QTLs significativos ligados al color de piel del fruto especialmente en el LG 3 (Figura 6.9), lo que indica la presencia de posibles genes mayores controlando este carácter. También observamos algunos QTLs importantes en el LG 1 de 'Goldrich' en cuanto a fecha de maduración, color del fruto, firmeza y calibre, así como también la influencia sobre acidez del fruto en los LG 2 y 8 (Figura 6.9).



**Figura 6.9.** QTLs más representativos (en 2 años de fenotipado) para un LOD superior a 3 en la población 'Goldrich' (G) x 'Currot' (C). El color violeta indica fecha de floración (BD); rojo, fecha de maduración (RT); naranja, ciclo de desarrollo del fruto (FDP); amarillo, peso del fruto, peso del hueso y calibre (FW, SW y CAL); verde oscuro, color del fruto (color de piel (SKC), chapa (BLSC) y color de pulpa (FLSC)); verde claro, acidez (MALIC); azul oscuro, contenido en sólidos solubles (SS); azul claro, firmeza (FIRM).

A la vista de los resultados obtenidos, el enfoque que nos podría aportar mayores éxitos en esta línea de investigación, sería la búsqueda de los genes implicados en la maduración y el color del fruto de la especie albaricoquero en los LG 4 y LG 3 respectivamente (Figuras 6.8 y 6.9).

Ambos caracteres son de especial relevancia, por un lado fecha de maduración determina una cosecha más temprana o tardía, carácter muy importante en la búsqueda de selecciones que amplíen el calendario productivo, mientras que el color del fruto es importante tanto por aportar un mayor atractivo para el consumidor, como por su relación directa con el contenido en compuestos carotenoides beneficiosos para la salud.

Por tanto, partiendo de la clara influencia de los LG 3 y LG 4 sobre la calidad del fruto de albaricoquero, nuestra estrategia queda orientada hacia la búsqueda de zonas del genoma más concretas que nos aporten mayor información en cuanto a los genes mayores que controlan los caracteres color del fruto y fecha de maduración, y poder así diseñar marcadores moleculares específicos que nos permitan la selección asistida a nivel de vivero de los genotipos más interesantes desde el punto de vista de la calidad del fruto.

Para ello, en primer lugar, sería necesaria la obtención de las secuencias de ADNc de los parentales implicados para diseñar SNPs que sean al 100 % polimórficos, saturando en nuestras poblaciones las regiones del genoma de los LG 3 y LG 4 más significativas en cuanto a color de piel y maduración. De esta manera pretendemos obtener mayores valores de significación de los QTLs, seleccionando regiones mucho más específicas a partir de las cuales podemos diseñar distintas combinaciones de marcadores moleculares y comprobar si la presencia o ausencia de ciertos alelos se corresponde con el polimorfismo fenotípico para estos caracteres.

Previamente a todo lo expuesto, podemos analizar y evaluar en nuestras poblaciones de albaricoquero los marcadores NAC diseñados por Pirona y col. (2013) para el LG 4 de melocotonero, ya que estos marcadores están diseñados en la misma región del QTL obtenida en nuestras poblaciones. Por tanto, si obtenemos polimorfismos con estos marcadores y éstos a su vez se corresponden con QTLs significativos, podríamos secuenciar el ADN resultante de estos fragmentos para comprobar si se trata de las mismas secuencias y por tanto de los mismos genes identificados en melocotonero.

## 6.5. Conclusiones

- I. El mapeo combinado con marcadores SSRs y SNPs, nos ha permitido por una parte comparar la ubicación y corroborar la sintenia de SSRs previamente diseñados y mapeados en otras especies del género *Prunus*, mientras que los SNPs nos han aportado una mayor abundancia e información en el genotipado.
- II. En las poblaciones 'B×C' y 'G×C' han sido mapeados un total de 87 marcadores (37 SSRs y 50 SNPs) en 'B×C' y 89 marcadores (35 SSRs y 54 SNPs) en 'G×C', que nos han permitido la construcción de los correspondientes mapas de ligamiento genético. La distancia media entre marcadores en la población 'B×C' fue de 7,59 cM en el mapa de 'Bergeron' y 7,53 cM en el mapa de 'Currot', mientras que en la población 'G×C' fue de 5,6 cM en el mapa de 'Goldrich' y 7,5 cM para 'Currot'.
- III. En fecha de floración destacamos sobre todo los QTLs del LG 7 en el caso de 'B×C' y el LG 4 en la población 'G×C'. La fecha de floración es un carácter muy dependiente de las variaciones interanuales y por ello diferentes autores relacionan este carácter con casi todos los grupos de ligamiento descritos en las diferentes especies de *Prunus*.
- IV. Los QTLs de mayor relevancia por su significación se dan en el LG 4, considerando este grupo de vital importancia para el control de fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto y contenido en sólidos solubles. Estos resultados coinciden con los descritos previamente tanto en albaricoquero como en melocotonero. En el intervalo del QTL de sólidos solubles, se localizan los genes ppa001122m y ppa000854m, que tienen una función de unión de di-glucosas a nivel del retículo endoplasmático, mecanismo relacionado con el contenido en sólidos solubles.
- V. Peso del fruto, peso del hueso y calibre son parámetros muy relacionados entre sí, identificando los QTLs más importantes para peso del fruto y peso del hueso en el LG 6 de la población 'B×C', mientras que en el LG 2 de 'G×C' destacó el QTL asociado a peso del hueso. Además, se da la presencia de un importante QTL ligado a calibre al final del LG 1 de 'G×C'.

- VI.** Para el color del fruto y especialmente color de piel y pulpa son detectados QTLs al final del LG 3 de 'Goldrich' y en la zona media de 'Currot'. En el intervalo del QTL se localiza un gen *MYB* previamente descrito por otros autores en cerezo y manzano, lo que confirma la homología entre especies de diferente género en la familia *Rosaceae*. En la población 'B×C', el color de pulpa parece estar más relacionado con el LG 6.
- VII.** La firmeza es transmitida por 'Bergeron' en el LG 4, dándose una fuerte correlación con fecha de maduración. En 'G×C' encontramos los QTLs más importantes en los LG 1, LG 3 y LG 6, siendo este carácter heredado de forma conjunta con el color del fruto en el LG 3 de la población 'G×C'.
- VIII.** En cuanto a la acidez del fruto, destacamos los QTLs asociados al contenido de ácido málico de los grupos LG 2 y 8 de la población 'G×C' como los más importantes, siendo esta influencia menor en el caso de la población 'B×C', posiblemente debido a la mayor influencia del parental 'Goldrich' de elevada acidez.



## ***7. Conclusiones generales***





## 7. CONCLUSIONES GENERALES

- I. En el estudio de evaluación fenotípica y modo de herencia de las poblaciones de albaricoquero 'Z701-1' × 'Palsteyn' ('Z×P'), 'Bergeron' × 'Currot' ('B×C') y 'Goldrich' × 'Currot' ('G×C'), los resultados revelan una distribución normal de las descendencias para la mayoría de caracteres evaluados, lo que confirma el carácter poligénico y herencia cuantitativa de los caracteres relacionados con la fenología y calidad del fruto. Además, se ha obtenido una elevada variabilidad fenotípica en las tres familias estudiadas para todos los caracteres analizados, evidenciándose una gran segregación en las poblaciones. Asimismo, todos los caracteres evaluados son influenciados por variaciones interanuales, especialmente en el caso de fecha de floración y maduración.
- II. La presencia de valores transgresivos fuera del rango de los parentales en muchos de los caracteres evaluados, especialmente para el color del fruto en la población 'Z×P', revela la notable influencia del fondo genético de los parentales, el cual determina en gran medida la segregación obtenida en las descendencias estudiadas. Se observa también una mayor tendencia hacia floración tardía, sobre todo en el caso de la población 'B×C', así como también se observa una mayor influencia del carácter peso bajo del fruto en 'B×C' y 'G×C', procedente del parental 'Currot'.
- III. Los resultados revelaron una elevada correlación entre años de todos los caracteres evaluados, especialmente para fecha de floración, fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto, color del fruto y acidez. Con respecto a la correlación entre distintos caracteres, destacan las correlaciones entre fecha de floración y fecha de maduración, fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto, color de piel y color de pulpa o peso y calibre. Además, destaca la correlación positiva entre fecha de maduración y firmeza de la población 'B×C', debido al carácter tardío y elevada firmeza de 'Bergeron'.

- IV.** El uso combinado de la tecnología de secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-Seq), la técnica SNPlex y la espectrometría de masas, nos ha permitido el diseño de SNPs para el estudio de la diversidad genética de 37 variedades de albaricoquero con orígenes diversos, así como el genotipado de las poblaciones 'B×C' y 'G×C'. La heterocigosidad observada y poder de discriminación con los SNPs es mucho más bajo que en el caso de los marcadores tipo SSRs debido a la naturaleza bi-alélica de los mismos.
- V.** Se mostraron relaciones fenéticas y de distancia genética esperables entre los cultivares de albaricoquero ensayados acorde con el pedigrí y la procedencia de cada uno de ellos, siendo 'Orange Red' y 'Currot' dos de las variedades más alejadas genéticamente, observándose que la mayoría de los SNPs diseñados debían provenir de 'Orange Red', ya que la mayoría de variedades eran más cercanas a esta variedad que a 'Currot'. En definitiva, el uso de la tecnología SNPlex nos permite mayor flexibilidad, reproducibilidad y precisión en el genotipado de SNPs, tanto en regiones codificantes como no codificantes. Además, el uso de regiones codificantes de ADN nos permite conocer la función de algunos de los genes identificados en el genoma del melocotonero.
- VI.** En la población 'Z×P' fueron mapeados un total de 42 SSRs procedentes la mayoría de ellos de ADN genómico de albaricoquero (UDAp). La distancia media entre marcadores fue de 10,5 cM para 'Z701-1' y 9,5 cM para 'Palsteyn'. En las poblaciones 'B×C' y 'G×C' el uso combinado de marcadores SSRs y SNPs nos ha permitido establecer un primer marco de referencia mediante SSRs, así como una mayor saturación y precisión en el mapeo genético de las poblaciones con SNPs, utilizándose un total de 87 marcadores (37 SSRs y 50 SNPs) en 'B×C' y 89 marcadores (35 SSRs y 54 SNPs) en 'G×C'. La distancia media entre marcadores en la población 'B×C' fue de 7,59 cM en el mapa de 'Bergeron' y 7,53 cM en el mapa de 'Currot', mientras que en la población 'G×C' fue de 5,6 cM en el mapa de 'Goldrich' y 7,5 cM para 'Currot'.

- VII.** La ubicación en el genoma de la mayoría de los SSRs mapeados en las tres poblaciones se corresponde con la descrita por otros autores, así como la mayoría de los SNPs se ubicaron en torno a las posiciones en que habían sido diseñados, confirmando así la gran homología y sintenia entre especies del género *Prunus*. La construcción de los mapas de ligamiento genético en las poblaciones 'Z×P', 'B×C' y 'G×C' ha implicado el mapeo de marcadores moleculares no ubicados en el mapa de referencia de *Prunus*, lo que aporta nueva información sobre zonas no descritas en el genoma del albaricoquero. Además, la presencia de QTLs sobre marcadores previamente descritos por otros autores en otras especies del género *Prunus* confirma la elevada homología y sintenia entre las especies de este género.
- VIII.** Los QTLs de mayor relevancia por su significación se han identificado en el LG 4, considerando este grupo de vital importancia para el control de fecha de maduración, ciclo de desarrollo del fruto y contenido en sólidos solubles. Por tanto, el LG 4 se perfila como uno de los más importantes en la especie albaricoquero y el género *Prunus*, localizándose genes con función de unión de di-glucosas a nivel del retículo endoplasmático, mecanismo relacionado sin duda con el contenido en sólidos solubles. El LG 6 también ha sido relacionado en la población 'Z×P' con fecha de maduración y ciclo de desarrollo del fruto
- IX.** En la población 'Z×P', el carácter fecha de floración a pesar de su intermitencia entre años parece estar más relacionado con el LG 4 y LG 7. Mientras que en la población 'B×C' éste se relaciona más al LG 7 siendo el LG 4 el más importante para 'G×C'.
- X.** Peso del fruto y peso del hueso se relacionan con los LG 2 y 6 de la población 'B×C', siendo el LG 2 el de mayor influencia sobre peso del hueso en la población 'G×C'. También destaca la presencia de un importante QTL ligado a calibre del fruto al final del LG 1 de 'G×C'. El LG 3 parece estar especialmente relacionado con el color de piel y color de pulpa, sobre todo en la población 'G×C', lo que apuntaría a la posible presencia de genes *MYB* relacionados con el color del fruto al igual que los ya descritos previamente en cerezo y manzano. El LG 6 parece estar vinculado con el color de pulpa en las poblaciones 'Z×P' y 'B×C'.

- XI.** En cuanto al contenido de acidez, se observa la influencia de los LG 2 y LG 4 en la población 'Z×P', mientras que en la población 'G×C' los QTLs más significativos asociados al contenido de ácido málico fueron identificados en el LG 2 y LG 8, siendo este carácter más influenciado por el parental 'Goldrich' de elevada acidez. La firmeza es transmitida por 'Bergeron' en el LG 4 junto con fecha de maduración, mientras que en la población 'G×C' la firmeza o textura parece estar relacionada con los LG 1, LG 3 y LG 6, siendo este carácter heredado de forma conjunta con el color del fruto en el LG 3.





## ***8. General conclusions***





## **8. GENERAL CONCLUSIONS**

- I. In the phenotypic evaluation and inheritance analysis of apricot progenies 'Z701-1' × 'Palsteyn' ('Z×P'), 'Bergeron' × 'Currot' ('B×C') and 'Goldrich' × 'Currot' ('G×C'), results show a normal distribution in most of the evaluated traits as well as the polygenic nature and quantitative inheritance of agronomic traits related to phenology and fruit quality. In addition, high phenotypic variability was obtained in the three families studied for all traits analysed, showing great segregation in the progeny. Moreover, the traits studied are influenced by inter-annual variations due to environmental conditions, mainly in the cases of blooming date and ripening time.
- II. The presence of transgressive values out of the range of progenitors in many of the evaluated traits, especially for fruit colour in the 'Z×P' population, reveals the significant influence of the genetic background of the parents, which largely determines the segregation obtained in the progenies studied. In addition, late blooming has been observed to have a greater influence than early blooming, especially in the 'B×C' population. Furthermore, low fruit weight was observed to have a greater influence in the 'B×C' and 'G×C' populations from the parental 'Currot'.
- III. Results showed a high correlation between years in all evaluated traits, especially for blooming date, ripening time, fruit development period, fruit colour and acidity. In the correlations among traits we can highlight those between blooming date and ripening time, ripening time and fruit development period, fruit skin colour and flesh colour or fruit weight and fruit diameter. Moreover, results showed positive correlation between ripening time and firmness in the 'B×C' population due to late blooming date and high firmness from 'Bergeron'.

- IV.** The combination of high throughput sequencing of the transcriptome (RNA-Seq), SNPlex technology and detection by mass spectrometry has allowed us to design SNPs to study the genetic diversity of 37 apricot cultivars from diverse backgrounds as well as to genotype 'B×C' and 'G×C' populations. Additionally, the heterozygosity observed and power discrimination of SNPs was much lower than in SSR markers due to bi-allelic nature of SNPs.
- V.** Genetic distances and phenetic relationships were expected among apricot cultivars assessed in accordance with the pedigree and origin of each one of them, with 'Orange Red' and 'Currot' being two of the most genetically distant varieties, also showing that most SNPs designed should come from 'Orange Red', because most of the varieties were closer to this variety. Definitively, the use of the SNPlex technology allows us greater flexibility, repeatability and accuracy for genotyping SNPs using coding and non-coding regions. Furthermore, the use of DNA coding regions allows us to know the function of some genes identified in the peach genome.
- VI.** In the 'Z×P' population, 42 SSRs were mapped, most from apricot genomic DNA (UDAp). Average distance between markers was 10.5 cM and 9.5 cM for 'Z701-1' and 'Palsteyn' respectively. The combined use of SSR and SNP markers allowed for the establishment of a reference framework with SSRs as well as for major saturation and accuracy in genetic linkage maps with the use of SNPs in both populations, using 87 markers (37 SSRs and 50 SNPs) in 'B×C' and 89 markers in 'G×C' (35 SSRs and 54 SNPs). The average distance between markers were 7.59 and 7.53 cM in the 'Bergeron' and 'Currot' maps respectively; while in the 'G×C' population were 5.6 cM and 7.5 cM to 'Goldrich' and 'Currot' maps.

- VII.** The genome location in most of the mapped SSR markers was similar to that described by other authors and the majority of SNPs were located around the designed locus. Therefore, we can confirm the homology and synteny among species within the *Prunus* genus. In the construction of the Genetic Maps 'Z×P', 'B×C' and 'G×C' new markers not located previously in the *Prunus* reference map have been incorporated. Moreover, the presence of QTLs over markers previously described by other authors in different species of the *Prunus* genus again confirms the homology and synteny within this genus.
- VIII.** The most relevant QTLs were identified in the LG 4. This linkage group is therefore considered to be of great importance to ripening time, fruit development period and soluble solids content control. LG 4 is thus shaping up as one of the most important in the apricot specie and *Prunus* genus, showing genes with di-glucose binding function located in the endoplasmic reticulum which seem to be related to soluble solids content. In the 'Z×P' population, LG 6 has also been associated with ripening time and fruit development period.
- IX.** In the 'Z×P' population, the blooming date trait, despite intermittency among years, seems to be more associated with LG 4 and LG 7. In the 'B×C' population, on the other hand, this trait is more linked to LG 7. LG 4 is the most important for the 'G×C' population.
- X.** QTLs linked to fruit weight and stone weight were identified in LG 2 and LG 6 in the 'B×C' population. However, we can highlight the greatest influence of stone weight in LG 2 of the 'G×C' population as well as the presence of an important fruit diameter QTL at the end of LG 1. LG 3 seems to be particularly related to fruit skin and flesh colour, mainly in the 'G×C' population, which would indicate the possible presence of MYB genes related to fruit color as those described previously in cherry and apple.
- XI.** As for the acid content, we can see the influence in the LG 2 and LG 4 of the 'Z×P' population, while in the 'G×C' population, the most significant QTLs were identified in LG 2 and LG 8. This trait is strongly influenced by the high acidity from 'Goldrich'. Finally, fruit firmness and ripening time is transmitted by 'Bergeron' in LG 4, while in the 'G×C' population, firmness seems to be related to LG 1, LG 3 and LG 6 and is inherited beside fruit colour in LG 3.



## ***9. Bibliografía***



---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott JA (1999)** Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15:207-225
- Abbott AG, Rajapakse S, Sosinski B, Lu ZX, Sossey-Alaoui K, Gannavarapu M, Reighard G, Ballard RE, Baird WV, Callahan A (1998)** Construction of saturated linkage maps of peach crosses segregating for characters controlling fruit quality, tree architecture and pest resistance. *Acta Horticulturae*, 465:4-49
- Agustí M (2004)** Fruticultura. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España
- Ahmad R, Parfitt DE, Fass J, Ogundiwin E, Dhingra A, Gradziel TM, Lin D, Joshi NA, Martínez-García PJ, Crisosto CH (2011)** Whole genome sequencing of peach (*Prunus persica* L.) for SNP identification and selection. *BMC Genomics*, 12:569
- Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB (1992)** Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 132:1131-1139
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Berg DE (1992)** PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acid Research*, 20: 6221-6225
- Alberch, P (1991)** From genes to phenotype. *Genetica* 84:5-11
- Alburquerque N, García-Montiel F, Carrillo A, Burgos L (2008)** Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environmental and Experimental Botany*, 64:162-170
- Alkio M, Jonas U, Declerq M, Van Nocker S, Knoche M (2014)** Transcriptional dynamics of the developing sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit: sequencing, annotation and expression profiling of exocarp-associated genes. *Horticulture Research*, 1:11
- Allan AC, Hellens RP, Laing WA (2008)** MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in Plant Science*, 13:99-102
- Amari K, Ruiz D, Gómez G, Sánchez-Pina MA, Pallás V, Egea J (2007)** An important new apricot disease in Spain is associated with Hop stunt viroid infection. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 173-181
- Andrés MV, Durán JM (1999)** Cold and heat requirements of the apricot (*Prunus armeniaca* L.) tree. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74:757-761
- Aranzana MJ, Cosson P, Dirlwanger E, Ascasibar J, Cipriani G, Arús P, Testolin R, Abbott A, King GJ, Iezzoni AF (2003)** A set of simple sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:819-825
- Aranzana MJ, García-Mas J, Carbo J, Arús P (2002)** Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding*, 121(1):87-92
- Aranzana MJ, Illa E, Howad B, Arús P (2012)** A first insight into peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SNP variability. *Tree Genetics and Genomes*, 8:1359-1369

- Arús P, Howad W, Mnejja M (2005)** Marker development and marker-assisted selection in temperate fruit trees. In: *In the wake of the double helix: From the green revolution to the gene revolution*. Tuberosa R, Phillips RL and Gale M (Editors). Avenue Media, Bologna, Italy, 309-325
- Arús P, Messeguer R, Viruel M, Tobutt K, Dirlwanger E, Santi F, Quarta R, Ritter E (1994)** The european *Prunus* mapping project - progress in the almond linkage map. *Euphytica*, 77 1-2:97-100
- Arús P, Verde I, Sosinski B, Zhebentyayeva T, Abbot AG (2012)** The peach Genome. *Tree Genetics and Genomes*, 8(3):531-547
- Arús P, Yamamoto T, Dirlwanger E, Abbott AG (2006)** Synteny in the Rosaceae. *Plant Breeding Reviews*, 27:175-211
- Asma BM, Ozturk K (2005)** Analysis of morphological, pomological and yield characteristics of some apricot germplasm in Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52:305-313
- Atkins JF, Gesteland RF, Cech TR (2011)** RNA Worlds: From Life's to Diversity in Gene Regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, USA, 361 pp
- Audergon JM (1995)** Variety and breeding. *Acta horticulturae*, 384:35-45
- Audergon JM, Souty M, Breuils L (1990)** Amélioration génétique pour l'obtention d'abricots de qualité. In 9\_Colloque sur les recherches fruitières. Avignon 4-5-6 décembre 1990. *Ctifl-INRA*, pp 217-228
- Audergon JM, Souty M, Breuils L (1991a)** Biochemical and physicochemical characterization of 400 apricot varieties. Consequences in the apricot selection an improvement process. *Acta Horticulturae* 293:111-119
- Audergon JM, Reich M, Souty M (1991b)** Abricot. Les variations des critères de qualité. *L'Arboriculture fruitière*, 436:35-46
- Azodanlou R, Darbellay C, Luisier JL, Villettaz JC, Amadò R (2003)** Development of a model for quality assessment of tomatoes and apricots. *Food Science and Technology*, 36:223-233
- Badenes ML, Llácer G, Crisosto CH (2006)** Mejora de la calidad de frutales de hueso. En: Llácer G, Díez MJ, Carrillo JM, Badenes ML (Eds.). "Mejora Genética de la Calidad en Plantas, p. 551-578. *Sociedad Española de Ciencias Hortícolas y Sociedad Española de Genética*. Universidad Politécnica de Valencia. ISBN: 84-9705-693-0
- Badenes ML, Martínez-Calvo J, Llácer G (1998)** Analysis of apricot germplasm from the European ecogeographical group. *Euphytica*, 102:93-99
- Badenes ML, Martínez-Calvo J, Llácer G (2002)** Estado actual del programa de mejora genética del albaricoquero en la Comunidad Valenciana. *Actas de Horticultura*, 637-643
- Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Séguin C, Tuffnell PS, Barrell BG (1984)** DNA sequence and expression of the B95.8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310:207-211



- Bailey CH, Cowgill W, Hough LF (1978)** Estimate of chilling requirements of apricot selections. *Acta Horticulturae*, 85:184-189
- Bailey CH, Hough LF (1975)** Apricots. En: *Advances in fruit breeding*. (Janick J. y Moore J.N. Eds.). *Purdue University Press*, West Lafayette, Indiana, 367-383
- Baird WV, Estager AS, Wells JK (1994)** Estimating nuclear-DNA content in peach and related diploid species using laser flow-cytometry and DNA hybridization. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119:1312-1316
- Ball A, Stapley J, Dawson D, Birkhead T, Burke T, Slate J (2010)** A comparison of SNPs and microsatellites as linkage mapping markers: lessons from the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *BMC Genomics*, 11(1):218
- Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, Igarashi M, Bessho H, Moriguchi T (2007)** Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant Cell Physiology*, 48:958-970
- Base de datos de Comercio Exterior (2012)** <http://aduanas.camaras.org>
- Bassi D, Bartolozzi F (1993)** Il miglioramento genetico dell'albicocco: obiettivi e strategie. *Rivista di Frutticoltura*, 5:41-50
- Bassi D, Bartolozzi F, Muzzi E (1996)** Patterns and heritability of carboxylic acids and soluble sugars in fruits of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Breeding*, 115:67-70
- Bassi D, Bellini E, Guerriero R, Monastra F, Pennone F (1995)** Apricot breeding in Italy. *Acta Horticulturae*, 384:47-54
- Bassi D, Negri P (1991)** Ripening date and fruit traits in apricot progenies. *Acta Horticulturae*, 293:133-140
- Bassi D, Selli R (1990)** Evaluation of fruit quality in peach and apricot. *Advances in Horticultural Science*, 4:107-112
- Bassman BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991)** Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 196:80-83
- Bebeli PJ, Zhou Z, Somers DJ, Gustafson JP (1997)** PCR primed with mini satellite core sequences yields DNA fingerprinting probes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 276-283
- Beckmann JS (1988)** Oligonucleotide polymorphisms: A new tool for genomic genetics. *Bio/Technology*, 6: 161-164
- Beckmann JS, Soller M (1990)** Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Bio/Technology*, 8:930-932
- Beidler JL, Hilliard PR, Rill RL (1982)** Ultrasensitive Staining of Nucleic Acids with Silver. *Analytical Biochemistry*, 126:374-380
- Benito A, Diaz E (2010)** Albaricoquero. Comportamiento de algunas variedades en Navarra. *Navarra agraria*, ISSN 0214-6401, N° 181, págs. 13-16
- Bennett MD, Leitch IJ (2011)** Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany*, 107:467-590

- Bielsa B, Jiwan D, Fernandez i Martí A, Dhingra A, Rubio-Cabetas MJ (2014)** Detection of SNP and validation of a SFP InDel (deletion) in inverted repeat region of the *Prunus* species chloroplast genome. *Scientia Horticulturae*, 168:108-112
- Bliss FA, Arulsekar S, Foolad MR, Becerra V, Gillen AM, Warburton ML, Dandekar AM, Kocsisne GM, Mydin KK (2002)** An expanded genetic linkage map of *Prunus* based on an interspecific cross between almond and peach. *Genome*, 45:520-529
- Boonprakob, Byrne (1990)** Mume, a possible source of genes in apricot breeding. *Fruit Varieties Journal*, 44(3):108-113
- Brow MA, Oldenburg MC, Lyamichev V, Heisler LM, Lyamicheva N, Hall JG, Eagan NJ, Olive DM, Smith LM, Fors L, Dahlberg JE (1996)** Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and Mycobacterium tuberculosis katG genes by structure-specific endonuclease cleavage. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 3129-3137
- Brown GS, Walker TD (1990)** Indicators of maturity in apricots using biplot multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53:321-331
- Burgos L, Ledbetter CA, Pérez Tornero O, Ortín-Párraga F, Egea J (1997)** Inheritance of sexual incompatibility in apricot. *Plant Breeding*, 116:383-386
- Byrne DH, Littleton TG (1989)** Characterization of isozyme variability in apricots. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 114:674-678
- Byrne DH, Nikolic AN, Burns EE (1991)** Variability in sugars, acids, firmness and color characteristics of 12 peach genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116:1004-1006
- Caetano-Anollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1993)** Enhanced detection of polymorphic DNA by multiple arbitrary amplicon profiling of endonuclease-digested DNA: identification of markers tightly linked to the super nodulation locus in soybean. *Molecular and General Genetics*, 241:57-64
- Campoy JA, Martínez-Gómez P, Ruiz D, Rees J, Celton JM (2010)** Developing microsatellite multiplex and megaplex PCR systems for high throughput characterization of breeding progenies and linkage maps spanning the apricot genome. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28:560-568
- Campoy JA, Ruiz D, Cook N, Alderman L, Egea J (2011a)** High temperatures and time to budbreak in low chill apricot 'Palsteyn'. Towards a better understanding of chill and heat requirements fulfilment. *Scientia Horticulturae*, 129:649-655
- Campoy JA, Ruiz D, Egea J, Rees J, Celton JM, Martínez-Gómez P (2011b)** Inheritance of flowering time in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and analysis of linked quantitative trait loci (QTLs) using simple sequence repeat (SSR) markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29:404-410
- Cantín CM, Crisosto CH, Ogundiwin EA, Gradziel T, Torrents J, Moreno MA, Gogorcena Y (2010)** Chilling injury susceptibility in an intra-specific peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] progeny. *Postharvest Biology and Technology*, 58:79-87

- Cantini C, Iezzoni AF, Lamboy WF, Boritzki M, Struss D (2001)** DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(2):205-209
- Casa AM, Brouwer C, Nagel A, Wang L, Zhang Q, Kresovich S, Wessler SR (2000)** The MITE family Heartbreaker (Hbr): Molecular markers in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18): 10083-10089
- Chagné D, Carlisle CM, Blond C, Volz RK, Whitworth CJ, Oraguzie NC, Crowhurst RN, Allan AC, Espley RV, Hellen RP, Gardiner SE (2007)** Mapping a candidate gene (MdMYB10) for red flesh and foliage colour in apple. *BMC Genomics*, 8:212
- Chang RY, O'Donoghue LS and Bureau TE (2001)** Inter-MITE polymorphisms (IMP): a high throughput transposon-based genome mapping and fingerprinting approach. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 773781
- Chen X, Wu Q, Sun R, Zhang L (2012)** Two combinatorial optimization problems for SNP discovery using base-specific cleavage and mass spectrometry. *BMC Systems Biology*, 6 (Suppl 2): S5
- Chen Y, Mao Y, Liu H, Yu F, Li S, Yin T (2014)** Transcriptome differentially expressed genes relevant to variegation in peach flowers. *PLOS ONE* 9:e90842
- Chevalier T, Rigal D, Mbéguié-A-Mbéguié D, Gaillard F, Richard-Forget F, Fils-Lycaon BR (1999)** Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiology*, 119(4):1261-1270
- Cipriani G, Lot G, Huang HG, Marrazzo MT, Peterlunger E, Testolin R (1999)** AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L) Basch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99:65-72
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005)** An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142:169-196
- Collard BCY, Mackill DJ (2008)** Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, 363: 557-572
- Costa F, Van de Weg WE, Stella S, Dondini L, Pratesi D, Musacchi S, Sansavini S (2008)** Map position and functional allelic diversity of Md-Exp7, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*). *Tree Genetics and Genomes*, 4(3):575-586
- Couranjou J (1995)** Genetic studies of 11 quantitative characters in apricot. *Scientia Horticulturae*, 61:61-75
- Couvillon GA, Erez A (1985)** Effect of level and duration of high-temperatures on rest in the peach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110:579-581
- Cozzone AJ (2010)** Proteins: Fundamental chemical properties. *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net/WileyCDA/>
- Crossa-Raynaud P, Audergon JM (1991)** Some reflexions on apricot selections. *Acta Horticulturae*, 293:73-85

- Darnell J (2011)** RNA: Life's indispensable molecule. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, USA. 416 pp
- De Franceschi P, Stegmeir T, Cabrera A, van der Knaap E, Rosyara UR, Sebolt AM, Dondini L, Dirlewanger E, Quero-García J, Campoy JA, Iezzoni AF (2013)** Cell number regulator genes in *Prunus* provide candidate genes for the control of fruit size in sweet and sour cherry. *Molecular Breeding*, 32:311-326
- De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH (2005)** Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP genotyping assay and the SNPlex genotyping system. *Mutation Research*, 573:111-135
- De Vicente MC, Truco MJ, Egea J, Burgos L, Arús P (1998)** RFLP variability in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Breeding*, 117:153-158
- Decroocq V, Fave MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S (2003)** Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:912-922
- Dhanapal AP, Martínez-García PJ, Gradziel TM, Crisosto CH (2012)** First genetic linkage map of chilling injury susceptibility in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) fruit with SSR and SNP markers. *Journal of Plant Science and Molecular Breeding*, ISSN 2050-2389
- Di Nicola-Negri E, Tavazza M, Salandri L, Ilardi V (2010)** Silencing of *Plum pox virus* 5'UTR/P1 sequence confers resistance to a wide range of PPV strains. *Plant Cell*, 29:1435-1444
- Dirlewanger E, Claverie J, Iezzoni AF, Wünsch A (2009)** Sweet and Sour Cherries: Linkage Maps, QTL Detection and Marker Assisted Selection. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, 6:291-313
- Dirlewanger E, Cosson A, Tavaud P, Aranzana MJ, Poizat C, Zanetto A, Arús P and Laigret L (2002)** Development of microsatellite markers in peach and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry. *Theor Appl Genet* 105:127-138
- Dirlewanger E, Cosson P, Boudehri K, Renaud C, Capdeville G, Tauzin Y (2006)** Development of a second-generation genetic linkage map for peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and characterization of morphological traits affecting flower and fruit. *Tree Genetics and Genomes*, 3:1-13
- Dirlewanger E, Graziano E, Joobeur T, Garriga-Caldre F, Cosson P, Howad W, Arús P (2004)** Comparative mapping and marker assisted selection in *Rosaceae* fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101:9891-9896
- Dirlewanger E, Moing A, Rothan C, Svanello L, Pronier V, Guye A, Plomion C, Monet R (1999)** Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 18-31

- Dirlewanger E, Quero-García J, Le Dantec L, Lambert P, Ruiz D, Dondini L, Illa E, Quilot-Turion B, Audergon JM, Tartarini S, Letourmy P, Arùs P (2012)** Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach, apricot and sweet cherry. *Heredity*, 109(5):280-292
- Dondini L, Lain O, Geuna F, Banfi R, Gaiotti F, Tartarini S, Bassi D, Testolin R (2007)** Development of a new SSR-based linkage map in apricot and analysis of synteny with existing *Prunus* maps. *Tree Genetics and Genomes*, 3:239-249
- Dondini L, Lain O, Vendramin V, Rizzo M, Vivoli D, Adami M, Guidarelli M, Gaiotti F, Palmisano F, Bazzoni A, Boscia D, Geuna F, Tataranni S, Negri P, Castellano M, Savino V, Bassi D, Testolin R (2011)** Identification of QTL for resistance to plum pox virus strain M and D in Lito and Harcot apricot cultivars. *Molecular Breeding*, 79:289-299
- Dorado G (2001)** Marcadores moleculares. *Fruticultura Profesional* (Especial Olivicultura III), 120:82-87
- Downey SL, Iezzoni AF (2000)** Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(1):76-80
- Doyle JJ, Doyle JL (1987)** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15
- Drogoudi PD, Vemmos S, Pantelidis G, Petri E, Tzoutzoukou C, Karayiannis I (2008)** Physical characters and antioxidant, sugar, and mineral nutrient contents in fruit from 29 apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars and hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22):10754-10760
- Eduardo I, Chietera G, Pirona R, Pacheco I, Troglio M, Banchi E, Bassi D, Rossini L, Vecchiotti A, Pozzi C (2013)** Genetic dissection of aroma volatile compounds from the essential oil of peach fruit: QTL analysis and identification of candidate genes SNPmaps. *Tree Genetics and Genomes*, 9:189-204
- Eduardo I, Pacheco I, Chietera G, Bassi D, Pozzi C, Vecchiotti A, Rossini L (2011)** QTL analysis of fruit quality traits in two peach intraspecific populations and importance of maturity date pleiotropic effect. *Tree Genetics and Genomes* 7:323-335
- Egea L, Berenguer T, Egea J, García JE (1988)** Origin, situation and characteristics of apricot cultivars from Murcia. *Anales de Edafología y Agrobiología* 5: 999-1011
- Egea J, Burgos L (1996)** Detecting cross-incompatibility of three North American apricot cultivars and establishing the first incompatibility group in apricot. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121:1002-1005
- Egea J, Burgos L, Martínez-Gómez P, Dicenta F (1999)** Apricot breeding for sharka resistance at the CEBAS-CSIC, Murcia (Spain). *Acta Horticulturae*, 488:153-157
- Egea J, Campoy JA, Dicenta F, Burgos L, Patiño JL, Ruiz D (2009)** 'Estrella' and 'Sublime' Apricot Cultivars. *HortScience*, 44(2):469-470
- Egea J, Dicenta F, Burgos L (2004a)** 'Rojo Pasión' apricot. *HortScience*, 39:1490-1491

- Egea J, Martínez-Gómez P, Dicenta F, Burgos L (2004b)** 'Selene' apricot. *HortScience*, 39:1492-1493
- Egea J, Campoy JA, Ruiz D (2010a)** Presente y futuro del albaricoquero en España: la resistencia a Sharka (PPV), factor crucial. *Revista de Fruticultura*, 5: 4-10
- Egea J, Rubio M, Campoy J.A, Dicenta F, Ortega E, Nortes MD, Martínez-Gómez P, Molina A, Molina A.Jr, Ruiz D (2010b)** 'Mirlo Blanco', 'Mirlo Anaranjado', and 'Mirlo Rojo': Three New Very Early-season Apricots for the Fresh Market. *HortScience*, 45(12):1893-1894
- Egea J, Martínez-Gómez P, Almansa MS, Contreras E (1997)** Influencia de la recolección prematura en la calidad del fruto de variedades de albaricoquero de maduración precoz: resultados preliminares. *ITEA*, 93:81-93
- Egea J, Ortega E, Martínez-Gómez P, Dicenta F (2003)** Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany*, 50:79-85
- Egea J, Ruiz D, Dicenta F, Burgos L (2005a)** 'Murciana' apricot. *HortScience*, 40:254-255
- Egea J, Ruiz D, Burgos L (2005b)** 'Dorada' apricot. *HortScience*, 40: 1919-1920
- Espley RV, Hellens RP, Puterill J, Kutty-Amma S, Allan AC (2007)** Red colouration in apple fruit is due to the activity of a MYB transcription factor, MdMYB10. *Plant Journal*, 49:414-427
- Esti M, Messia MC, Sinesio F, Nicotra A, Conte L (1997)** Quality evaluation of peaches and nectarines by electrochemical and multivariate analyses: relationships between analytical measurements and sensory attributes. *Food Chemistry*, 60:659-666
- Etienne C, Rothan C, Moing A, Plomion C, Bodnes C, Svanella-Dumas L, Cosson P, Pronier V, Monet R, Dirlewanger E (2002)** Candidate gene and QTLs for sugar and organic acid content in peach. *Theoretical and Applied Genetics*, 105:145-159
- Fan S, Bielenberg DG, Zhebentyayeva TN, Reighard GL, Okie WR, Holland D, Abbott AG (2010)** Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). *New Phytologist*, 185:917-930
- Fang JG, Twito T, Zhang Z, Chao CCT (2006)** Genetic relationships among fruiting-mei (*Prunus mume* Sieb et Zucc.) cultivars evaluated with AFLP and SNP markers. *Genome*, 10:1256-1264
- FAO (2009)** World Information and Early Warning System on PGRFA (Plant Genetic Resources for Food and Agriculture). Available on line: <http://apps3.fao.org/wiews/wiews.jsp>
- FAO (2014)** Datos extraídos de FAOSTAT (2007-2012). <http://faostat.fao.org>
- Faust M, Surànyi D, Nyujto F (1998)** Origin and dissemination of apricot. In: J. Janick (ed.), *Horticultural Reviews*, Vol. 22. John Wiley and Sons Inc., New York, 225-266

- Fernandez i Marti A, Athanson B, Koepke T, Font I Forcada C, Dhingra A, Oraguzie N (2012)** Genetic diversity and relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars based on single nucleotide polymorphic markers. *Frontiers in Plant Science*, 3:116
- Fiehm O (2002)** Metabolomics - the link between genotype and phenotype. *Plant Molecular Biology*, 48:155-171
- Flavell AJ, Knox MR, Pearce SR, Ellis THN (1998)** Retro transposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant Journal* 16: 643-650
- Forte V (1992)** Origen, clasificación y caracteres botánicos. "Hábitat". En: El albaricoquero. Caracteres. Cultivo. Comercialización. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. pp. 11-21
- Frett TJ, Reighard GL, Okie WR, Gasic K (2014).** Mapping quantitative trait loci associated with blush in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Tree Genetics and Genomes*, 10:367-381
- Fridman E, Pichersky E (2005)** Metabolomics, genomics, proteomics, and the identification of enzymes and their substrates and products. *Current Opinion in Plant Biology*, 8:242-248
- Gabriel S, Ziugara L, Tabbaa D (2009)** SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX Platform. In Wiley Interscience (www.interscience.wiley.com). *Current Protocols in Human Genetics*, unit 2.12, pp 1-18
- Gäetean B (1998)** Les determinants génétiques de la qualité chez l'abricot (*Prunus armeniaca* L.)
- García JE, Egea J, Egea L, Berenguer T (1988)** The floral biology of certain apricot cultivars in Murcia. *Advances in Horticultural Science*, 2:84-87
- Génard M, Bruchou C (1992)** Multivariate analysis of within tree factors accounting for the variation of peach fruit quality. *Scientia Horticulturae*, 52:37-51
- Génard M, Souty M, Holmes S, Reich M, Breuils L (1994)** Correlation among quality parameters of peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 66:241-245
- Geuna F, Banfi R, Bassi D (2005)** Identification and characterization of transcripts differentially expressed during development of apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit. *Tree Genetics and Genomes*, 1(2):69-78
- Geuna F, Toschi M, Bassi D (2003)** The use of AFLP markers for cultivar identification in apricot. *Plant Breeding*, 122:526-531
- González-Agüero M, Troncoso S, Gudenschwager O, Campos-Vargas R, Moya-León MA, Defilippi BG (2009)** Differential expression levels of aroma-related genes during ripening of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(5):435-440

- Grimplet J, Romieu C, Audergon JM, Marty I, Albagnac G, Lambert P, Bouchet JP, Terrier N (2005)** Transcriptomic study of apricot fruit (*Prunus armeniaca*) ripening among 13006 expressed sequence tags. *Physiologia Plantarum*, 125(3):281-292
- Grodzicker T, Williams J, Sharp P, Sambrook J (1974)** Physical mapping of temperature sensitive mutations. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 39:439-446
- Gu WK, Weeden NF, Yu J, Wallace DH (1995)** Large-scale, cost-effective screening of PCR products in marker-assisted selection applications. *Theoretical and Applied Genetics*, 91:465-470
- Guerriero R, Monteleone, Marrocco F (1995)** Distribution of main fruit and tree traits in some apricot progenies. *Acta Horticulturae*, 384:79-84.
- Gupta PK, Balyan HS, Sharma PC, Ramesh B (1996)** Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Current Science*, 70:45-54
- Gurrieri F, Audergon JM, Albagnac G, Reich M (2001)** Soluble sugars and carboxylic acids in ripe apricot fruit as parameters for distinguishing different cultivars. *Euphytica*, 117:183-189
- Hagen LS, Chaib J, Fad B, Decroocq V, Bouchet P, Lambert P, Audergon JM (2004)** Genomic and cDNA microsatellite from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Molecular Ecology Notes*, 4:432-434
- Hagen LS, Khadari B, Lambert P, Audergon JM (2002)** Genetic diversity in apricot revealed by AFLP markers: species and cultivar comparisons. *Theoretical and Applied Genetics*, 105:298-305
- Hatada I, Hayashizaki Y, Hirotsune S, Komatsubara H, Mukai T (1991)** A genome scanning method for higher organism using restriction sites as landmarks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88:397-400
- Hayden MJ, Nguyen TM, Waterman A, McMichael GL, Chalmers KJ (2008)** Application of multiplex-ready PCR for fluorescence-based SSR genotyping in barley and wheat. *Molecular Breeding*, 21(3):271-281
- Hilling KW, Iezzoni A (1988)** Multivariate analysis in a sour cherry germplasm collection. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113:928-934
- Hormaza JI (2002)** Molecular characterization and similarity relationships among apricot genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 104:321-328
- Howad W, Yamamoto T, Dirlewanger E, Testolin R, Cosson P, Cipriani G, Monforte AJ, Georgi L, Abbott AG, Arús P (2005)** Mapping with a few plants: using selective mapping for microsatellite saturation of the *Prunus* reference map. *Genetics*, 171:1305-1309
- Hunter RS (1942)** Photoelectric tristimulus colorimetry with three filters. NBS Circ. C 249, U.S. Dept. Commerce, Washington, D.C
- Iezzoni AF, Pritts MP (1991)** Applications of principal component analysis to horticultural research. *Hort Science*, 26:334-338



- Illa I, Eduardo I, Audergon JM, Barale F, Dirlwanger E, Li X, Moing A, Lambert P, Le Dantec L, Gao Z, Poëssel JL, Pozzi C, Rossini L, Vecchietti A, Arús P, Howad W (2011) Saturating the *Prunus* (stone fruits) genome with candidate genes for fruit quality. *Molecular Breeding*, 28:667-682
- Infante R, Martínez-Gómez P, Predieri S (2008) Quality oriented fruit breeding: Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Journal of Food Agriculture and Environment* 6(2): 342-356
- Infante R, Martínez-Gómez P, Predieri S (2011) "Breeding for fruit quality in *Prunus*". In: Breeding for Fruit Quality. M.A. Jenks, P.J. Bebeli (Editors). Ed. Wiley & Blackwel. New York (USA). pp 201-229
- Infante R, Rubio P, Meneses C (2007) Calidad sensorial de albaricoques frescos sometidos a poscosecha prolongada. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones, 1205-1212
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Hyper variable mini satellite regions in human DNA. *Nature*, 314:67-73
- Jiang YQ, Ma RC (2003) Generation and analysis of expressed sequence tags from almond (*Prunus dulcis* Mill.) pistils. *Sexual Plant Reproduction*, 16:197-207
- Jiménez P, Collada C (2000) Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. ISSN 1131-7965, págs. 237-248
- Joobeur T, Viruel MA, de Vicente MC, Jauregui B, Ballester J, Dettori MT, Verde I, Truco MJ, Messeguer R, Batlle I, Quarta R, Dirlwanger E, Arús P (1998) Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using an almond X peach F2 progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 97:1034- 1041
- Jordan SA, Humphries P (1994) Single nucleotide polymorphism in exon 2 of the BCP gene on 7q31-q35. *Human Molecular Genetics*, 3(10): 1915
- Jung S, Jiwan D, Cho I, Abbott A, Tomkins J, Main D (2009) Synteny of *Prunus* and other model plant species. *BMC Genomics*, 10:76
- Jurinke C, van den Boom D, Cantor CR, Köster H (2002) Automated Genotyping Using the DNA MassArray™ Technology. *Methods in Molecular Biology*, 187(18):179-192
- Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A (1999) IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 704-711
- Karayiannis I, Mainou A, Tsaftaris (1999) Apricot breeding in Greece for fruit quality and resistance to plum plox virus. *Acta Horticulturae*, 488:111-117
- Kaulmann A, Jonville MC, Schneider YJ, Hoffmann L, Bohn T (2014) Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of *Brassica oleraceae* and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 155:240-250
- Kazankaya A (2002) Pomological traits of apricots (*Prunus armeniaca* L.) selected from Bitlis seedling population. *Journal American Pomological Society*, 56:184-188

- Klagges C, Campoy JA, Quero-García J, Guzmán A, Mansur L, Gratacós E, Silva H, Rosyara UR, Iezzoni A, Meisel LA, Dirlewanger E (2013)** Construction and comparative analyses of highly dense linkage maps of two sweet cherry intra-specific progenies of commercial cultivars. *PLoS ONE* 7:e54743
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971)** Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, 56:341-361
- Koepke T, Schaeffer S, Harper A, Dicenta F, Edwards M, Henry RJ, Møller BL, Meisel L, Oraguzie N, Silva H, Sánchez-Pérez R, Dhingra A (2013)** Comparative Genomics Analysis in *Prunoideae* to Identify Biologically Relevant Polymorphisms. *Plant Biotechnology Journal*, 11:883-893
- Koepke T, Schaeffer S, Krishnan V, Jiwan D, Harper A, Whiting M, Oraguzie N, Dhingra A (2012)** Rapid gene-based SNP and haplotype marker development in non-model eukaryotes using 3'UTR sequencing. *BMC Genomics*, 13:18
- Kostina KF (1964)** Application of the phytogeographical method to apricot classification (in Russian). *Proc. Nik. Bot. Gard. Kolos. Moscow*, v 24
- Krska B, Pramukova J, Vachun M (2009)** Inheritance of some pomological traits in Minaret × Betinka apricot progeny. *Horticultural Science*, 36:85-91
- Kumar SK (1999)** DNA markers in plant improvement: A review. *Biotechnology Advances*, 17:143-182
- Lambert P, Hagen LS, Arús P, Audergon JM (2004)** Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) compared with the almond Texas × peach Earlygold reference map for *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 108:1120-1130
- Landegren U, Kaiser R, Sanders J, Hood L (1988)** DNA diagnostics. Molecular techniques and automation. *Science*, 241: 1077-1080
- Lapins KO, Mann AJ, Keane FW (1957)** Progeny analysis of some apricot crosses. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 70:125-130
- Layne DR, Jiang ZW, Rushing JW (2001)** Tree fruit reflective film improves red skin coloration and advances maturity in peach. *HortTechnology*, 11(2):234-242
- Layne REC, Bailey CH, Hough LF (1996)** Apricots. In: Janick, J., Moore, J.N. (Eds.) Fruit breeding: Tree and tropical fruits, vol.II. *John Wiley and Sons*, New York. pp. 79-111
- Ledbetter CA, Gómez E, Burgos L, Peterson S (1996)** Evaluation of fruit quality of apricot cultivars and selections. *Journal of Tree Fruit Production*, 1:73-86
- Leida C, Conesa A, Llácer G, Badenes ML, Ríos G (2012)** Histone modifications and expression of *DAM6* gene in peach are modulated during bud dormancy release in a cultivar-dependent manner. *New Phytologist*, 193:67-80
- Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt (1996)** A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics*, 14(4):421-429

- Lester DR, Sherman WB, Atwell BJ (1996)** Endopolygalacturonase and the Melting flesh (M) locus in peach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(2):231-235
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R (2009)** 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25:2078-2079
- Li X, Wang Y, Wang B, Wang C, Shangguan L, Huang Z, Fang J (2010)** Genetic relationships between fruiting and flowering mei (*Prunus mume*) cultivars using SNP markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85:329-334
- Lichou J, Audubert A (1992)** L'abricotier. Ed. Ctifl.
- Lijavetzky D, Cabezas JA, Ibáñez A, Rodríguez V, Martínez-Zapater JM (2007)** High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BMC Genomics*, 8:424
- Lindner R, Friedel CC (2012)** A Comprehensive Evaluation of Alignment Algorithms in the Context of RNA-Seq. *PLoS ONE* 7:e52403
- Little CA (1975)** A research note off on a tangent. *Journal of Food Science*, 40:410-411
- Llácer G (2000)** La elección de variedades de albaricoque en la Comunidad Valenciana. ISSN: 1138-2775 Revista: *Comunitat Valenciana agraria*, 17: 26-32
- Llácer G (2006)** El programa de mejora genética del albaricoquero en el IVIA. Primeras obtenciones. *Agrícola Vergel*, 293: 250-258
- Llácer G, Cambra M, Laviña A (1985)** Detection of plum pox virus in Spain. *EPPO Bulletin*, 15: 325-329
- Lo Bianco R, Farina V, Indelicato SG, Filizzola F, Agozzino P (2010)** Fruit physical, chemical and aromatic attributes of early, intermediate and late apricot cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(6):1008-1019
- Lopes MS, Sefc KM, Laimer M, Machado AD (2002)** Identification of microsatellite loci in apricot. *Molecular Ecology Notes*, 2(1):24-26
- Maghuly F, Fernandez EB, Ruthner S, Pedryc A, Laimer M (2005)** Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographic origin and breeding history. *Tree Genetics and Genome*, 1:151-165
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) (2014)** Datos extraídos del Anuario de estadística agraria (2008-2012). <http://www.magrama.gob.es>
- Maheswaran M (2004)** Molecular Markers: History, Features and Application. *Advanced Biotech*, 17-24
- Mariniello L, Sommella MG, Sorrentino A, Forlani M, Porta R (2002)** Identification of *Prunus armeniaca* cultivars by RAPD and SCAR markers. *Biotechnology Letters* 24:749-755
- Martínez-Calvo J, Llácer G, Badenes ML (2010)** 'Rafel' and 'Belgida', Two Apricot Cultivars Resistant to Sharka. *Hortscience*, 45(12):1904-1905

- Martínez-Calvo J, Llácer G, Badenes ML (2011)** ML 'Moixent', an Apricot Resistant to Sharka. *Hortscience*, 46(4):655-656
- Martínez-García PJ, Fresnedo-Ramírez J, Parfitt DE, Gradziel TM, Crisosto CH (2013a)** Effect prediction of identified SNPs linked to fruit quality and chilling injury in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Plant Molecular Biology*, 81:175-188
- Martínez-García PJ, Parfitt DE, Ogundiwin EA, Fass J, Chan HM, Ahmad R, Lurie S, Dandekar A, Gradziel TM, Crisosto CH (2013b)** High density SNP mapping and QTL analysis for fruit quality characteristics in peach (*P. persica* L.). *Tree Genetics and Genomes*, 9:19-36
- Martínez-García PJ, Parfitt DE, Bostock RM, Fresnedo-Ramírez J, Vázquez-Lobo A, Gradziel TM, Crisosto CH (2013c)** Application of genomic and quantitative genetic tools to identify candidate resistance genes for brown rot resistance in peach. *PLoS ONE* 7:e78634
- Martínez-Gómez P, Crisosto C, Bonghi C, Rubio M (2011)** New approaches to *Prunus* transcriptome analysis. *Genetica*, 139:755-769
- Martínez-Gómez P, Dicenta F (2000)** Evaluation of resistance of apricot cultivars to a Spanish isolate of plum poxpotyvirus (PPV). *Plant Breeding*, 119:179-181
- Martínez-Gómez P, Sánchez-Pérez R, Howad V, Dicenta F, Arús P, Gradziel TM (2007)** Almond. In: *Genome Mapping and Molecular Breeding*. C.R. Kole (Editor). Springer, New York, USA. Volume 4:229-242
- Martínez-Gómez P, Sánchez-Pérez R, Rubio M (2012)** Clarifying Omics Concepts, Challenges and Opportunities for *Prunus* Breeding in the Postgenomic Era. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 16(5):268-283
- Martínez-Gómez P, Sozzi GO, Sánchez-Pérez R, Rubio M, Gradziel TM (2003)** New approach to *Prunus* tree crop breeding. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 1:52-63
- Marty I, Bureau S, Sarkissian G, Gouble B, Audergon JM, Albagnac G (2005)** Ethylene regulation of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in colour-contrasted apricot varieties (*Prunus armeniaca*). *Journal of Experimental Botany*, 56(417):1877-1886
- Mbéguié-A- Mbéguié D, Chahine H, Gomez RM, Gouble B, Reich M, Audergon JM, Souty M, Albagnac G, Fils-Lycaon B (1999)** Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-aminociclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase from apricot fruit (*Prunus armeniaca*). *Physiologia Plantarum*, 105(2):294-303
- Mbéguié-A-Mbéguié D, Gouble B, Gomez RM, Audergon JM, Albagnac G, Fils-Lycaon B (2002)** Two expansion cDNAs from *Prunus armeniaca* expressed during fruit ripening are differently regulated by ethylene. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40:445-452
- McGettigan PA (2013)** Transcriptomics in the RNA-Seq era. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(1): 4-11
- McGuire RG (1992)** Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27:1254-1255
- McPherson MJ, Møller SG (2000)** "PCR", BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK

- Mehlenbacher SA, Cociu V, Hough LF (1991)** Apricots (*Prunus*). In: Moore JN, Ballington JR (eds) Genetic resources of temperate fruit and nut crops. *International Society for Horticultural Science*, pp 65-107
- Messina R, Lain O, Marrazo T, Cipriano G, Testolin R (2004)** New set of microsatellite loci isolated in apricot. *Molecular Ecology Notes*, 4:432-434
- Milne I, Stephen G, Bayer M, Cock PJ, Pritchard L, Cardle L, Shaw PD, Marshall D (2013)** Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in bioinformatics*, 14:193-202
- Minolta (1994)** Precise color communication. Minolta Co, Ramsey, NJ
- Mnejja M, García-Mas J, Howad W, Arús P (2005)** Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Molecular Ecology Notes*, 5(3):531-535
- Mnejja M, García-Mas M, Howad W, Badenes ML, Arús P (2004)** Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. *Molecular ecology notes*, 4(2):163-166
- Monastra F, De Salvador FR (1995)** Apricot: Present and future. *Acta Horticulturae*, 384, 401-414
- Moreno-González J (2000)** Marcadores moleculares para la selección de caracteres cuantitativos. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal, ISBN 84-7721-945-1, págs. 383-408
- Morgante M, Vogel J (1994)** Compound microsatellite primers for the detection of genetic polymorphisms. *U. S. Patent Appl* 08/326456
- Ogawa JM, Southwick SM (1995)** Apricot. In: Ogawa J.M, Zehr E.I, Bird G.W, Ritchie D.F, Uriu K and Uyemoto J.K. (Eds.). *Compendium of Stone Fruit Diseases* (pp. 5-6). St. Paul, MN: APS Press
- Ogundiwin EA, Peace CP, Gradziel TM, Parfitt DE, Bliss FA, Crisosto CH (2009)** A fruit quality gene map of *Prunus*. *BMC Genomics*, 10:587
- Okie WR, Blackburn (2008)** Interaction of chill and heat in peach flower bud dormancy. *Hort Science*, 43:1161-1161
- Olsen M, Hood L, Cantor C, Botstein D (1989)** A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, 245:1434-1435
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989)** Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics*, 5:874-879
- Pandey A, Mann M (2000)** Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405:837-846
- Paran I, Michelmore RW (1993)** Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 985-993

- Parolari G, Virgili R, Bolzoni L (1992)** Analysis of sensory and instrumental data on apricot purees with pattern recognition techniques. *Analytica Chimica Acta*, 259:257-265
- Paunovic SA (1988)** Apricot germplasm, breeding, selection, cultivar, rootstock and environmental. *Acta horticulturae*, 209:13-28
- Peace C, Bassil N, Main D, Ficklin S, Rosyara UR, Stegmeir T, Sebolt A, Gilmore B, Lawley CT, Mockler TC, Bryant DW, Whilelm L, Iezzoni A (2012)** Development and evaluation of a genome-wide 6K SNP array for diploid sweet cherry and tetraploid sour cherry. *PLoS ONE* 7:e48305
- Peace C, Norelli JL (2009)** Genomics approaches to crop improvement in the *Rosaceae*. In Genetics and Genomics of *Rosaceae*. Folta, K.M., and Gardiner, S.E. (Editors). Springer, Heidelberg, Germany. pp. 19-53
- Peace CP, Crisosto CH, Gradziel TM (2005)** Endopolygalacturonase: A candidate gene for Freestone and Melting flesh in peach. *Molecular Breeding*, 16(1):21-31
- Pérez S, Montes S, Mejía C (1993)** Analysis of peach germplasm in Mexico. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118:519-524
- Pérez-Gonzales S (1992)** Associations among morphological and phenological characters representing apricot germplasm in Central Mexico. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117:486-490
- Phillips MW, Rodrigues H, Fritz PJ (1995)** Marcadores de DNA. Teoría y protocolos de trabajo. Con ejemplos de investigaciones en cacao. *Ed. Turrialba*, CR, CATIE. 183 pp
- Pirone R, Eduardo I, Pacheco I, Linge CD, Miculan M, Verde I, Tartarini S, Dondini L, Pea G, Bassi D, Rossini L (2013)** Fine mapping and identification of a candidate gene for a major locus controlling maturity date in peach. *BMC Plant Biology*, 13:166
- Pukkila PJ (2011)** Molecular Biology: The Central Dogma. Encyclopedia of Life Sciences. <http://www.els.net/WileyCDA/>
- Quarta R, Dettori MT, Sartori A, Verde I (2000)** Genetic linkage map and QTL analysis in peach. *Acta Hort* 521:233-241
- Quilot B, Wu BH, Kervella J, Génard M, Foulongne M, Moreau K (2004)** QTL analysis of quality traits in an advanced backcross between *Prunus persica* cultivars and the wild relative species *P. davidiana*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:884-897
- Rafalski A (2002)** Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5:94-100
- Reiter RS, Williams JGK, Feldmann KA, Rafalski JA, Tingey SV, Scolnik PA (1992)** Global and local genomic mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:1477-1481
- Remay A, Lalanne D, Thouroude T, Le Couviour F, Hibrand-Saint Oyant L, Foucher F (2009)** A survey of flowering genes reveals the role of gibberellins in floral control in rose *Theoretical and Applied Genetics*, 119(5):767-781

- Rohde W (1996)** Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *Journal of Genetics and Breeding*, 50: 249-261
- Romero C, Pedryc A, Munoz V, Llácer G, Badenes ML (2003)** Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. *Genome*, 46(2):244-252
- Rosyara UR, Sebolt AM, Peace C, Iezzoni AF (2014)** Identification of the parental parent of 'Bing' sweet cherry and confirmation of descendants using single nucleotide polymorphism markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 139:148-156
- Rubio A, Ruiz D, Egea J, Martínez-Gómez P, Dicenta F (2008)** Evaluation of apricot resistance to Plum pox virus (Sharka) in controlled greenhouse and natural field conditions. *Scientia Horticulturae*, 116(2):176-179
- Rubio M, García-Ibarra A, Soler A, Martínez-Gómez P, Dicenta F (2013)** Relationship of viruses and viroids with apricot "viruela" disease. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(1):148-153
- Rubio M, Ruiz D, Egea J, Martínez-Gómez P, Dicenta F (2014)** Opportunities of marker-assisted selection for Plum pox virus resistance in apricot breeding programs. *Tree Genetics and Genomes*, 10(3):513-525
- Ruiz D, Campoy JA, Egea J (2007)** Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany*, 61:254-263
- Ruiz D, Dicenta F, Burgos L, Martínez-Gómez P, Rubio M, Campoy JA, Ortega E, Patiño JL, Molina A, Egea J (2010a)** New apricot cultivars from CEBAS-CSIC (Murcia, Spain) breeding programme. *Acta Horticulturae* 862: 113-117
- Ruiz D, Lambert P, Audergon JM, Dondini L, Tartarini S, Adami M, Gennari F, Cervellati C, De Franceschi P, Sansavini S, Bureau S, Gouble B, Reich M, Renard CMGC, Bassi D, Testolin R (2010b)** Identification of QTLs for fruit quality traits in apricot. *Acta Horticulturae*, 862:587-592
- Ruiz D, Egea J (2008)** Phenotypic diversity and relationships of fruit quality traits in apricot (*Prunus armeniaca* L.) germplasm. *Euphytica*, 163:143-158
- Ruiz D, Egea J, Tomás-Barberán FA, Gil MI (2005)** Carotenoids from new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties and their relationship with flesh and skin color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:6368-6374
- Ruiz D, Martínez-Gómez P, Rubio M, Petri C, Larios A, Campoy JA, Egea J (2011)** Application of Biotechnology Tools to Apricot Breeding. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 5(1):101-117
- Ruiz D, Salazar JA, Nortes MD, Martínez-Gómez P, Egea J, Audergon JM, Clauzel G, Blanc A, Lambert P, Bureau S, Gouble B, Reich M, Reling P, Renard CMGC, Dondini L, Tartarini S (2012)** Inheritance of fruit quality traits in apricot progenies. *Acta Horticulturae*, 966:93-99
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986)** Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324: 163-166

- Salazar JA, Ruiz D, Campoy JA, Sánchez-Pérez R, Crisosto CH, Martínez-García PJ, Blenda A, Jung S, Main D, Martínez-Gómez P, Rubio M (2014)** Quantitative Trait Loci (QTL) and Mendelian Trait Loci (MTL) analysis in *Prunus*: A breeding perspective and beyond. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32:1-18
- Sánchez-Pérez R, Dicenta F, Martínez-Gómez P (2012)** Inheritance of chilling and heat requirements for flowering in almond and QTL analysis. *Tree Genetics and Genomes*, 8:379-389
- Sánchez-Pérez R, Howad D, Dicenta F, Arús P, Martínez-Gómez P (2007)** Mapping major genes and quantitative trait loci controlling agronomic traits in almond. *Plant Breed*, 126:310-318
- Sánchez-Pérez R, Howad W, García-Mas J, Arús P, Martínez-Gómez P, Dicenta F (2010)** Molecular markers for kernel bitterness in almond. *Tree Genetics and Genomes*, 6:237-245
- Sánchez-Pérez R, Martínez-Gómez P, Dicenta F, Egea J, Ruiz D (2006)** Level and transmission of genetic heterozygosity in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using simple sequence repeat markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53:763-770
- Sánchez-Pérez R, Ruiz D, Dicenta F, Egea J, Martínez-Gómez P (2005)** Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships. *Scientia Horticulturae* 103:305-315
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJG (1994)** Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17:915-919
- Schauer N, Fernie AR (2006)** Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends in Plant Science*, 11:508-516
- Scherrer K, Jost J (2007)** Gene and genon concept: coding versus regulation. *Theory in Biosciences*, 126, 65-113.
- Silva C, García-Mas J, Sánchez AM, Arús P, Oliveira MM (2005)** Looking into flowering time in almond (*Prunus dulcis* (Mill) D. A. Webb): the candidate gene approach. *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 959-968
- Sims ET, Comin D (1963)** Evaluation of objective maturity indices for Halehaven peaches. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 82:125-130
- Socquet-Juglard D, Christen D, Devènes G, Gessler C, Duffy B, Patocchi A (2012)** Mapping Architectural, Phenological, and Fruit Quality QTLs in Apricot. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31:387–397
- Socquet-Juglard D, Kamber T, Pothier J., Christen D, Gessler C, Duffy B, Patocchi A (2013)** Comparative RNA-Seq analysis of early-infected peach leaves by the Invasive phytopathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *PLoS ONE* 8:e54196
- Sooriyapathirana SS, Khan A, Sebolt AM, Wang D, Bushakra JM, Wang KL, Allan AC, Gardiner SE, Chagné H, Iezzoni AF (2010)** QTL analysis and candidate gene mapping for skin and flesh color in sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.). *Tree Genetics and Genomes*, 6:821-832
- Soriano JM, Domigo ML, Zuriaga E, Romero C, Llácer G, Badenes (2012)** Genetic Tools for Selecting Resistance to Sharka Disease in Apricot XV International Symposium on Apricot Breeding and Culture. *Acta Horticulturae*, 966:255-258



- Soriano JM, Domingo ML, Zuriaga E, Romero C, Zhebentyayeva T, Abbott AG, Badenes ML (2011)** Identification of simple sequence repeat markers tightly linked to plum pox virus resistance in apricot. *Molecular Breeding*, 30(2):1017-1026
- Sorkheh K, Malysheva-Otto LV, Wirthensohn MG, Tarkesh-Esfahani S, Martínez-Gómez P (2008)** Linkage disequilibrium, genetic association mapping and gene localization in crop plants. *Genetics and Molecular Biology*, 31:805–814
- Sorkheh K, Shiraz B, Aranzana MJ, Mohammadi SA, Martínez-Gómez P (2007)** Application of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis to plant breeding and genetics: procedures, applications and prospects. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 5:197-204
- Sosinski B, Gannavarapu M, Hager LE, Beck LE, King GJ, Ryder CD, Rajapakse S, Baird WV, Ballard RE, Abbott AG (2000)** Characterization of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L) Basch). *Theoretical and Applied Genetics*, 101:421-428
- Sosinski B, Verde I, Morgante M, Rokhsar D (2010)** The international peach genome initiative. A first draft of the peach genome sequence and its use for genetic diversity analysis in peach. 5<sup>th</sup> *International Rosaceae genomics conference*. November 2010. Stellenbosch (South Africa), O46
- Southern EM (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517
- Souty M, Audergon JM, Chambroy Y (1990)** Abricot: les critères de qualité. *L'Arboriculture fruitière* 430:16-24
- Souty M, Audergon JM, Duprat F (1991)** Physical and Biochemical criteria for apricot varieties characterization. *Acta Horticulturae*, 293:95-109
- Stevens R, Buret M, Duffe P, Garchery C, Baldet P, Rothan C, Causse M (2007)** Candidate genes and quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations. *Plant Physiology*, 143(4):1943-1953
- Sun LD, Zhang QX, Xu ZD, Yang WR, Guo Y, Lu JX, Pan HT, Chang TR, Cai M (2013)** Genome-wide DNA polymorphisms in two mei (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.). *BMC Genetics*, 14:98
- Sutherland BG, Robbins TP, Tobutt KR (2004)** Primers amplifying a range of *Prunus* S-alleles. *Plant Breeding*, 123(6):582-584
- Takos AM, Jaffe FW, Jacob SR, Bogs J, Robinson SP, Walker AR (2006)** Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant Physiology*, 142:1216-1232
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013)** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725-2729
- Tavassolian I, Rabiei G, Gregory D, Mnejja M, Wirthensohn MG, Hunt PW, Gibson JP, Ford CM, Sedgley M, Wu SB (2010)** Construction of an almond linkage map in an Australian population Nonpareil × Lauranne. *BMC Genomics*, 11:551

- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BJ, Tunnacliffe A (1992)** Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13:718-725
- Testolin R, Messina R, Lain O, Marrazzo MT, Huang WG, Cipriani G (2004)** Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. *Molecular Ecology Notes*, 4(3): 459-461
- Tobler AR, Short S, Anderse MR, Planer TM, Briggs JC, Lambert SM, Wu PP, Wang Y, Spoonde AY, Koheler RT, Peyret N, Chen C, Broomer AJ, Ridzon DA, Zhou H, Hoo BS, Hayashibara KC, Leong LN, Ma CN, Rosenblum BB, Day JP, Ziegler JS, de La Vega F, Rhodes MD, Hennessy KM, Wenz M (2005)** The SNPLex genotyping system: A flexible and scalable platform for SNP genotyping. *Journal of Biomolecular Techniques*, 16:398-406
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009)** TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25:1105-1111
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R, Hirano H (2003)** Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell*, 15(3):771-781
- Valero C, Barreiro P, Valcárcel-Resalt G, Ruiz Altisent M (1998)** Parámetros de calidad organoléptica en albaricoque. *Fruticultura profesional*, ISSN 1131-5660, págs: 112-117
- Van der Wurff AWG, Chan YL, van Straalen NM, Schouten J (2000)** TE-AFLP: combining rapidity and robustness in DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 28: 105-109
- Van Ooijen JW (1999)** LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. *Heredity*, 83:613-624
- Van Ooijen JW (2004)** MapQTL® 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Kyazma, B.V, Wageningen
- Van Ooijen JW (2006)** JoinMap 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma, Wageningen
- Varady-Burgueti C, Hámori-Szabo J, Faskebtí E (1983)** Determination of maturity in apricots by instrumental measurement of flesh firmness and colour. *Acta alimentaria*, 12:412-413
- Vavilov NI (1951)** The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants (translated by K. Starr Chester). *Chronica Botanica*, 13:1-366
- Velculescu VE, Zhang L, Zhou W, Vogelstein J, Basrai MA, Bassett DE, Hieter P, Vogelstein B, Kinzler KW (1997)** Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*, 88:243-251
- Vendramin E, Dettori MT, Giovinazzi J, Micali S, Quarta R, Verde I (2007)** A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species. *Molecular Ecology Notes*, 7(2):307-310
- Vendramin E, Pea G, Dondini L, Pacheco I, Dettori MT, Gazza L, Scalabrin S, Strozzi F, Tartarini S, Bassi D, Verde I, Rossini L (2014)** A Unique Mutation in a MYB Gene Cosegregates with the Nectarine Phenotype in Peach. *PLoS ONE* 9(3): e90574

- Verde I, Abbott AG, Scalabrin S, Jung S, Shu S, Marroni F, Zhebentyayeva T, Dettori MT, Grimwood J, Cattarino F, Zuccolo A, Rossini L, Jenkins J, Vendramin E, Meisel LA, Decroocq V, Sosininski B, Prochnik S, Mitros T, Policriti A, Cipriani G, Dondini L, Ficklin S, Goodstein DM, Xuan P, Del Fabbro C, Aramini V, Copeti D, González S, Horner D, Falchi R, Lucas S, Mica E, Maldonado J, Lazzari B, Bielenberg D, Pirona R, Miculan M, Barakat A, Testolin R, Stella A, Tartarin S, Tonutti P, Arús P, Orellana A, Wells C, Main D, Vizzotto G, Silva H, Salamani F, Schmutz J, Morgante M, Rokhsar D (2013) The high-quality draft of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nature Genetics*, 45:487-494
- Verde I, Bassil N, Scalabrin S, Gilmore B, Lawley CT, Gasic K, Micheletti D, Rosyara UR, Cattonaro F, Vendramin E, Main D, Aramini V, Blas AL, Mockler TC, Bryant DW, Wilhelm L, Troggio M, Sosinski B, Aranzana MJ, Arús P, Iezzoni A, Morgante M, Peace C (2012) Development and evaluation of a 9K SNP array for peach by internationally coordinated SNP detection and validation in breeding germplasm. *PLoS One* 7:e35668
- Verde I, Quarta R, Cerdrola C, Dettori MT (2002) QTL analysis of agronomic traits in a BC1 peach population. *Acta Horticulturae*, 592:291-297
- Vilanova S, Romero C, Abbott AG, Llácer G, Badenes ML (2003) An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 107:239-247
- Viruel MA, Messeguer R, De Vicente MC, García-Mas J, Puig domènech P, Vargas FJ, Arús P (1995) A linkage map with RFLP and isozyme markers for almond. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 964-971
- Visagie TR (1984) Maturity indices for nectarines. *Deciduous Fruit grower*, 34:362-363
- Visagie TR (1985) Optimum picking maturity for apricots. Preliminary results and recommendations. *Deciduous fruit grower*, 35(11):401-404
- Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93:77-78
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: A new technique for finger printing. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414
- Wang D, Karle R, Iezzoni AF (2000) QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry. *Theoretical and Applied Genetics*, 100:535-544
- Wang L, Zhao S, Gu C, Zhou Y, Zhou H, Ma J, Cheng J, Han Y (2013) Deep RNA-Seq uncovers the peach transcriptome landscape. *Plant Molecular Biology*, 83:365-377
- Warburton ML, Becerra-Velasquez VL, Goffreda JC, Bliss FA (1996) 1324 Utility of RAPD markers in identifying genetic linkages to genes of 1325 economic interest in peach. *Theoretical and Applied Genetics*, 93:920-925

- Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BT, Powell W (1997)** Genetic distribution of BARE-1 retro transposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular and General Genetics*, 253: 687-694
- Welsh J, McClelland M (1990)** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18:7213-7218
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalsk JA, Tingey SV (1990)** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535
- Winter P, Kahl G (1995)** Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11:438-448
- Witherspoon JM, Jackson JF (1996)** Analysis of fresh and dried apricot. In: *Linskens HF, Jackson JF (eds) Modern methods of plant analysis*, vol 18. Fruit analysis Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 111-131
- Wu SB, Tavassolian I, Francks TK, Hunt P, Wirthensohn MG, Gibson JP, Sedgley M (2010)** Discrimination of SNP genotypes associated with complex haplotypes by high-resolution melting analysis in almond: implications for improved marker efficiencies. *Molecular Breeding*, 25:351-357
- Wu SB, Tavassolian I, Rabiei G, Hunt PW, Wirthensohn MG, Gibson JP, Ford CM, Sedgley M (2009)** Mapping SNP-anchored genes using high-resolution melting analysis in almond. *Molecular Genetics and Genomics*, 282:273-281
- Xu YB, Crouch JH (2008)** Marker-assisted selection in plant breeding: From publications to practice. *Crop Science*, 48(2):391-407
- Yamamoto T, Mochida K, Imai T, Shi IZ, Ogiwara I, Hayashi T (2002)** Microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] derived from an enriched genomic and cDNA libraries. *Molecular Ecology Notes*, 2, 298-302
- Yamamoto T, Shimada T, Imai T, Yaegaki H, Haji T, Matsuta N, Yamaguchi M, Hayashi T (2001)** Characterization of morphological traits based on a genetic linkage map in peach. *Breed Science*, 51:271-278
- Zagrai I, Capote N, Ravelonandro M, Cambra M, Zagrai L, Scorza R (2008)** Plum pox virus silencing of C5 transgenic plums is stable under challenge inoculation with heterologous viruses. *Journal of Plant Pathology*, 90:S1.63-S1.71
- Zhang JB, Sebolt AM, Wang D, Bink M, Olmstead JW, Iezzoni AF (2010)** Fruit size QTL analysis of an F-1 population derived from a cross between a domesticated sweet cherry cultivar and a wild forest sweet cherry. *Tree Genetics and Genomes*, 6:25-36
- Zhong W, Gao Z, Zhuang W, Shi T, Zhang Z, Ni Z (2013)** Genome-wide expression profiles of seasonal bud dormancy at four critical stages in Japanese apricot. *Plant Molecular Biology*, 86:247-264
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994)** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183

## ***10. Anexos***



## 10. ANEXOS

**Tabla suplementaria 1.** Evaluación de marcadores SSR realizada en la población 'ZxP' mediante secuenciador ABI PRIMS.

LG	SSR	'Z701-1'	'Palsteyn'	LG	SSR	'Z701-1'	'Palsteyn'
LG 1	BPPCT011	173/185	173	LG 4	UDA-021	95/107	95/118
LG 1	CPDCT038	-	-	LG 4	UDA-027	137/154	131/154
LG 1	CPPCT003	-	-	LG 4	UDP98-024	87	87/93
LG 1	CPPCT004	-	-	LG 5	AMPA112	-	-
LG 1	CPPCT016	-	-	LG 5	CPPCT038	-	-
LG 1	CPPCT027	80/88	84/88	LG 5	CPSCT006	119/121	119/121
LG 1	CPPCT042	168/186	168	LG 5	CPSCT022	-	-
LG 1	CPPCT060	-	-	LG 5	CPSCT030	191	193/195
LG 1	EPPCU1090	-	-	LG 5	EPDCU2584	133	133
LG 1	EPPCU1945	-	-	LG 5	EPDCU4658	240/278	240/278
LG 1	EPPCU6569	-	-	LG 5	EPDCU5183	-	-
LG 1	M16a	-	208	LG 5	EPPCU4962	213	210/258
LG 1	PacA18	176/181	170/183	LG 5	Ma026a	-	-
LG 1	pchcms4	181/183	156/183	LG 5	PaCITA021	-	-
LG 1	pchgms28	159/163	163	LG 5	pchgms4	181/183	156/183
LG 1	pchgms3	-	-	LG 5	Pr1-36	186/194/203	182/184/196/205
LG 1	pchgms35	-	-	LG 5	UDP97-401	-	-
LG 1	PGS1.21	-	-	LG 6	AMPA130	-	-
LG 1	PS9F8	161/165	152	LG 6	BPPCT025	150/162	162
LG 2	AMPA93	224/278	214/229	LG 6	CPPCT015	-	-
LG 2	CPDCT044	-	-	LG 6	CPPCT021	-	-
LG 2	CPPCT044	149	149	LG 6	CPPCT047	163	163
LG 2	CPSCT021	132/136	136/140	LG 6	CPSCT012	151	151
LG 2	CPSCT044	185/194	194/196	LG 6	EPPCU4092	101/108	101/108
LG 2	EPDCU4017	141/147	144/147	LG 6	MA014	-	-
LG 2	PceGA34	132/173	132/157	LG 6	MA040a	207/218	209/218
LG 2	pchgms1	-	-	LG 6	pchcms5	172	172
LG 2	pchgms26	-	-	LG 6	UDP98-021	127	127
LG 2	UDA-023	-	-	LG 7	CPPCT022	-	-
LG 3	BPPCT007	146/156	146	LG 7	CPPCT039	98/100	100/102
LG 3	CPPCT002	-	-	LG 7	CPPCT057	-	-
LG 3	EPDCU0532	164/168	164/166	LG 7	CPSCT004	105	105/107
LG 3	EPDCU3083	132	132	LG 7	EPDCU3392	-	-
LG 4	BPPCT010	115	115	LG 7	EPPCU5176	94	94
LG 4	BPPCT015	-	-	LG 7	EPPCU7340	-	-
LG 4	CPPCT011	-	-	LG 7	MA020a	179/190	192
LG 4	CPPCT046	132/134	126/134	LG 7	pchcms2	-	-
LG 4	CPPCT051	-	-	LG 7	pchgms62	161	161
LG 4	CPSCT005	222	189/222	LG 7	PR-62	-	-
LG 4	EPDCU3832	-	-	LG 7	PS5C3	-	-
LG 4	EPPCU0888	-	-	LG 8	CPDCT034	-	-
LG 4	EPPCU1106	-	-	LG 8	CPPCT019	-	-
LG 4	EPPCU1775	142/166	142/166	LG 8	CPSCT018	142/149	145/149
LG 4	EPPCU2000	-	-	LG 8	EPDCU3117	162	162
LG 4	EPPCU6216	162/164	162/164	LG 8	M6a	181	181/206
LG 4	EPPCU8503	-	-	LG 8	PS1H03	-	-
LG 4	EPPCU9268	187	187	LG 8	UDP98-409	154/162	133/162
LG 4	EPPISF032	-	-				
LG 4	M12a	180/186/196/228	180/196/240		<b>Amplificados</b>	53	
LG 4	MA059a	138	138		<b>Polimórficos</b>	38	
LG 4	pchgms2	-	-		<b>Monomórficos</b>	13	
LG 4	pchgms55	-	-				
LG 4	PMS40	102/121	102/104				
LG 4	PS12e2	185	164/166		<b>Total</b>	101	

**Tabla suplementaria 2.** Evaluación de marcadores SSR realizada en la población 'ZxP' en agarosa METAPHOR.

LG	SSR	Ampl.	Polimórfico	T °C	LG	SSR	Ampl.	Polimórfico	T °C
LG 1	AMPA109	Si		57	LG 2	UDAp403	Si		55
LG 1	AMPA113			59	LG 2	UDAp405	Si		56
LG 1	AMPA115	Si	Si	58	LG 2	UDAp406	Si	Si	56
LG 1	AMPA124	Si	Si	59	LG 2	UDAp413	Si	Si	56
LG 1	BPPCT016			57	LG 2	UDAp428	Si		59
LG 1	BPPCT019	Si		57	LG 2	UDAp434	Si	Si	55
LG 1	BPPCT028	Si		57	LG 2	UDAp447	Si	Si	57
LG 1	CPPCT026	Si		56	LG 2	UDAp448	Si		57
LG 1	CPPCT029			56	LG 2	UDAp451	Si	Si	53
LG 1	PaCITA05			56	LG 2	UDAp455			55
LG 1	PaCITA07	Si	Si	59	LG 2	UDAp456	Si	Si	57
LG 1	pchgms12	Si		57	LG 2	UDAp457	Si	Si	53
LG 1	pchgms40	Si		57	LG 2	UDAp461	Si	Si	57
LG 1	pchgms41	Si		57	LG 2	UDAp462	Si	Si	57
LG 1	PMS67	Si		57	LG 2	UDAp473	Si	Si	55
LG 1	PS12a02			57	LG 2	UDAp498	Si	Si	59
LG 1	UDA031	Si		57	LG 2	UDP96013			57
LG 1	UDAp410	Si		56	LG 2	UDP98406	Si	Si	57
LG 1	UDAp414	Si	Si	53	LG 2	UDP98410			52
LG 1	UDAp415	Si	Si	56	LG2/4	CPPCT005			50
LG 1	UDAp426	Si	Si	57	LG2/4	UDP98411	Si	Si	57
LG 1	UDAp435			54	LG 3	AMPA101	Si	Si	56
LG 1	UDAp440	Si	Si	56	LG 3	BPPCT006			57
LG 1	UDAp441	Si	Si	55	LG 3	BPPCT039			57
LG 1	UDAp442	Si		56	LG 3	CPDCT008			59
LG 1	UDAp444			55	LG 3	MA015a			59
LG 1	UDAp453	Si	Si	57	LG 3	PacC25	Si		52
LG 1	UDAp458	Si	Si	55	LG 3	PaCITA04	Si	Si	57
LG 1	UDAp463	Si	Si	55	LG 3	PaCITA23	Si	Si	52
LG 1	UDAp466			55	LG 3	UDAp412	Si	Si	56
LG 1	UDAp467	Si	Si	56	LG 3	UDAp429	Si	Si	56
LG 1	UDAp469	Si	Si	53	LG 3	UDAp436	Si	Si	52
LG 1	UDAp471	Si	Si	57	LG 3	UDAp446	Si	Si	57
LG 1	UDAp474			53	LG 3	UDAp449	Si		57
LG 1	UDAp485	Si	Si	56	LG 3	UDAp468	Si	Si	57
LG 1	UDAp487	Si	Si	56	LG 3	UDAp472			56
LG 1	UDP96018	Si		57	LG 3	UDAp493	Si	Si	57
LG1/2	UDP96005	Si		57	LG 3	UDAp494	Si	Si	57
LG1/5	UDAp479	Si	Si	57	LG 3	UDAp496			56
LG 2	AMPA095			57	LG 3	UDAp499	Si	Si	57
LG 2	AMPA116	Si	Si	57	LG 3	UDP96008	Si		59
LG 2	AMPA118	Si		58	LG 3	UDP97403	Si		57
LG 2	BPPCT001			57	LG3/5	UDAp423	Si	Si	59
LG 2	BPPCT004	Si		57	LG3/8	UDP96019	Si		52
LG 2	BPPCT013	Si		55	LG 4	AMPA103	Si		56
LG 2	BPPCT020			57	LG 4	AMPA110			56
LG 2	BPPCT024			57	LG 4	BPPCT023			57
LG 2	BPPCT030	Si	Si	55	LG 4	BPPCT035			57
LG 2	BPPCT034	Si	Si	56	LG 4	CPPCT028	Si		57
LG 2	MA007	Si	Si	59	LG 4	CPSCT035			52





**Tabla suplementaria 3.** Resumen de marcadores microsatélite evaluados en la población 'ZxP'.

SSR	Referencia	Especie	Origen	Nº de SSRs evaluados	Nº de SSRs amplificados	Nº de SSRs mapeados
AMPA	Hagen y col., 2004	Melocotonero	Genómico	9	6	1
AMPA	Hagen y col., 2004	Melocotonero	ADNc	2	0	0
AMPA	Hagen y col., 2004	Melocotonero	EST	5	4	1
BPPCT	Dirlewanger y col., 2002	Melocotonero	Genómico	28	11	2
CPDCT	Mnejja y col., 2005	Ciruelo	Genómico	4	0	0
CPPCT	Aranzana y col., 2002	Melocotonero	Genómico	30	11	0
CPSCT	Mnejja y col., 2004	Ciruelo	Genómico	10	8	1
EPDCU	Howad y col., 2005 (GDR)	Almendro	EST	11	8	0
EPPCU	Howad y col., 2005 (GDR)	Melocotonero	EST	19	8	1
EPPISF	Vendramin y col., 2007	Melocotonero	EST	1	0	0
M	Yamamoto y col., 2002	Melocotonero	ADNc	3	2	1
MA	Yamamoto y col., 2002	Melocotonero	Genómico	7	4	0
Pac	Decroocq y col., 2003	Albaricoquero	EST	3	2	0
PaCITA	Lopes y col., 2002	Albaricoquero	Genómico	8	5	2
PceGA	Downey y col., 2000	Cerezo	Genómico	1	1	1
pchcms	Sosinski y col., 2000	Melocotonero	ADNc	3	2	0
pchgms	Sosinski y col., 2000	Melocotonero	ADNc	16	7	0
PGS	Soriano y col., 2011	Albaricoquero	ADNc	1	1	1
PMS	Cantini y col., 2001	Cerezo	Genómico	2	2	0
PS	Sosinski y col., 2000	Cerezo	Genómico	6	2	0
UDA	Testolin y col., 2004	Almendro	Genómico	4	3	2
UDAp	Messina y col., 2004	Albaricoquero	Genómico	96	84	22
UDP	Cipriani y col., 1999	Melocotonero	Genómico	23	15	6
<b>Total</b>				<b>292</b>	<b>186</b>	<b>42</b>

**Tabla suplementaria 4.** Segregaciones alélicas mostradas por los marcadores mapeados para cada uno de los parentales utilizados en la población 'ZxP'.

LG	SSR	'Z701-1'	'Palsteyn'	LG	SSR	'Z701-1'	'Palsteyn'
LG 1	UDAp440	ef	eg	LG 4	UDAp480	nn	np
LG 1	UDAp441	nn	np	LG 4	UDAp404	ef	eg
LG 1	UDAp415	ef	eg	LG 4	UDAp482	nn	np
LG 1	PGS1.21	ef	eg	LG 4	UDP96003	ef	eg
LG 1	PaCITA7	ab	cd	LG 4	UDAp439	ef	eg
LG 1	UDAp487	nn	np	LG 4	UDA021	ef	eg
LG 2	BPPCT34	ef	eg	LG 4	UDA027	ef	eg
LG 2	UDAp456	ef	eg	LG 4	EPPCU1775	hk	hk
LG 2	UDAp434	ef	eg	LG 4	CPSCT005	nn	np
LG 2	UDAp461	hk	hk	LG 5	AMPA105	ab	cd
LG 2	UDP98411	ef	eg	LG 5	UDAp423	lm	ll
LG 2	UDAp457	ef	eg	LG 6	UDP98416	hk	hk
LG 2	BPPCT30	ef	eg	LG 6	UDAp420	ab	cd
LG 2	UDAp473	ef	eg	LG 6	UDP98412	hk	hk
LG 2	PceGA34	ef	eg	LG 7	UDAp503	hk	hk
LG 2	AMPA116	ef	eg	LG 7	UDAp471	ef	eg
LG 2	UDP98406	ef	eg	LG 7	UDAp460	lm	ll
LG 3	UDAp446	ef	eg	LG 7	UDAp407	nn	np
LG 3	UDAp412	lm	ll	LG 8	UDAp470	ef	eg
LG 3	PaCITA4	nn	np	LG 8	UDP98409	ef	eg
LG 3	UDAp499	nn	np	LG 8	M6a	nn	np
				<b>Total</b>		<b>42</b>	

**Tabla suplementaria 5.** Posición de las ‘target sequences’ en cada grupo de ligamiento utilizadas para el diseño de SNPs, genotipo de procedencia y descripción del gen correspondiente en el genoma del melocotonero (Genome Database Rosaceae, GDR). Los SNPs analizados se muestran en verde.

Marcador	Posición	LG	Anotación del gen	Genotipo	Librería
S1_1761101	1761101	1	BRG-1	Rojo Pasión	ceb1
S1_2386633	2386633	1	His Kinase A (phosphoacceptor) domain	Rojo Pasión	ceb1
S1_3689497_bis	3689497	1	no hit	Rojo Pasión	ceb1
S1_9687151	9687151	1	CHAPERONE BINDING PROTEIN	Rojo Pasión	ceb1
S1_11325551	11325551	1	no hit	Rojo Pasión	ceb1
S1_11325551	11325551	1	no hit	Rojo Pasión	ceb4
S1_13282432	13282432	1	PPR repeat	Rojo Pasión	ceb3
S1_18466842	18466842	1	DNA binding	Rojo Pasión	ceb1/3
S1_21385614	21385614	1	Acetylglucosaminyltransferase EXT1/exostosin 1	Rojo Pasión	ceb1
S1_23746169	23746169	1	LIPOXYGENASE	Rojo Pasión	ceb1
S1_25942251	25942251	1	U5 snRNP-like RNA helicase subunit	Rojo Pasión	ceb1
S1_27742963	27742963	1	Purple acid phosphatase	Rojo Pasión	ceb1
S1_28684003	28684003	1	Predicted small molecule transporter	Rojo Pasión	ceb1
S1_31065373	31065373	1	PHOSPHATIDYLINOSITOL-4-PHOSPHATE 5-KINASE RELATED	Rojo Pasión	ceb1
S1_31188376	31188376	1	PPR repeat	Rojo Pasión	ceb1
S1_32252927	32252927	1	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase	Rojo Pasión	ceb3
S1_32984769	32984769	1	GULONOLACTONE OXIDASE	Rojo Pasión	ceb3
S1_33905456	33905456	1	two-component response regulator ARR-B family	Rojo Pasión	ceb1
S1_38382339	38382339	1	Metallothionein-like protein	Rojo Pasión	ceb3
S2_972162	972162	2	No hits	Rojo Pasión	ceb3
S2_3896846	3896846	2	PPR repeat	Rojo Pasión	ceb1
S2_9884272	9884272	2	FE(II)/ ASCORBATE OXIDASE SUPERFAMILY	Rojo Pasión	ceb4
S2_12550486	12550486	2	protein binding	Rojo Pasión	ceb1
S2_15890109	15890109	2	TOPOISOMERASE-RELATED PROTEIN	Rojo Pasión	ceb1
S2_16631751	16631751	2	No hits	Rojo Pasión	ceb1
S2_18180525	18180525	2	RNA polymerase II transcription mediator	Rojo Pasión	ceb4
S2_18992724	18992724	2	eIF-2alpha kinase PEK/EIF2AK3	Rojo Pasión	ceb1
S2_21073478	21073478	2	HSP	Rojo Pasión	ceb3
S2_21958314	21958314	2	IkappaB kinase complex, IKAP component	Rojo Pasión	ceb1
S2_23012822	23012822	2	FE(II)/ ASCORBATE OXIDASE SUPERFAMILY	Rojo Pasión	ceb1
S2_24048418	24048418	2	Serine/threonine protein kinase	Rojo Pasión	ceb3
S2_24952146	24952146	2	Uncharacterized conserved protein	Rojo Pasión	ceb3
S3_899478	899478	3	DNA2/NAM7 HELICASE FAMILY	Rojo Pasión	ceb1
S3_2149868	2149868	3	MYB-RELATED	Rojo Pasión	ceb4
S3_2522110	2522110	3	SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE-RELATED	Rojo Pasión	ceb1
S3_3710366	3710366	3	Protein kinase A anchor protein nuclear localisation signal	Rojo Pasión	ceb1
S3_5031624	5031624	3	26S proteasome regulatory complex, subunit RPN11	Rojo Pasión	ceb1
S3_5399175	5399175	3	Phospholipase D1	Rojo Pasión	ceb1
S3_6312135	6312135	3	Serine/threonine protein kinase	Rojo Pasión	ceb1
S3_7584297	7584297	3	HSP	Rojo Pasión	ceb3

Tabla suplementaria 5 (Continuación).

Marcador	Posición	LG	Anotación del gen	Genotipo	Librería
S3_8465286	8465286	3	no hits	Rojo Pasión	ceb1
S3_9642593	9642593	3	ALPHA/BETA HYDROLASE RELATED	Rojo Pasión	ceb3
S3_10315819	10315819	3	no hits	Rojo Pasión	ceb1
S3_11297539	11297539	3	Folypolyglutamate synthase	Rojo Pasión	ceb3
S3_12023722	12023722	3	N-TERMINAL ACETYLTRANSFERASE	Rojo Pasión	ceb1
S3_13001567	13001567	3	Serine/threonine protein kinase	Rojo Pasión	ceb3
S3_13711279	13711279	3	No hits	Rojo Pasión	ceb4
S3_14518113	14518113	3	Auxin response factor	Rojo Pasión	ceb1
S3_15588939	15588939	3	zinc ion binding	Rojo Pasión	ceb4
S3_16114753	16114753	3	CENTROMERE/KINETOCHORE PROTEIN ZW10	Rojo Pasión	ceb4
S3_17297604	17297604	3	FRATAXIN	Rojo Pasión	ceb3
S3_17969374	17969374	3	No hits	Rojo Pasión	ceb1
S3_18629805	18629805	3	No hits	Rojo Pasión	ceb1
S3_19232990	19232990	3	No hits	Rojo Pasión	ceb4
S3_20305123	20305123	3	No hits	Rojo Pasión	ceb4
S3_21206814	21206814	3	Transcription factor GT-2 and related proteins	Rojo Pasión	ceb3
S4_568071	568071	4	PHOSPHATIDATE CYTIDYLTRANSFERASE	Rojo Pasión	ceb3
S4_1732813	1732813	4	protein binding	Rojo Pasión	ceb1
S4_3867486	3867486	4	Protein of unknown function, DUF642	Rojo Pasión	ceb3
S4_5168436	5168436	4	Protein kinase C terminal domain	Rojo Pasión	ceb1
S4_5816417	5816417	4	SNARE PROTEINS	Rojo Pasión	ceb1
S4_6714611	6714611	4	No hits	Rojo Pasión	ceb1
S4_9061773	9061773	4	No hits	Rojo Pasión	ceb1
S4_10035210	10035210	4	RNA-binding protein	Rojo Pasión	ceb1
S4_11060651	11060651	4	peroxidase [EC:1.11.1.7]	Rojo Pasión	ceb3
S4_11947345	11947345	4	Protein tyrosine kinase	Rojo Pasión	ceb3
S4_13226667	13226667	4	Hsp70 protein	Rojo Pasión	ceb3
S4_14541399	14541399	4	No hits	Rojo Pasión	ceb4
S4_15508720	15508720	4	RING FINGER PROTEIN 11	Rojo Pasión	ceb1
S4_16590520	16590520	4	Pre-mRNA splicing factor PRP21 like protein	Rojo Pasión	ceb4
S4_17945630	17945630	4	mRNA cleavage factor I subunit/CPSF subunit	Rojo Pasión	ceb1
S4_19301972	19301972	4	Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase	Rojo Pasión	ceb1
S4_20001145	20001145	4	ribosomal RNA assembly protein	Rojo Pasión	ceb3
S5_1627140	1627140	5	No hits	Rojo Pasión	ceb1
S5_2844611	2844611	5	No hits	Rojo Pasión	ceb3
S5_3526670	3526670	5	Kinase phosphorylation protein	Rojo Pasión	ceb1
S5_4396841	4396841	5	EYES ABSENT HOMOLOG	Rojo Pasión	ceb1
S5_5409978	5409978	5	Protein of unknown function (DUF1162)	Rojo Pasión	ceb3
S5_12157132	12157132	5	Anaphase-promoting complex (APC), subunit 11	Rojo Pasión	ceb1

**Tabla suplementaria 5 (Continuación).**

Marcador	Posición	LG	Anotación del gen	Genotipo	Librería
S5_13966692	13966692	5	Telomere length regulation protein	Rojo Pasión	ceb4
S5_16641712	16641712	5	Mitochondrial carrier protein	Rojo Pasión	ceb1
S5_17864403	17864403	5	Serine/threonine protein kinase	Rojo Pasión	ceb1
S6_1754449	1754449	6	PX domain	Rojo Pasión	ceb1
S6_7361516	7361516	6	ATP-DEPENDENT HELICASE SMARCA	Rojo Pasión	ceb1
S6_8182669	8182669	6	pheophorbide a oxygenase	Rojo Pasión	ceb1
S6_10052033	10052033	6	60S RIBOSOMAL PROTEIN L10A - RELATED	Rojo Pasión	ceb1
S6_12174633	12174633	6	Molecular chaperone	Rojo Pasión	ceb1
S6_13331943	13331943	6	Nse1 non-SMC component of SMC5-6 complex	Rojo Pasión	ceb3
S6_13646233	13646233	6	LUPUS LA RIBONUCLEOPROTEIN	Rojo Pasión	ceb3
S6_17630830	17630830	6	PPR repeat	Rojo Pasión	ceb1
S6_18492225	18492225	6	GRAM domain	Rojo Pasión	ceb1
S6_20222412	20222412	6	Serine/threonine protein kinase	Rojo Pasión	ceb1
S6_22539524	22539524	6	Protein of unknown function (DUF3741)	Rojo Pasión	ceb1
S6_24150690	24150690	6	No hits	Rojo Pasión	ceb1
S6_26089411	26089411	6	No hits	Rojo Pasión	ceb3
S6_26592718	26592718	6	PWWP domain	Rojo Pasión	ceb1
S6_27144082	27144082	6	heat shock protein binding	Rojo Pasión	ceb4
S7_1238305	1238305	7	HISTIDINE TRIAD (HIT) PROTEIN	Rojo Pasión	ceb3
S7_2345619	2345619	7	RNA BINDING PROTEIN	Rojo Pasión	ceb1
S7_3054683	3054683	7	No hits	Rojo Pasión	ceb1
S7_4381332	4381332	7	Molecular chaperone (DnaJ superfamily)	Rojo Pasión	ceb1
S7_6660631	6660631	7	PEPTIDE CHAIN RELEASE FACTOR	Rojo Pasión	ceb1
S7_8399162	8399162	7	ADP-RIBOSYLATION FACTOR	Rojo Pasión	ceb3
S7_9026845	9026845	7	RNA-BINDING PROTEIN	Rojo Pasión	ceb3
S7_11190908	11190908	7	GAMMA TUBULIN COMPLEX PROTEIN	Rojo Pasión	ceb1
S7_12471396	12471396	7	rRNA processing protein Rrp5	Rojo Pasión	ceb3
S7_14883608	14883608	7	PPR repeat	Rojo Pasión	ceb3
S7_19379420	19379420	7	Predicted transposase	Rojo Pasión	ceb3
S8_4773161	4773161	8	STEROL DESATURASE	Rojo Pasión	ceb3
S8_5519857	5519857	8	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase	Rojo Pasión	ceb3
S8_13630387	13630387	8	Uncharacterized conserved protein	Rojo Pasión	ceb4
S8_17732612	17732612	8	HSP	Rojo Pasión	ceb1
S8_19381679	19381679	8	INOSINE-5-MONOPHOSPHATE DEHYDROGENASE	Rojo Pasión	ceb1

**Tabla suplementaria 5 (Continuación).**

Marcador	Posición	LG	Anotación del gen	Genotipo	Librería
S1_4496195	4496195	1	CCT motif	Z506-7	ceb5
<b>S1_5542439</b>	5542439	1	APOSPORY-ASSOCIATED PROTEIN C-RELATED	Z506-7	ceb5
S1_6455560	6455560	1	Putative serine esterase (DUF676)	Z506-7	ceb5
S1_8500474	8500474	1	No hits	Z506-7	ceb6
<b>S1_14071595</b>	14071595	1	HIRAN domain	Z506-7	ceb5
S1_16779583	16779583	1	ATPase family associated with various cellular activities (AAA)	Z506-7	ceb5
<b>S1_17542722</b>	17542722	1	RIBOSOMAL PROTEIN L7/L12	Z506-7	ceb5
<b>S1_20067081</b>	20067081	1	Disrupter of silencing SAS10	Z506-7	ceb5
S1_24310609	24310609	1	Targeting protein for Xklp2 (TPX2)	Z506-7	ceb5
<b>S1_36001839</b>	36001839	1	Serine palmitoyltransferase	Z506-7	ceb5
S1_39008664	39008664	1	Plant protein of unknown function	Z506-7	ceb5
<b>S1_40540558</b>	40540558	1	No hits	Z506-7	ceb5
S1_42048104	42048104	1	ENDO-1,4-BETA-GLUCANASE	Z506-7	ceb5
<b>S1_45557783</b>	45557783	1	BETA-1,3-GLUCURONYLTRANSFERASE-RELATED	Z506-7	ceb5
<b>S2_2396072</b>	2396072	2	No hits	Z506-7	ceb6
<b>S2_7309483</b>	7309483	2	No hits	Z506-7	ceb6
<b>S2_8280543</b>	8280543	2	AMMECR1 HOMOLOG	Z506-7	ceb5
<b>S2_9011704</b>	9011704	2	No hits	Z506-7	ceb5
<b>S2_10509467</b>	10509467	2	Cysteine endopeptidases.	Z506-7	ceb5
<b>S5_8566413</b>	8566413	5	Aspartyl protease	Z506-7	ceb5
<b>S5_9617269</b>	9617269	5	SNARE associated Golgi protein	Z506-7	ceb5
<b>S6_5217065</b>	5217065	6	Serine/threonine protein kinase	Z506-7	ceb5
<b>S8_15339816</b>	15339816	8	INTERFERON-RELATED DEVELOPMENTAL REGULATOR-RELATED	Z506-7	ceb5

**Tabla suplementaria 6.** Combinaciones alélicas (C.A), heterocigosidad (H) y poder de discriminación (PD) calculados para los SNPs ensayados en el estudio de diversidad genética de 37 genotipos de albaricoquero y genotipado de las poblaciones 'B×C' y 'G×C'.

LG	SNP	CA	H	PD	LG	SNP	CA	H	PD	LG	SNP	CA	H	PD
S1	1761101	3	0,32	0,48	S3	2149868	3	0,08	0,20	S5	3526670	3	0,38	0,62
S1	3689497	2	0,38	0,47	S3	2522110	3	0,30	0,52	S5	8566413	3	0,51	0,58
S1	5542439	2	0,24	0,37	S3	5031624	2	0,38	0,47	S5	9617269	3	0,42	0,63
S1	9687151	3	0,38	0,58	S3	6312135	2	0,11	0,19	S5	12157132	3	0,46	0,64
S1	11325551	3	0,46	0,57	S3	9642593	2	0,14	0,23	S5	13966692	3	0,42	0,64
S1	13282432	3	0,54	0,58	S3	10315819	2	0,11	0,19	S5	16641712	3	0,57	0,55
S1	14071595	3	0,58	0,56	S3	12023722	3	0,43	0,65	S5	17864403	3	0,49	0,63
S1	17542722	3	0,46	0,61	S3	13001567	3	0,57	0,58	S6	1754449	3	0,54	0,57
S1	20067081	3	0,50	0,57	S3	13711279	3	0,51	0,55	S6	5217065	3	0,49	0,60
S1	21385614	3	0,49	0,59	S3	14518113	2	0,32	0,44	S6	7361516	3	0,27	0,43
S1	23746169	3	0,46	0,55	S3	15588939	3	0,59	0,56	S6	10052033	2	0,22	0,34
S1	27742963	3	0,56	0,59	S3	16114753	3	0,31	0,47	S6	12174633	3	0,62	0,54
S1	31065373	3	0,46	0,62	S3	17969374	3	0,62	0,51	S6	13331943	3	0,24	0,44
S1	32252927	3	0,54	0,52	S3	18629805	3	0,43	0,64	S6	18492225	2	0,19	0,31
S1	36001839	3	0,30	0,64	S3	21206814	3	0,32	0,47	S6	22539524	2	0,35	0,46
S1	38382339	3	0,46	0,55	S4	568071	3	0,41	0,66	S6	24150690	3	0,27	0,47
S1	40540558	3	0,30	0,59	S4	1732813	3	0,46	0,57	S6	26089411	3	0,46	0,52
S1	45557783	2	0,22	0,35	S4	3867486	3	0,06	0,32	S6	26592718	2	0,32	0,44
S2	972162	3	0,59	0,53	S4	5168436	3	0,27	0,50	S7	1238305	2	0,32	0,44
S2	2396072	3	0,43	0,57	S4	5816417	3	0,49	0,62	S7	3054683	3	0,51	0,55
S2	7309483	2	0,14	0,24	S4	9061773	3	0,29	0,64	S7	6660631	3	0,28	0,64
S2	8280543	3	0,43	0,61	S4	10035210	3	0,53	0,61	S7	9026845	3	0,30	0,52
S2	9011704	3	0,35	0,63	S4	11947345	3	0,49	0,53	S7	11190908	3	0,16	0,36
S2	9884272	3	0,49	0,61	S4	13226667	3	0,21	0,52	S7	12471396	2	0,30	0,42
S2	10509467	3	0,42	0,57	S4	14541399	3	0,47	0,61	S7	14883608	3	0,30	0,64
S2	12550486	3	0,57	0,58	S4	15508720	3	0,49	0,60	S7	19379420	3	0,65	0,50
S2	15890109	3	0,31	0,58	S4	16590520	3	0,58	0,55	S8	4773161	3	0,14	0,28
S2	18180525	2	0,19	0,31	S4	17945630	3	0,38	0,53	S8	5519883	3	0,35	0,49
S2	18992724	3	0,26	0,63	S4	19301972	3	0,35	0,65	S8	13630387	3	0,46	0,57
S2	21073478	2	0,00	0,12	S4	20001145	3	0,38	0,60	S8	15339816	3	0,41	0,51
S2	24952146	3	0,14	0,32	S5	1627140	3	0,65	0,52	S8	17732612	2	0,24	0,37
S3	899478	3	0,56	0,58	S5	2844611	3	0,17	0,62	<b>Promedio</b>		<b>2,8</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>





**Tabla suplementaria 8. Evaluación de marcadores SSR realizada en las poblaciones 'BxC' y 'GxC' mediante secuenciador ABI PRISM 3730.**

LG	SSR	'Bergeron'	'Currot'	'Goldrich'	Mapeados	LG	SSR	'Bergeron'	'Currot'	'Goldrich'	Mapeados	
LG 1	UDAp415	185/190	178	190/200	Si	LG 4	UDAp404	182/188	198	178	Si	
LG 1	UDAp440	140/163	148/161	143	Si	LG 4	UDAp439	145/152	137/152	127/146	Si	
LG 1	UDAp463	172	150/172	138/170	Si	LG 4	UDP003	127/142	127	127/141	Si	
LG 1	PGS1.21	206/222	222/232	212/250	Si	LG 4	UDAp416	136	119/136	132/138	Si	
LG 1	PGSI.24	133/135	164/172	132/162	Si	LG 4	CPST005	216/256	251	217/251	Si	
LG 1	UDAp426	183/195	183	157/181	Si	LG 4	UDA021	122/147	122/147	123/148		
LG 1	UDAp414	197	197	197/201	Si	LG 4	UDA027	183	183	163		
LG 1	UDAp441	151/157	151/159	159/201		LG 5	AMPA105	210/241	230/241	219	Si	
LG 1	UDAp485	-	122/127	-		LG 5	UDAp417	147/163	123/147/163	160/167	Si	
LG 1	UDAp410	151	151	151		LG 5	UDAp425	161	161	150/161	Si	
LG 1	UDAp487	239/241	227/239	239/241		LG 5	UDAp452	188/190	180/190/194	188/190		
LG 1	PACITA7	237/241	220/239	237/239		LG 5	BPPCT038*	hk	hk	hk	Si	
LG 2	UDAp406	165/169	165	165/169	Si	LG 6	AMPA100	224/236	236	225/236	Si	
LG 2	UDAp428	125/127	127	127/136	Si	LG 6	UDP98412	143/147	115	137/143	Si	
LG 2	UDAp456	197	197	187/197	Si	LG 6	UDAp489	163/195	163/195	178/195	Si	
LG 2	BPPCT030	164/172	164	162/172	Si	LG 6	MA027*	nn	np/eg	ef	Si	
LG 2	PcGA34	164/188	164	144	Si	LG 6	PACITA14	172/214	172/212	172/212		
LG 2	A116	152	152/172	146/162	Si	LG 6	PACITA12	239/241	212/241	212/241		
LG 2	UDAp473	148/186	148/169	152/164	Si	LG 7	UDAp471	170/188	170	166/188	Si	
LG 2	UDAp457	181/189	189/205	179/205		LG 7	UDAp503	236	236	210/236	Si	
LG 2	UDP98411	196/239	196/239	239/241		LG 7	UDAp460	194	178/194	194	Si	
LG 3	UDAp423	200/221	200/208/224	200/224	Si	LG 7	UDAp407*	nn	np	nn	Si	
LG 3	UDAp436	156/165	160/183	160	Si	LG 7	CPPCT022*	nn	np/eg	ef	Si	
LG 3	PaCITA10	205	187/200	205/208	Si	LG 7	UDAp478*	lm	ll	lm	Si	
LG 3	UDAp496	127/168/196	154/197	-		LG 7/LG 8	UDAp401	203/232	232	232		
LG 3	UDAp446	162/181	163/182	143/194		LG 8	UDAp470	133/145	133/145	-	Si	
LG 3/5/7	UDAp431	207/222	203/227	220/238		LG 8	M6a	211	211/236	236	Si	
LG 4	UDAp480	200/210	175/187	165/212	Si	LG 9	UDP409	190	182/190	163/167	Si	
LG 4	UDAp421	141/143/152	141/164	144/162	Si							
						<b>Mapeados</b>						<b>41</b>
						<b>Total</b>						<b>57</b>

\*Marcadores completados en geles de agarosa METAPHOR.





