



Universitat de Lleida

Desarrollo y transferibilidad de los microsátélites en Prunus y su aplicación en estudios de variabilidad

Mourad Mnejja Abd Mouleh

Dipòsit Legal: L.233-2015

<http://hdl.handle.net/10803/286780>



Desarrollo y transferibilidad de los microsátélites en Prunus y su aplicación en estudios de variabilidad està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

Les publicacions incloses en la tesi no estan subjectes a aquesta llicència i es mantenen sota les condicions originals.

(c) 2015, Mourad Mnejja Abd Mouleh



Universitat de Lleida
Escola de Doctorat

IRTA, Centre de Recerca en Agrigenòmica
CSIC-IRTA-UAB-UB

Programa Genòmica de plantes i animals

Universitat de Lleida

Programa Ciència i Tecnologia Agrària i
Alimentària

DESARROLLO Y TRANSFERIBILIDAD DE LOS MICROSATÉLITES EN *PRUNUS* Y SU APLICACIÓN EN ESTUDIOS DE VARIABILIDAD

Mourad Mnejja Abd Mouleh
Bellaterra, septiembre 2014

**TESIS DOCTORAL
UNIVERSITAT DE LLEIDA**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRÀRIA
PROGRAMA DE DOCTORADO CIÈNCIA I TECNOLOGIA AGRÀRIA I
ALIMENTÀRIA

**DESARROLLO Y TRANSFERIBILIDAD DE LOS MICROSATÉLITES
EN *PRUNUS* Y SU APLICACIÓN EN ESTUDIOS DE VARIABILIDAD**

Memoria presentada por Mourad Mnejja Abd Mouleh para optar al
título de doctor en la Universitat de Lleida

Mourad Mnejja Abd Mouleh
Bellaterra, septiembre 2014

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Pere Arús i Gorina
IRTA-CRAG

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Jordi Garcia Mas
IRTA-CRAG

TUTOR DE TESIS
Prof. Juan A. Martín
Sánchez
UDL

**'Ciencia es todo aquello sobre lo cual
siempre cabe discusión'.**

José Ortega y Gasset

Agradecimiento

Creo firmemente que somos el resultado de las influencias de las gentes que han ido pasando por nuestra vida. Llevar a cabo mi tesis es, sin duda, la sinergia de muchos esfuerzos y ayudas. Por eso quiero dar las gracias a todo aquel que influyó positivamente para que esta tesis tuviera un buen final, sin menospreciar una simple sonrisa.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis Dr. Pere Arús y Dr. Jordi Garcia por confiar en mí para realizar este trabajo en su laboratorio y bajo su tutela. Les quiero dar las gracias por su inestimable aporte en mi formación, por su apoyo y por su infinita paciencia. A mi tutor Profesor Juan Antonio Martín Sánchez, por orientarme y solucionarme los pequeños problemas que fui encontrando en el camino.

La realización de este trabajo fue posible gracias a la ayuda de muchas personas, pero no quiero dejar pasar esta oportunidad sin agradecer la colaboración de la Dra. Marisa Badenas y del Dr. Ignasi Iglesias que nos facilitaron el material vegetal y los detalles y características de cada variedad. También mis agradecimientos al Dr. Jean Marc Audergon por compartir con nosotros sus cebadores de albaricoquero. A la Dra. Txose Aranzana, muchas gracias por ayudarme con el programa "Structure" y por sus inestimables ánimos.

Tantos años hasta la finalización de esta tesis hicieron que coincidiera y conviviera con mucha gente, pero es inevitable destacar unas cuantas personas que marcaron esta etapa de forma positiva. Ibo, compañero de despacho desde que aterricé en el departamento, muchas gracias por todo, sabes que te considero un amigo. A las dos adorables chicas, que además de haber sido compañeras de trabajo, tuve la suerte de poder disfrutar de su compañía también en el pueblo, Mireia y Montse. Muchas gracias por dejarme tan buenos recuerdos. A mis compañeros del laboratorio desde mi llegada al grupo y hasta el momento; Angel, Esteve, Vanessa y Fuensi, muchas gracias por vuestra ayuda, vuestro apoyo y por los buenos momentos compartidos.

Quiero reiterar mi agradecimiento a todos los que pasaron por el departamento, a los que estuvieron en algún momento; Toni Monforte (me encantó tu compañía), Ali, Andrea, Carmen, Claudio, Celia, Céline, Edu, Eudald, Gisela, Jonatan, Julio, Michael, Mónica, Raúl, Roger, Xavier Pera y muchos más (nos lo pasamos bien y espero seguir disfrutando de vuestra amistad), a los que siguen estando; Amparo, Dani, Joana, Marta, Montse, Noemi y Werner, y a los que me acompañaron en mi aventura con la mejora del geranio; Cristina, Gemma, la, Manoli y Toni. Muchas gracias a todos.

Finalmente, quiero dedicar esta tesis a mi madre y a mi padre, que en paz descanse, a mis hermanos, mis cuñados y mis sobrinos, que al estar lejos no puedo disfrutar de su compañía. A mi solecito Nour, a Marta y su familia.

ÍNDICE

Resumen	1
Resum	3
Abstract	5
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
1. El género <i>Prunus</i>	9
1.1. Subgénero <i>Amygdalus</i>	9
1.1.1. Melocotonero	10
1.1.2. Almendro	11
1.2. Subgénero <i>Prunophora</i>	12
1.2.1. Albaricoquero	13
1.2.2. Ciruelo	13
1.3. Subgénero <i>Cerasus</i>	14
1.3.1. Cerezo	14
2. Marcadores moleculares y su uso en las especies del género <i>Prunus</i>	14
2.1. Isoenzimas	15
2.2. RFLPs	16
2.3. RAPDs	17
2.4. AFLPs	18
2.5. SSRs	19
2.6. SNPs	19
3. Marcadores basados en microsatélites	21
3.1. Estrategias de desarrollo de los microsatélites	21
3.2. Distribución y frecuencia de los microsatélites	24
3.3. Mecanismos de mutación y evolución de los microsatélites	27
3.4. Funciones de los microsatélites	29
3.5. Transferibilidad de los microsatélites entre diferentes especies	30
3.6. Aplicaciones de los microsatélites	32
4. Microsatélites en las Rosáceas	33
4.1. Microsatélites en <i>Prunus</i>	33
4.1.1. Microsatélites disponibles	33
4.1.2. Aplicaciones en estudios de variabilidad	37
4.1.2.1. Estudios de variabilidad en el melocotonero	37
4.1.2.2. Estudios de variabilidad en el almendro	38
4.1.2.3. Estudios de variabilidad en el albaricoquero	39
4.1.2.4. Estudios de variabilidad en los ciruelos	40
4.1.2.5. Estudios de variabilidad en los cerezos	41
4.1.3. Construcción de mapas genéticos con SSRs y otras aplicaciones a la genética y mejora	46
4.2. Microsatélites en las Maloideas	51
4.2.1. Microsatélites disponibles	51
4.2.2. Aplicaciones en estudios de variabilidad	52
4.2.3. Construcción de mapas genéticos y otras aplicaciones a la genética y mejora ...	56
4.3. Microsatélites en las Rosoideas	60
4.3.1. Microsatélites disponibles	60
4.3.2. Aplicaciones en estudios de variabilidad	61
4.3.3. Construcción de mapas genéticos y otras aplicaciones a la genética y mejora ...	63
5. Transferencia de microsatélites en las Rosáceas	65
Referencias	75
OBJETIVOS	101

CAPÍTULO I. DESARROLLO DE MICROSATÉLITES	105
Development and transportability across <i>Prunus</i> species of 42 polymorphic almond microsatellites	107
Abstract.....	107
References.....	111
Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (<i>Prunus salicina</i> Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond.....	113
Abstract.....	113
References.....	116
CAPÍTULO II. TRANSFERIBILIDAD	117
Prunus microsatellite marker transferability across rosaceous crops	119
Abstract.....	119
Introduction.....	119
Materials and methods	120
Plant material and DNA extraction	120
SSR markers	120
Scoring of amplification and polymorphism	121
Results	123
Cross-species amplification.....	123
Cross-species transferability.....	123
SSR number, diversity and origin	124
Discussion.....	124
SSR transferability	124
Comparing <i>Prunus</i> species variability.....	126
A universal SSR set for <i>Prunus</i>	127
Genomic vs. EST-derived SSRs.....	128
<i>Prunus</i> SSRs in other Rosaceae	128
References.....	129
CAPÍTULO III. VARIABILIDAD	139
Estudio de la variabilidad del almendro usando marcadores microsatélite.....	141
Introducción.....	141
Materiales y métodos.....	143
Resultados y discusión.....	147
Referencias	158
Estudio de la variabilidad y comprobación de pedigrís en ciruelo japonés usando marcadores microsatélite	161
Introducción.....	161
Materiales y métodos.....	163
Resultados y discusión.....	169
Referencias	180
DISCUSIÓN GENERAL	183
1. Desarrollo de los microsatélites	185
2. Variabilidad de los microsatélites desarrollados	187
2.1. Variabilidad en almendro.....	187
2.2. Variabilidad en ciruelo japonés	190
3. Transferibilidad de los microsatélites	193
3.1. Comparación de la variabilidad entre especies de <i>Prunus</i>	195
3.2. Microsatélites genómicos y derivados de ESTs.....	196
4. Aplicaciones a la genética y mejora de frutales	197
Referencias.....	201
Conclusiones	204

Resumen

El género *Prunus*, de la familia *Rosaceae*, incluye los frutales de hueso: melocotonero (*P. persica*), albaricoquero (*P. armeniaca*), ciruelo europeo (*P. domestica*), ciruelo Japonés (*P. salicina*), cerezo (*P. avium*) y guindo (*P. cerasus*), además de una especie cultivada por sus semillas, el almendro (*P. dulcis*). Esta investigación tiene por objeto desarrollar marcadores de tipo microsatélite (o SSR por simple-sequence repeat) en almendro y ciruelo japonés, las dos únicas especies entre los cultivos de *Prunus* diploides para las que estos marcadores todavía no estaban disponibles al inicio de esta tesis, y estudiar su variabilidad en una colección de cultivares de ambas especies. Adicionalmente, hemos estudiado la transferibilidad de los microsatélites obtenidos en *Prunus* a las especies cultivadas de las rosáceas, incluyendo seis especies de *Prunus*, y tres de otros géneros: el manzano (*Malus x domestica*), el peral (*Pyrus comunis*) y la fresa octoploide (*Fragaria x ananassa*).

Para desarrollar nuevos marcadores microsatélites, se utilizaron dos métodos: uno a partir de genotecas de ADN enriquecidas (para las secuencias CT/AG), con el que se obtuvieron 31 SSRs en almendro y 27 en ciruelo japonés y otro usando las secuencias de ESTs (expressed sequence tags) existentes en las bases de datos de almendro (22 SSRs) y melocotonero (25 SSRs). Todos estos microsatélites fueron polimórficos en un grupo de ocho cultivares de su correspondiente especie.

Con los marcadores obtenidos se estudió la variabilidad de una colección más extensa de variedades de almendro (30) usando 47 microsatélites procedentes de almendro (25 genómicos y 22 derivados de ESTs). Un estudio parecido se realizó en 38 variedades de ciruelo japonés con 27 SSRs genómicos obtenidos en esta especie. Estos marcadores fueron altamente variables en ambas especies, con un promedio de 7,3 alelos por locus en almendro y 7,2 en ciruelo japonés, permitiendo identificar individualmente todos los individuos estudiados. Los datos obtenidos indicaron que los SSRs de la misma especie son más variables que los

desarrollados en otras especies próximas. Además, en almendro, pudimos constatar que los microsatélites procedentes de ESTs, y particularmente los localizados en zonas codificantes, eran menos variables que los de origen genómico.

La agrupación de las variedades estudiadas en función de su distancia genética (dendrograma) o de su estructura subpoblacional fue bastante similar tanto en almendro como ciruelo japonés. En almendro las variedades se agruparon según su procedencia geográfica y su época de floración. En cuanto a las variedades de ciruelo japonés, mayoritariamente de reciente origen y desarrolladas en Estados Unidos, se agruparon según los programas de mejora de los diferentes estados en los que fueron obtenidas.

Para el estudio de transferibilidad, se eligieron 145 SSRs de *Prunus* [25 genómicos de almendro, melocotonero y ciruelo japonés; 25 de ESTs de melocotonero, 22 de ESTs de almendro y 23 de albaricoquero (10 genómicos y 13 de ESTs)], todos polimórficos e identificando un único locus en su especie origen. Estos microsatélites se estudiaron en ocho variedades de las siguientes nueve especies: almendro, melocotonero, ciruelo europeo, ciruelo japonés, albaricoquero, cerezo, manzano, peral y fresón. El 83% de estos marcadores amplificaron bandas del tamaño esperado en el resto de las especies de *Prunus* y el 63,9% fueron polimórficos, denotando la elevada transferibilidad dentro de este mismo género. Esta transferibilidad fue decayendo según se hacía más grande la distancia genética que separa la especie origen del SSR de la especie estudiada, por lo que sólo el 16,3% fueron transferibles a especies de otros géneros de Rosáceas (manzano, peral y fresón). No detectamos diferencias significativas entre microsatélites de diferente origen (genómicos y de ESTs) por lo que respecta a su transferibilidad, ni a su capacidad para la detección de variabilidad.

Un total de 31 SSRs amplificaron y fueron polimórficos en todas las especies de *Prunus* estudiadas, de los cuales 12, seleccionados para que tuvieran una buena cobertura del genoma, fueron propuestos como el juego universal para análisis de variabilidad en *Prunus*.

Resum

El gènere *Prunus*, de la família *Rosaceae*, inclou els fruiters d'os: presseguer (*P. persica*), albercoquer (*P. armeniaca*), pruna europea (*P. domestica*), pruna japonesa (*P. salicina*), cirerer (*P. avium*) i el guinder (*P. cerasus*), a més a més d'una espècie cultivada per les seves llavors, l'ametller (*P. dulcis*). Aquesta investigació té com a objectiu el desenvolupament de marcadors tipus microsatèl·lit (o SSR per simple-sequence repeat) en ametller i en pruna japonesa, les dos úniques espècies entre els cultius de *Prunus* diploides pels quals aquests tipus de marcadors encara no estaven disponibles a l'inici d'aquesta tesi, i estudiar la seva variabilitat en una col·lecció de cultivars de ambdues espècies. Addicionalment, hem estudiat la transferibilitat dels microsatèl·lits obtinguts en *Prunus* a les espècies cultivades de les rosàcies, incloent sis espècies de *Prunus*, i tres d'altres gèneres: la pomera (*Malus x domestica*), la perera (*Pyrus comunis*) i la maduixa octoploide (*Fragaria x ananassa*).

Per desenvolupar nous marcadors microsatèl·lit es van utilitzar dos mètodes: un a partir de genoteques de ADN enriquides (per les seqüències CT/AG), amb el que es van obtenir 31 SSRs en ametller i 27 en pruna japonesa, i un altre utilitzant les seqüències de ESTs (expressed sequence tags) existents a les bases de dades d'ametller (22 SSRs) i presseguer (25 SSRs). Tots aquests marcadors van ser polimòrfics en un grup de vuit varietats de la espècie corresponent.

Amb els marcadors obtinguts es va estudiar la variabilitat d'una col·lecció més extensa de varietats d'ametller (30) utilitzant 45 SSRs procedents d'ametller (25 genòmics i 22 derivats d'ESTs). Un estudi similar es va realitzar en 38 varietats de pruna japonesa amb 27 SSRs genòmics obtinguts en aquesta espècie. Aquests marcadors van ser altament variables en ambdues espècies, amb un promig de 7,3 al·lels per locus en ametller i 7,2 en pruna japonesa, permetent identificar individualment tots els individus estudiats. Les dades obtingudes indicaven que els SSRs de la mateixa espècie són més variables que els desenvolupats en espècies pròximes. A

mes a mes, en ametller, vam poder constatar que els SSRs procedents de ESTs, i particularment els que estan localitzats en regions codificants, eren menys variables que els d'origen genòmic.

L'agrupació de les varietats estudiades en funció de la seva distancia genètica (dendrograma) o de la seva estructura subpoblacional va ser bastant similar tant en ametller com en pruna japonesa. En ametller les varietats es van agrupar segons la procedència geogràfica i l'època de maduració. Les varietats de pruna japonesa, majoritàriament d'origen recent i desenvolupades als Estats Units, es van agrupar segons el programa de millora dels diferents estats en els que van ser obtinguts.

Per l'estudi de transferibilitat, es van elegir 145 SSRs de *Prunus* [25 genòmics d'ametller, presseguer i prunera japonesa; 25 d'ESTs de presseguer, 22 d'ESTs d'ametller i 23 d'albercoquer (10 genòmics i 13 d'ESTs)], tots polimòrfics i identificant un únic locus en la seva espècie d'origen. Aquests SSRs es van estudiar en vuit varietats de les següents noues espècies: ametller, presseguer, pruna europea, pruna japonesa, albercoquer, cirerer, pomera, perera i maduixot. El 83% d'aquests marcadors van amplificar bandes de la mida esperada en la resta d'espècies de *Prunus* i el 63,9% van ser polimòrfics, indicant la elevada transferibilitat dins d'aquest mateix gènere. Aquesta transferibilitat anava disminuint a mida que augmentava la distancia genètica que separa la espècie origen del SSR de la espècie estudiada, amb la qual cosa el 16,3% van ser transferibles a espècies d'altres gèneres de les Rosàcies (pomera, perera i maduixot). No van detectar diferències significatives entre SSRs de diferent origen (genòmics i ESTs) en quant a la seva transferibilitat, ni a la seva capacitat per a la detecció de variabilitat.

Un total de 31 SSRs van amplificar i van ser polimòrfics en totes les espècies estudiades, dels quals 12, seleccionats per a tenir una bona cobertura del genoma, van ser proposats com a joc universal per l'anàlisi de variabilitat en *Prunus*.

Abstract

The *Prunus* genus belongs to the *Rosaceae* family and includes stone fruit crops such as peach (*P. persica*), apricot (*P. armeniaca*), European plum (*P. domestica*), Japanese plum (*P. salicina*), sweet cherry (*P. avium*) and sour cherry (*P. cerasus*), as well as almond (*P. dulcis*), a species cultivated for its seeds. This work aims to develop simple-sequence repeat (SSR) or microsatellite markers in almond and Japanese plum, the only two diploid *Prunus* species lacking these markers when this thesis began, and to study their variability in a collection of cultivars of each species. In addition, we studied the transferability of the microsatellites obtained from *Prunus* in other cultivated rosaceous species, including six *Prunus* species, and three other genus: apple (*Malus x domestica*), pear (*Pyrus comunis*) and octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*).

To develop new microsatellite markers, we used two methods: one from enriched DNA genomic library (for sequences CT/AG), for which we obtained 31 SSRs in almond and 27 in Japanese plum, and another using the available sequences of ESTs (expressed sequence tags) of almond (22 SSRs) and peach (25 SSRs). All these microsatellites were polymorphic in a set of eight cultivars of their respective species.

We used the obtained markers in an extensive collection of almond varieties (30) to study their genetic variability using 47 microsatellites derived from this species (25 genomic and 22 derived from ESTs). A similar study was conducted in 38 varieties of Japanese plum with 27 genomic SSRs obtained in this species. These markers were highly variable in both species, with an average of 7.3 alleles per locus in almond and 7.2 in Japanese plum, allowing us to distinguish individually all the studied genotypes. Our data indicated that the SSRs of the same species are more variable than those developed in other related species. In addition, in almond we found that the microsatellites derived from ESTs, and particularly those located in coding regions, were less variable than those obtained from genomic sequence.

The grouping of the studied varieties in function of their genetic distance (dendrogram) or their population structure was quite similar both in almond and Japanese plum. The almond varieties were grouped by their geographical origin and their flowering time, whereas the Japanese plum varieties, of recent origin and largely developed in the United States, were clustered according to the breeding programs of the different States they were obtained.

A total of 145 *Prunus* SSRs [25 genomic from almond, peach and Japanese plum, 25 ESTs derived from peach, 22 ESTs derived from almond and 23 derived from apricot (10 genomic and 13 from ESTs)] were chosen to study transferability, all polymorphic and identifying a single locus in the origin species. These microsatellites were studied in eight varieties of the following nine species: almond, peach, European plum, Japanese plum, apricot, sweet cherry, apple, pear and strawberry. Eighty-three percent (83%) of these markers amplified bands of the expected size in the other *Prunus* species and 63.9% were polymorphic, indicating the high transferability within this genus. This transferability decreased as the genetic distance between the species origin of the SSR and the studied species increased. Thus, only 16.3% of the tested SSRs were transferable to species of other rosaceous genera (apple, pear and strawberry). No significant differences were detected between microsatellites of different origins (genomic and ESTs) regarding their transferability, nor their capacity to detect variability.

From the studied SSRs, 31 amplified and were polymorphic in all tested *Prunus* species. Twelve, selected to cover the whole genome, were proposed as the universal set for the analysis of variability in *Prunus*.

*INTRODUCCIÓN
GENERAL*

1. El género *Prunus*

El género *Prunus* pertenece, dentro de la familia de las Rosáceas, a la subfamilia *Spiroideae*, tribu *Amygdaleae* (Potter *et al.*, 2007) y contiene más de 400 especies (Rehder, 1954), la mayor parte procedentes de Asia. Está dividido en tres subgéneros: *Amygdalus*, *Prunophora* y *Cerasus*. Desde el punto de vista económico, *Prunus* incluye los frutales de hueso: melocotonero (*P. persica* L. Batsch), albaricoquero (*P. armeniaca* L.), ciruelo europeo (*P. domestica* L.), ciruelo japonés (*P. salicina* Lindl.), cerezo (*P. avium* L.) y guindo (*P. cerasus* L.), además de una especie aprovechada por sus semillas, el almendro (*P. dulcis* (Mill.) D.A. Webb). La producción mundial del año 2011 de los frutales de hueso fue de unos 42 millones de toneladas, de las que algo más de la mitad correspondieron a la producción de melocotón (FAOSTAT data, 2013, <http://faostat.fao.org>).

La mayor parte de las especies cultivadas del género *Prunus* son diploides ($2n = 2x = 16$) a excepción del guindo que es tetraploide ($2n = 4x = 32$) y del ciruelo europeo que es hexaploide ($2n = 6x = 48$).

1.1. Subgénero *Amygdalus*

El melocotonero y el almendro son los dos cultivos más importantes de este subgénero con una producción mundial del año 2011 de 21.510.180 y 1.942.242 toneladas respectivamente. España ocupa el tercer lugar en la producción de melocotones y nectarinas con 1.336.362 toneladas y el segundo lugar en la producción de almendras con cáscara con 211.717 toneladas (FAOSTAT data, 2013, <http://faostat.fao.org>).

Estas dos especies se pueden cruzar fácilmente produciendo híbridos fértiles algunos de los cuales se usan como portainjertos para el melocotonero. Gracias a esta facilidad de hibridación, ha sido posible elaborar poblaciones F2 interespecíficas altamente polimórficas, algunas de las cuales han sido utilizadas para la construcción de mapas genéticos. El primer mapa publicado de estas características fue el de Foolad *et al.* (1995)

usando una población F2. Más adelante se publicó el mapa que se convirtió en el de referencia de la comunidad científica de *Prunus* utilizando la población F2 del cruzamiento interespecífico entre el almendro 'Texas' y el melocotonero 'Earlygold' (Joobeur *et al.*, 1998).

1.1.1. Melocotonero

El melocotonero (*P. persica*), tiene su centro de origen en China. Entró a Europa a través de las rutas clásicas de comercio y posteriormente a América con los conquistadores españoles (Hesse, 1975). Tras siglos de selección por su productividad y comportamiento bajo diferentes condiciones ambientales, en Europa y América se fueron obteniendo poblaciones de melocotonero localmente adaptadas (Hesse, 1975; Scorza y Okie, 1990). Fue hacia la segunda mitad del siglo XIX cuando se introdujeron variedades chinas de frutos grandes y de buena calidad en Estados Unidos, algunas de las cuales fueron usadas en los primeros programas de mejora norteamericanos. Las variedades resultantes de estos programas de mejora, obtenidas con un número pequeño de genotipos que representaban una pequeña fracción de la variabilidad genética disponible, tuvieron éxito y reemplazaron rápidamente las variedades tradicionales cultivadas (Scorza *et al.*, 1985; Warburton y Bliss, 1996).

Dentro del género *Prunus*, el melocotonero es la especie con mayor importancia económica del mercado. En la anterior década se obtuvieron más de 500 nuevas variedades comerciales (Fideghelli *et al.*, 1998). Este gran dinamismo en la obtención de nuevos cultivares crea la necesidad de buscar métodos más eficientes para la caracterización y selección de las mismas, siendo los marcadores moleculares una de las herramientas adecuadas para este propósito.

Al tener un gran peso económico, presentar una fase juvenil relativamente corta (2 a 3 años) en comparación con la mayoría de los frutales, ser autocompatible y tener un pequeño genoma haploide de aproximadamente 290 Mbp (Baird *et al.*, 1994), prácticamente el doble del tamaño de genoma de *Arabidopsis thaliana* (Arumuganathan y Earle, 1991),

el melocotonero es un sistema modelo para el análisis genético y genómico del género e incluso de la familia.

El melocotonero es una especie autocompatible a diferencia del resto de especies del género. Es preferiblemente autógeno aunque presenta un cierto grado de polinización cruzada (Miller *et al.*, 1989). La autogamia permite el estudio de poblaciones F₂, con las que se pueden estudiar caracteres de herencia recesiva. De hecho, el melocotonero ha sido la especie frutal en la que más estudios de herencia de genes mayores se han hecho (Monet *et al.*, 1996). Las variedades comerciales de melocotonero presentan un nivel bajo de variabilidad, en comparación con la de otros *Prunus* (Byrne, 1990), debido a la posibilidad de autofecundarse que ha favorecido su erosión genética y también a su origen (en muchas de las variedades Europeas y Norteamericanas), a partir de pocos individuos. Su poca variabilidad hace que las poblaciones provenientes de cruzamientos intraespecíficos usadas habitualmente para el estudio de caracteres agronómicos, presenten importantes zonas del genoma en homocigosis, lo que hace a menudo imposible elaborar mapas con cobertura completa de sus ocho cromosomas.

1.1.2. Almendro

El almendro (*P. dulcis*) es la única especie del género en la que el producto comercial es la semilla, siendo el fruto una drupa como en todos los miembros del género. El almendro es un cultivo muy antiguo cuya domesticación se remonta a la edad de bronce en Oriente Medio, entre el tercer milenio y la primera mitad del segundo milenio A.C. (Zohary y Hopf, 1993). En la tumba de Tutankamón, de 1327 A.C., se encontraron las primeras almendras bien conservadas (Hepper, 1990).

El almendro es originario de Asia central (Vavilov, 1930; Kovalyov y Kostina, 1935). Existen numerosas especies de almendro silvestre representando una gran diversidad morfológica y geográfica extendiéndose en el centro y el suroeste de Asia (Komarov *et al.*, 1941, Grassely, 1976, Browicz y Zohary, 1996, Ladizinsky, 1999). Algunas especies silvestres

fueron también descubiertas en el sureste de Europa, la cuenca mediterránea central, el sur de Mongolia y el oeste de China (Browicz y Zohary, 1996). A partir de su centro de origen, el cultivo del almendro, llegó al principio a la cuenca mediterránea y después se extendió en todas las zonas de clima mediterráneo o parecido.

California, la cuenca mediterránea y Asia son las tres principales regiones de producción de almendras. El almendro se introdujo en España desde las regiones greco-romanas y de África del Norte (Egea y García, 1975). Su cultivo está concentrado en el tercio mediterráneo del sureste, desde Huelva hasta Lleida (Kester *et al.*, 1990).

Bajo las presiones de selección que ejercieron el hombre y el clima sobre el almendro durante dos mil años, se crearon diversas poblaciones geográficas y se obtuvieron genotipos con frutos dulces, de gran calibre (Grasselly y Duval, 1997) y con cáscaras fáciles de romper (Browicz y Zohary, 1996).

El almendro presenta una autoincompatibilidad gametofítica, frecuente en la familia de las Rosáceas (Fryxell, 1957; Keep, 1968), que exige la presencia de al menos dos cultivares intercompatibles y de floración simultánea para la producción de frutos. Este hándicap hizo que la mayoría de los nuevos programas de mejora se volcaran en la obtención de variedades autocompatibles sobre todo después del hallazgo de cultivares autocompatibles en la región italiana de Apulia.

1.2. Subgénero *Prunophora*

Los cultivos más importantes de este subgénero son: el albaricoquero (*P. armeniaca*), el ciruelo europeo (*P. domestica*) y el ciruelo japonés (*P. salicina*). El segundo y tercer cultivo más importantes de los frutales de hueso, después del melocotonero, son, el ciruelo (incluyendo ambos tipos) con una producción mundial de 10.999.162 toneladas y el albaricoquero con 3.900.828 toneladas en el año 2011 (FAOSTAT data, 2013, <http://faostat.fao.org>).

1.2.1. Albaricoquero

El albaricoquero, es originario del noreste de China, cerca de la frontera con Rusia, y no de Armenia como lo indica su nombre científico. Aunque Armenia tiene una gran tradición de su cultivo desde tiempos remotos, llegó allí a través de la Ruta de la Seda.

A Europa, el albaricoquero pudo haber llegado por dos vías. Vía Grecia y Italia, por los romanos, en el siglo I A.C. procedente de Irán y Armenia (Zohary y Hopf, 1993) y más tarde por los árabes, a España, en el siglo VII desde oriente Próximo. A partir del siglo XVII, se puede hablar de auténticas plantaciones de albaricoquero en el sur de Europa (Faust *et al.*, 1998).

Turquía es el primer país en producción de albaricoques con 676.138 toneladas en el 2011. España ocupa el onceavo puesto en la producción mundial con una producción estimada en 2011 de 86.880 toneladas (FAOSTAT data, 2013 <http://faostat.fao.org>).

1.2.2. Ciruelo

Existen varios tipos de ciruelo. Los más importantes que se cultivan como frutales son: ciruelo europeo (*P. domestica*), hexaploide y ciruelo japonés (*P. salicina*), diploide.

El ciruelo europeo es un árbol procedente del sur de Europa y oeste de Asia (Crane y Laurence, 1956). Es una especie que se considera reciente y de la que no existe ninguna especie silvestre ancestral. Luther Burbank comentó que las montañas del Cáucaso, cerca del mar Caspio, son el lugar de origen del ciruelo europeo y de sus ancestros (Malcolm, 2006).

El ciruelo japonés, aunque su nombre hace referencia al Japón, es originario de China, donde se puede encontrar en estado silvestre en las provincias de Hubei y Yunnan (Okie y Weinberger, 1996). China es el primer productor mundial de ciruelos. En el año 2011 produjo 5.850.000 toneladas, la mitad de la producción mundial. España ocupa el octavo lugar con una

producción en el 2011 de 230.877 toneladas (FAOSTAT data, 2013, <http://faostat.fao.org>).

1.3. Subgénero *Cerasus*

Las dos especies más difundidas de este subgénero son *P. avium*, de frutos dulces y habitualmente de color oscuro, y *P. cerasus*, el guindo, de frutos amargos y muchas veces de color rojo brillante. Las dos especies son oriundas de Europa y de Asia occidental. En Europa se produce el cerezo desde la península Ibérica hasta Anatolia y también en Gran Bretaña y el sur de Escandinavia. En Norteamérica, el cerezo se cultiva sobre todo en el oeste y el guindo, en la región de los Grandes Lagos.

1.3.1. Cerezo

El cerezo tuvo probablemente su origen en las regiones del mar Negro y del mar Caspio de Asia menor (Webster, 1996), difundiéndose después hacia Europa y Asia, llevado posiblemente al principio por aves migratorias (Watkins, 1976). Fue uno de los frutales más apreciados por los griegos y con el Imperio Romano se extendió a regiones muy diversas.

La producción mundial de cerezas del año 2011 fue de 2.241.424 toneladas. Turquía es el primer país productor de cerezas con una producción de 438.550 toneladas. España ocupa el quinto puesto con una producción de 101.945 toneladas (FAOSTAT data, 2013, <http://faostat.fao.org>).

2. Marcadores moleculares y su uso en las especies del género *Prunus*

Desde los años 70 comenzaron a desarrollarse diferentes tipos de marcadores moleculares que fueron utilizados posteriormente en diferentes

aplicaciones a la genética especialmente para la construcción de mapas de ligamiento y en estudios de variabilidad y diversidad. Los marcadores son particularmente útiles en la mejora de frutales puesto que precisan grandes superficies y muchos años para obtener nuevas variedades debido a su tamaño y largos períodos intergeneracionales. A continuación se detallan los tipos de marcadores más utilizados y algunos de los resultados obtenidos en especies de *Prunus*.

2.1. Isoenzimas

Los isoenzimas son variantes moleculares de un enzima con pequeñas diferencias en su composición de aminoácidos, que resultan en diferencias de tamaño o carga en los isoenzimas que permiten identificarlos. Esto se hace por medio de la electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida y se detectan con tinciones específicas para cada sistema enzimático. Estos marcadores fueron los primeros en usarse para estudiar la variabilidad genética y con ellos se pusieron las bases para su utilización en mejora genética. Tanksley y Orton (1983) resumieron el conocimiento existente en aquel momento y las aplicaciones más importantes de los isoenzimas para las plantas. El uso de este tipo de marcadores, muchos de ellos de excelente calidad y comparables entre especies (Gottlieb, 1981) se vio, sin embargo, limitado por el pequeño número de sistemas enzimáticos disponibles, que resulta en un número bajo, raramente más de veinte, de marcadores polimórficos.

En *Prunus* los isoenzimas se usaron en los estudios de identificación varietal y en la evaluación de la diversidad genética presente en varias especies, como en melocotonero (Arulsekhar *et al.*, 1986; Durham, 1986; Durham *et al.*, 1987; Messeguer *et al.*, 1987; Byrne, 1990), almendro (Arulsekhar *et al.*, 1986; Hauagge *et al.*, 1987; Cerezo *et al.*, 1989; Byrne, 1990; Vezvaei *et al.*, 1994; Čolić *et al.*, 2010), ciruleo (Byrne y Littleton, 1988; Byrne, 1990) y albaricoquero (Byrne y Littleton, 1989; Byrne, 1990; Battistini y Sansavini, 1991; Manganaris *et al.*, 1999). También se usaron en el estudio de caracteres de interés como la autoincompatibilidad usando

ribonucleasas estilares en cerezo (Boskovic *et al.*, 1998) y almendro (Boskovic *et al.*, 1999, Mnejja *et al.*, 2002). Diferentes mapas de ligamiento se construyeron sólo con isoenzimas o en combinación con otros marcadores de ADN como por ejemplo, en almendro (Arús *et al.*, 1994, Viruel *et al.*, 1995), en melocotonero (Chaparro *et al.*, 1994) y en poblaciones interespecíficas como en almendro x melocotonero (Foolad *et al.*, 1995; Joobeur *et al.*, 1998), o en cerezo x *P. nipponica* y cerezo x *P. incisa* (Boskovic y Tobbut, 1998).

2.2. RFLPs

Los RFLPs (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), fueron los primeros marcadores basados en la molécula del ADN en ser desarrollados (Beckman y Soller, 1983). Aparecieron a principios de la década de los ochenta gracias al descubrimiento de las enzimas de restricción y se aplicaron inicialmente al estudio del genoma humano (Botstein *et al.*, 1980; Wyman y White, 1980).

La técnica consiste en digerir el ADN con enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes se separan en gel de agarosa y luego se transfieren a membranas de nylon mediante Southern Blot. El polimorfismo de los RFLPs, causado por las diferencias en las dianas de restricción, se observa generalmente como diferencias en la longitud de los fragmentos hibridados.

Los RFLPs son marcadores de alta calidad (codominantes y transferibles entre especies) que resolvieron el problema del escaso número de marcadores obtenidos con los isoenzimas. Sin embargo, los RFLPs presentan los inconvenientes de una metodología lenta, compleja y costosa (Staub *et al.*, 1996).

Los RFLPs fueron usados en diferentes aplicaciones de las que destacamos los estudios de variabilidad y diversidad genética como los realizados en albaricoquero (de Vicente *et al.*, 1998) o en melocotonero (Quarta *et al.*, 1998), así como la construcción de mapas de ligamiento, como en melocotonero (Dirlewanger *et al.*, 1998; Rajapakse *et al.*, 1995) y

en híbridos almendro x melocotonero (Foolad *et al.*, 1995; Joobeur *et al.*, 1998) o melocotonero x *P. ferganensis* (Quarta *et al.*, 1998). Los RFLPs fueron los marcadores más utilizados hasta la llegada de las técnicas de PCR.

2.3. RAPDs

Los marcadores RAPDs (“Random Amplified Polymorphic DNA”) fueron los primeros que se basaron en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: “Polymerase Chain Reaction”) (Williams *et al.*, 1990). La técnica de los RAPDs se basa en la amplificación de fragmentos de ADN mediante la PCR utilizando pequeños cebadores de secuencia aleatoria (generalmente de unos 10 nucleótidos) que se hibridan al ADN genómico donde encuentran complementariedad. El éxito de la amplificación depende de que la distancia entre una pareja de cebadores sea corta (entre 200 y 2.000 pb). Los fragmentos amplificados se separan en gel de agarosa y se visualizan habitualmente mediante la tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta.

A diferencia de los RFLPs, la técnica de los RAPDs permite la detección de muchos marcadores de forma rápida, sencilla y poco costosa, aunque los resultados obtenidos con esta técnica son a veces poco reproducibles por diversas causas, como el pequeño tamaño de cebadores y la baja temperatura de hibridación empleada en la reacción que hace que la amplificación sea poco específica. Skroch y Nienhuis, (1995) observaron que el 25% de las bandas amplificadas con 50 cebadores de RAPDs no fueron estables entre las diferentes repeticiones realizadas. Al detectar la presencia o ausencia de cada fragmento amplificado, los RAPDs suelen ser dominantes y por consiguiente poco informativos comparados con los marcadores codominantes.

Entre otras aplicaciones, los RAPDs se usaron en diferentes análisis de variabilidad e identificación varietal como por ejemplo en albaricoquero (Gogorcena y Parfitt, 1994; Mariniello *et al.*, 2002; Yilmaz *et al.*, 2012), melocotonero (Warburton y Bliss, 1996; Badenes *et al.*, 1998; Quarta *et al.*, 2000; Cheng, 2007), almendro (Bartolozzi *et al.*, 1998; Resta *et al.*, 1998;

Woolley et al., 2000; Martins et al., 2001; Martins et al., 2003; MirAli y Nabulsi, 2003; Shiran et al., 2007), ciruelo (Shimada et al., 1999; Qiao et al., 2007) y en diferentes patrones de *Prunus* (Casas et al., 1999). También se emplearon para la construcción de mapas genéticos en melocotonero (Chaparro et al., 1994; Rajapakse et al., 1995; Dirlewanger et al., 1998), cerezo (Stockinger et al., 1996), almendro (Joobeur et al., 2000; Tavassolian et al., 2010) y en el cruzamiento interespecífico de melocotonero x *P. davidiana* (Dirlewanger et al., 1996). Recientemente, los RAPDs fueron utilizados para estudiar las relaciones genéticas entre varias especies del subgénero *Cerasus* (Zanami et al., 2012),

2.4. AFLPs

Vos et al. (1995) desarrollaron la técnica de los marcadores AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) combinando la digestión del ADN, usada con los RFLPs, y su amplificación usando la PCR. Los fragmentos obtenidos tras la digestión del ADN genómico con dos enzimas de restricción, se ligan a dos adaptadores específicos a cada uno de los enzimas. Mediante cebadores complementarios a los adaptadores se amplifican los fragmentos digeridos con la PCR. Para reducir el número de fragmentos obtenidos se procede a una segunda amplificación selectiva añadiendo uno o dos nucleótidos a los cebadores anteriores. Los fragmentos obtenidos se separan según su tamaño en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Debido al elevado número de fragmentos amplificados, los AFLPs permiten detectar una gran cantidad de marcadores polimórficos y más reproducibles que los RAPDs (Jones et al., 1997), sin embargo, su limitación principal es que son marcadores dominantes.

En *Prunus*, los AFLPs se usaron en diferentes estudios de variabilidad genética y de identificación de cultivares, como en melocotonero (Augusto et al., 1999; Manubens et al., 1999; Aranzana et al., 2003b), almendro (Martins et al., 2001; Sorkheh et al., 2007), diferentes especies de ciruelo (Valmor et al., 2002), varias especies de *Prunus* (Aradhya et al., 2004) o en albaricoquero japonés (*P. mume*) (Fang et al., 2005; 2006; Li et al., 2012).

También se emplearon en la construcción de mapas como en melocotonero (Dirlewanger *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1998) y albaricoquero (Vilanova *et al.*, 2003) y en cruzamientos interespecíficos como el retrocruzamiento (*P. persica* x *P. ferganensis*) x *P. persica* (Verde *et al.*, 2005).

2.5. SSRs

Los microsatélites, SSRs (“Simple Sequence Repeats”) o STRs (“Short Tandem Repeats”) son iteraciones en tándem de motivos de 1 a 6 nucleótidos distribuidos en todo el genoma. Fueron descritos por primera vez por Hamada *et al.* (1982), y se encuentran en todos los organismos a unas frecuencias mucho más altas de las esperadas en base a sus combinaciones nucleotídicas (Tautz y Renz, 1984; Epplen *et al.*, 1993). Al estar basados en su amplificación por PCR con cebadores específicos de las secuencias flanqueantes del microsatélite, los SSRs amplifican habitualmente un solo locus, que frecuentemente presenta un alto nivel de polimorfismo y un modo de herencia codominante, por lo que estos marcadores son una excelente herramienta para los estudios genéticos (Rakoczy y Bolibok, 2004) y aplicaciones a la mejora que superan ampliamente a otros marcadores como los RAPDs y AFLPs. Puesto que son los marcadores en los que se ha basado este trabajo, sus características y aplicaciones en el género *Prunus* se estudian en mayor detalle más adelante.

2.6. SNPs

Gracias a la progresiva mejora de las técnicas de secuenciación y su abaratamiento, cada vez adquieren más importancia los marcadores basados en sustituciones de una sola base de la molécula de ADN, llamados SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). En teoría, se pueden encontrar cuatro alelos por cada SNP correspondientes a los cuatro nucleótidos posibles, pero en la práctica, los SNPs son mayoritariamente bialélicos. Los SNPs se consideran mutaciones puntuales que han sido lo

suficientemente exitosas evolutivamente para encontrarse en una parte de los individuos de una especie (Stoneking, 2001). Para que una sustitución se considere un SNP, el alelo menos frecuente tiene que presentar una frecuencia superior al 1%. Los SNPs son muy frecuentes en el genoma. En efecto, forman hasta el 78% de todas las variaciones genómicas (Levy *et al.*, 2007) y se encuentran cada 1.250 bases de promedio a lo largo del genoma humano (Venter *et al.*, 2001). En manzano, los SNPs se encuentran cada 706 bp de ADN codificante (Newcomb *et al.*, 2006) y en melocotonero cada 1.850 bp de ADN codificante y cada 598 pb de ADN total (Aranzana *et al.* 2012).

Recientemente, se han desarrollado muchos métodos de genotipado de los SNPs que presentan diferencias en sus dos fases: 1) la técnica molecular para generar los alelos y 2) la técnica de separación y detección para revelar el polimorfismo. La elección de un método u otro depende según los objetivos del estudio y los recursos de cada laboratorio (Vignal *et al.*, 2002).

Con los últimos avances tecnológicos en secuenciación y detección de polimorfismo de los SNPs, su utilización es cada vez más barata, aunque un SSR resulta más informativo por su carácter multialélico en comparación con el carácter bialélico de un SNP. Según el reciente trabajo de Fernandez i Marti *et al.* (2012), en una comparación entre los marcadores SSRs y SNPs usados en cerezo, los SNPs resultaron ser mejores para la diferenciación de mutantes y para el estudio de parentesco. En *Prunus*, cada vez hay más trabajos que usan los SNPs como marcadores moleculares. En el estudio de variabilidad del albaricoquero japonés (*P. mume*) realizado por Fang *et al.* (2006), se usaron además de los AFLPs, 103 SNPs, de los cuales 73 fueron heterocigóticos en los loci de 50 cultivares. En un estudio más reciente, Li *et al.* (2010) usaron 92 SNPs en un estudio de variabilidad en la misma especie con 68 cultivares. Wu *et al.* (2008) detectaron 100 SNPs en almendro que validaron en 25 cultivares. En el estudio de la diversidad genética del cerezo, Fernandez i Marti *et al.* (2012) usaron además de 7 marcadores SSRs, 40 marcadores SNPs en un set de 114 cultivares y Aranzana *et al.* (2012) estudiaron la variabilidad de 23 fragmentos de ADN distribuidos por todo el genoma en 47 cultivares de melocotonero, detectando un bajo nivel de

variabilidad de SNPs en comparación con otras especies. También en almendro los SNPs fueron utilizados en el mapeo de esta especie (Wu *et al.*, 2009; 2010; Tavassolian *et al.*, 2010). Los SNPs se usaron también como marcadores de anclaje en el estudio de sintenia realizado entre los dos mapas de *Prunus* y *Fragaria* por Vilanova *et al.* (2008). Recientemente las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) han permitido identificar grandes cantidades de estos marcadores en melocotonero (Ahmad *et al.*, 2011; Verde *et al.*, 2012) lo que ha facilitado la creación de un chip Infinium de Illumina que permite el análisis simultáneo de más de 8.000 SNPs (Verde *et al.*, 2012) que ha sido usado ya para estudios genéticos en varias poblaciones de melocotonero (Eduardo *et al.*, 2013, o melocotonero x almendro (Donoso, 2014).

3. Marcadores basados en microsatélites

Los microsatélites se encuentran de forma ubicua en el genoma de los Procariotas (Gur-Arie *et al.*, 2000) y Eucariotas (Morgante *et al.*, 2002) y en regiones tanto codificantes como no codificantes (Jung *et al.*, 2005). El número de repeticiones en cada locus cambia por mutación y las mutaciones son más frecuentes cuando hay un número elevado de unidades repetidas en tándem (Wierdl *et al.*, 1997).

A continuación se explicaran algunas de las estrategias para el desarrollo de este tipo de marcadores y algunos conceptos generales sobre su funcionamiento y las características que los hacen útiles para diferentes aplicaciones.

3.1. Estrategias de desarrollo de los microsatélites

Existen dos estrategias para desarrollar marcadores microsatélite: *de novo*, construyendo genotecas genómicas o *in silico*, buscando en las diferentes bases de datos. La construcción de genotecas genómicas y la posterior búsqueda de microsatélites en los fragmentos resultantes es una

técnica poco eficiente. La frecuencia de clones que llevan dentro un microsatélite, en genotecas es baja: tan sólo 10% en el caso del centeno (Saal y Wricke, 1999) y de menos de 2% en caso del trigo (Röder *et al.*, 1995). Esta estrategia se utiliza en especies para las que existe muy poca o ninguna información de secuencia y el objetivo es encontrar un número relativamente bajo de microsatélites para iniciar los estudios genéticos (Zane *et al.*, 2002). Para mejorar la eficiencia se desarrollaron diferentes técnicas de enriquecimiento, especialmente en plantas (Zane *et al.*, 2002). El método más habitual de enriquecimiento es el de la hibridación selectiva usando sondas de varias repeticiones del motivo en cuestión. Estas sondas pueden estar pegadas a membranas de nylon o biotiniladas en su extremo 5' para su posterior captura con bolas magnéticas revestidas de estreptavidina. Este método de enriquecimiento fue usado por diferentes autores en plantas con pequeñas modificaciones (Kijas *et al.*, 1994; Prochazka, 1996; Fischer y Bachmann, 1998; Sosinski *et al.*, 2000; Aranzana *et al.*, 2001). La eficiencia obtenida en todos casos fue mucho más alta que si se hubiera hecho sin enriquecimiento. Como ejemplo, en las genotecas enriquecidas GA/CT y AC/TG de albaricoquero, respectivamente el 90% y 75% de los clones llevaban microsatélites (Hagen *et al.*, 2004). En la genoteca enriquecida GA/CT de melocotonero, el 60,7% de los clones fueron positivos (Aranzana *et al.*, 2002).

La otra estrategia para desarrollar microsatélites consiste en buscar ESTs ("Expressed Sequence Tags"), depositadas en las bases de datos como EMBL o GenBank, que los contengan. Esta estrategia tiene la ventaja de ser más rápida y menos costosa. Asimismo, las secuencias encontradas de esta manera, corresponden a genes expresados, por lo que su variabilidad tiene mayor valor funcional que los marcadores basados en secuencias de zonas genómicas no codificantes. Además, el posterior mapeo genético o físico de estos marcadores puede identificar posibles genes candidatos para caracteres de interés (Jung *et al.*, 2005). El inconveniente de este método es la pérdida del polimorfismo presente en regiones no codificantes del genoma. Además, está limitado a los cultivos de

los que se dispone de mucha información sobre secuencias de ESTs en las bases de datos.

Cho *et al.* (2000), encontraron que los microsatélites derivados de genotecas genómicas detectan un nivel de polimorfismo más alto (83,8% de promedio) que los derivados de ESTs (54,0% de promedio). También fueron más altos otros parámetros de variabilidad estudiados como el número de alelos por locus y el rango de tamaño de los alelos. Aunque los SSRs derivados de ESTs son generalmente menos polimórficos, destacan por ser más transferibles a otras especies relacionadas cuando están en zonas codificantes (Cordeiro *et al.*, 2001). Los microsatélites en las regiones no traducidas 5' o 3' UTR en los ESTs pueden ser marcadores más útiles ya que están ligados a los genes y son más polimórficos que los presentes en los exones (Jung *et al.*, 2005).

Con el abaratamiento de la secuenciación del ADN es ahora más asequible obtener una gran cantidad de secuencias y ensamblarlas para poder identificar marcadores de interés, ya sean estos SSRs, SNPs u otros marcadores. Esta misma circunstancia hace que para muchas especies esté ya disponible la secuencia del genoma entero, lo que permite también localizar la gran mayoría de las secuencias microsatélite junto con sus secuencias flanqueantes, por lo que es posible con relativamente poco esfuerzo disponer de marcadores en cualquier parte del genoma. Afortunadamente la secuencia del genoma del melocotonero está publicada (Verde *et al.*, 2013) y accesible libremente en la base de datos de las Rosáceas (<http://www.rosaceae.org/>). Esta secuencia, basada en un dihaploide de la variedad 'Lovell', es de alta calidad al haber sido construida con secuencias largas (Sanger), y supone una gran y profunda mejora para la búsqueda de marcadores, el análisis de la variabilidad a nivel de genoma entero y en general para el avance de la genética de esta especie y otras del género *Prunus*. En la página web del genoma del melocotonero IGA, (<http://services.appliedgenomics.org/projects/drupomics/gbrowse/>) se puede consultar el listado de todos los microsatélites encontrados en el genoma ensamblado usando el programa Sputnik, unos 32.000 microsatélites.

Un buen ejemplo que ilustra esta creciente facilidad de búsqueda de marcadores basándose en la secuenciación, es el reciente trabajo de Dong *et al.* (2014) en el que utilizando la técnica de pirosecuenciación del albaricoquero siberiano (*P. sibirica* L.), pudieron identificar 7.304 secuencias tipo microsatélite.

3.2. Distribución y frecuencia de los microsatélites

Los microsatélites se encuentran a lo largo de todo el genoma. El tipo, distribución y frecuencia de estos últimos difiere según cada organismo. En el genoma humano (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) concluyó que el 3% del genoma son microsatélites, más de un millón de loci en total. Este número incluye una gran proporción de microsatélites interrumpidos o imperfectos, muchos de los cuales son probablemente monomórficos. Las repeticiones dinucleotídicas son las más abundantes, seguidas de las repeticiones mono y tetranucleotídicas. Las trinucleotídicas son las menos comunes en el genoma humano. De las dinucleotídicas, la repetición (CA)_n es la más frecuente, seguida de las repeticiones (AT)_n y (GA)_n, mientras que la repetición (GC)_n es la más rara (Ellegren, 2004).

El genoma del ratón es mucho más rico en secuencias microsatélite, de dos a tres veces más que en el genoma humano (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). La frecuencia de los microsatélites difiere entre especies relativamente cercanas, esto parece ser un fenómeno general (Ellegren, 2004). Efectivamente, estas diferencias ocurren incluso entre especies cercanas como humanos y chimpancés (Webster *et al.*, 2002), y dentro del mismo género *Drosophila* (Pascual *et al.*, 2000; Schlötterer y Harr, 2000).

Muchos autores consideraron que los SSRs son secuencias de selección neutral y de distribución aleatoria a lo largo del genoma (Schlötterer y Wiehe, 1999; Schlötterer, 2000). Sin embargo, Bachrog *et al.* (1999), ponen de manifiesto la existencia de variación regional en la frecuencia de los microsatélites. En efecto, en el genoma humano y del ratón, la densidad de los microsatélites es casi el doble en los extremos de los cromosomas. Marcotte *et al.* (1999) encontraron que el 14% de las

regiones codificantes contienen secuencias repetidas, con una frecuencia tres veces mayor en eucariotas que en procariotas. No obstante, el número de repeticiones y el tamaño total de los microsatélites en las regiones transcritas es relativamente pequeño (Kantety *et al.*, 2002; Thiel *et al.*, 2003).

En Eucariotas, la densidad de los microsatélites tiende a estar correlacionada positivamente con el tamaño del genoma (Hancock, 1996; Katti *et al.*, 2001). Sin embargo, en plantas, se ha demostrado que la frecuencia de los microsatélites está negativamente correlacionada con el tamaño del genoma, explicado por el hecho de que los microsatélites están infra-representados en las partes repetitivas del genoma que están involucradas en la expansión del genoma (Morgante *et al.*, 2002).

La frecuencia de los microsatélites en los ESTs es de 3 % en *Arabidopsis* (Cardle *et al.*, 2000), 3,2% en gramíneas (Kantety *et al.*, 2002), 2,9% en caña de azúcar (Cordeiro *et al.*, 2001) y 4% en las Rosáceas después de haber eliminado las secuencias redundantes (Jung *et al.*, 2005). Morgante *et al.* (2002) afirman que la frecuencia de los microsatélites es más alta en las regiones transcritas y especialmente en las partes no traducidas de éstas que en el ADN genómico. Scotti *et al.* (2000), encontraron que la frecuencia de los microsatélites formados por dinucleótidos es 20 veces más baja en las secuencias expresadas que en secuencias genómicas cogidas al azar en abeto (*Picea abies*).

En plantas, la composición de los microsatélites dinucleotídicos difiere entre las secuencias genómicas y transcritas, las repeticiones (AT)_n parecen ser típicas de las regiones no transcritas, sin embargo en ESTs, las repeticiones (AG)_n son las más frecuentes seguidas de las repeticiones (AT)_n (Morgante *et al.*, 2002). La repetición (AC)_n es poco frecuente en el genoma de las plantas contrariamente a los mamíferos donde es la más frecuente; la repetición (CG)_n es en ambos casos la más rara (Morgante *et al.*, 2002). La repetición (TAT)_n prevalece dentro de los trinucleótidos, aunque algunos tipos de microsatélites parecen ser específicos o más frecuentes en algunos grupos de plantas como en los cereales, donde la repetición (CGG)_n es la más abundante dentro de las trinucleotídicas, con un 32% en trigo, 49% en sorgo (Thiel *et al.*, 2003; Varshney *et al.*, 2002) y 50% en arroz (Morgante *et*

al., 2002), contrariamente al genoma de *Arabidopsis* donde esta repetición es la menos frecuente (Jung *et al.*, 2005). En monocotiledóneas, el motivo AAT es el más raro (<1%) (Cordeiro *et al.*, 2001).

En las Rosáceas, las repeticiones dinucleotídicas son las más abundantes en las colecciones de ESTs estudiadas por Jung *et al.* (2005), representando el 51% en almendro y el 59% en melocotonero y en *Rosa* del total de microsatélites, seguidos de las repeticiones trinucleotídicas en los tres casos (entre 35% y 43%). Las repeticiones tetra y pentanucleotídicas corresponden a menos del 5%. En un reciente trabajo de secuenciación de la especie *P. virginiana* L., Wang *et al.* (2012) confirmaron que las repeticiones dinucleotídicas son las más abundantes representando el 85,9% del total de microsatélites, seguidas por las trinucleotídicas (12,89%). Las repeticiones tetra y pentanucleotídicas sólo representan el 0,84% y 0,42%, respectivamente del total de microsatélites. En general en las Rosáceas, la repetición dinucleotídica más frecuente es (AG)_n (Jung *et al.*, 2005), lo que confirma las observaciones de Sosinski *et al.* (2000) que estimaron un promedio de un microsatélite con esta repetición cada 100 kb en el genoma del melocotonero, mientras que la repetición menos frecuente es (CG)_n. En un estudio sobre ESTs de manzano, Newcomb *et al.* (2006), confirmaron los resultados anteriores y encontraron que el 88,3 % del total de las repeticiones dinucleótidas fueron del motivo (AG)_n, mientras que las repeticiones del motivo (CG)_n sólo representaban el 0,1%. Similares conclusiones se obtuvieron en *P. virginiana*, donde la repetición más frecuente es la dinucleotídica (AG)_n, representando el 46,1% del total de microsatélites, seguida de la repetición (AT)_n (22,5%), de la (AC)_n (14,44%) y de la (CG)_n (2,91%). El resto de las repeticiones no representan más del 2% cada motivo (Wang *et al.*, 2012). En la reciente secuenciación del genoma de *P. mume* por shotgun, Sun *et al.* (2013), confirman que la repetición dinucleotídica más frecuente es la (AG)_n, mientras que la (CG)_n se revela la menos frecuente. Los motivos trinucleotídicos más abundantes difieren dependiendo de la especie; AAG en *Rosa* y manzano, AGC en almendro y ATG en melocotonero (Jung *et al.*, 2005; Newcomb *et al.*, 2006). La densidad de los SSRs es de dos a cuatro veces más grande en las regiones

no traducidas (UTRs) que en las regiones codificantes (Jung *et al.*, 2005). En efecto, la estimación de la distancia media entre microsatélites en las regiones UTR es de 5,5 kb en *Rosa*, 5,1 kb en almendro, 7 kb en melocotonero y 13 kb en *Arabidopsis*. En cambio, el promedio de esta distancia en regiones codificantes es de 12,8 kb en *Rosa*, 20,3 kb en almendro, 24,4 kb en melocotonero y 25,6 kb en *Arabidopsis* (Jung *et al.*, 2005). Las repeticiones más frecuentes en las regiones UTR son las dinucleotídicas, con un 84% en almendro y un 74% en melocotonero del total de microsatélites presentes en estas regiones. En cambio, en las regiones codificantes, las repeticiones trinucleotídicas son las más abundantes y representan un 86% en almendro y un 55% en melocotonero del total de microsatélites que allí se encuentran (Jung *et al.*, 2005).

3.3. Mecanismos de mutación y evolución de los microsatélites

Los microsatélites presentan un alto nivel de mutabilidad (entre 10^{-2} y 10^{-6} mutaciones por locus y generación, con un promedio de 5×10^{-4}) (Schlötterer, 2000), lo que les confiere un alto nivel de polimorfismo que los hace particularmente útiles para los estudios genéticos. Esta elevada mutabilidad se explica por diferentes mecanismos incluyendo errores durante los procesos de recombinación, replicación y reparación (Strand *et al.*, 1993).

Dos mecanismos (el deslizamiento de la polimerasa del ADN y la recombinación no recíproca) fueron propuestos inicialmente para explicar la generación y evolución de los microsatélites. El primero de ellos y el más generalmente aceptado se basa en que durante la replicación de un microsatélite, el mecanismo de deslizamiento de cadena durante la replicación (“replication slippage”) puede dar lugar a cadenas con inserciones o deleciones de una o varias repeticiones. Esto se debe a la formación de un bucle en la hebra inicial (formación de un nuevo alelo con menos repeticiones) o la nascente (formación de alelo con más repeticiones). Si el mecanismo de reparación de errores de emparejamiento entre las

bases (MMR “MisMatch Repair”) no consigue corregir estos errores, pueden generarse nuevos alelos del mismo locus de microsatélite con más o menos repeticiones (Levinson y Gutman, 1987; Strand *et al.*, 1993). El segundo mecanismo se basa en la recombinación no recíproca, llamada también recombinación desigual “unequal crossing over”, en la que se producen intercambios desiguales de fragmentos entre las hebras de ADN durante la recombinación, en este caso secuencias de microsatélites (Hancock, 1999; Jakupciak y Wells, 2000; Richard y Paques, 2000). Sin embargo, podrían existir otros mecanismos además de los dos mencionados anteriormente como proponen otros autores (Schlötterer, 2000; Beck *et al.*, 2003; Ellegren, 2004).

Varios estudios sugieren la existencia de mecanismos que regularían el tamaño de los microsatélites que sería la resultante del efecto de dos fuerzas opuestas: el mecanismo de “replication slippage”, que tiende a favorecer el alargamiento, y las mutaciones puntuales, que rompen las largas repeticiones y acortan el tamaño del microsatélite (Kruglyak *et al.*, 1998; Santibáñez-Koref *et al.*, 2001; Ellegren, 2002).

La tasa de mutación de los microsatélites está positivamente correlacionada con su tamaño (Brinkmann *et al.*, 1998; Pupko y Graur, 1999, Primmer *et al.*, 1998; Harr y Schlötterer, 2000; Brohede *et al.*, 2002). Durante la replicación, los microsatélites largos dificultan el buen funcionamiento de la polimerasa más que los cortos, lo que hace que los alelos largos tengan mayor propensión a la mutación. Además, un gran número de repeticiones proporciona más oportunidades para los errores de apareamiento de bases durante el emparejamiento con la hebra naciente (Eisen, 1999). Sin embargo, las mutaciones puntuales en microsatélites largos pueden romper las repeticiones perfectas y reducir así su tasa de mutación (Taylor *et al.*, 1999). Además del número de repeticiones, la mutabilidad de un microsatélite parece también depender del motivo de la repetición (Schlötterer y Tautz, 1992; Chakraborty *et al.*, 1997; Pupko y Graur, 1999; Bachtrog *et al.*, 2000) y de sus secuencias flanqueantes (Glenn *et al.*, 1996, Bachtrog *et al.*, 2000). La tasa de mutación de los microsatélites puede también incrementarse por elementos externos como la irradiación

(Kovalchuk *et al.*, 2003) o la inflamación de tejidos en humanos (Faber *et al.*, 2006).

En cuanto a la génesis de los microsatélites, diferentes investigaciones (Messier *et al.*, 1996; Rose y Falush, 1998; Harr *et al.*, 2000) postulan que pequeñas secuencias repetitivas de dos a tres repeticiones serían el punto de partida (proto-microsatélite) de las subsecuentes expansiones de los microsatélites. Estas secuencias repetitivas primarias pueden proceder de simples sustituciones de bases o de inserciones (Ellegren, 2004).

En los estudios de diversidad poblacional usando microsatélites y especialmente para calcular las distancias genéticas entre individuos que dependen de la frecuencia de los alelos de cada locus, se han elaborado diferentes modelos de los cuales dos han sido los más usados. El más tradicional es el modelo de infinitos alelos (IAM “Infinite Allele Model”), según el cual cada evento de mutación crearía un nuevo alelo independiente del tamaño del alelo inicial (Selkoe y Toonen, 2006). El segundo modelo, más específico de los microsatélites, es el modelo SMM (“Stepwise Mutational Model”), que propone la adición o sustracción de una repetición a un ritmo constante, imitando el proceso de errores durante la replicación de ADN (“replication slippage”) causante de las mutaciones. Aunque puedan haber mutaciones que no sigan este modelo (Richard y Paques, 2000), el consenso actual considera que el SMM sería la fuerza dominante para crear nuevos alelos en los organismos estudiados hasta el momento (Eisen, 1999; Ellegren, 2004). Otros modelos más complejos y realistas de mutación han sido desarrollados tomando como base el SMM y que se ofrecen en diferentes paquetes estadísticos (Piry *et al.*, 1999; Van Oosterhout *et al.*, 2004).

3.4. Funciones de los microsatélites

Los microsatélites pueden tener un efecto neutral en el genoma o tener algún papel en aspectos funcionales. Su distribución no aleatoria confirmada por muchos trabajos (ver 3.2.) es un signo de su funcionalidad. Los microsatélites pueden tener efecto sobre la organización de la cromatina,

regulación de la actividad de diferentes genes, la recombinación y la replicación del ADN o el ciclo celular entre otras funciones (Li *et al.*, 2002).

En las regiones codificantes, los diferentes alelos de los microsatélites pueden dar lugar a nuevos fenotipos. En efecto, en humanos muchas enfermedades neurológicas (Cummings y Zoghbi, 2000a; 2000b; Zhoghbi y Orr, 2000) y cancerígenas (Zienoddiny *et al.*, 1999; Redston, 2001; Yamada *et al.*, 2002; Vassileva *et al.*, 2002) son el resultado de la variación de los microsatélites en las regiones codificantes. Muchos tumores son causados por la inactivación de los diferentes genes MMR responsables de la corrección de los errores de la polimerasa. Esta inactivación está causada esencialmente por la mutación en las repeticiones mononucleotídicas (A)_n presentes en los exones de los dos genes MMR (Duval y Hamelin, 2002). En los organismos procariotas, la variación de los microsatélites en regiones codificantes puede afectar la expresión de genes y la virulencia de estos patógenos (Hood *et al.*, 1996; Van Belkum *et al.*, 1998). Los microsatélites en las regiones 5-' o 3'-UTRs y en los intrones pueden también regular la expresión de los genes (Kashi *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2002; Trifonov, 2003) y llegar hasta hacerles perder su función (Saveliev *et al.*, 2003).

Varios autores sugieren que las repeticiones dinucleotídicas pueden actuar como puntos calientes (hot spot) de recombinación (Trecó y Arnheim, 1986; Wahls *et al.*, 1990; Bailey *et al.*, 1998). Las repeticiones dinucleotídicas forman unos sitios preferenciales para los eventos de recombinación por su alta afinidad a los enzimas de recombinación (Biet *et al.*, 1999).

3.5 Transferibilidad de los microsatélites entre diferentes especies

La alta conservación de las regiones flanqueantes a los microsatélites fue reportada en los cetáceos (Schlötterer *et al.*, 1991), tortugas marinas (FitzSimmons *et al.*, 1995) y peces (Rico *et al.*, 1996), permitiendo su transferibilidad entre especies que divergieron hace más de 470 millones de años (Rico *et al.*, 1996).

La transferibilidad de los marcadores microsatélite facilita el trabajo en especies no modelo, que no tengan secuencias publicadas en las bases de datos y con especies que presentan bajas frecuencias de microsatélites en su genoma como es el caso de las aves (Primmer *et al.*, 1997), ahorrando la tarea de desarrollarlos *de novo*. Otro importante elemento de los microsatélites transferibles es que una vez conocida su posición en el genoma de una especie, puede predecirse la misma en el genoma de otra próxima. Esto puede ser útil para una mejor selección de los microsatélites que cubren bien el genoma con objetivos de estudios de variabilidad, desequilibrio de ligamiento o construcción de mapas genéticos. Por otra parte, el uso de los mismos juegos de microsatélites para el estudio de la variabilidad entre diferentes especies puede ser útil para el análisis comparativo de dicha variación genética.

En plantas, varios trabajos confirman la transferibilidad de los microsatélites entre especies del mismo género como en *Quercus* (Isagi y Suhandono, 1997), *Prunus* (Cipriani *et al.*, 1999), *Brassica* (Lowe *et al.*, 2002), *Olea* (Rallo *et al.*, 2003), *Pinus* (Chagne *et al.*, 2004), *Coffea* (Poncet *et al.*, 2004), *Geum* (Arens *et al.*, 2004), *Ficus* (Giraldo *et al.*, 2005), *Oryza* (Gao *et al.*, 2005), *Corylus* (Boccacci *et al.*, 2005), *Fragaria* (Davis *et al.*, 2006; Sargent *et al.*, 2007), *Gossypium* (Guo *et al.*, 2006), *Arachis* (Bravo *et al.*, 2006) y *Theobroma* (Alves *et al.*, 2006) e incluso entre diferentes géneros de la misma familia como en *Meliaceae* (White y Powell, 1997), *Fagaceae* (Isagi y Suhandono, 1997), *Euphorbiaceae* (Roa *et al.*, 2000), *Myrtaceae* (Zucchi *et al.*, 2002), *Oleaceae* (De La Rosa *et al.*, 2002), *Fabaceae* (Peakall *et al.*, 1998; Gutierrez *et al.*, 2005) y *Poaceae* (Guyomarc'h *et al.*, 2002; Kuleung *et al.*, 2004; Adonina *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006).

El éxito de la transferibilidad decae proporcionalmente a la distancia genética o divergencia entre la especie origen del microsatélite y la especie estudiada (Primmer *et al.*, 1996; Primmer y Merilä, 2000; Wright *et al.*, 2004). Al transferir los SSRs a otras especies, estos suelen perder variabilidad alélica (polimorfismo) en comparación con la especie origen (Ellegren *et al.*,

1995; Primmer *et al.*, 1996; Ellegren *et al.*, 1997; Neff y Gross, 2001; Wright *et al.*, 2004).

3.6. Aplicaciones de los microsatélites

Desde su primera descripción por Hamada *et al.* (1982), los microsatélites empezaron a utilizarse en diversos tipos de estudios. En plantas, los microsatélites fueron usados ampliamente en la construcción de mapas genéticos, estudios de variabilidad y diversidad, análisis filogenéticos, diseño de estrategias de conservación y evaluación de pureza híbrida, entre otras aplicaciones (Chen *et al.*, 1997; Röder *et al.*, 1998).

Los SSRs son especialmente atractivos, por ser codominantes y altamente polimórficos, en el caso de especies con poca variabilidad genética y con alto nivel de endogamia como las autógamas, como es el caso del melocotonero (Aranzana *et al.*, 2002), del trigo (Röder *et al.*, 1995) y de la cebada (Becker y Heun, 1995), y en poblaciones recientemente derivadas o geográficamente cercanas (Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004).

El conocimiento de la variabilidad genética y su distribución en las diferentes poblaciones de plantas, hace posible una mejor implementación de estrategias de conservación del germoplasma porque los microsatélites ofrecen una inestimable información sobre la estructura poblacional, el análisis de paternidad y permiten estimar del efecto de aspectos de la historia reciente de especies o poblaciones, como la selección y la deriva genética en la variabilidad (Oliveira *et al.*, 2006).

Al ser codominantes y presentar la posibilidad de detectar muchos alelos por marcador, los SSRs se convierten en una herramienta ideal para la identificación individual (“fingerprinting”) (Rongwen *et al.*, 1995), los estudios de paternidad y de pedigrí en general, y el estudio de diversidad genética. En efecto, en el estudio publicado por Ashkenazi *et al.* (2001), dos microsatélites fueron suficientes para distinguir entre 12 cultivares de patata. En melocotonero, tres microsatélites fueron suficientes para diferenciar a 24

de los 25 cultivares estudiados (Aranzana *et al.*, 2002). Los microsatélites se han usado también en los estudios forenses, de ADN antiguo, genética de poblaciones y conservación de recursos biológicos (Jarne y Lagoda, 1996; Martín *et al.*, 2011).

Los SSRs han sido especialmente utilizados en la construcción de mapas genéticos entre otros motivos porque su abundancia, elevado polimorfismo, codominancia y alta reproducibilidad permiten identificar juegos de SSRs que pueden ser usados en la construcción de mapas en diferentes descendencias de la misma especie, y a menudo de especies próximas, cuyos resultados son comparables entre sí. La cosegregación de algunos genes mayores o QTLs de interés con SSRs en poblaciones segregantes permite identificar sus posiciones en el genoma y usarlos posteriormente en la selección asistida con marcadores (MAS “Marker Assisted Selection”). Además, los microsatélites desarrollados a partir de ESTs pueden ser muy útiles para el mapeo de genes con funciones putativas (Jung *et al.*, 2005). Juegos de microsatélites seleccionados han sido también usados para el análisis de la conservación del desequilibrio de ligamiento en varias especies (Ohashi y Tokunaga, 2003, Aranzana *et al.*, 2010).

4. Microsatélites en las Rosáceas

4.1. Microsatélites en *Prunus*

4.1.1. Microsatélites disponibles

En la página web de la base de datos de las Rosáceas (GDR; http://www.rosaceae.org/bio/content/?title=&url=/cgi-bin/gdr/gdr_marker_search.cgi), se describen un total de 457 microsatélites desarrollados de diferentes especies de *Prunus*: 220 de *P. persica*, 136 de *P. dulcis*, 45 de *P. armeniaca*, 35 de *P. salicina*, 18 de *P. avium* y 3 de *P. cerasus*.

A continuación, se presenta la cronología de los avances realizados en el desarrollo de los microsatélites en *Prunus* (Tabla 1), resaltando los trabajos pioneros en cada especie.

Cipriani *et al.* (1999), fueron los primeros en desarrollar 17 microsatélites usando dos genotecas genómicas de melocotonero enriquecidas con los motivos AC y AG. En el año siguiente, Sosinski *et al.* (2000), desarrollaron microsatélites tanto genómicos (5 SSRs) como de ESTs (5 SSRs). Desde entonces, se sucedieron los trabajos de desarrollo de microsatélites usando ambas estrategias, al principio en el melocotonero y luego en las diferentes especies del género *Prunus* (Tabla 1). Sosinski *et al.* (2000) presentaron también en el mismo trabajo, los cinco primeros microsatélites genómicos de cerezo desarrollados por el grupo de G. King (Wellsbourne, Gran Bretaña). Downey y Iezzoni (2000), en su estudio de variabilidad del cerezo negro (*P. serotina*) usaron un nuevo microsatélite genómico desarrollado en su mismo laboratorio en guindo (*P. cerasus*). Cantini *et al.* (2001), en su estudio molecular de la colección de cerezos tetraploides de Geneva (Nueva York), utilizaron ocho nuevos microsatélites; seis genómicos de cerezo y otros dos de guindo (*P. cerasus*) proporcionados por D. Struss y A. Iezzoni respectivamente. Lopes *et al.* (2002), consiguieron desarrollar los primeros 25 microsatélites del albaricoquero usando una genoteca genómica, de los que 21 fueron polimórficos. Al año siguiente, Decroocq *et al.* (2003), desarrollaron 10 nuevos microsatélites para el albaricoquero con una genoteca de cDNA, de los cuales, uno resultó monomórfico en las 5 variedades ensayadas en dicho trabajo. Los únicos microsatélites descritos de ciruelo fueron los 35 desarrollados en la presente tesis, que se obtuvieron con una genoteca de ADN genómico de ciruelo japonés enriquecida para el motivo CT. Todos estos microsatélites fueron polimórficos en un set de ocho variedades de dicha especie (Mnejja *et al.*, 2004). Testolin *et al.* (2004) obtuvieron 20 microsatélites usando una genoteca genómica de almendro enriquecida para el motivo AC, de los cuales 16 fueron polimórficos al ensayarlos en los 16 cultivares de la misma especie. En el mismo año, Xu *et al.* (2004), desarrollaron otros 18 microsatélites desde la base de datos de ESTs de almendro y otros dos de

cerezo. En esta tesis también fueron desarrollados 47 microsatélites con una genoteca genómica del almendro, de los cuales 42 fueron polimórficos en ocho variedades de la misma especie (Mnejja *et al.*, 2005). Más tarde, Tsuda *et al.* (2009), desarrollaron 13 SSRs derivados de ESTs polimórficos en seis especies de cerezo. Usando secuencias de ESTs, 47 nuevos microsatélites fueron desarrollados en esta tesis, de los cuales 22 son de almendro y 25 de melocotonero, que fueron usados para estudiar su transferibilidad a otras especies de la familia de las Rosáceas (Mnejja *et al.*, 2010). Gracias al abaratamiento de la secuenciación, Wang *et al.* (2012) desarrollaron 212 microsatélites de la especie *P. virginiana* usando el secuenciador 454.

Tabla 1: Microsatélites de *Prunus* disponibles en la bibliografía

Publicación	Año	Especie	Microsatélites	
			Genómicos	ESTs
Cipriani <i>et al.</i>	1999	<i>P. persica</i>	17 UDP	
Downey y Iezzoni	2000	<i>P. cerasus</i>	1 PceGA*	
Sosinski <i>et al.</i>	2000	<i>P. persica</i> <i>P. avium</i>	5 pchgms 5 PS*	5 pchcms
Testolin <i>et al.</i>	2000	<i>P. persica</i>	9 UDP	
Cantini <i>et al.</i>	2001	<i>P. avium</i> <i>P. cerasus</i>	6 PMS* 2 PceGA*	
Aranzana <i>et al.</i>	2002	<i>P. persica</i>	35 CPPCT	
Dirlewanger <i>et al.</i>	2002	<i>P. persica</i>	41 BPPCT	
Georgi <i>et al.</i>	2002	<i>P. persica</i>	4 pchgms	
Lopes <i>et al.</i>	2002	<i>P. armeniaca</i>	21 ssrPaCITA	
Wang <i>et al.</i>	2002	<i>P. persica</i>	17 pchgms	
Yamamoto <i>et al.</i>	2002d	<i>P. persica</i>	24 MA	12 M
Clarke y Tobbut	2003	<i>P. avium</i>	21 EMPA	
Decroocq <i>et al.</i>	2003	<i>P. armeniaca</i>		10 Pac
Struss <i>et al.</i>	2003	<i>P. avium</i>	15 UCD-CH	
Hagen <i>et al.</i>	2004	<i>P. armeniaca</i>	13 AMPA	11 AMPA
Messina <i>et al.</i>	2004a	<i>P. armeniaca</i>	20 (99) UDAp	
Mnejja <i>et al.</i>	2004	<i>P. salicina</i>	35 CPSCT	
Testolin <i>et al.</i>	2004	<i>P. dulcis</i>	20 (44) UDA	
Vaughan y Russell	2004	<i>P. avium</i>	14 EMPaS	
Xu <i>et al.</i>	2004	<i>P. dulcis</i> <i>P. avium</i>		18 ASSR 2 ASSR
Mnejja <i>et al.</i>	2005	<i>P. dulcis</i>	47 CPDCT	
Verde <i>et al.</i>	2005	<i>P. persica</i> *	4 pchgms*	
Vilanova <i>et al.</i>	2006	<i>P. armeniaca</i>	8 aprigms	
Xie <i>et al.</i>	2006	<i>P. dulcis</i> <i>P. persica</i>		1 ASSR 2 ASSR
Nishitani <i>et al.</i>	2007	<i>P. persica</i>	62 MA	
Vendramin <i>et al.</i>	2007	<i>P. persica</i>		18 (21) EPPISF
Ai <i>et al.</i>	2008	<i>P. pseudocerasus</i>	24	
Tsuda <i>et al.</i>	2009	<i>Prunoideae</i>		13 (63) AM, DN, DY
Mnejja <i>et al.</i>	2010	<i>P. dulcis</i> <i>P. persica</i> * <i>P. armeniaca</i>		22 EPDCU 25 EPDCU 3 AMPA*
Wang <i>et al.</i>	2012	<i>P. virginiana</i>	212	
Wang <i>et al.</i>	2014b	<i>P. sibirica</i>	52	

*Estos microsatélites no fueron desarrollados por este grupo, sino sólo presentados y usados en sus trabajos

4.1.2. Aplicaciones en estudios de variabilidad

Desde su desarrollo en *Prunus*, los microsatélites fueron usados en estudios de variabilidad de las diferentes especies del género. Los microsatélites obtenidos en melocotonero fueron lo más utilizados ya que en esta especie había más y se desarrollaron antes. En la Tabla 2 se presentan los diferentes estudios de variabilidad en *Prunus* encontrados en la bibliografía. A continuación se detallan algunos estudios de variabilidad por especies.

4.1.2.1. Estudios de variabilidad en el melocotonero

Por ser la especie económicamente más importante del género, el melocotonero fue objeto de muchos estudios de variabilidad. En el primero (Testolin *et al.*, 2000) se usaron 26 microsatélites todos procedentes de genotecas genómicas de melocotonero para estudiar la variabilidad de 50 cultivares de esta especie. Los autores mostraron con este estudio el alto poder discriminatorio de los microsatélites y sugirieron la posibilidad de llegar a distinguir entre dos cultivares que se diferencian sólo por mutaciones somáticas, llamados también sports.

De los primeros estudios de variabilidad el más exhaustivo fue el de Aranzana *et al.* (2003c), que usaron 16 microsatélites de melocotonero en una colección de 212 cultivares de origen europeo o estadounidense. Aún trabajando con una especie muy poco variable, se pudieron distinguir claramente 195 cultivares de los 212 estudiados, siendo el resto grupos de variedades conocidas como sports o probables sinonimias. La variabilidad observada permitió separar tres grupos de cultivares: uno formado básicamente por melocotones, otro por nectarinas y un tercero que agrupaba los cultivares de carne dura. Más adelante Aranzana *et al.* (2010) publicaron un nuevo trabajo estudiando 224 cultivares (de los cuales 208 estudiados en el anterior trabajo arriba descrito) usando 50 microsatélites desarrollados en diferentes especies del género *Prunus* y con buena cobertura del genoma. Sus resultados fueron consistentes con los del trabajo anterior y permitieron una primera estima del desequilibrio de ligamiento en la especie que resultó

estar altamente conservado (10-12 cM), de acuerdo con los datos disponibles sobre la historia de este cultivo (autogamia y un reciente cuello de botella al principio de la mejora moderna). En un estudio más reciente, Rojas *et al.* (2008) intentaron buscar el número mínimo de microsatélites necesarios para la identificación varietal de melocotonero. De los 117 cultivares estudiados de origen chileno y norteamericano, 102 pudieron ser identificados inequívocamente con un set de tan sólo 7 microsatélites. Yoon *et al.* (2006), estudiaron la variabilidad de 96 cultivares de melocotonero de origen asiático (China, Japón y Corea) y norteamericano con 33 marcadores microsatélites, todos derivados de melocotonero salvo uno (Ps12A02) desarrollado desde el cerezo. En este estudio, los microsatélites pudieron diferenciar entre todos los genotipos y revelaron una relación entre su variabilidad y la distribución geográfica entre los cultivares estudiados. Más recientemente Li *et al.* (2013) estudiaron una amplia colección de variedades (653) de origen oriental (China y Japón principalmente) y occidental (Europa y Estados Unidos) con 48 SSRs, lo que permitió constatar que la variabilidad genética es mayor y la conservación del desequilibrio de ligamiento es menor en las variedades orientales que en las occidentales, de acuerdo con la historia conocida de *P. persica* desde su domesticación.

4.1.2.2. Estudios de variabilidad en el almendro

La variabilidad de 36 cultivares de almendro originarios de China y el mediterráneo fue estudiada por Xu *et al.* (2004) con 28 microsatélites de diferentes orígenes; 21 microsatélites procedentes de ESTs (18 de almendro, uno de cerezo negro, uno de guindo y uno de manzano) y siete genómicos (cuatro de melocotonero, dos de cerezo y uno de almendro). Todos los microsatélites genómicos resultaron polimórficos en esta colección de variedades. De los 21 microsatélites derivados de ESTs usados, sólo 11 fueron polimórficos, entre los cuales los dos derivados de manzano y de guindo. En el análisis filogenético realizado, se distinguen claramente dos grupos, las variedades chinas por un lado y las europeas y americanas por el otro. En este mismo estudio, se incluyeron dos cultivares de melocotonero, dos híbridos almendro x melocotonero y cuatro especies de

almendros silvestres (*P. triloba*, *P. mongolica*, *P. ledebouriana*, *P. tangutica*). Los resultados de Xu *et al.* (2004) indican que el almendro común está más cerca genéticamente del melocotonero que de las 4 especies de almendro silvestre ensayadas.

Otro estudio de variabilidad en el almendro fue realizado por Xie *et al.* (2006) en el que se usaron 16 marcadores SSRs (ocho genómicos y ocho derivados de ESTs) en 38 cultivares de almendro, de los cuales 23 eran chinos y los otros 15 europeos y norteamericanos. En este estudio también se incluyeron dos híbridos almendro x melocotonero y tres cultivares de melocotonero. Con el análisis UPGMA basado en las similitudes genéticas, se diferenciaron los 23 cultivares chinos del resto, formando un único grupo. Los dos híbridos interespecíficos se parecieron genéticamente más a los melocotoneros que a los almendros.

4.1.2.3. Estudios de variabilidad en el albaricoquero

Muchos estudios de variabilidad en el albaricoquero se encuentran descritos en la bibliografía. El primer trabajo (Hormaza, 2002) usó un juego de 37 microsatélites desarrollados de diferentes especies de *Prunus*, de los cuales 31 amplificaron una colección de 48 genotipos de albaricoquero. Sólo 20 (19 SSRs de melocotonero y uno de cerezo) fueron polimórficos en la muestra ensayada. Todos los genotipos pudieron ser diferenciados usando los 20 microsatélites y fueron agrupados según su origen geográfico mediante el análisis UPGMA.

Más adelante, Zhebentyayeva *et al.* (2003) usando inicialmente 30 microsatélites derivados de melocotonero estudió de variabilidad de 14 loci polimórficos en 74 cultivares. Se lograron distinguir individualmente 63 cultivares y el estudio posterior de variabilidad no detectó agrupaciones compatibles con la proveniencia geográfica de las variedades, lo que demuestra, según los autores, la compleja historia de la domesticación del albaricoquero.

El primer estudio de variabilidad que usa microsatélites derivados del propio albaricoquero fue el de Maghuly *et al.* (2005). En este trabajo se

usaron diez microsatélites para estudiar la variabilidad en una colección de 133 cultivares, además de tres especies relacionadas. El dendrograma resultante dividió los cultivares en dos grandes grupos, uno que contenía sólo cultivares de Asia central y el otro cultivares de Europa del Este.

En un trabajo de colaboración de nuestro grupo con investigadores tunecinos (Krichen *et al.*, 2006), se estudiaron 54 cultivares locales de Túnez usando 26 microsatélites derivados de almendro, ciruelo japonés, desarrollados en esta tesis, y melocotonero. Este estudio, mostró que un juego de únicamente 5 microsatélites fue suficiente para diferenciar entre los 54 cultivares estudiados.

Una especie próxima al albaricoquero, llamada albaricoquero japonés (*P. mume*) que incluye variedades usadas por su fruto y otras como ornamentales, fue también objeto de análisis de variabilidad con SSRs por Hayashi *et al.* (2008) incluyendo 127 genotipos de *P. mume* y tres de *P. armeniaca*. De los 58 microsatélites desarrollados de melocotonero y albaricoquero estudiados, 39 amplificaron en *P. mume*, de los cuales se eligieron los 14 que presentaban mejor amplificación y mayor polimorfismo para el estudio de variabilidad. Sus resultados sugieren una fuerte similitud entre un grupo de cultivares de *P. mume* ('Bungo') y las variedades de albaricoquero estudiadas, mientras que el resto del material de distribuía en el dendrograma siguiendo patrones de distribución geográfica. Recientemente se ha estudiado la variabilidad de otra especie cercana al albaricoquero (*P. sibirica*) usando marcadores SSR desarrollados en esta misma especie (Wang *et al.*, 2014a) o de otras especies próximas como son el albaricoquero o el melocotonero (Li *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014a).

4.1.2.4. Estudios de variabilidad en los ciruelos

Ahmad *et al.* (2004a), estudiaron la variabilidad de 14 cultivares de ciruelo japonés con 6 pluots y 1 plumcot. Para elucidar la proveniencia de los pluots y plumcots, supuestamente híbridos entre ciruelos y albaricoqueros, añadieron al estudio 7 cultivares de albaricoquero. El trabajo se llevó a cabo usando 28 microsatélites; 25 derivados de cerezo (*P. avium*) y 3 de

melocotonero. En el dendrograma obtenido, se agruparon los ciruelos y los pluots, mientras que los albaricoqueros formaron un cluster aparte. El Plumcot se quedó entre los dos grupos. Esto sostiene la afirmación de que el plumcot es un híbrido entre un ciruelo (*P. salicina*) y un albaricoquero pero no asegura que el albaricoquero sea un ancestro de los pluots.

Rohrer *et al.* (2004), estudiaron la variabilidad de los ciruelos del norte de América (*Prunus* sección *Prunocerasus*) para establecer las relaciones genéticas entre las diferentes especies. Para ello estudiaron 21 cultivares pertenecientes a 13 especies de ciruelo e incluyeron un albaricoquero y un ciruelo mirabolano (*P. cerasifera*) como controles. Usaron en este estudio 15 microsatélites (12 derivados de *P. avium* y tres de *P. persica*). Los resultados de la representación de las relaciones de distancia genética entre especies de su dendrograma fueron congruentes en algunos aspectos con la actual división filogenética de estas especies y no en otros. Los autores concluyen que los microsatélites son probablemente un tipo de marcadores no adecuado para analizar las relaciones taxonómicas a nivel interespecífico.

4.1.2.5. Estudios de variabilidad en los cerezos

La especie económicamente más importante dentro del subgénero *Cerassus* es el cerezo común (*P. avium*), sobre la que se han realizado varios estudios de variabilidad genética. Dirlewanger *et al.* (2002), usaron 41 microsatélites desarrollados de melocotonero para el estudio de 21 variedades de cerezo además de diversos melocotoneros. De estos microsatélites, 14 resultaron polimórficos en las variedades de cerezo permitiendo identificar individualmente a todas las variedades. Estos autores comprobaron que con varias combinaciones de tan sólo 3 microsatélites cada una, se podían distinguir inequívocamente todas las 21 variedades de cerezo ensayadas. Wünsch y Hormaza (2002), estudiaron la variabilidad del cerezo usando nueve microsatélites de melocotonero en 76 genotipos. Estos microsatélites diferenciaron de manera inequívoca a 72 genotipos de los 76 estudiados. Los cuatro restantes no se pudieron distinguir por tratarse de mutaciones de otras variedades. Struss *et al.* (2003), con 15 microsatélites

desarrollados por ellos mismos en *P. avium*, estudiaron la variabilidad genética existente entre 15 variedades de cerezo. De estos 15 microsatélites, 13 resultaron polimórficos permitiendo una identificación individual de todos los cultivares estudiados.

Downey y lezzoni (2000), usaron microsatélites derivados de diferentes especies (dos de *P. persica*, uno de *P. cerasus* y uno de *P. avium*) para estudiar la diversidad genética de la especie silvestre *P. serotina*. Cantini *et al.* (2001) estudiaron la variabilidad de la colección de germoplasma de cerezos tetraploides (guindo: *P. cerasus*, cerezo enano europeo: *P. fruticosa* y sus híbridos) de Geneva (Nueva York) usando diez microsatélites (siete de *P. avium*, dos de *P. cerasus* y uno de *P. persica*). Todos los 59 cerezos estudiados pudieron ser diferenciados con este set de microsatélites salvo dos.

Para estudiar la variabilidad genética y comprobar la clasificación de los taxones de cerezos japoneses en diferentes secciones, Ohta *et al.* (2005), estudiaron 144 genotipos del subgénero *Cerasus* pertenecientes a 15 taxones usando nueve microsatélites; ocho derivados de melocotonero y uno de *P. avium* que permitieron distinguir a todos los genotipos salvo dos. Los dendrogramas resultantes de los 144 genotipos y de los 14 taxones mediante el análisis UPGMA, concordaban a grosso modo con las divisiones taxonómicas basadas en la morfología.

Zhang *et al.* (2008), estudiaron la variabilidad de 44 genotipos de cerezo coreano (*P. tomentosa*), además de 7 genotipos de otras tres especies cercanas, utilizando 44 microsatélites de diferentes orígenes (36 de *P. persica*, cinco de *P. avium*, dos de *P. armeniaca* y uno de *P. cerasus*). Estos microsatélites fueron elegidos, por su especificidad y la claridad de su bandeo al testarlos en *P. tomentosa*, de un total de 110 microsatélites publicados. El dendrograma basado en el análisis UPGMA, separó los siete genotipos de las tres especies cercanas (*P. humilis*, *P. japonica* y *P. glandulosa*) del resto de genotipos de *P. tomentosa*.

Tabla 2: Estudios de variabilidad en *Prunus* usando microsatélites

Publicación	Año	Especies estudiadas	Especies origen de los microsatélites	Nº de microsatélites	Nº de cultivares
Albaricoqueros					
Hormaza	2002	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. cerasus</i>	37	48
Romero <i>et al.</i>	2003	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i>	16	40
Zhebentyayeva <i>et al.</i>	2003	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i>	30	74
Maghuly <i>et al.</i>	2005	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. armeniaca</i>	10	133
Sánchez-Pérez <i>et al.</i>	2005a	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i>	14	25
Krichen <i>et al.</i>	2006	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. salicina</i> , <i>P. dulcis</i> , <i>P. persica</i>	26	54
Romero <i>et al.</i>	2006	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i>	12	20
Sánchez-Pérez <i>et al.</i>	2006b	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i>	17	31
He <i>et al.</i>	2007	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i>	40	81
Donoso <i>et al.</i>	2008	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i>	7	31
Hayashi <i>et al.</i>	2008	<i>P. mume</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. armeniaca</i>	14	127
Bourguiba <i>et al.</i>	2012	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. armeniaca</i>	24	183
Yilmaz <i>et al.</i>	2012	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i>	16	95
Li <i>et al.</i>	2014	<i>P. sibirica</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. armeniaca</i>	10	252
Wang <i>et al.</i>	2014a	<i>P. sibirica</i>	<i>P. sibirica</i> , <i>P. persica</i> , <i>P. armeniaca</i>	31	672
Zhang <i>et al.</i>	2014	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. armeniaca</i> , <i>P. dulcis</i> , <i>P. salicina</i>	21	93
Almendros					
Martínez-Gómez <i>et al.</i>	2003a	<i>P. dulcis</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	18	30
Martínez-Gómez <i>et al.</i>	2003b	<i>P. dulcis</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	18	5
Xu <i>et al.</i>	2004	<i>P. dulcis</i>	<i>P. dulcis</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. serotina</i> , <i>P. persica</i> y manzano	28	36
Sánchez-Pérez <i>et al.</i>	2005b	<i>P. dulcis</i>	<i>P. persica</i>	6	21
Sánchez-Pérez <i>et al.</i> ,	2006a	<i>P. dulcis</i>	<i>P. persica</i>	6	21
Xie <i>et al.</i>	2006	<i>P. dulcis</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. dulcis</i>	16	38
Shiran <i>et al.</i>	2007	<i>P. dulcis</i>	<i>P. persica</i>	18	39
Zeinalabedini <i>et al.</i>	2007	<i>P. dulcis</i> , <i>P. ssp.</i>	<i>P. persica</i>	21	5, 40
Fathi <i>et al.</i>	2008	<i>P. dulcis</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. dulcis</i>	25	56
Dangl <i>et al.</i>	2009	<i>P. dulcis</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. armeniaca</i> , <i>P. salicina</i> , <i>P. avium</i>	24	21
Tahan <i>et al.</i>	2009	<i>P. tenella</i>	<i>P. dulcis</i>	14	227
Zeinalabedini <i>et al.</i>	2010	<i>P. dulcis</i> , <i>P. ssp.</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. salicina</i>	26	40, 25
Kadkhodaei <i>et al.</i>	2011	<i>P. dulcis</i>	<i>P. dulcis</i>	7	53
Gouta <i>et al.</i>	2012	<i>P. dulcis</i>	<i>P. dulcis</i> , <i>P. salicina</i>	10	54
Rahemi <i>et al.</i>	2012	<i>P. dulcis</i> , <i>P. ssp.</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. dulcis</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. salicina</i> , <i>P. cerasus</i>	44	9, 80

Tabla 2 (continuación)

Publicación	Año	Especies estudiadas	Especies origen de los microsatélites	Nº de microsatélites	Nº de cultivares
Cerezos					
Downey y Iezzoni	2000	<i>P. serotina</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. cerasus</i>	4	66
Cantini <i>et al.</i>	2001	<i>P. cerasus</i> , <i>P. fruticosa</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. cerasus</i>	10	59
Dirlwanger <i>et al.</i>	2002	<i>P. avium</i>	<i>P. persica</i>	41	21
Wünsch y Hormaza	2002	<i>P. avium</i>	<i>P. persica</i>	9	76
Struss <i>et al.</i>	2003	<i>P. avium</i>	<i>P. avium</i>	15	15
Ohta <i>et al.</i>	2005	<i>Prunus</i> subgénero <i>cerasus</i>	<i>P. avium</i> , <i>P. cerasus</i> , <i>P. persica</i>	25	144
Pairon y Jacquemart	2005	<i>P. serotina</i>	<i>P. persica</i>	6	20
Iketani <i>et al.</i>	2007	<i>Prunus x yedoensis</i>	<i>P. avium</i> , <i>P. cerasus</i> , <i>P. persica</i>	21	52
Ai <i>et al.</i>	2008	<i>P. pseudocerasus</i>	<i>P. pseudocerasus</i>	12	26
Zhang <i>et al.</i>	2008	<i>P. tomentosa</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. cerasus</i> , <i>P. armeniaca</i>	44	44
Antonius <i>et al.</i>	2012	<i>P. cerasus</i>	<i>P. persica</i>	9	52
Fernández i Martí <i>et al.</i>	2012	<i>P. avium</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. dulcis</i>	7	114
Stanys <i>et al.</i>	2012	<i>P. avium</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	14	31
Barac <i>et al.</i>	2014	<i>Prunus</i> subgénero <i>cerasus</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	26	77
Kato <i>et al.</i>	2014	<i>Prunus</i> subgénero <i>cerasus</i>	<i>Prunoideae</i> , <i>P. persica</i>	31	215
Ciruelos					
Valmor <i>et al.</i> *	2002	<i>P. salicina</i> , <i>P. cerasifera</i> , <i>P. domestica</i>	Sin información	Sin información	12
Ahmad <i>et al.</i>	2004a	<i>P. salicina</i> , pluot, <i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	26	28
Rohrer <i>et al.</i>	2004	13 <i>Prunus</i> sección <i>Prunocerasus</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	15	23
Qiao <i>et al.</i>	2007	<i>P. salicina</i> , <i>P. domestica</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. cerasus</i>	21	56
Horvath <i>et al.</i>	2008	<i>P. cerasifera</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. salicina</i>	7	29
Wöhrmann <i>et al.</i>	2011	<i>P. divaricata</i> Ledeb.	<i>P. persica</i> , <i>P. salicina</i>	11	12 (poblaciones)
Kazija <i>et al.</i>	2014	<i>P. domestica</i> , <i>P. insititia</i> L.	<i>P. persica</i> , <i>P. armeniaca</i>	11	62

Tabla 2 (continuación)

Publicación	Año	Especies estudiadas	Especies origen de los microsatélites	Nº de microsatélites	Nº de cultivares
Melocotoneros					
Testolin <i>et al.</i>	2000	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	26	50
Aranzana <i>et al.</i>	2002	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	35	25
Dirlewanger <i>et al.</i>	2002	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	41	27
Aranzana <i>et al.</i>	2003c	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	16	212
Martínez-Gómez <i>et al.</i>	2003a	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	18	45
Martínez-Gómez <i>et al.</i>	2003b	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	18	6
Yamamoto <i>et al.</i>	2003	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	17	16
Ahmad <i>et al.</i>	2004b	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	20	38
Wünsch <i>et al.</i>	2006	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	10	85
Yoon <i>et al.</i>	2006	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	33	96
Bouhadida <i>et al.</i>	2007	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	14	29
Nishitani <i>et al.</i>	2007	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	18	14
Rojas <i>et al.</i>	2008	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	9	117
Cheng y Huang	2009	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	7	32
Aranzana <i>et al.</i>	2010	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. cerasus</i> , <i>P. salicina</i>	50	224
Cao <i>et al.</i>	2012	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. dulcis</i> , <i>P. salicina</i>	53	104
Sitther <i>et al.</i>	2012	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	15	37
Li <i>et al.</i>	2013	<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	48	653
Especies varias de Prunus					
Bianchi <i>et al.</i>	2004	patrones de <i>Prunus</i> (<i>Prunophora</i> y <i>Amygdalus</i>)	<i>P. persica</i>	5	29
Baranek <i>et al.</i>	2006	<i>Prunus</i> subgénero <i>Amygdalus</i>	<i>P. persica</i>	21	15
Bouhadida <i>et al.</i>	2009	patrones de <i>Prunus</i>	<i>P. persica</i>	13	44
Arismendi <i>et al.</i>	2012	patrones de <i>Prunus</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	12	26
Turkoglu <i>et al.</i>	2012	patrones de cerezo (<i>P. avium</i> , <i>P. Cerasus</i> , <i>P. mahaleb</i> y <i>P. angustifolia</i>)	<i>P. persica</i> , <i>P. salicina</i>	10	184
Khadivi-Khub <i>et al.</i>	2014	<i>Prunus</i> subgénero <i>Cerasus</i>	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	16	53

4.1.3. Construcción de mapas genéticos con SSRs y otras aplicaciones a la genética y mejora

Por su carácter de herencia codominante, su buena repartición en todo el genoma y por ser altamente transferibles dentro de la especie y a veces entre especies próximas, los SSRs son excelentes marcadores para la construcción de mapas genéticos. Por eso, se han usado frecuentemente para este objetivo en muchas especies, las del género *Prunus* no son una excepción. En este caso los mapas se han obtenido tanto de cruzamientos intraespecíficos, como interespecíficos gracias a la compatibilidad que existe entre muchas especies de *Prunus*, lo que genera un mayor polimorfismo en las descendencias. En la Tabla 3 se resumen los diferentes mapas de *Prunus* que se encuentran en la bibliografía, de los cuales comentamos a continuación los más relevantes.

Diversas poblaciones de especies de *Prunus* fueron objeto de mapas genéticos. En la bibliografía se encuentran mapas de *P. dulcis*, *P. persica*, *P. armeniaca*, *P. avium*, *P. cerasus* y *P. mume*. La primera vez que se incluyeron marcadores de tipo microsatélite en mapas de *Prunus* fue en un mapa de almendro usando una población F1 del cruce 'Ferragnès' x 'Tuono', en donde se pudieron mapear 6 de los 8 microsatélites ensayados (Joobeur *et al.*, 2000).

Uno de los mapas de melocotonero más completo es el de la población F2 del cruce 'Ferjalou Jalousia' x 'Fantasia'. Este mapa, contiene 82 microsatélites, un alto número teniendo en cuenta el bajo polimorfismo que suele encontrarse en los mapas intraespecíficos de melocotonero. Los 187 marcadores que constituyen este mapa (82 SSRs, 37 RFLPs, 61 AFLPs, un isoenzima y seis caracteres agronómicos) se agruparon en solamente siete grupos de ligamiento, y no en los ocho esperados, cubriendo una distancia genética de 621,2 cM (Dirlewanger *et al.*, 2006). La causa de que haya un grupo de ligamiento sin marcadores polimórficos se debe muy probablemente a que se trata de que los dos cromosomas homólogos

correspondientes a este grupo son idénticos por descendencia por lo que todos los marcadores son homocigotos.

Dondini *et al.* (2007) construyeron un mapa de albaricoquero constituido exclusivamente por microsatélites. La población de este mapa es una F1 del cruzamiento 'Lito' x 'BO81604311'. Ciento ochenta y siete de los 319 microsatélites probados mapearon y formaron los ocho grupos de ligamiento esperados. La distancia genética resultante fue de 504 cM para el mapa de 'Lito' y 620 cM para el mapa de 'BO81604311', esta diferencia se explica por los microsatélites que mapearon sólo en el parental masculino en los extremos de los seis primeros grupos de ligamiento. Estos autores presentaron también un estudio de microsintenia entre sus dos mapas de albaricoquero con otros mapas publicados de *Prunus*, del cual se muestra el sustancial mantenimiento del orden de los marcadores entre los diferentes mapas del género, tal como ya se había observado previamente usando todo tipo de marcadores (Dirlewanger *et al.*, 2004).

En una población F1 del cruzamiento entre los cultivares de cerezo 'Emperor Francis' (EF), como parental femenino, y 'New York 54' (NY), como donante de polen, se mapearon 111 microsatélites de un total de 433 probados procedentes de diferentes especies de *Prunus*. Los mapas de los parentales están formados por los ocho grupos de ligamiento esperados y cubren una distancia genética de 711,1 cM para el mapa de EF y 565,8 cM para el mapa de NY (Olmstead *et al.*, 2008).

Muy recientemente, y gracias a la secuenciación masiva por shotgun, Sun *et al.* (2013) detectaron 188.149 SSRs en el genoma ensamblado del albaricoquero japonés, de los que mapearon 144 microsatélites en una población F1 de *P. mume* del cruzamiento 'Fenban' x 'Kouzi Yudie', que se distribuyeron en 8 grupos de ligamiento, cubriendo una distancia total de 670 cM.

El único mapa obtenido en una especie poliploide es el del guindo, especie tetraploide, usando una descendencia F1 del cruzamiento 'Reinische Schattenmorelle' x 'Erdi Botermo'. Este mapa fue construido previamente por Wang *et al.* (1998) exclusivamente con RFLPs. En la

segunda generación de este mapa, se probaron 45 SSRs derivados de manzano, melocotonero, cerezo y guindo, de los cuales diez fueron polimórficos (seis de melocotonero, dos de cerezo y dos de guindo) dando lugar a un total de 17 marcadores segregantes en la descendencia. El mapa del guindo está constituido de 161 marcadores formando 19 grupos de ligamiento y cubriendo una distancia de 442,4 cM. Este mapa es incompleto y faltarían algunos marcadores más para llegar a detectar los 16 grupos de ligamiento esperados y una distancia alrededor de dos veces la de una especie diploide del género *Prunus* (Canli, 2004).

De los mapas elaborados con poblaciones procedentes de cruzamientos interespecíficos destacaremos especialmente el mapa de referencia de *Prunus* y otros dos mapas que incluyen un importante número de microsatélites.

El mapa de referencia de *Prunus* se obtuvo a partir de la descendencia F2 procedente de la autofecundación de un individuo del cruzamiento entre la variedad de almendro 'Texas' y la de melocotonero 'Earlygold', que se llama abreviadamente TxE y que fue inicialmente construido con 235 RFLPs y 11 isoenzimas, todos ellos de alta calidad y transferibles (Joobeur *et al.*, 1998). Este mapa se fue saturando con otros marcadores de alta calidad dando lugar a un mapa constituido por 562 marcadores (361 RFLPs, 185 SSRs, 11 isoenzimas y 5 STSs), cubriendo un total de distancia genética de 519 cM, con una densidad alta de marcadores (<1 cM/marcador) y presentando el hueco más grande de tan sólo 7 cM (Aranzana *et al.*, 2003, Dirlwanger *et al.*, 2004a). Muchos mapas de *Prunus* construidos después del de Joobeur *et al.* (1998) usaron los marcadores de TxE para tener una buena cobertura del genoma y disponer de marcadores de anclaje que faciliten la comparación con TxE y con otros mapas. Dieciséis de ellos, con al menos 28 marcadores de anclaje con TxE han sido publicados (Arús *et al.*, 2005). En la actualización del mapa presentada por Howad *et al.* (2005), el mapa quedó constituido por 826 marcadores con mayoría de tipo microsatélites (449 SSRs, 361 RFLPs, 11 isoenzimas y 5 STSs), cubriendo una distancia genética de 524 cM, con densidad media de 0,63 cM/marcador y presentando el hueco más grande de 7 cM. Con el desarrollo de la técnica

de mapeo llamada “bin mapping” (Howad *et al.*, 2005) basada en el uso de solamente ocho plantas de TxE (el parental ‘Earlygold’, el híbrido F1 ‘Texas’ x ‘Earlygold’ y seis plantas seleccionadas de la F2), fue posible el mapeo de nuevos SSR y de muchos genes candidatos en el mapa de TxE con un esfuerzo mucho menor del requerido usando toda la población. Considerando todos los marcadores añadidos recientemente con esta aproximación (Ogundiwin *et al.*, 2009; Cabrera *et al.*, 2009; Sargent *et al.*, 2009a; Illa *et al.*, 2011), el mapa de TxE tiene un total de 1.803 marcadores basados en secuencias conocidas, lo que supone una densidad de 0,29 cM/marcador (Illa *et al.*, 2011), lo que es un importante recurso genético que ha sido utilizado en diversas aplicaciones, entre otras el alineamiento entre el mapa genético y el físico para la construcción de la secuencia del genoma del melocotonero (Verde *et al.*, 2013).

El único mapa construido usando el ciruelo mirabolano como uno de los progenitores fue el publicado por Dirlwanger *et al.* (2004b) y sirvió para la localización de genes de resistencia a nematodos procedentes de *P. cerasifera* y del melocotonero. La población de este mapa es una F1 del cruce entre *P. cerasifera* ‘P.2175’ por ‘GN22’ (almendro ‘Garfi’ x melocotonero ‘Nemared’). Este mapa está constituido mayoritariamente por marcadores de tipo microsatélite (165 SSRs).

Clarke *et al.* (2009), obtuvieron un mapa constituido mayoritariamente por microsatélites (168 SSRs) en una población F1 procedente del cruzamiento interespecífico entre *P. avium* ‘Napoleon’ y *P. nipponica* ‘F1292’. Este mapa está formado por ocho grupos de ligamiento y cubre una distancia genética de 736 cM, y fue comparado con otros de *Prunus* en un estudio de microsintenia, en el que se demuestra que aunque el cerezo es una especie más distante que el resto de especies cultivadas de *Prunus*, sus genomas son esencialmente sinténicos.

Tabla 3: Mapas genéticos de *Prunus* usando microsatélites

Publicación	Año	Especie origen de los microsatélites	Mapa	Nº de microsatélites
Cruces intraespecíficos				
Joobeur <i>et al.</i>	2000	<i>P. persica</i>	F1 <i>P. dulcis</i> ('Ferragnès' x 'Tuono')	6
Gregory <i>et al.</i>	2005	<i>P. persica</i> y <i>P. avium</i>	F1 <i>P. dulcis</i> ('Nonpareil' x 'Lauranne')	36
Sánchez-Pérez <i>et al.</i>	2007	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. dulcis</i>	F1 <i>P. dulcis</i> ('R1000' x 'Desmayo Langueta')	56
Tavassolian <i>et al.</i>	2010	<i>P. persica</i> , <i>P. dulcis</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. armeniaca</i> , <i>P. salicina</i> , <i>P. cerasus</i>	F1 <i>P. dulcis</i> ('Nonpareil' x 'Lauranne')	96
Fernández i Martí <i>et al.</i>	2011	<i>P. persica</i> , <i>P. dulcis</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. salicina</i>	F1 <i>P. dulcis</i> ('Vivot' x 'Blanquerna')	52
Wang <i>et al.</i>	2002	<i>P. persica</i>	F2 <i>P. persica</i> ('Empress' op op dwarf x 'Evergrowing')	8
		<i>P. persica</i>	F2 <i>P. persica</i> ('Nemared' x 'Lovell')	8
Dirlwanger <i>et al.</i>	2006	<i>Prunus ssp.</i>	F2 <i>P. persica</i> ('Ferjalou Jalousia' x 'Fantasia')	82
Blenda <i>et al.</i>	2007	<i>P. persica</i>	F2 <i>P. persica</i> ('Guardian' selección 3-17-7 x 'Nemaguard')	21
Hurtado <i>et al.</i>	2002	<i>P. persica</i>	F1 <i>P. armeniaca</i> ('Goldrich' x 'Valenciano')	17
Vilanova <i>et al.</i>	2003	<i>P. persica</i>	F2 <i>P. armeniaca</i> 'Lito' ('Stark Early Orange' x 'Tyrinthos')	29
Lambert <i>et al.</i>	2004	<i>P. persica</i> , <i>P. armeniaca</i> , <i>P. davidiana</i>	F1 <i>P. armeniaca</i> ('Polonais' x 'Stark Early Orange')	35
Dondini <i>et al.</i>	2007	<i>P. persica</i> , <i>P. dulcis</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. armeniaca</i>	F1 <i>P. armeniaca</i> ('Lito' x 'BO81604311')	185
Canli	2004	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i> y <i>P. cerasus</i>	F1 <i>P. cerasus</i> ('Reinische Schattenmorell' x 'Erdi Botermo')	10
Olmstead <i>et al.</i>	2008	<i>Prunus ssp.</i>	F1 <i>P. avium</i> ('Emperor Francis' x 'New York 54')	111
Sun <i>et al.</i>	2013	<i>P. mume</i>	F1 <i>P. mume</i> ('Fenban' x 'Kouzi Yudie')	144
Cruces interespecíficos				
Dettori <i>et al.</i>	2001	<i>P. persica</i>	BC1 <i>P. persica</i> x (<i>P. persica</i> x <i>P. ferganensis</i>)	17
Verde <i>et al.</i>	2005	<i>P. persica</i>	BC1 <i>P. persica</i> x (<i>P. persica</i> x <i>P. ferganensis</i>)	41
Bliss <i>et al.</i>	2002	<i>P. avium</i> y <i>P. cerasus</i>	F2 <i>P. dulcis</i> 'Padre' x <i>P. persica</i> '54P455'	4
Aranzana <i>et al.</i>	2003a	<i>P. persica</i> , <i>P. avium</i>	F2 <i>P. dulcis</i> 'Texas' (T) x <i>P. persica</i> 'Early Gold' (E)	87
Dirlwanger <i>et al.</i>	2004a	<i>Prunus ssp.</i>	F2 T x E	89
Howad <i>et al.</i>	2005	<i>Prunus ssp.</i>	F2 T x E	264
Nishitani <i>et al.</i>	2007	<i>P. persica</i>	F2 T x E	15
Vilanova <i>et al.</i>	2008	<i>P. armeniaca</i> , <i>P. persica</i>	F2 T x E	2
Foulongne <i>et al.</i>	2003	<i>P. persica</i>	F1 <i>P. persica</i> 'Summergrand' x <i>P. davidiana</i> 'P1908'	14
			F2 SD402 (<i>P. persica</i> 'Summergrand' x <i>P. davidiana</i> 'P1908')	24
Vaughan y Russell.	2004	<i>P. avium</i>	F1 <i>P. avium</i> 'Napoleon' x <i>P. nipponica</i>	11
Clarke <i>et al.</i>	2009	<i>Prunus ssp.</i>	F1 <i>P. avium</i> 'Napoleon' x <i>P. nipponica</i> 'F1292'	168
Dirlwanger <i>et al.</i>	2004b	<i>Prunus ssp.</i>	F1 <i>P. cerasifera</i> 'P.2175' x (<i>P. dulcis</i> 'Garfi' x <i>P. persica</i> 'Nemared') 'GN22'	165

Otros usos de los microsatélites en *Prunus* además de los ya citados son el análisis de paternidad y pedigrí (Testolin *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2003; Decroocq *et al.*, 2004; Ikatani *et al.*, 2007; Jolivet *et al.*, 2012; Sitther *et al.*, 2012), la selección asistida por marcadores o MAS (Dirlewanger *et al.*, 2004a; Verde *et al.*, 2004; Dirlewanger *et al.*, 2006; Sánchez-Pérez *et al.*, 2007; Miguel Soriano *et al.*, 2012; Picañol *et al.*, 2013), en la comprobación de la pureza híbrida (Ikatani *et al.*, 2007), en estudios de comparación de mapas por su carácter transferible (Dondini *et al.*, 2007; Olmstead *et al.*, 2008; Vilanova *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2009), en estudios de desequilibrio de ligamiento y de estructura poblacional (Aranzana *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2012; Font i Forcada *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; 2014; Wang *et al.*, 2014a), y en estudios de la historia evolutiva de las especies como en el caso del almendro (Deplancke *et al.*, 2013).

4.2. Microsatélites en las Maloideas

4.2.1. Microsatélites disponibles

Si en *Prunus* la primera descripción de microsatélites fue en 1999, en *Malus*, se empezaron a usar los microsatélites unos años antes, Szewc-McFadden *et al.* (1995) propusieron su uso en el examen de la diversidad genética del manzano (*Malus x domestica*) y desarrollaron más tarde los primeros ocho SSRs en esta especie (Szewc-McFadden *et al.* 1996) obtenidos de una genoteca genómica del cultivar ‘Golden Delicious’. Desde entonces empezaron a desarrollarse muchos más SSRs para las Maloideas (Tabla 4). En dos publicaciones se presentó un considerable número de microsatélites derivados del manzano: Liebhart *et al.* (2002) desarrollaron 140 nuevos microsatélites, todos obtenidos de una genoteca genómica del cultivar “Florina” y Silfverberg-Dilworth *et al.* (2006) obtuvieron 148 de los que 117 derivaban de una genoteca genómica y otros 31 desarrollados *in silico*, a partir de los ESTs publicados en las bases de datos del manzano. Otros microsatélites fueron desarrollados en el peral japonés (*Pyrus pyrifolia*) (Yamamoto *et al.*, 2002a; 2002b; 2002c) y en el europeo (*P. communis*)

(Yamamoto *et al.*, 2002a; 2002c; Fernandez-Fernandez *et al.*, 2006), en *Sorbus torminalis* (Oddou-Muratorio *et al.*, 2001) o en *Malus floribunda* (Vinatzer *et al.*, 2004).

Tabla 4: Microsatélites de la subfamilia *Maloideae* disponibles en la bibliografía

Publicación	Año	Especie	Microsatélites	
			Genómicos	ESTs
Szewc-McFadden <i>et al.</i>	1996	<i>Malus x domestica</i>	8	
Hemmat <i>et al.</i>	1997	<i>Malus x domestica</i>	1	
Guilford <i>et al.</i>	1997	<i>Malus x domestica</i>	10	
Gianfranceschi <i>et al.</i>	1998	<i>Malus x domestica</i>	16	
Hokanson <i>et al.</i>	1998	<i>Malus x domestica</i>	8	
Oddou-Muratorio <i>et al.</i>	2001	<i>Sorbus torminalis</i>	9	
Liebhart <i>et al.</i>	2002	<i>Malus x domestica</i>	140	
Yamamoto <i>et al.</i>	2002a	<i>P. communis</i> y <i>P. pyrifolia</i>	9	
Yamamoto <i>et al.</i>	2002b	<i>P. pyrifolia</i>	13	
Yamamoto <i>et al.</i>	2002c	<i>P. communis</i> y <i>P. pyrifolia</i>	19	
Vinatzer <i>et al.</i>	2004	<i>Malus floribunda</i>	2	
Bassil <i>et al.</i>	2005	<i>Pyrus</i>		18
Fernandez-fernandez <i>et al.</i>	2006	<i>P. communis</i>	19	
Silfverberg-Dilworth <i>et al.</i>	2006	<i>Malus x domestica</i>	117	31
Khan <i>et al.</i>	2007	<i>Malus x domestica</i>	2	
Celton <i>et al.</i>	2009	<i>Malus x domestica</i>		47
Gasic <i>et al.</i>	2009	<i>Malus x domestica</i>		51
Yao <i>et al.</i>	2010	<i>Malus x domestica</i>		94
Fernández-Fernández <i>et al.</i>	2012	<i>Malus x domestica</i>		35

4.2.2. Aplicaciones en estudios de variabilidad

Con los microsatélites desarrollados, se realizaron varios estudios de variabilidad en las diferentes especies de las Maloideas (Tabla 5). Desde muy pronto, se usaron los microsatélites del manzano para estudiar la variabilidad tanto en esta especie (Szewc-McFadden *et al.*, 1996; Hokanson *et al.*, 1998) como en otras cercanas (Hokanson *et al.*, 1997; Benson *et al.*, 2001; Hokanson *et al.*, 2001; Coart *et al.*, 2003; Richards *et al.*, 2009). Con los microsatélites desarrollados de peral, se analizó la diversidad genética del género *Pyrus* (Kimura *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002a). Coart *et al.* (2003), estudiaron la variabilidad genética existente en *M. sylvestris*, uno de los posibles ancestros de *M. x domestica* usando AFLPs y microsatélites. En

este estudio, además de 76 genotipos de *M. sylvestris*, se incluyeron seis presuntos híbridos entre este manzano silvestre y el domesticado, 11 cultivares de manzano y 28 genotipos de diferentes especies de manzano ornamental. Los resultados obtenidos con los 12 marcadores microsatélites usados en este estudio concordaron ampliamente con los proporcionados por los otros 139 AFLPs indicando una clara separación entre las secciones silvestre y cultivada y con muy pocas accesiones que pudieran considerarse mezcla entre ambas. Más adelante, Richards *et al.* (2009), realizaron un estudio de variabilidad y de estructura poblacional de la especie *M. sieversii*, otro posible progenitor del manzano domesticado, usando siete microsatélites en 949 individuos pertenecientes a ocho poblaciones de Kazajistán. Estos microsatélites amplificaron 103 alelos, variando de tres a 29 alelos por locus, y detectaron claras diferencias en polimorfismo entre las poblaciones muestreadas, siendo las más septentrionales menos variables que las meridionales.

Además de los géneros *Malus* y *Pyrus*, se ha estudiado la variabilidad de otras especies pertenecientes a la subfamilia de las Maloideas. Yamamoto *et al.* (2004a), ensayaron 118 microsatélites derivados de manzano y peral para analizar la variabilidad del membrillo (*Cydonia oblonga*), de los cuales sólo 39 fueron polimórficos en los 20 cultivares estudiados. Con estos microsatélites, se pudieron diferenciar 12 de los 20 cultivares ensayados. Se realizó también un estudio de variabilidad con 40 cultivares del níspero (*Eriobotrya japonica*) usando 30 microsatélites derivados de manzano de los que 13 fueron polimórficos, pudiendo diferenciar inequívocamente a 34 de los cultivares analizados (Soriano *et al.*, 2005).

Tabla 5: Estudios de variabilidad en la subfamilia *Maloideae* usando microsatélites

Publicación	Año	Especies estudiadas	Especies origen de los microsatélites	Nº de microsatélites	Nº de cultivares
Szewc-McFadden <i>et al.</i>	1996	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	6	75
Hokanson <i>et al.</i>	1997	<i>Malus ssp.</i>	<i>Malus x domestica</i>	5	133
Hokanson <i>et al.</i>	1998	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	8	66
Benson <i>et al.</i>	2001	<i>M. hupehensis</i>	<i>Malus x domestica</i>		65
Hokanson <i>et al.</i>	2001	<i>Malus ssp.</i>	<i>Malus x domestica</i>	8	142
Kimura <i>et al.</i>	2002	6 <i>Pyrus ssp.</i>	<i>P. pyrifolia</i> y <i>P. communis</i>	9	60
Yamamoto <i>et al.</i>	2002a	5 <i>Pyrus ssp.</i>	<i>P. pyrifolia</i> y <i>P. communis</i>	7	32
Coart <i>et al.</i>	2003	<i>M. sylvestris</i>	<i>Malus x domestica</i>	12	121
Yamamoto <i>et al.</i>	2004a	<i>Cydonia oblonga</i>	<i>Malus x domestica</i> , <i>P. communis</i> y <i>P. pyrifolia</i>	39	20
Kitahara <i>et al.</i>	2005	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	19	42
Soriano <i>et al.</i>	2005	<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Malus x domestica</i>	13	40
Guarino <i>et al.</i>	2006	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	9	56
Larsen <i>et al.</i>	2006	<i>M. sylvestris</i> , <i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	10	207
Muzher <i>et al.</i>	2007	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	5	6
Pereira-Lorenzo <i>et al.</i>	2007	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	10	114
Brini <i>et al.</i>	2008	<i>P. communis</i>	<i>Malus x domestica</i>	7	31
Garkava-Gustavsson <i>et al.</i>	2008	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	10	68
Gharghani <i>et al.</i>	2009	<i>Malus ssp.</i>	<i>Malus x domestica</i>	9	159
Richards <i>et al.</i>	2009	<i>M. sieversii</i>	<i>Malus x domestica</i>	7	949
Ahmed <i>et al.</i>	2010	4 <i>Pyrus ssp.</i>	<i>Malus x domestica</i>	12	64
Bassil <i>et al.</i>	2010	<i>P. communis</i> , <i>P. pyrifolia</i> , <i>P. ussuriensis</i> , <i>P. x bretschnideri</i>	<i>Pyrus ssp.</i>	13	114
Gasi <i>et al.</i>	2010	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	10	39

Tabla 5 (continuación)

Publicación	Año	Especies estudiadas	Especies origen de los microsatélites	Nº de microsatélites	Nº de cultivares
Yao <i>et al.</i>	2010	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	18	20
		<i>Pyrus ssp.</i>	<i>Malus x domestica</i>	8	24
Ba <i>et al.</i>	2011	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	10	37
Cao <i>et al.</i>	2011	<i>Pyrus ssp.</i>	<i>Malus x domestica</i> , <i>P. communis</i> y <i>P. pyrifolia</i>	9	106
Farrokhi <i>et al.</i>	2011	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	16	44
He <i>et al.</i>	2011	<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Malus x domestica</i>	39	54
Lacis <i>et al.</i>	2011	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i> , <i>pyrus</i>	8	109
Moriya <i>et al.</i>	2011	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	15	95
Naseri <i>et al.</i>	2011	<i>Malus x domestica</i>	Sin información	15	48
Urbanovich <i>et al.</i>	2011	<i>Pyrus ssp.</i>	<i>Malus x domestica</i>	17	43
Yakovin <i>et al.</i>	2011	<i>P. ussuriensis</i> , <i>P. bretschneideri</i> , <i>P. pyraster</i> , <i>P. Elaeagnifolia</i>	<i>P. pyrifolia</i> y <i>P. communis</i>	5	46
Erfani <i>et al.</i>	2012	<i>Pyrus ssp.</i>	<i>Malus x domestica</i> , <i>P. communis</i> y <i>P. pyrifolia</i>	28	47
Patzak <i>et al.</i>	2012	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	10	273
Potts <i>et al.</i>	2012	<i>Malus ssp.</i>	<i>Malus x domestica</i>	17	164
Sehic <i>et al.</i>	2012	<i>P. communis</i>	<i>Malus x domestica</i>	10	86
Urrestarazu <i>et al.</i>	2012	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus x domestica</i>	13	538
Zhang <i>et al.</i>	2012	<i>Malus ssp.</i>	<i>Malus x domestica</i>	19	29
Gasi <i>et al.</i>	2013	<i>P. communis</i>	<i>Malus x domestica</i>	11	64

4.2.3. Construcción de mapas genéticos y otras aplicaciones a la genética y mejora

Los microsatélites han sido muy usados para la construcción de mapas en las Maloideas. Sobre un mapa original basado en marcadores RAPDs de una población F1 del cruce 'Iduna' x A679/2, Gianfranceschi *et al.* (1998), mapearon diez microsatélites de los 19 que desarrollaron de manzano. Maliepaard *et al.* (1998) publicaron un mapa de manzano de una población F1 del cruce 'Prima' x 'Fiesta', en el que mapearon diez microsatélites. Los mapas de los dos parentales están formados por los 17 grupos de ligamiento esperados, cubriendo una distancia genética de 842 cM para 'Prima' y de 984 cM para 'Fiesta'.

Uno de los mapas más completos y utilizados en manzano es de la F1 'Fiesta' x 'Discovery' que inicialmente contenía (Liebhart *et al.*, 2002) 115 microsatélites. El mapa de 'Fiesta' está constituido por 94 marcadores RAPDs y 106 marcadores microsatélites distribuidos en 17 grupos de ligamiento y cubre una distancia genética de 914,2 cM. El mapa de 'Discovery' muestra también los 17 grupos de ligamiento en los que se encuentran 120 marcadores RAPDs y 100 microsatélites, cubriendo una distancia genética de 1.015 cM. Liebhart *et al.* (2003), publicaron una versión más saturada del mismo mapa con más marcadores microsatélites, AFLPs, RAPDs y SCARs. El nuevo mapa de 'Fiesta' está constituido por un total de 439 marcadores, de los cuales 115 son microsatélites, cubriendo una distancia genética de 1.143,8 cM. El mapa de 'Discovery' contiene 499 marcadores de los que 112 son microsatélites y cubren 1.454,6 cM de distancia genética. La última versión de este mapa la presentaron Silfverberg-Dilworth *et al.* (2006) incluyendo muchos más marcadores microsatélites. Se testaron 156 nuevos microsatélites, de los cuales 148 pudieron ser mapeados en la población del mapa y el resto lo fueron en otros cruzamientos y posteriormente situados manualmente en el mapa de 'Fiesta' x 'Discovery' a partir de la posición de marcadores comunes. Estos 156 nuevos microsatélites resultaron en 168 loci polimórficos, de los cuales 99 mapearon en el mapa de 'Fiesta' y 115 en el mapa de 'Discovery'. El mapa actual abarca un total de 1.145,3 cM ('Fiesta') y de 1.417,1 cM

(‘Discovery’). Recientemente se han presentado dos nuevos mapas obtenidos de cruzamientos entre patrones de manzano. El primero basado en una población F1 del cruce ‘Malling 9’ x ‘Robusta 5’ (Celton *et al.*, 2009), está construido por 298 marcadores (224 SSRs, 18 SCARs, 14 SNPs y 42 RAPDs) identificando los 17 grupos de ligamiento de *Malus*. El mapa de ‘Malling 9’ cubre una distancia genética de 1.175,7 cM mientras que el de ‘Robusta 5’ de 1.086,7 cM. El segundo mapa, es una F1 entre un patrón enano ‘M27’ y otro vigoroso ‘M116’ (Fernández-Fernández *et al.*, 2012), está constituido exclusivamente de marcadores microsatélite (323 loci), además del locus S de autoincompatibilidad, formando 17 grupos de ligamiento y cubriendo una distancia genética de 1.229,5 cM, lo que correspondería al 91% del genoma *Malus*, basándose en el tamaño del mapa integrado de 6 diferentes poblaciones de manzano presentado por Velasco *et al.* (2010) que cubría una distancia genética de 1.354,9 cM.

Además de los mapas de manzano, se han construido algunos mapas de peral. El primero (Yamamoto *et al.*, 2002c) fue construido con una población F1 de un cruzamiento interespecífico entre un peral europeo cultivar ‘Bartlett’ y un peral japonés cultivar ‘Housui’. El mapa de ‘Bartlett’ está constituido por 226 loci, de los cuales 49 son microsatélites, repartidos entre 18 grupos de ligamiento y cubriendo una distancia genética de 949 cM. El mapa del parental masculino ‘Housui’ presenta 154 loci, de los cuales 42 son microsatélites, formando 17 grupos de ligamiento y abarcando 926 cM de distancia genética. Yamamoto *et al.* (2004b) presentaron la nueva versión más saturada de este mapa. Al mapa de ‘Bartlett’ se le añadieron 30 nuevos loci, llegando a un total de 256, de los cuales 76 fueron microsatélites (27 más), formando 19 grupos de ligamiento y cubriendo una distancia genética de 1.020 cM. El mapa de ‘Housui’ también presenta en esta versión 180 loci, de los cuales 64 son microsatélites, distribuidos en 20 grupos de ligamiento y cubriendo 995 cM. Posteriormente Yamamoto *et al.* (2007) presentaron una versión mejorada del mapa de ‘Bartlett’ con 447 loci, 118 de los cuales microsatélites, repartidos en 17 grupos de ligamiento y cubriendo 1.000 cM. En este mismo artículo, se presenta el mapa de otra variedad, ‘La France’, constituido por 414 loci, de los cuales 134 son microsatélites, formando 17

grupos de ligamiento y con 1.156 cM de distancia genética total. La posición de 66 microsatélites comunes de estos dos mapas de peral con los mapas saturados de manzano, demostró la colinearidad de los dos genomas.

Pierantoni *et al.* (2004) describieron también dos mapas de peral europeo que incluyen microsatélites. En el mapa de la población F1 del cruce 'Passe Crassane' x 'Harrow Sweet' se mapearon 41 microsatélites; mientras que en el mapa de la población F1 del cruce 'Abbe Fetel' x 'Max Red Bartlett' se mapearon 31. La comparación entre estos dos mapas y el del manzano, muestra también la similaridad entre los genomas de manzano y peral.

En las Maloideas, los microsatélites fueron usados en diferentes aplicaciones, además de los estudios de variabilidad y la construcción de mapas genéticos, entre otras, estudios de selección asistida por marcadores (Hemmat *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2007; Bus *et al.*, 2008; Celton *et al.*, 2009; Stoeckli *et al.*, 2009; Tobbut *et al.*, 2009), estudios de sintenia (Hemmat *et al.*, 2003; Pierantoni *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004, Yamamoto *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010), manejo de collecciones de germoplasma (van Treuren *et al.*, 2010), análisis de paternidad y estudios de pedigrí (Vinatzer *et al.*, 2004; Kitahara *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2011), estudio del nivel de ploidía y del origen apomíctico o sexual de la descendencia (Bisognin *et al.*, 2009), y genotipado masivo de cultivares y descendencias (Patocchi *et al.*, 2009).

Tabla 6: Mapas genéticos en la bibliografía de la subfamilia *Maloideae* usando microsatélites

Publicación	Año	Especies origen de los SSRs	Número de microsatélites	Poblaciones de los mapas
Gianfranceschi <i>et al.</i>	1998	<i>Malus x domestica</i>	10	Manzano ('Iduna' x A679/2)
Maliepaard <i>et al.</i>	1998	<i>Malus x domestica</i>	10	Manzano('Prima' x 'Fiesta')
Liebhart <i>et al.</i>	2002	<i>Malus x domestica</i>	115	Manzano ('Fiesta' x 'Discovery')
Yamamoto <i>et al.</i>	2002c	<i>Malus x domestica, Pyrus y Prunus</i>	64	Peral europeo 'Bartlett' x peral japonés 'Housui'
Hemmat <i>et al.</i>	2003	<i>Malus x domestica</i>	41	Manzano ('White Angel' x 'Rome Beauty')
Liebhart <i>et al.</i>	2003	<i>Malus x domestica</i>	129	Manzano ('Fiesta' x 'Discovery')
Pierantoni <i>et al.</i>	2004	<i>Malus x domestica</i>	41, 31	Peral europeo ('Passe Crassane' x 'Harrow Sweet'); ('Abbe Fetel' x 'Max Red Bartlett')
Yamamoto <i>et al.</i>	2004b	<i>Malus x domestica, Pyrus y Prunus</i>	76, 64	Peral europeo 'Bartlett' x peral japonés 'Housui'
Silfverberg-Dilworth <i>et al.</i>	2006	<i>Malus x domestica</i>	156	Manzano ('Fiesta' x 'Discovery')
Khan <i>et al.</i>	2007	<i>Malus x domestica</i>	2	Manzano ('Fiesta' x 'Discovery')
Yamamoto <i>et al.</i>	2007	<i>Malus x domestica y Pyrus</i>	118, 134	'Bartlett' x 'Housui'; 'Shinsei' x 282-12 ('Housui' x 'La France')
Igarashi <i>et al.</i>	2008	<i>Malus x domestica</i>	54, 64	'Ralls Janet' x <i>Malus sieboldii</i> ; 'Delicious' x <i>Malus sieboldii</i>
Celton <i>et al.</i>	2009	<i>Malus x domestica</i>	224	Manzano ('Malling 9'x 'Robusta 5')
Lu <i>et al.</i>	2010	<i>Malus x domestica</i>	29	F1 'Mishirazi' (<i>Pyrus pyrifolia</i> x <i>P. communis</i>) x 'Jinhua' (<i>Pyrus bretschneideri</i>)
Han <i>et al.</i>	2011	<i>Malus x domestica</i>	443	Manzano F1 ('Co-op 17' x 'Co-op 16')
Fernández-Fernández <i>et al.</i>	2012	<i>Pyrus ssp., Malus x domestica, Prunus persica, sorbus tormalis</i>	323	Manzano ('M27' x 'M116')
Zhang <i>et al.</i>	2013	<i>P. Communis, P. Pyrifolia</i>	6	Peral europeo 'Bayuehong' x peral chino 'Dangshansuli'

4.3. Microsatélites en las Rosoideas

4.3.1. Microsatélites disponibles

El género *Fragaria*, que incluye la fresa cultivada octoploide (*F. x ananassa*) y otras especies de diversos niveles de ploidía incluyendo varias diploides (*F. vesca*, *F. viridis* y *F. bucharica*, *F. iinumae*), ha sido el más estudiado de la subfamilia *Rosoideae* por ser el más importante económicamente. Los primeros 18 microsatélites de *Fragaria* fueron desarrollados por Nourse *et al.* (2002) en *F. x ananassa* a partir de una genoteca genómica de la variedad 'Earliglow'. Desde entonces se han publicado diversos trabajos de desarrollo de microsatélites mayoritariamente en este género, pero también en otros dentro de esta subfamilia que se resumen en la Tabla 7.

Los primeros trabajos de desarrollo de microsatélites en las Rosoideas se realizaron en el género *Rubus* (Amsellem *et al.*, 2001; Graham *et al.*, 2002). En rosa encontramos en la bibliografía únicamente dos trabajos de desarrollo de microsatélites; uno en *Rosa wichurana* (Zhang *et al.*, 2006) y otro en *Rosa hybrida* (Park *et al.*, 2010). Arens *et al.* (2004) obtuvieron los únicos microsatélites del género *Geum* que fueron 13 a partir de genotecas genómicas de la especie silvestre *Geum urbanum*. Recientemente y gracias a la técnica de secuenciación, Dobeš y Scheffknecht (2012) desarrollaron 74 microsatélites, usando el secuenciador 454, de la especie *Potentilla pusilla* Host, de los cuales 72 resultaron polimórficos.

Tabla 7: Microsatélites de la subfamilia *Rosoideae* disponibles en la bibliografía

Publicación	Año	Especies orígenes de los microsatélites	Nº de Microsatélites	
			Genómicos	ESTs
Amsellem <i>et al.</i>	2001	<i>Rubus alceifolius</i>	8	
Graham <i>et al.</i>	2002	<i>Rubus idaeus</i>	10	
Nourse <i>et al.</i>	2002	<i>Fragaria x ananassa</i>	18	
Ashley <i>et al.</i>	2003	<i>Fragaria virginiana</i>	4	
James <i>et al.</i>	2003	<i>Fragaria vesca</i>	10	
Sargent <i>et al.</i>	2003	<i>Fragaria viridis</i>	22	
Arens <i>et al.</i>	2004	<i>Geum urbanum</i>	13	
Cipriani y Testolin	2004	<i>F. vesca</i>	20	
Graham <i>et al.</i>	2004	<i>R. idaeus</i>	66	8
Hadonou <i>et al.</i>	2004a	<i>F. vesca</i>	21	
Lewers <i>et al.</i>	2005	<i>F. x ananassa</i> (gen), <i>Fragaria ssp.</i> (ESTs)	28	25
Bassil <i>et al.</i>	2006	<i>F. x ananassa</i>		37
Cipriani <i>et al.</i>	2006	<i>F. vesca</i> (gen), <i>F. x ananassa</i> (ESTs)	45	23
Gil-Ariza <i>et al.</i>	2006	<i>F. x ananassa</i>		10
Keniry <i>et al.</i>	2006	<i>F. x ananassa</i>		14
Lopes <i>et al.</i>	2006	<i>Rubus hochstetterorum</i>	41	
Monfort <i>et al.</i>	2006	<i>F. vesca</i>	36	
Sargent <i>et al.</i>	2006	<i>Fragaria nubicola</i> (gen) y <i>F. x ananassa</i> (ESTs)	31	14
Shimomura y Hirashima	2006	<i>F. x ananassa</i>	4	
Zhang <i>et al.</i>	2006	<i>Rosa wichurana</i>	30	
Hibrand-Saint Oyantet <i>et al.</i>	2008	<i>R. wichuraiana</i> (gen, ESTs) y <i>R. hybrida</i> (ESTs)	14	26
Lewers <i>et al.</i>	2008	<i>Rubus L</i>		33
Rousseau-Gueutin <i>et al.</i>	2008	<i>F. x ananassa</i>	50	
Spigler <i>et al.</i>	2008	<i>F. vesca</i> , <i>F. x ananassa</i> y EST contigs de Rosáceas		331
Sargent <i>et al.</i>	2008	<i>F. x ananassa</i>	38	
Woodhead <i>et al.</i>	2008	<i>Rubus idaeus</i>		25
Castillo <i>et al.</i>	2010	<i>Rubus idaeus</i> y <i>Rubus hybrid</i>	12	1
Park <i>et al.</i>	2010	<i>Rosa hybrida</i>		287
Zorrilla-Fontanesi <i>et al.</i>	2011	<i>F. x ananassa</i> y <i>F. vesca</i>	2	120
Dobeš y Scheffknecht	2012	<i>Potentilla pusilla</i>	74	
Chambers <i>et al.</i>	2013	<i>F. vesca</i>	8	

4.3.2. Aplicaciones en estudios de variabilidad

El primer estudio de variabilidad en esta subfamilia fue realizado por Hadonou *et al.* (2004a) en la fresa silvestre (*F. vesca*) (Tabla 8). Los trabajos en este ámbito se concentran en el género *Fragaria* y son escasos en otras especies de la subfamilia como en rosa o en frambuesa.

Tabla 8: Estudios de variabilidad en la subfamilia *Rosoideae* usando microsatélites

Publicación	Año	Especies estudiadas	Especies orígenes de los microsatélites	Número de los microsatélites	Número de genotipos estudiados
Hadonou <i>et al.</i>	2004a	<i>Fragaria vesca</i>	<i>Fragaria vesca</i>	26	15
Govan <i>et al.</i>	2008	<i>F. x ananassa</i> , <i>F. Chilensis</i> , <i>F. virginiana</i>	<i>Fragaria ssp.</i>	10	60
Lopes <i>et al.</i>	2008	<i>Rubus hochstetterorum</i>	<i>Rubus hochstetterorum</i>	15	30
Gil-Ariza <i>et al.</i>	2009	<i>F. x ananassa</i>	<i>F. x ananassa</i>	10	92
Brunings <i>et al.</i>	2010	<i>F. x ananassa</i>	<i>Fragaria ssp.</i>	9	26
Park <i>et al.</i>	2010	<i>Rosa hybrida</i>	<i>Rosa hybrida</i>	20	47
Castillo <i>et al.</i>	2010	<i>Rubus idaeus</i> , <i>Rubus hybrid</i>	<i>Rubus idaeus</i> , <i>Rubus hybrid</i>	13	48, 48
Horvath <i>et al.</i>	2011	<i>F. x ananassa</i>	<i>F. vesca</i> y <i>F. x ananassa</i>	23	87
Njuguna <i>et al.</i>	2011	<i>F. nipponica</i> , <i>F. iinumae</i>	<i>F. vesca</i> y <i>F. x ananassa</i>	20	137
Dossett <i>et al.</i>	2012	<i>Rubus occidentalis</i>	<i>Rubus ssp.</i>	21	148
Min-Young <i>et al.</i>	2012	<i>F. x ananassa</i>	<i>F. nubicola</i> y <i>F. x ananassa</i>	18	59
Farooq <i>et al.</i>	2013	<i>Rosa ssp.</i>	<i>R. hybrida</i> , <i>R. wichuraiana</i>	10	36
Isobe <i>et al.</i>	2013	<i>F x ananassa</i>	<i>F. vesca</i> y <i>F. x ananassa</i>	45	129
Chambers <i>et al.</i>	2013	<i>Fragaria ssp.</i>	<i>F. vesca</i>	8	219

4.3.3. Construcción de mapas genéticos y otras aplicaciones a la genética y mejora

En la subfamilia de las Rosoideas se construyeron diferentes mapas para sus tres géneros más importantes *Fragaria*, *Rosa* y *Rubus* incluyendo marcadores de tipo microsatélite (ver Tabla 9).

El primer mapa incluyendo microsatélites de la subfamilia *Rosoideae* fue el desarrollado en una población F2 de *Rosa hybrida* procedente de un cruzamiento entre la línea anfidiplóide 86-7 y la línea tetraplóide 82-1134 por Rajapakse *et al.* (2001). El mapa consistía básicamente en AFLPs, pero contenía dos microsatélites de melocotonero, pchgms2 y pchgms3, después de haber probado 21 (13 de melocotonero, 5 de manzano y 3 de guindo). El mapa de 86-7 está constituido por 171 marcadores formando 15 grupos de ligamiento y cubriendo más de 902 cM de distancia genética. El mapa de 82-1134 está construido con 167 marcadores que forman 14 grupos de ligamiento y abarcando más de 682 cM del genoma. Zhang *et al.* (2006) presentaron una nueva versión de este mismo mapa incluyendo especialmente nuevos microsatélites derivados de *Rosa wichurana*. El nuevo mapa de 86-7 engloba 286 marcadores, de los cuales 24 loci son microsatélites, formando 20 grupos de ligamiento y sumando una distancia genética 920 cM. El mapa del parental masculino 82-1134 incluye 256 marcadores, de los cuales 17 son microsatélites, repartidos en 14 grupos de ligamiento y cubriendo una distancia genética de 770cM.

Sargent *et al.* (2004a), presentaron un mapa de *Fragaria* diploide, de una población F2 derivada de un cruce interespecífico entre *Fragaria vesca* f. *semperflorens* cultivar FDP815 y *F. nubicola* cultivar 'FDP601'. En esta primera versión, el mapa estaba constituido esencialmente por microsatélites (68 de una total de 78 marcadores) que se distribuyeron en los siete grupos de ligamiento esperados y cubriendo una distancia genética de 448 cM. Este mapa se convirtió en de referencia de *Fragaria* y en su última versión contenía un total de 296 marcadores, de los cuales 270 son microsatélites y cubriendo 578 cM del genoma (Sargent *et al.*, 2008). Para confirmar la

validez de este mapa como referencia del género *Fragaria*, se comparó con el mapa de *F. vesca* de la población F1 del cruce '91.333.2' x 'Snovit' construido por Cipriani *et al.* (2006) con el que guardaba una colinearidad completa (Sargent *et al.*, 2008).

Recientemente, Isobe *et al.* (2013) presentaron un mapa intergrado de *F x ananassa*, construido exclusivamente por marcadores microsatélites, usando 3 poblaciones de mapeo. Los 1.856 SSRs se repartieron en los 28 grupos de ligamiento esperados y cubrieron 2.364,1 cM de distancia genética.

Tabla 9: Mapas genéticos en la bibliografía de la subfamilia *Rosoideae* usando microsatélites

Publicación	Año	Mapa
Rajapakse <i>et al.</i>	2001	F2 Rosa hybrida (86-7 x 'Basye's Blueberry' 82-1134)
Graham <i>et al.</i>	2004	F1 <i>Rubus idaeus</i> ('Glen Moy' x 'Latham')
Hadonou <i>et al.</i>	2004b	F2 <i>F. vesca</i> ('Yellow Wonder' x 'Pawtuckaway')
Sargent <i>et al.</i>	2004a	F2 <i>F. vesca f. semperflorens</i> FDP815 x <i>F. nubicola</i> * FDP601
Cipriani <i>et al.</i>	2006	F1 <i>F. vesca</i> (91.333.2 x 'Snovit')
Davis <i>et al.</i>	2006	F1 <i>F. vesca</i> ('Baron Solemacher' x WC6)
Nier <i>et al.</i>	2006	BC1 <i>F. vesca</i> x (<i>F. vesca</i> x <i>F. virginiana</i>)
Sargent <i>et al.</i>	2006	F2 <i>F. vesca</i> 815 x <i>F. nubicola</i> 601
Zhang <i>et al.</i>	2006	F2 Rosa hybrida (86-7 x 'Basye's Blueberry' 82-1134)
Hibrand-Saint Oyant <i>et al.</i>	2008	F1 'H190' x <i>R. wichuraiana</i>
Rousseau-Gueutin <i>et al.</i>	2008	F1 <i>F. x ananassa</i> ('Capitola' x 'CF1116'), F2 <i>F. v. x F. n.</i>
Spigler <i>et al.</i>	2008	F1 <i>F. virginiana</i> (Y33b2 x O477)
Sargent <i>et al.</i>	2008	F2 <i>F. vesca</i> 815 x <i>F. nubicola</i> 601
Woodhead <i>et al.</i>	2008	F1 <i>Rubus idaeus</i> ('Glen Moy' x 'Latham')
Sargent <i>et al.</i>	2009	F1 <i>F. x ananassa</i> ('Redgauntlet' x 'Hapil')
Gar <i>et al.</i>	2011	F1 Rosa hybrida ('Golden Gate' x 'Fragrant Cloud')
Zorrilla-Fontanesi <i>et al.</i>	2011	F2 <i>F. vesca</i> 815 x <i>F. bucharica</i> 601
Bushakra <i>et al.</i>	2012	F1 <i>Rubus occidentalis</i> '96395S1' x <i>Rubus idaeus</i> 'Latham'
Ward <i>et al.</i>	2013	F1 <i>Rubus idaeus</i> 'Heritage' x 'Tulameen'

*F. nubicola** ha sido reclasificada recientemente como *F. bucharica*

Los microsatélites de las *Rosoideas* fueron igualmente utilizados en estudios de identificación varietal (Shimomura y Hirashima, 2006; Govan *et al.*, 2008), comparación de mapas (Nier *et al.*, 2006; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008; Sargent *et al.*, 2008; Sargent *et al.*, 2009b; Spigler *et al.*, 2010; Gar *et al.*, 2011; Bushakra *et al.*, 2012; Isobe *et al.*, 2013) y en estudios de estructura poblacional (Horvath *et al.*, 2011; Njuguna *et al.*, 2011).

5. Transferencia de microsatélites en las Rosáceas

Gracias a la conservación de sus regiones flanqueantes en especies próximas, los microsatélites desde su descubrimiento fueron objeto de ensayos de transferibilidad. A continuación resumimos la información existente sobre la transferencia de los microsatélites a diferentes niveles de proximidad en las Rosáceas: entre diferentes especies del mismo género, primero *Prunus* (Tabla 10) y luego especies del mismo género en las subfamilias *Maloideae* y *Prunoideae* (Tabla 11), y finalmente entre especies pertenecientes a diferentes subfamilias (Tabla 12).

La transferibilidad de los microsatélites en diferentes especies de *Prunus* es generalmente alta (Cipriani *et al.*, 1999, Dirlwanger *et al.*, 2002), de modo que los microsatélites desarrollados fueron testados y frecuentemente polimórficos en cualquier especie de este género. Esto resultó en una gran ventaja en la construcción de mapas genéticos, ya que generó un amplio juego de marcadores, la mayoría mapeados en el mapa de referencia, que podían ser elegidos para la construcción de nuevos mapas o para la saturación de regiones específicas que contenían genes o QTLs de interés (Dirlwanger *et al.*, 2004a; Arús *et al.*, 2005; Dondini *et al.*, 2007; Olmstead *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2009). Puede verse también que los datos más bajos de transferibilidad ocurren entre las especies del subgénero *Cerassus* y las de los otros dos subgéneros, lo que confirma su ya conocida lejanía genética, tal como sugiere el hecho de que son subgéneros en los que es muy difícil obtener híbridos interespecíficos (Watkins, 1976).

En el primer trabajo de desarrollo de microsatélites en melocotonero, Cipriani *et al.* (1999) estudiaron la amplificación de 17 microsatélites en siete especies de *Prunus*, confirmando la alta transferibilidad de estos marcadores dentro del mismo género. Tanto en este trabajo como en muchos de los posteriores que abordaban la transferibilidad, los autores se limitaban a comprobar si se producía amplificación de los microsatélites en diferentes especies de *Prunus* (Sosinski *et al.*, 2000; Dirlwanger *et al.*, 2002; Struss *et*

al., 2003; Messina *et al.*, 2004a; 2004b; Mnejja *et al.*, 2004; 2005; Nishitani *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012) sin considerar su polimorfismo, es decir, sin informar de la utilidad de los microsatélites estudiados en cada una de las especies. Además de los trabajos que aprovecharon la transferibilidad de los microsatélites para usarlos en diversas especies, también hay en la bibliografía algunos ensayos específicos de transferibilidad que consideran tanto la amplificación como el polimorfismo de los SSRs en diferentes especies del mismo género *Prunus* (Decroocq *et al.*, 2003; Martínez-Gómez *et al.*, 2003a; Wünsch, 2009) (Tabla 10).

En la Tabla 11, se enumeran los diferentes trabajos que abordaban la transferencia de los microsatélites entre especies del mismo género de las dos subfamilias *Maloideae* (*Malus*, *Pyrus* y *Sorbus*) y *Rosoideae* (*Fragaria*, *Geum*, *Rubus* y *Rosa*). Los resultados de estos estudios ponen de manifiesto un elevado nivel de transferencia, tal como ocurre entre especies del género *Prunus*.

La situación es diferente cuando se considera la transferibilidad de SSRs entre diferentes géneros dentro de la misma subfamilia (Tabla 12), donde el porcentaje de éxito es claramente inferior y frecuentemente nulo, con la excepción de varios géneros de la subfamilia *Maloideae*, lo que indicaría que la proximidad genética entre los géneros de esta subfamilia es mayor que en las demás.

Tabla 10: Transferencia de los microsatélites en *Prunus*

Publicación	Año	Especie origen	Especie objetivo	Nº total	Microsatélites	
					Amp ¹ (%)	Pol ² (%)
Cipriani <i>et al.</i>	1999	<i>P. persica</i>	<i>P. dulcis</i>	17	82,4	n.d.
		<i>P. persica</i>	<i>P. armeniaca</i>	17	76,5	n.d.
		<i>P. persica</i>	<i>P. salicina</i>	17	76,5	n.d.
		<i>P. persica</i>	<i>P. domestica</i>	17	82,4	n.d.
		<i>P. persica</i>	<i>P. avium</i>	17	76,5	n.d.
		<i>P. persica</i>	<i>P. cerasus</i>	17	70,6	n.d.
Downey y lezzoni	2000	<i>P. persica, P. avium, P. cerasus</i>	<i>P. serotina</i>	8	50,0	50,0
Sosinski <i>et al.</i>	2000	<i>P. persica</i>	<i>P. armeniaca</i>	7	100,0	n.d.
		<i>P. persica</i>	<i>P. cerasus</i>	7	57,1	n.d.
Cantini <i>et al.</i>	2001	<i>P. persica, P. avium, P. cerasus</i>	<i>P. cerasus</i>	10	100,0	100,0
Dirlwanger <i>et al.</i>	2002	<i>P. persica</i>	<i>P. avium</i>	41	80,5	43,2
Hormaza	2002	<i>P. persica, P. avium, P. cerasus</i>	<i>P. armeniaca</i>	37	83,8	54,1
Wang <i>et al.</i>	2002	<i>P. persica</i>	<i>P. armeniaca</i>	17	58,8	47,1
		<i>P. persica</i>	<i>Prunus ssp.</i>	17	58,8	52,9
Wünsch y Hormaza	2002	<i>P. persica</i>	<i>P. avium</i>	34	70,6	41,2
Clarke y Tobbut	2003	<i>P. avium</i>	<i>P. persica</i>	21	57,1	33,3
Decroocq <i>et al.</i>	2003	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. domestica</i>	10	100,0	90,0
		<i>P. armeniaca</i>	<i>P. persica</i>	10	100,0	40,0
		<i>P. armeniaca</i>	<i>P. avium</i>	10	70,0	50,0
		<i>P. armeniaca</i>	<i>P. cerasus</i>	10	90,0	70,0
Martínez-Gómez <i>et al.</i>	2003 ^a	<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (3)	<i>P. persica</i>	19	94,7	89,5
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (3)	<i>P. dulcis</i>	19	78,9	78,9

Tabla 10 (continuación)

Publicación	Año	Especie origen	Especie objetivo	Nº total	Microsatélites	
					Amp ¹ (%)	Pol ² (%)
Martínez-Gómez <i>et al.</i>	2003b	<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. argentea</i>	18	72,2	33,3
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. bucharica</i>	18	66,7	44,4
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. davidiana</i>	18	88,9	33,3
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. dulcis</i>	18	83,3	83,3
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. glandulosa</i>	18	33,3	22,2
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. kuramica</i>	18	72,2	33,3
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. mira</i>	18	83,3	44,4
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. pedunculata</i>	18	61,1	22,2
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. persica</i>	18	100,0	94,4
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. petunikowii</i>	18	38,4	16,7
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. scoparia</i>	18	55,6	11,1
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. tangutica</i>	18	55,6	22,2
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. webbii</i>	18	83,3	50,0
		Romero <i>et al.</i>	2003	<i>P. persica</i>	<i>P. armeniaca</i>	16
Struss <i>et al.</i>	2003	<i>P. avium</i>	<i>P. salicina</i>	15	86,7	n.d.
		<i>P. avium</i>	<i>P. persica</i>	15	80,0	n.d.
		<i>P. avium</i>	<i>P. armeniaca</i>	15	100,0	n.d.
Zhebentyayeva <i>et al.</i>	2003	<i>P. persica</i>	<i>P. armeniaca</i>	30	60,0	40,0
Ahmad <i>et al.</i>	2004	<i>P. avium</i>	<i>P. salicina, pluot</i>	25	80,0	76,0
		<i>P. persica</i>	<i>P. salicina, pluot</i>	3	100,0	100,0
		<i>P. avium</i>	<i>P. armeniaca</i>	25	92,0	92,0
		<i>P. persica</i>	<i>P. armeniaca</i>	3	100,0	100,0
Decroocq <i>et al.</i>	2004	<i>P. armeniaca</i>	<i>P. domestica</i>	10	100,0	100,0
Foulongne <i>et al.</i>	2004	<i>P. persica</i>	<i>Prunus ssp.</i>	28	n.d.	n.d.
Gao <i>et al.</i>	2004	<i>Prunus ssp.</i>	<i>P. mume</i>	14	n.d.	
Messina <i>et al.</i>	2004a	<i>P. armeniaca</i>	<i>Prunus ssp.</i>	20	n.d.	n.d.
Messina <i>et al.</i>	2004b	<i>P. armeniaca</i> y <i>P. dulcis</i>	<i>Prunus ssp.</i>	20, 20	n.d.	n.d.
Mnejja <i>et al.</i>	2004	<i>P. salicina</i>	<i>P. dulcis</i>	27	77,8	n.d.
		<i>P. salicina</i>	<i>P. persica</i>	27	85,2	n.d.
Testolin <i>et al.</i>	2004	<i>P. dulcis</i>	<i>Prunus ssp.</i>	20	30,0 ³	n.d.

Tabla 10 (continuación)

Publicación	Año	Especie origen	Especie objetivo	Nº total	Microsatélites	
					Amp ¹ (%)	Pol ² (%)
Mnejja <i>et al.</i>	2005	<i>P. dulcis</i>	<i>P. persica</i>	25	100,0	n.d.
		<i>P. dulcis</i>	<i>P. avium</i>	25	88,0	n.d.
		<i>P. dulcis</i>	<i>P. salicina</i>	25	84,0	n.d.
		<i>P. dulcis</i>	<i>P. armeniaca</i>	25	84,0	n.d.
Ohta <i>et al.</i>	2005	<i>P. persica</i>	<i>Prunus ssp. subgénero cerasus</i>	71	69,0	26,7 ³
		<i>P. avium</i>	<i>Prunus ssp. subgénero cerasus</i>	12	75,0	41,7 ³
		<i>P. cerasus</i>	<i>Prunus ssp. subgénero cerasus</i>	2	100,0	50,0 ³
Sánchez-Pérez <i>et al.</i>	2005a	<i>P. persica</i>	<i>P. armeniaca</i>	17	100,0	82,4
Sánchez-Pérez <i>et al.</i>	2005b	<i>P. persica</i>	<i>P. dulcis</i>	6	100,0	100,0
Krichen <i>et al.</i>	2006	<i>P. salicina, P. dulcis, P. persica</i>	<i>P. armeniaca</i>	26	n.d.	n.d.
Romero <i>et al.</i>	2006	<i>P. persica</i>	<i>P. armeniaca</i>	12	100,0	100,0
He <i>et al.</i>	2007	<i>P. persica, P. avium y Malus x domestica</i>	<i>P. armeniaca</i>	96	n.d.	41,7
Nishitani <i>et al.</i>	2007	<i>P. persica</i>	<i>P. salicina</i>	62	95,2	n.d.
		<i>P. persica</i>	<i>P. armeniaca</i>	62	95,2	n.d.
		<i>P. persica</i>	<i>P. avium</i>	62	93,6	n.d.
Hayashi <i>et al.</i>	2008	<i>P. persica</i>	<i>P. mume</i>	37	67,6	n.d.
		<i>P. armeniaca</i>	<i>P. mume</i>	21	66,7	n.d.
Zhang <i>et al.</i>	2008	<i>P. persica, P. avium, P. cerasus, P. armeniaca</i>	<i>P. tomentosa, P. humilis, P. japonica y P. glandulosa</i>	110	n.d.	40,0
Pairon <i>et al.</i>	2008	<i>P. persica, P. avium, P. cerasus</i>	<i>P. serotina</i>	67	38,8	26,9
Tsuda <i>et al.</i>	2009	subfamilia Prunoideae	6 especies de cerezo ornamentales	96	65,6	13,5
Wünsch	2009	<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. persica</i>	18	72,2 ³	61,1
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. dulcis</i>	18	72,2 ³	66,7
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. armeniaca</i>	18	72,2 ³	55,6
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. domestica</i>	18	72,2 ³	72,2
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. insititia</i>	18	72,2 ³	72,2
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. salicina</i>	18	72,2 ³	61,1
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. cerasifera</i>	18	72,2 ³	61,1
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. avium</i>	18	72,2 ³	66,7
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. cerasus</i>	18	72,2 ³	55,6
		<i>P. persica</i> (16), <i>P. avium</i> (2)	<i>P. mahaleb</i>	18	72,2 ³	50,0

Tabla 10 (continuación)

Publicación	Año	Especie origen	Especie objetivo	Nº total	Microsatélites	
					Amp ¹ (%)	Pol ² (%)
Wang <i>et al.</i>	2012	<i>P. virginiana</i>	<i>P. cerasus</i>	246	65,4	53,0
		<i>P. virginiana</i>	<i>P. serotina</i>	246	63,0	n.d.
		<i>P. virginiana</i>	<i>P. avium</i>	246	62,4	13,9
		<i>P. virginiana</i>	<i>P. persica</i>	246	61,8	n.d.
		<i>P. virginiana</i>	<i>P. nigra x P. salicina</i>	246	57,7	n.d.
		<i>P. virginiana</i>	<i>P. armeniaca</i>	246	56,5	n.d.
		<i>Prunus ssp.</i> (n.d.)	<i>P. virginiana</i>	108	86,1	67,6

¹ porcentaje de microsatélites que presentaron amplificación

² porcentaje de microsatélites que presentaron polimorfismo

³:porcentaje de microsatélites que amplifican o que son polimórficos en todas las especies ensayadas

n.d.: no determinado

Tabla 11: Transferencia de los microsatélites en los géneros de las subfamilias *Maloideas* y *Rosoideas*

Publicación	Año	Especie origen	Especie objetivo	Nº total	Microsatélites Amp ¹ (%)	Pol ² (%)
Subfamilia <i>Maloideae</i>						
Hokanson <i>et al.</i>	1997	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus ssp.</i>	5	100,0	100,0
Benson <i>et al.</i>	2001	<i>Malus x domestica</i>	<i>Malus hupehensis</i>	n.d.	n.d.	n.d.
Oddou-Muratorio <i>et al.</i>	2001	<i>Sorbus torminalis</i>	<i>Sorbus ssp.</i>	9	n.d.	n.d.
Kimura <i>et al.</i>	2002	<i>Pyrus pyrifolia</i> , <i>Pyrus communis</i>	<i>Pyrus ssp.</i>	9	100,0	100,0
Yamamoto <i>et al.</i>	2002	<i>Pyrus communis</i> y <i>pyrifolia</i>	<i>Pyrus ssp.</i>	9	100,0	88,9
Fernandez-fernandez <i>et al.</i>	2006	<i>Pyrus communis</i>	<i>Pyrus ssp.</i>	19	100,0	100,0
Subfamilia <i>Rosoideae</i>						
Amsellem <i>et al.</i>	2001	<i>Rubus alceifolius</i>	<i>Rubus ssp.</i>	4	100,0	100,0
Graham <i>et al.</i>	2002	<i>Rubus idaeus</i>	<i>Rubus ssp.</i>	10	100,0	n.d.
Ashley <i>et al.</i>	2003	<i>F. virginiana</i> , <i>F x ananassa</i>	<i>F. x ananassa</i> , <i>F. chiloensis</i> , <i>F. virginiana</i>	8	100,0	100,0
Sargent <i>et al.</i>	2003	<i>F. viridis</i>	<i>F. vesca</i>	22	68,2	68,2
Arens <i>et al.</i>	2004	<i>Geum urbanum</i>	<i>Geum ssp.</i>	13	n.d.	n.d.
Cipriani y Testolin	2004	<i>F. vesca</i>	<i>F x ananassa</i>	20	95,0	n.d.
		<i>F. vesca</i>	<i>F. chiloensis</i>	20	80,0	n.d.
Hadonou <i>et al.</i>	2004	<i>F. vesca</i>	<i>F. x ananassa</i>	31	100,0	n.d.
		<i>F. vesca</i>	7 <i>Fragaria</i> diploide <i>ssp.</i>	31	67,7 ³	n.d.
Sargent <i>et al.</i>	2004b	<i>F. vesca</i>	8 <i>Fragaria</i> diploide <i>ssp.</i>	28	n.d.	n.d.
Lewers <i>et al.</i>	2005	<i>Rubus alceifolius</i>	<i>Rubus hybrid</i>	8	25,0	12,5
		<i>Rubus alceifolius</i>	<i>Rubus idaeus</i> y <i>R. occidentalis</i>	8	25,0	25,0
Bassil <i>et al.</i>	2006	<i>F. x ananassa</i>	<i>F. vesca</i>	37	89,2	n.d.
		<i>F. x ananassa</i>	<i>F. chiloensis</i> , <i>F. virginiana</i>	37	100,0	n.d.
Cipriani <i>et al.</i>	2006	<i>F. vesca</i>	16 <i>Fragaria ssp.</i>	20	70,0 ⁴	n.d.

Tabla 11 (continuación)

Publicación	Año	Especie origen	Especie objetivo	Nº total	Microsatélites	
					Amp ¹ (%)	Pol ² (%)
Davis <i>et al.</i>	2006	<i>F. x ananassa</i>	<i>F. vesca</i>	16	98,4	n.d.
		<i>F. x ananassa</i>	<i>F. iinumae</i>	16	93,8	n.d.
		<i>F. x ananassa</i>	<i>F. nubicola</i>	16	93,8	n.d.
		<i>F. x ananassa</i>	<i>F. mandshurica</i>	16	87,5	n.d.
		<i>F. x ananassa</i>	<i>F. nilgerrensis</i>	16	75,0	n.d.
		<i>F. x ananassa</i>	<i>F. viridis</i>	16	73,4	n.d.
Gil-Ariza <i>et al.</i>	2006	<i>F. x ananassa</i>	8 <i>Fragaria ssp.</i>	10	100,0	n.d.
Monfort <i>et al.</i>	2006	<i>F. vesca</i>	<i>Fragaria</i> diploide <i>ssp.</i>	36	81,0 ⁴	n.d.
		<i>F. vesca</i>	<i>F x ananassa</i>	36	94,0	n.d.
Sargent <i>et al.</i>	2006	<i>F. nubicola</i> y <i>F. x ananassa</i>	<i>F x ananassa</i>	45	100,0	100,0
Zhang <i>et al.</i>	2006	<i>Rosa wichurana</i>	<i>Rosa hybrida</i>	43	69,8	n.d.
Rousseau-Geuttin <i>et al.</i>	2008	<i>F. Vesca</i>	<i>F x ananassa</i> (mapa 'Capitola' x 'CF1116')	41	n.d.	70,7
		<i>F. Viridis</i>	<i>F x ananassa</i> (mapa 'Capitola' x 'CF1116')	31	n.d.	41,9
		<i>F. nubicola</i>	<i>F x ananassa</i> (mapa 'Capitola' x 'CF1116')	2	n.d.	100,0
		<i>F. virginiana</i>	<i>F x ananassa</i> (mapa 'Capitola' x 'CF1116')	2	n.d.	100,0
Woodhead <i>et al.</i>	2008	<i>Rubus idaeus</i>	<i>R. idaeus</i> x <i>R. fruticosus</i>	25	80,0	n.d.
		<i>Rubus idaeus</i>	<i>R. fruticosus</i>	25	72,0	n.d.
		<i>Rubus idaeus</i>	<i>R. geoides</i>	25	80,0	n.d.
		<i>Rubus idaeus</i>	<i>R. grabowski</i>	25	80,0	n.d.
		<i>Rubus idaeus</i>	<i>R. lacustre</i>	25	76,0	n.d.
		<i>Rubus idaeus</i>	<i>R. macraei</i>	25	64,0	n.d.
		<i>Rubus idaeus</i>	<i>R. mesogaeus</i>	25	76,0	n.d.
		<i>Rubus idaeus</i>	<i>R. coreanus</i>	25	28,0	n.d.
		<i>Rubus idaeus</i>	<i>R. strigosus</i>	25	100,0	n.d.

¹: porcentaje de microsatélites que presentaron amplificación

²: porcentaje de microsatélites que presentaron polimorfismo

³: microsatélites que amplifican en todas las especies ensayadas⁸

⁴: promedio del porcentaje de microsatélites que amplifican en las diferentes especies ensayadas

n.d.: no determinado

Tabla 12: Transferencia de los microsatélites entre especies de diferentes géneros de la familia Rosaceae

Publicación	Año	Especie origen	Especie objetivo	Microsatélites		
				Nº total	Amp ¹ (%)	Poi ² (%)
Transferibilidad de microsatélites entre especies de diferentes géneros de la misma subfamilia						
Oddou-Muratorio <i>et al.</i>	2001	<i>Sorbus torminalis</i>	<i>Malus ssp.</i>	6	44,0	n.d.
		<i>Sorbus torminalis</i>	<i>Pyrus ssp.</i>	6	61,0	n.d.
		<i>Sorbus torminalis</i>	<i>Mespilus germanicus</i>	6	16,0	n.d.
Yamamoto <i>et al.</i>	2001	<i>Malus x domestica</i>	<i>Pyrus ssp.</i>	7	100,0	100,0
Liebhart <i>et al.</i>	2002	<i>Malus x domestica</i>	<i>Maloideae</i>	15	100,0	n.d.
Yamamoto <i>et al.</i>	2002c	<i>Malus x domestica</i>	<i>Pyrus</i> (mapa 'Bartlett' x 'Houssui')	31	n.d.	45,2
Hemmat <i>et al.</i>	2003	<i>Malus x domestica</i>	<i>Pyrus communis</i>	41	81,0	n.d.
Pierantoni <i>et al.</i>	2004	<i>Malus x domestica</i>	<i>Pyrus communis</i> (mapas: PC x HS; AF x MRB)	112	n.d.	78,5; 79,4
Yamamoto <i>et al.</i>	2004a	<i>Malus x domestica</i> y <i>Pyrus communis</i> y <i>P. pyrifolia</i>	<i>Cydonia oblonga</i>	118	65,3	33,1
Lewers <i>et al.</i>	2005	<i>Fragaria</i> (SSRs genómicos)	<i>Rubus hybrid</i>	23	26,1	13,0
		<i>Fragaria</i> (SSRs genómicos)	<i>Rubus idaeus</i> y <i>R. occidentalis</i>	28	17,9	10,7
		<i>Fragaria</i> (SSRs derivados de ESTs)	<i>Rubus hybrid</i>	19	31,6	5,3
		<i>Fragaria</i> (SSRs derivados de ESTs)	<i>Rubus idaeus</i> y <i>R. occidentalis</i>	20	20,0	5,0
		<i>Fragaria vesca</i>	<i>Rubus hybrid</i>	8	12,5	0,0
		<i>Fragaria vesca</i>	<i>Rubus idaeus</i> y <i>R. occidentalis</i>	10	20,0	20,0
		<i>Fragaria virginiana</i>	<i>Rubus hybrid</i>	1	100,0	0,0
		<i>Fragaria virginiana</i>	<i>Rubus idaeus</i> y <i>R. occidentalis</i>	4	25,0	0,0
Soriano <i>et al.</i>	2005	<i>Malus x domestica</i>	<i>Eriobotrya japonica</i>	30	66,7	43,3
Fernandez-fernandez <i>et al.</i>	2006	<i>Pyrus communis</i>	<i>Malus ssp.</i>	19	73,7	47,4
Rousseau-Geuttin <i>et al.</i>	2008	<i>Rosa hybrida</i>	<i>F x ananassa</i> (mapa 'Capitola' x 'CF1116')	14	n.d.	14,3
Gasic <i>et al.</i>	2009	<i>Malus x domestica</i>	<i>Pyrus communis</i>	68	58,8	n.d.
Park <i>et al.</i>	2010	<i>Rosa hybrida</i>	<i>F. ananasa</i> , <i>F. vesca</i>	272	60,7	46,7
Yao <i>et al.</i>	2010	<i>Malus x domestica</i>	<i>Pyrus ssp.</i>	94	76,6	42,6
Zorrilla-Fontanesi <i>et al.</i>	2011	<i>F. x ananasa</i> y <i>F. vesca</i>	<i>Rosa</i>	174	27,0	17,2
		<i>F. x ananasa</i> y <i>F. vesca</i>	<i>Rubus idaeus</i>	174	19,1	9,8

Tabla 12 (continuación)

Publicación	Año	Especie origen	Especie objetivo	Microsatélites		
				Nº total	Amp ¹ (%)	Pol ² (%)
Transferibilidad de microsatélites entre especies de diferentes subfamilias						
Cipriani <i>et al.</i>	1999	<i>Prunus persica</i>	<i>Malus</i>	17	17,6	n.d.
Rajapakse <i>et al.</i>	2001	<i>Malus x domestica</i> , <i>Prunus persica</i> , <i>P. cerasus</i>	<i>Rosa hybrida</i>	21	76,2	9,5
Liebhart <i>et al.</i>	2002	<i>Malus x domestica</i>	<i>Amygdaloideae</i>	15	6,7	n.d.
Yamamoto <i>et al.</i>	2002c	<i>Prunus persica</i>	<i>Pyrus</i> (mapa 'Bartlett' x 'Houssui')	60	n.d.	10,0
		<i>Prunus avium</i>	<i>Pyrus</i> (mapa 'Bartlett' x 'Houssui')	6	n.d.	16,7
Testolin <i>et al.</i>	2004	<i>Prunus dulcis</i>	<i>Malus x domestica</i>	20	10,0	n.d.
Lewers <i>et al.</i>	2005	<i>P. persica</i> , <i>Malus x domestica</i> , <i>Pyrus communis</i>	<i>Fragaria ssp.</i> y <i>Rubus ssp.</i>	6	0,00	-
Cipriani <i>et al.</i>	2006	<i>Fragaria vesca</i>	<i>Prunus ssp.</i> y <i>Malus</i>	20	n.d.	n.d.
Nishitani <i>et al.</i>	2007	<i>Prunus persica</i>	<i>Malus x domestica</i>	62	40,3	n.d.
		<i>Prunus persica</i>	<i>Pyrus ssp.</i>	62	45,2	n.d.
		<i>Prunus persica</i>	<i>Fragaria x ananassa</i>	62	40,3	n.d.
		<i>Prunus persica</i>	<i>Rosa hybrida</i>	62	51,6	n.d.
Rousseau-Geuttin <i>et al.</i>	2008	<i>Prunus persica</i>	<i>F x ananassa</i> (mapa 'Capitola' x 'CF1116')	3	n.d.	33,3
Gasic <i>et al.</i>	2009	<i>Malus x domestica</i>	<i>Rosa hybrida</i>	68	29,4	n.d.
		<i>Malus x domestica</i>	<i>Fragaria vesca</i> , <i>F. moschata</i> , <i>F. virginiana</i> , <i>F. nipponica</i> , <i>F. pentaphylla</i>	68	48,5	n.d.
		<i>Malus x domestica</i>	<i>Prunus armeniaca</i>	68	25,0	n.d.
		<i>Malus x domestica</i>	<i>Prunus domestica</i>	68	29,4	n.d.
		<i>Malus x domestica</i>	<i>Prunus salicina</i>	68	35,3	n.d.
		<i>Malus x domestica</i>	<i>Prunus dulcis</i>	68	36,8	n.d.
		<i>Malus x domestica</i>	<i>Prunus persica</i>	68	38,2	n.d.
		<i>Malus x domestica</i>	<i>Prunus cerasus</i>	30	30	n.d.
Wang <i>et al.</i>	2012	<i>Prunus virginiana</i>	<i>Malus x domestica</i>	212	63,7	n.d.
		<i>Prunus virginiana</i>	<i>Malus x 'Dolgo'</i>	212	60,8	n.d.
		<i>Prunus virginiana</i>	<i>Amelanchier alnifolia</i>	212	54,7	n.d.
		<i>Prunus virginiana</i>	<i>Rubus idaeus</i>	212	51,9	n.d.
		<i>Prunus virginiana</i>	<i>Pyrus communis</i>	212	31,6	n.d.

¹: porcentaje de microsatélites que presentaron amplificación

²: porcentaje de microsatélites que presentaron polimorfismo

n.d.: no determinado

Referencias

- Adonina, I.G., Salina, E.A., Pestsova, E.G., and Roder, M.S., 2005. Transferability of wheat microsatellites to diploid *Aegilops* species and determination of chromosomal localizations of microsatellites in the S genome. *Genome* 48:959-970.
- Ahmad, R., Parfitt, D., Fass, J., Ogundiwin, E., Dhingra, A., Gradziel, T., Lin, D., Joshi, N., Martinez-Garcia, P., and Crisosto, C., 2011. Whole genome sequencing of peach (*Prunus persica* L.) for SNP identification and selection. *BMC Genomics* 12:569.
- Ahmad, R., Potter, D., and Southwick, S.M., 2004a. Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 79:164-169.
- Ahmad, R., Potter, D., and Southwick, S.M., 2004b. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129:204-210.
- Ahmed, M., Anjum, M.A., Khan, M.Q., Ahmed, M.J., and Pearce, S., 2010. Evaluation of genetic diversity in *Pyrus* germplasm native to Azad Jammu and Kashmir (Northern Pakistan) revealed by microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology* 9:8323-8333.
- Ai, C.X., Yu, X.M., Dahlenburg, A., Zhao, H.J., Zhao, Y., and Liu, Q.Z., 2008. Development and characterization of SSR markers in Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.). *European Journal of Horticultural Science* 73:104-110.
- Alves, R.M., Sebbenn, A.M., Artero, A.S., and Figueira, A., 2006. Microsatellite loci transferability from *Theobroma cacao* to *Theobroma grandiflorum*. *Molecular Ecology Notes* 6:1219-1221.
- Amsellem, L., Dutech, C., and Billotte, N., 2001. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae), an invasive weed in La Réunion island. *Molecular Ecology Notes* 1:33-35.
- Antonius, K., Aaltonen, M., Uosukainen, M., and Hurme, T., 2012. Genotypic and phenotypic diversity in Finnish cultivated sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:375-388.
- Aradhya, M.K., Weeks, C., and Simon, C.J., 2004. Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. *Scientia Horticulturae* 103:131-144.
- Aranzana, M.J., Abbassi, E.-K., Howad, W., and Arús, P., 2010. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. *BMC Genetics* 11:69.
- Aranzana, M.J., Carbo, J., and Arus, P., 2003b. Using amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) to identify peach cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128(5):672-677.
- Aranzana, M.J., Carbo, J., and Arus, P., 2003c. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. *Theor Appl Genet* 106:1341-1352.
- Aranzana, M.J., de Vicente, M.C., and Arús, P., 2001. Comparison of fruit and leaf DNA extracts for AFLP and SSR analysis in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Proceedings of the International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture*:297-300.
- Aranzana, M.J., Garcia-Mas, J., Carbó, J., and Arús, P., 2002. Development and variability of microsatellite markers in peach. *Plant Breed.* 121:87-92.
- Aranzana, M.J., Illa, E., Howad, W., and Arús, P., 2012. A first insight into peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SNP variability. *Tree Genetics & Genomes* 8:1359-1369.
- Aranzana, M.J., Pineda, A., Cosson, P., Dirlewanger, E., Ascasibar, J., Cipriani, G., Ryder, C.D., Testolin, R., Abbott, A., King, G.J., Iezzoni, A.F., and Arus, P., 2003a. A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theor Appl Genet* 106:819-825.
- Arens, P., Durka, W., Wernke-Lenting, J.H., and Smulders, M.J.M., 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Geum urbanum* (Rosaceae) and their transferability within the genus *Geum*. *Molecular Ecology Notes* 4:209-212.

- Arismendi, M.J., Hinrichsen, P., Almada, R., Pimentel, P., Pinto, M., and Sagredo, B., 2012. Characterization of Genetic Diversity of Stone Fruit Rootstocks Used in Chile by Means of Microsatellite Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 137:302-310.
- Arulsekar, S., Parfitt, D.E., and Kester, D.E., 1986. Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. *Journal of Heredity* 77:272-274.
- Arumuganathan, K. and Earle, E., 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:208-218.
- Arús, P., Olarte, C., Romero, M., and Vargas, F., 1994. Linkage analysis of 10 isozyme genes in F1 segregating almond progenies. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119:339-344.
- Arús, P., Yamamoto, T., Dirlwanger, E., and Abott, A.G., 2005. Synteny in the Rosaceae, p. 175-211. In: Janick, J. (ed.), *Plant Breeding Reviews*. John Wiley & Sons, Inc.
- Ashkenazi, V., Chani, E., Lavi, U., Levy, D., Hillel, J. and Veilleux, R.E., 2001. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome* 44:50-62.
- Ashley, M.V., Wilk, J.A., Styan, S.M.N., Craft, K.J., Jones, K.L., Feldheim, K.A., Lewers, K.S., and Ashman, T.L., 2003. High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (Rosaceae). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 107:1201-1207.
- Augusto, M., Lobos, S., Jadue, Y., Toro, M., Messina, R., Lladser, M., and Seelenfreund, D., 1999. DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*). *Plant Mol. Biol. Rep.* 17:255-326.
- Ba, Q., Zhao, Z., Gao, H., Wang, Y., Sun, B., Ba, Q.R., Zhao, Z.Y., Gao, H., Wang, Y.L., and Sun, B., 2011. Genetic relationship analysis of apple cultivars with SSR and SRAP markers. *Journal of Northwest A & F University - Natural Science Edition* 39:123-128.
- Bachtrog, D., Agis, M., Imhof, M., and Schlotterer, C., 2000. Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs-evidence from *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 17:1277-1285.
- Bachtrog, D., Weiss, S., Zangerl, B., Brem, G., and Schlotterer, C., 1999. Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. *Mol Biol Evol* 16:602-610.
- Badenes, L., Martínez-calvo, J., and L'acer, G., 1998. Analysis of peach germplasm from Spain. *Acta Hort.* (ISHS) 465:243-250.
- Bailey, A.D., Pavelitz, T., and Weiner, A.M., 1998. The microsatellite sequence (CT)_n x (GA)_n promotes stable chromosomal integration of large tandem arrays of functional human U2 small nuclear RNA genes. *Molecular and Cell Biology* 18:2226-2271.
- Baird, W.V., Estager, A.S., and Wells, J., 1994. Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:1312-1316.
- Barac, G., Ognjanov, V., Obreht, D., Ljubojevic, M., Bosnjakovic, D., Pejic, I., and Gasic, K., 2014. Genotypic and Phenotypic Diversity of Cherry Species Collected in Serbia. *Plant Molecular Biology Reporter* 32:92-108.
- Baranek, M., Raddova, J., and Pidra, M., 2006. Comparative analysis of genetic diversity in *Prunus L.* as revealed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 108:253-259.
- Bartolozzi, F., Warburton, M.L., Arulsekar, S., and Gradziel, T.M., 1998. Genetic Characterization and Relatedness among California Almond Cultivars and Breeding Lines Detected by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:381-387.
- Bassil, N. and Postman, J.D., 2010. Identification of European and Asian pears using EST-SSRs from *Pyrus*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57:357-370.
- Bassil, N.V., Gunn, M., Folta, K., and Lewers, K., 2006. Microsatellite markers for *Fragaria* from 'Strawberry Festival' expressed sequence tags. *Molecular Ecology Notes* 6:473-476.
- Bassil, N.V., Postman, J.D., and Neou, C., 2005. *Pyrus* microsatellite markers from GenBank sequences. *Acta Horticulturae* 671:289-292.
- Battistini, S. and Sansavini, S., 1991. Electrophoretic analysis of isozyme variability in apricot cultivars. *Journal of Genetics & Breeding* 45:117-121.

- Beck, N.R., Double, M.C., and Cockburn, A., 2003. Microsatellite evolution at two hypervariable loci revealed by extensive avian pedigrees. *Mol. Biol. Evol.* 20:54-61.
- Becker, J. and Heun, M., 1995. Barley microsatellites: Allele variation and mapping. *Plant Mol. Biol.* 27:835-845.
- Beckman, J.S. and Soller, M., 1983. Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement: methodologies, mapping and cost. *Theoretical and Applied Genetics* 67:33-43.
- Benson, L.L., Lamboy, W.F., and Zimmerman, R.H., 2001. Molecular Identification of *Malus hupehensis* (Tea Crabapple) Accessions Using Simple Sequence Repeats. *HortScience* 36:961-966.
- Bianchi, V.J., Sansavini, S., and Fachinello, J.C., 2004. Microsatellite markers for identification of *Prunus* spp. rootstocks. *Scientia Agricola* 61:303-306.
- Biet, E., Sun, J., and Dutreix, M., 1999. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. *Nucl. Acids Res.* 27:596-600.
- Bisognin, C., Seemueller, E., Citterio, S., Velasco, R., Grando, M.S., and Jarausch, W., 2009. Use of SSR markers to assess sexual vs. apomictic origin and ploidy level of breeding progeny derived from crosses of apple proliferation-resistant *Malus sieboldii* and its hybrids with *Malus x domestica* cultivars. *Plant Breeding* 128:507-513.
- Blenda, A., Verde, I., Georgi, L., Reighard, G., Forrest, S., Muñoz-Torres, M., Baird, W., and Abbott, A., 2007. Construction of a genetic linkage map and identification of molecular markers in peach rootstocks for response to peach tree short life syndrome. *Tree Genetics & Genomes* 3:341-350.
- Bliss, F.A., Arulsekhar, S., Foolad, M.R., Becerra, V., Gillen, A.M., Warburton, M.L., Dandekar, A.M., Kocsisne, G.M., and Mydin, K.K., 2002. An expanded genetic linkage map of *Prunus* based on an interspecific cross between almond and peach. *Genome* 45:520-529.
- Boccacci, P., Akkarak, A., Bassil, N.V., Mehlenbacher, S.A., and Botta, R., 2005. Characterization and evaluation of microsatellite loci in European hazelnut (*Corylus avellana* L.) and their transferability to other *Corylus* species. *Molecular Ecology Notes* 5:934-937.
- Boskovic, R. and Tobutt, K.R., 1998. Inheritance and linkage relationships of isoenzymes in two interspecific cherry progenies. *Euphytica* 103:273-286.
- Boskovic, R., Tobutt, K.R., Duval, H., Battle, I., Dicenta, F., and Vargas, F.J., 1999. A styler ribonuclease assay to detect self-compatible seedlings in almond progenies. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 99:800-810.
- Boskovic, R., Tobutt, K.R., and Russell, K., 1998. Selection of sweet cherry seedlings homozygous for self-compatibility, p. 249-253. In: Tobutt, K. R. and Alston, F. H. (eds.), *Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*. International Society Horticultural Science, Leuven 1.
- Botstein, D., R.L., W., Skolnick, M.H., and Davies, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Bouhadida, M., Casas, A.M., Gonzalo, M.J., Arús, P., Moreno, M.Á., and Gogorcena, Y., 2009. Molecular characterization and genetic diversity of *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulturae* 120:237-245.
- Bouhadida, M., Casas, A.M., Moreno, M.A., and Gogorcena, Y., 2007. Molecular characterization of Miraflores peach variety and relatives using SSRs. *Scientia Horticulturae* 111:140-145.
- Bourguiba, H., Audergon, J.-M., Krichen, L., Trifi-Farah, N., Mamouni, A., Trabelsi, S., and Khadari, B., 2012. Genetic diversity and differentiation of grafted and seed propagated apricot (*Prunus armeniaca* L.) in the Maghreb region. *Scientia Horticulturae* 142:7-13.
- Bravo, J.P., Hoshino, A.A., Angelici, C., Lopes, C.R., and Gimenes, M.A., 2006. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. *Genetics and Molecular Biology* 29:516-524.
- Brini, W., Mars, M., and Hormaza, J.I., 2008. Genetic diversity in local Tunisian pears (*Pyrus communis* L.) studied with SSR markers. *Scientia Horticulturae* 115:337-341.

- Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Hühne, J., and Rolf, B., 1998. Mutation Rate in Human Microsatellites: Influence of the Structure and Length of the Tandem Repeat. *The American Journal of Human Genetics* 62:1408-1415.
- Brohede, J., Primmer, C.R., Moller, A., and Ellegren, H., 2002. Heterogeneity in the rate and pattern of germline mutation at individual microsatellite loci. *Nucl. Acids Res.* 30:1997-2003.
- Browicz, K. and Zohary, D., 1996. The genus *Amygdalus* L. (Rosaceae): Species relationships, distribution and evolution under domestication. *Gen. Res. and Crop evolution* 43:229-247.
- Brunings, A.M., Moyer, C., Peres, N., and Folta, K.M., 2010. Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties. *Euphytica* 173:63-75.
- Bus, V., Chagné, D., Bassett, H., Bowatte, D., Calenge, F., Celton, J.M., Durel, C.E., Malone, M., Patocchi, A., Ranatunga, A., Rikkerink, E., Tustin, D., Zhou, J., and Gardiner, S., 2008. Genome mapping of three major resistance genes to woolly apple aphid (*Eriosoma lanigerum* Hausm.). *Tree Genetics & Genomes* 4:223-236.
- Bushakra, J.M., Stephens, M.J., Atmadjaja, A.N., Lewers, K.S., Symonds, V.V., Udall, J.A., Chagné, D., Buck, E.J., and Gardiner, S.E., 2012. Construction of black (*Rubus occidentalis*) and red (*R. idaeus*) raspberry linkage maps and their comparison to the genomes of strawberry, apple, and peach. *Theoretical and Applied Genetics* 125:311-327.
- Byrne, D.H., 1990. Isozyme variability in four diploid stone fruits compared with other woody perennial plants. *The Journal of Heredity* 81:68-71.
- Byrne, D.H. and Littleton, T.G., 1988. Electrophoretic characterization of diploid plums of the southeastern United States. *J Am Soc Hort Sci* 113:918-924.
- Byrne, D.H. and Littleton, T.G., 1989. Characterization of isozyme variability in apricots. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114:674-678.
- Cabrera, A., Kozik, A., Howad, W., Arus, P., Iezzoni, A., and Knaap, E., 2009. Development and bin mapping of a Rosaceae Conserved Ortholog Set (COS) of markers. *BMC Genomics* 10:562.
- Canli, F.A., 2004. Development of a second generation genetic map for sour cherry using SSR markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7:1676-1683.
- Cantini, C., Iezzoni, A.F., Lamboy, W.F., Boritzki, M., and Struss, D., 2001. DNA Fingerprinting of Tetraploid Cherry Germplasm Using Simple Sequence Repeats. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:205-209.
- Cao, K., Wang, L., Zhu, G., Fang, W., Chen, C., and Luo, J., 2012. Genetic diversity, linkage disequilibrium, and association mapping analyses of peach (*Prunus persica*) landraces in China. *Tree Genetics & Genomes* 8:975-990.
- Cao, Y., Tian, L., Gao, Y., Yang, J., and Zhang, S., 2011. Evaluation of genetic identity and variation in cultivars of *Pyrus pyrifolia* (Burm.f.) Nakai from China using microsatellite markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 86:331-336.
- Cardle, L., Ramsay, L., Milbourne, D., Macaulay, M., Marshall, D., and Waugh, R., 2000. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics* 156:847-854.
- Casas, A.M., Igartua, E., Balaguer, G., and Moreno, M.A., 1999. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. *Euphytica* 110:139-149.
- Castillo, N.R.F., Reed, B.M., Graham, J., Fernandez-Fernandez, F., and Bassil, N.V., 2010. Microsatellite Markers for Raspberry and Blackberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135:271-278.
- Celton, J.M., Tustin, D., Chagné, D., and Gardiner, S., 2009. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences. *Tree Genetics & Genomes* 5:93-107.
- Cerezo, M., Socias i Compani, R., and Arús, P., 1989. Identification of almond cultivars by pollen isoenzymes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114:164-169.
- Chagne, D., Chaumeil, P., Ramboer, A., Collada, C., Guevara, A., Cervera, M.T., Vendramin, G.G., Garcia, V., Frigerio, J.M., Echt, C., Richardson, T., and Plomion, C., 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theor Appl Genet* 109:1204-1214.

- Chakraborty, R., Kimmel, M., Stivers, D.N., Davison, L.J., and Deka, R., 1997. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1041-1046.
- Chambers, A., Carle, S., Njuguna, W., Chamala, S., Bassil, N., Whitaker, V., Barbazuk, W.B., and Folta, K., 2013. A genome-enabled, high-throughput, and multiplexed fingerprinting platform for strawberry (*Fragaria L.*). *Molecular Breeding* 31:615-629.
- Chaparro, J.X., Werner, D.J., O'Malley, D., and Sederoff, R.R., 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 87:805-815.
- Chen, X., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., and McCouch, S.R., 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa L.*). *Theoretical and applied genetics* 95:553-567
- Cheng, Z., 2007. Genetic characterization of different demes in *Prunus persica* revealed by RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 111:242-247.
- Cheng, Z.P. and Huang, H.W., 2009. SSR fingerprinting Chinese peach cultivars and landraces (*Prunus persica*) and analysis of their genetic relationships. *Scientia Horticulturae* 120:188-193.
- Cho, Y.G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S.R., Park, W.D., Ayres, N., and Cartinhour, S., 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa L.*). *Theor. Appl. Genet.* 100:713-722.
- Cipriani, G., Lot, G., Huang, W.G., Matarazzo, M.T., Peterlunger, E., and Testolin, R., 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica (L) Batsch*]: Isolation, characterisation and cross species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* 99:65-72.
- Cipriani, G., Pinosa, F., Bonoli, M., and Faedi, W., 2006. A new set of microsatellite markers for *Fragaria* species and their application in linkage analysis. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 81:668-675
- Cipriani, G. and Testolin, R., 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Fragaria*. *Molecular Ecology Notes* 4:366-368.
- Clarke, J.B., Sargent, D.J., Boskovic, R.I., Belaj, A., and Tobutt, K.R., 2009. A cherry map from the inter-specific cross *Prunus avium* 'Napoleon' x *P. nipponica* based on microsatellite, gene-specific and isoenzyme markers. *Tree Genetics & Genomes* 5:41-51.
- Clarke, J.B. and Tobutt, K.R., 2003. Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* 'Napoleon'. *Molecular Ecology Notes* 3:578-580.
- Coart, E., Vekemans, X., Smulders, M.J.M., Wagner, I., Van Huylenbroeck, J., Van Bockstaele, E., and Roldán-Ruiz, I., 2003. Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris (L.) Mill.*) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Molecular Ecology* 12:845-857.
- Čolić, S., Milatović, D., Nikolić, D., and Zec, G., 2010. Isoenzyme polymorphism of almond genotypes selected in the region of northern Serbia. *Horticultural Science* 37:56-61.
- Cordeiro, G.M., Casu, R., McIntyre, C.L., Manners, J.M., and Henry, R.J., 2001. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum spp.*) ESTs cross transferable to *erianthus* and *sorghum*. *Plant Science* 160:1115 - 1123.
- Crane, M.B. and Lawrence, W.J.C., 1956. *The genetics of garden plants*. 4th ed. MacMillan Company, London.
- Cummings, C.J. and Zoghbi, H.Y., 2000a. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Human Molecular Genetics* 9:909-916.
- Cummings, C.J. and Zoghbi, H.Y., 2000b. Trinucleotide repeats: Mechanisms and pathophysiology. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 1:281-328.
- Dangl, G.S., Yang, J., Golino, D.A., and Gradziel, T., 2009. A practical method for almond cultivar identification and parental analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica* 168:41-48.
- Davis, T.M., DiMeglio, L.M., Yang, R.H., Styan, S.M.N., and Lewers, K.S., 2006. Assessment of SSR marker transfer from the cultivated strawberry to diploid strawberry species: Functionality, linkage group assignment, and use in diversity analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131:506-512.
- De La Rosa, R., James, C.M., and Tobutt, K.R., 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea L.*) and their transferability to other genera in the *Oleaceae*. *Molecular Ecology Notes* 2:265-267.

- de Vicente, M.C., Truco, M.J., Egea, J., Burgos, L., and Arús, P., 1998. RFLP variability in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Breeding* 117:153-158.
- Decroocq, V., Fave, M.G., Hagen, L., Bordenave, L., and Decroocq, S., 2003. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theor Appl Genet* 106:912-922.
- Decroocq, V., Hagen, L.S., Fave, M.G., Eyquard, J.P., and Pierronnet, A., 2004. Microsatellite markers in the hexaploid *Prunus domestica* species and parentage lineage of three European plum cultivars using nuclear and chloroplast simple-sequence repeats. *Molecular Breeding* 13:135-142.
- Delplancke, M., Alvarez, N., Benoit, L., Espíndola, A., I Joly, H., Neuenschwander, S., and Arrigo, N., 2013. Evolutionary history of almond tree domestication in the Mediterranean basin. *Molecular Ecology* 22:1092-1104.
- Dettoni, M.T., Quarta, R., and Verde, I., 2001. A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers. *Genome* 44:783-790.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Boudehri, K., Renaud, C., Capdeville, G., Tauzin, Y., Laigret, F., and Moing, A., 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 & Genomes* 3:1-13.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Howad, W., Capdeville, G., Bosselut, N., Claverie, M., Voisin, R., Poizat, C., Lafargue, B., Baron, O., Laigret, F., Kleinhentz, M., Arus, P., and Esmenjaud, D., 2004b. Microsatellite genetic linkage maps of myrobalan plum and an almond-peach hybrid-location of root-knot nematode resistance genes. *Theor Appl Genet* 109:827-838.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, J., Poizat, C., Zanetto, A., Arus, P., and Laigret, F., 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor Appl Genet* 105:127-138.
- Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Garriga-Caldere, F., Cosson, P., Howad, W., and Arus, P., 2004a. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:9891-9896.
- Dirlewanger, E., Pascal, T., Zuger, C., and Kervella, J., 1996. Analysis of molecular markers associated with powdery mildew resistance genes in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) x *Prunus davidiana* hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 93:909-919.
- Dirlewanger, E., Pronier, V., Parvery, C., Rothan, C., Guye, A., and Monet, R., 1998. Genetic linkage map of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using morphological and molecular markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 97:888-895.
- Dobeš, C. and Scheffknecht, S., 2012. Isolation and characterization of microsatellite loci for the *Potentilla* core group (Rosaceae) using 454 sequencing. *Molecular Ecology Resources* 12:726-739.
- Dondini, L., Lain, O., Geuna, F., Banfi, R., Gaiotti, F., Tartarini, S., Bassi, D., and Testolin, R., 2007. Development of a new SSR-based linkage map in apricot and analysis of synteny with existing *Prunus* maps. *Tree Genetics & Genomes* 3:239-249.
- Dong, S., Liu, Y., Niu, J., Ning, Y., Lin, S., and Zhang, Z., 2014. De novo transcriptome analysis of the Siberian apricot (*Prunus sibirica* L.) and search for potential SSR markers by 454 pyrosequencing. *Gene* 544:220-227.
- Donoso, J.M., 2014. Genética de la introgression de fragmentos del almendro en el melocotonero: desarrollo de una estrategia de selección de líneas casi isogénicas (NILs) con marcadores moleculares. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Donoso, J.M., Aros, D., Meneses, C., Narvaez, C., and Infante, R., 2008. Genetic relationships in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using SSR markers and their implications for breeding. *Journal of Food Agriculture & Environment* 6:378-382.
- Dossett, M., Bassil, N., Lewers, K., and Finn, C., 2012. Genetic diversity in wild and cultivated black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) evaluated by simple sequence repeat markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:1849-1865.
- Downey, S.L. and Iezzoni, A.F., 2000. Polymorphic DNA Markers in Black Cherry (*Prunus serotina*) Are Identified Using Sequences from Sweet Cherry, Peach, and Sour Cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125:76-80.

- Durham, R.E., 1986. Isozyme banding patterns and inheritance studies in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch. University of Florida.
- Durham, R.E., Moore, G.A., and Sherman, W.B., 1987. Isozyme banding-patterns and their usefulness as genetic-markers in peach. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112:1013-1018.
- Duval, A. and Hamelin, R., 2002. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res.* 62:2447-2454.
- Eduardo, I., Chietera, G., Pirona, R., Pacheco, I., Troggio, M., Banchi, E., Bassi, D., Rossini, L., Vecchietti, A., and Pozzi, C., 2013. Genetic dissection of aroma volatile compounds from the essential oil of peach fruit: QTL analysis and identification of candidate genes using dense SNP maps. *Tree Genetics & Genomes* 9:189-204.
- Egea, L. and García, J.E., 1975. Lignes de recherche actuelle sur l'amandier au CEBAS, Murcie. Objectifs et recherches observations. 2nd Coll. GREMPA, CIHEAM. Montpellier, France.
- Eisen, J.A., 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability, p. 34-48. In: Goldstein, D. B. and Schlötterer, C. (eds.), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Ellegren, H., 2002. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation. *Trends in Genetics* 18:70-70.
- Ellegren, H., 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5:435-445.
- Ellegren, H., Lindgren, G., Primmer, C.R., and Moller, A.P., 1997. Fitness loss and germline mutations in barn swallows breeding in Chernobyl. *Nature* 389:593-596.
- Ellegren, H., Primmer, C.R., and Sheldon, B., 1995. Microsatellite evolution: directionality or bias in locus selection? *Nature Genetics* 11:60-62.
- Epplen, C., Melmer, G., Siedlaczek, I., Schwaiger, F.-W., Maüeler, W., and Epplen, J.T., 1993. On the essence of "meaningless" simple repetitive DNA in eukaryote genomes, p. 29-45. In: Pena, S. D. P., Chakraborty, R., Epplen, J. T., and Jeffreys, A. J. (eds.), *DNA fingerprinting: state of the science*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Erfani, J., Ebadi, A., Abdollahi, H., and Fatahi, R., 2012. Genetic Diversity of Some Pear Cultivars and Genotypes Using Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 30:1065-1072.
- Evans, K.M., Patocchi, A., Rezzonico, F., Mathis, F., Durel, C.E., Fernandez-Fernandez, F., Boudichevskaia, A., Dunemann, F., Stankiewicz-Kosyl, M., Gianfranceschi, L., Komjanc, M., Lateur, M., Madduri, M., Noordijk, Y., and van de Weg, W.E., 2011. Genotyping of pedigreed apple breeding material with a genome-covering set of SSRs: trueness-to-type of cultivars and their parentages. *Molecular Breeding* 28:535-547.
- Faber, P., Fisch, P., Waterhouse, M., Schmitt-Gräff, A., Bertz, H., Finke, J., and Spyridonidis, A., 2006. Frequent genomic alterations in epithelium measured by microsatellite instability following allogeneic hematopoietic cell transplantation in humans. *Blood* 107:3389-3396.
- Fang, J., Qiao, Y., Zhang, Z., and Chao, C.T., 2005. Genotyping Fruiting Mei (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) Cultivars Using Amplified Fragment-length Polymorphism Markers. *HortScience* 40:325-328.
- Fang, J., Twito, T., Zhang, Z., and Chao, C.T., 2006. Genetic relationships among fruiting-mei (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) cultivars evaluated with AFLP and SNP markers. *Genome* 49:1256-1264.
- Farooq, A., Kiani, M., Khan, M., Riaz, A., Khan, A., Anderson, N., and Byrne, D., 2013. Microsatellite analysis of *Rosa damascena* from Pakistan and Iran. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 54:141-147.
- Farrokhi, J., Darvishzadeh, R., Naseri, L., Azar, M.M., and Maleki, H.H., 2011. Evaluation of genetic diversity among Iranian apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars and landraces using simple sequence repeat markers. *Australian Journal of Crop Science* 5:815-821.
- Fathi, A., Ghareyazi, B., Haghazari, A., Ghaffari, M.R., Pirseyedi, S.M., Kadkhodaei, S., Naghavi, M.R., and Mardi, M., 2008. Assessment of the genetic diversity of almond (*Prunus dulcis*) using microsatellite markers and morphological traits. *Iranian Journal of Biotechnology* 6:98-106, 130.

- Faust, M., Suranyi, D., and Nyujto, F., 1998. Origin and dissemination of apricot. *Horticultural Reviews* 22:225-266.
- Fernandez I Marti, A., Athanson, B., Koepke, T., Font I Forcada, C., Dhingra, A., and Oraguzie, N., 2012. Genetic diversity and relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars based on single nucleotide polymorphic markers. *Frontiers in plant science* 3:116-116.
- Fernández-Fernández, F., Antanaviciute, L., Dyk, M.M., Tobutt, K.R., Evans, K.M., Rees, D.J.G., Dunwell, J.M., and Sargent, D.J., 2012. A genetic linkage map of an apple rootstock progeny anchored to the *Malus* genome sequence. *Tree Genetics & Genomes* 8:991-1002.
- Fernández-Fernández, F., Harvey, N.G., and James, C.M., 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from European pear (*Pyrus communis* L.). *Molecular Ecology Notes* 6:1039-1041.
- Fideghelli, C., Della Strada, G., Grassi, F., Morico, G., and Monet, R., 1998. The peach industry in the world: present situation and trend. *Acta Horticulturae* 465:29-40.
- Fischer, D. and Bachman, K., 1998. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *BioTechniques* 24:796-802.
- FitzSimmons, N.N., Moritz, C., and Moore, S.S., 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 12:432-440.
- Font i Forcada, C., Oraguzie, N., Igartua, E., Moreno, M.Á., and Gogorcena, Y., 2013. Population structure and marker-trait associations for pomological traits in peach and nectarine cultivars. *Tree Genetics & Genomes* 9:331-349.
- Foolad, M.R., Arulsekhar, S., Becerra, V.V., and Bliss, F.A., 1995. A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theor. Appl. Genet* 91:262-269.
- Foster, L. and Trimarchi, J.M., 1994. Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs. *Science* 265:407-409.
- Foulongne, M., Minier, J., Pascal, T., and Kervella, J., 2004. Genetic relationships between peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and closely related wild species using SSR markers, p. 629-633. In: Laurens, F. and Evans, K. (eds.), *Proceedings of the Xith Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*, Vols 1 and 2.
- Foulongne, M., Pascal, T., Arus, P., and Kervella, J., 2003. The potential of *Prunus davidiana* for introgression into peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] assessed by comparative mapping. *Theor Appl Genet* 107:227-238.
- Fryxell, P.A., 1957. Mode of reproduction in higher plants. *Bot. Rev.* 23:135-233.
- Gao, L.Z., Zhang, C.H., and Jia, J.Z., 2005. Cross-species transferability of rice microsatellites in its wild relatives and the potential for conservation genetic studies. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52:931-940.
- Gao, Z.H., Shen, Z.J., Han, Z.H., Fang, J.G., Zhang, Y.M., and Zhang, Z., 2004. Microsatellite markers and genetic diversity in Japanese apricot (*Prunus mume*). *Hortscience* 39:1571-1574.
- Gar, O., Sargent, D.J., Tsai, C.-J., Pleban, T., Shalev, G., Byrne, D.H., and Zamir, D., 2011. An Autotetraploid Linkage Map of Rose (*Rosa hybrida*) Validated Using the Strawberry (*Fragaria vesca*) Genome Sequence. *Plos One* 6.
- Garkava-Gustavsson, L., Kolodinska Brantestam, A., Sehic, J., and Nybom, H., 2008. Molecular characterisation of indigenous Swedish apple cultivars based on SSR and S-allele analysis. *Hereditas* 145:99-112.
- Gasi, F., Kurtovic, M., Kalamujic, B., Pojskic, N., Grahic, J., Kaiser, C., and Meland, M., 2013. Assessment of European pear (*Pyrus communis* L.) genetic resources in Bosnia and Herzegovina using microsatellite markers. *Scientia Horticulturae* 157:74-83.
- Gasi, F., Simon, S., Pojskic, N., Kurtovic, M., and Pejic, I., 2010. Genetic assessment of apple germplasm in Bosnia and Herzegovina using microsatellite and morphologic markers. *Scientia Horticulturae* 126:164-171.
- Gasic, K., Han, Y.P., Kertbundit, S., Shulaev, V., Iezzoni, A.F., Stover, E.W., Bell, R.L., Wisniewski, M.E., and Korban, S.S., 2009. Characteristics and transferability of new apple EST-derived SSRs to other Rosaceae species. *Molecular Breeding* 23:397-411.
- Georgi, L., Wang, Y., Yvergnaux, D., Ormsbee, T., Inigo, M., Reighard, G., and Abbott, G., 2002. Construction of a BAC library and its application to the identification of simple

- sequence repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor Appl Genet* 105:1151-1158.
- Gharghani, A., Zamani, Z., Talaie, A., Oraguzie, N., Fatahi, R., Hajnajari, H., Wiedow, C., and Gardiner, S., 2009. Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars and landraces, wild *Malus* species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeat (SSR) marker analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56:829-842.
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., and Gessler, C., 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 96:1069-1076.
- Gil-Ariza, D.J., Amaya, I., Botella, M.A., Muñoz Blanco, J., Caballero, J.L., López-Aranda, J.M., Valpuesta, V., and Sánchez-Sevilla, J.F., 2006. EST-derived polymorphic microsatellites from cultivated strawberry (*Fragaria xananassa*) are useful for diversity studies and varietal identification among *Fragaria* species. *Molecular Ecology Notes* 6:1195-1197.
- Gil-Ariza, D.J., Amaya, I., Lopez-Aranda, J.M., Sanchez-Sevilla, J.F., Botella, M.A., and Valpuesta, V., 2009. Impact of Plant Breeding on the Genetic Diversity of Cultivated Strawberry as Revealed by Expressed Sequence Tag-derived Simple Sequence Repeat Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134:337-347.
- Giraldo, E., Viruel, M.A., Lopez-Corrales, M., and Hormaza, J.I., 2005. Characterisation and cross-species transferability of microsatellites in the common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 80:217-224.
- Glenn, T.C., Stephan, W., Dessauer, H.C., and Braun, M.J., 1996. Allelic diversity in alligator microsatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability. *Mol. Biol. Evol.* 13:1151-1154.
- Gogorcena, Y. and Parfitt, D.E., 1994. Evaluation of RAPD marker consistency for detection of polymorphism in apricot. *Scientia Horticulturae* 59:163-167.
- Gottlieb, L.D., 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. *Phytochemistry* 7:1-45.
- Gouta, H., Ksia, E., Buhner-Zaharieva, T., Mliki, A., and Gogorcena, Y., 2012. Development of an SSR-based identification key for Tunisian local almonds. *Scientia Agricola* 69:108-113.
- Govan, C., Simpson, D., Johnson, A., Tobutt, K., and Sargent, D., 2008. A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. × ananassa* cultivars. *Molecular Breeding* 22:649-661.
- Graham, J., Smith, K., MacKenzie, K., Jorgenson, L., Hackett, C., and Powell, W., 2004. The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 109:740-749.
- Graham, J., Smith, K., Woodhead, M., and Russell, J., 2002. Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species. *Molecular Ecology Notes* 2:250-252.
- Grasselly, C., 1976. Les espèces sauvages d'amandiers. *Options Méditerranéennes* 32:28-43.
- Grasselly, C. and Duval, H., 1997. *L'Amandier*. CTIFL, Paris.
- Gregory, D., Sedgley, M., Wirthensohn, M.G., Arus, P., Kaiser, B., and Collins, G.G., 2005. An integrated genetic linkage map for almond based on RAPD, ISSR, SSR and morphological markers, p. 67-72. In: Drew, R. (ed.), *Proceedings of the International Symposium on Harnessing the Potential of Horticulture in the Asian-Pacific Region*.
- Guarino, C., Santoro, S., De Simone, L., Lain, O., Cipriani, G., and Testolin, R., 2006. Genetic diversity in a collection of ancient cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) as revealed by SSR-based fingerprinting *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 81:39-44.
- Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J.M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett, H., and Forster, R., 1997. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 94:249-254.
- Guo, W.Z., Wang, W., Zhou, B.L., and Zhang, T.Z., 2006. Cross-species transferability of G-arboreum-derived EST-SSRs in the diploid species of *Gossypium*. *Theoretical and Applied Genetics* 112:1573-1581.

- Gur-Arie, R., Cohen, C.J., Eitan, Y., Shelef, L., Hallerman, E.M., and Kashi, Y., 2000. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: Abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome Research* 10:62-71.
- Gutierrez, M.V., Patto, M.C.V., Huguet, T., Cubero, J.I., Moreno, M.T., and Torres, A.M., 2005. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theoretical and Applied Genetics* 110:1210-1217.
- Guyomarc'h, H., Sourdille, P., Edwards, K.J., and Bernard, M., 2002. Studies of the transferability of microsatellites derived from *Triticum tauschii* to hexaploid wheat and to diploid related species using amplification, hybridization and sequence comparisons. *Theoretical and Applied Genetics* 105:736-744.
- Hadonou, A.M., Sargent, D.J., Wilson, F., James, C.M., and Simpson, D.W., 2004a. Development of microsatellite markers in *Fragaria*, their use in genetic diversity analysis, and their potential for genetic linkage mapping. *Genome* 47:429-438.
- Hadonou, M., Sargent, D., Walden, R., and Simpson, D., 2004b. Characterisation of *Fragaria vesca* simple sequence repeats (SSR) markers. *Acta Horticulturae* 649:99-102.
- Hagen, L.S., Chaib, J., Fady, B., Decroocq, V., Bouchet, J.P., Lambert, P., and Audergon, J.M., 2004. Genomic and cDNA microsatellites from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Molecular Ecology Notes* 4:742-745.
- Hamada, H., Petrino, M.C., and Takugana, T., 1982. A novel repeated element with Z-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:6465-6469.
- Han, Y., Zheng, D., Vimolmangkang, S., Khan, M.A., Beever, J.E., and Korban, S.S., 2011. Integration of physical and genetic maps in apple confirms whole-genome and segmental duplications in the apple genome. *Journal of Experimental Botany* 62:5117-5130.
- Hancock, J.M., 1996. Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays* 18:421-425.
- Hancock, J.M., 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms, p. 1-9. In: Goldstein, D. B. and Schlötterer, C. (eds.), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford.
- Harr, B. and Schlotterer, C., 2000. Long microsatellite alleles in *Drosophila melanogaster* have a downward mutation bias and short persistence times, which cause their genomewide underrepresentation. *Genetics* 155:1213-1220.
- Harr, B., Zangerl, B., and Schlotterer, C., 2000. Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: phylogenetic evidence from *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 17:1001-1009.
- Hauagge, R., Kester, D.E., Arulsekar, S., Parfitt, D.E., and Liu, L., 1987. Isozyme variation among California almond cultivars: II. Cultivar characterization and origins. *J Am Soc Hort Sci* 112:693-698.
- Hayashi, K., Shimazu, K., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Iketani, H., and Yamamoto, T., 2008. Genetic diversity in fruiting and flower-ornamental Japanese apricot (*Prunus mume*) germplasms assessed by SSR markers. *Breeding Science* 58:401-410.
- He, Q., Li, X.W., Liang, G.L., Ji, K., Guo, Q.G., Yuan, W.M., Zhou, G.Z., Chen, K.S., van de Weg, W.E., and Gao, Z.S., 2011. Genetic Diversity and Identity of Chinese Loquat Cultivars/Accessions (*Eriobotrya japonica*) Using Apple SSR Markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 29:197-208.
- He, T.M., Chen, X.S., Xu, Z., Gao, J.S., Lin, P.J., Liu, W., Liang, Q., and Wu, Y., 2007. Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) in the Ily Valley of West China. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:563-572.
- Hemmat, M., Weeden, N.F., and Brown, S.K., 2003. Mapping and Evaluation of *Malus domestica* Microsatellites in Apple and Pear. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:515-520.
- Hemmat, M., Weeden, N.F., Conner, P.J., and Brown, S.K., 1997. A DNA Marker for Columnar Growth Habit in Apple Contains a Simple Sequence Repeat. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122:347-349.
- Hepper, F.N., 1990. Pharaoh's Flowers: the botanical treasures of Tutankhamum. Her supérieure Majesty's Stationary Office, London. pp. 80.
- Hesse, C., 1975. Peaches., p. 285-335. In: Janick, J. and Moore, J. (eds.), *In Advances in fruit breeding*, Purdue University Press, West Lafayette.

- Hibrand-Saint Oyant, L., Crespel, L., Rajapakse, S., Zhang, L., and Foucher, F., 2008. Genetic linkage maps of rose constructed with new microsatellite markers and locating QTL controlling flowering traits. *Tree Genetics & Genomes* 4:11-23.
- Hokanson, S.C., Lamboy, W.F., Szewc-McFadden, A.K., and McFerson, J.R., 2001. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica* 118:281-294.
- Hokanson, S.C., Szewc-McFadden, A.K., Lamboy, W.F., and McFerson, J.R., 1997. Simple Sequence Repeat (SSR) Variation in a Collection of *Malus* Species and Hybrids. *HortScience* 32:440-b-.
- Hokanson, S.C., Szewc-McFadden, A.K., Lamboy, W.F., and McFerson, J.R., 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* borkh. core subset collection. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 97:671-683.
- Hood, D.W., Deadman, M.E., Jennings, M.P., Bisercic, M., Fleischmann, R.D., Venter, J.C., and Moxon, E.R., 1996. DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11121-11125.
- Hormaza, J.I., 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 104:321-328.
- Horvath, A., Christmann, H., and Laignet, F., 2008. Genetic diversity and relationships among *Prunus cerasifera* (cherry plum) clones. *Botany-Botanique* 86:1311-1318.
- Horvath, A., Sanchez-Sevilla, J.F., Punelli, F., Richard, L., Sesmero-Carrasco, R., Leone, A., Hoefer, M., Chartier, P., Balsemin, E., Barreneche, T., and Denoyes, B., 2011. Structured diversity in octoploid strawberry cultivars: importance of the old European germplasm. *Annals of Applied Biology* 159:358-371.
- Howad, W., Yamamoto, T., Dirlewanger, E., Testolin, R., Cosson, P., Cipriani, G., Monforte, A.J., Georgi, L., Abbott, A.G., and Arús, P., 2005. Mapping With a Few Plants: Using Selective Mapping for Microsatellite Saturation of the *Prunus* Reference Map. *Genetics* 171:1305-1309.
- Hurtado, A., Romero, C., Vilanova, S., Abbott, G., Llacer, G., and Badenes, L., 2002. Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.), and mapping of PPV (sharka) resistance. *Theor Appl Genet* 105:182-191.
- Igarashi, M., Abe, Y., Hatsuyama, Y., Ueda, T., Fukasawa-Akada, T., Kon, T., Kudo, T., Sato, T., and Suzuki, M., 2008. Linkage maps of the apple (*Malus x domestica* Borkh.) cvs 'Ralls Janet' and 'Delicious' include newly developed EST markers. *Molecular Breeding* 22:95-118.
- Iketani, H., Ohta, S., Kawahara, T., Katsuki, T., Mase, N., Sato, Y., and Yamamoto, T., 2007. Analyses of Clonal Status in 'Somei-yoshino' and Confirmation of Genealogical Record in Other Cultivars of *Prunus times yedoensis* by Microsatellite Markers. *Breeding Science* 57:1-6.
- Illa, E., Eduardo, I., Audergon, J.M., Barale, F., Dirlewanger, E., Li, X., Moing, A., Lambert, P., Dantec, L., Gao, Z., Poëssel, J.-L., Pozzi, C., Rossini, L., Vecchietti, A., Arús, P., and Howad, W., 2011. Saturating the *Prunus* (stone fruits) genome with candidate genes for fruit quality. *Molecular Breeding* 28:667-682.
- International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Isagi, Y. and Suhandono, S., 1997. PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology* 6:897-899.
- Isobe, S.N., Hirakawa, H., Sato, S., Maeda, F., Ishikawa, M., Mori, T., Yamamoto, Y., Shirasawa, K., Kimura, M., Fukami, M., Hashizume, F., Tsuji, T., Sasamoto, S., Kato, M., Nanri, K., Tsuruoka, H., Minami, C., Takahashi, C., Wada, T., Ono, A., Kawashima, K., Nakazaki, N., Kishida, Y., Kohara, M., Nakayama, S., Yamada, M., Fujishiro, T., Watanabe, A., and Tabata, S., 2012. Construction of an Integrated High Density Simple Sequence Repeat Linkage Map in Cultivated Strawberry (*Fragaria x ananassa*) and its Applicability. *DNA Research*.
- Jakupciak, J.P. and Wells, R.D., 2000. Gene conversion (recombination) mediates expansions of CTG.CAG repeats. *Journal of Biological Chemistry* 275:4003-4013.
- James, C.M., Wilson, F.F., Hadonou, A.M., and Tobutt, K.R., 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in diploid strawberry (*Fragaria vesca*

- L.) for mapping, diversity studies and clone identification. *Molecular Ecology Notes* 3:171-173.
- Jarne, P. and Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11:424-429.
- Jolivet, C., Rogge, M., and Degen, B., 2012. Molecular and quantitative signatures of biparental inbreeding depression in the self-incompatible tree species *Prunus avium*. *Heredity*.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevschi, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., and Karp, A., 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3:381-390.
- Joobeur, T., Periam, N., de Vicente, M.C., King, G.J., and Arús, P., 2000. Development of a second generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers. *Genome* 43:649-655.
- Joobeur, T., Viruel, M.A., de Vicente, M.C., Jáuregui, B., Ballester, J., Dettori, M.T., Verde, I., Truco, M.J., Messeguer, R., Batlle, I., Quarta, R., Dirlewanger, E., and Arús, P., 1998. Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using an almond x peach F2 progeny. *Theor. Appl. Genet* 97:1034-1041.
- Jung, S., Abbott, A., Jesudurai, C., Tomkins, J., and Main, D., 2005. Frequency, type, distribution and annotation of simple sequence repeats in Rosaceae ESTs. *Funct Integr Genomics* 5:136-143.
- Kadkhodaei, S., Shahnazari, M., Nekouei, M.K., Ghasemi, M., Etmnani, H., Imani, A., and Ariff, A.B., 2011. A comparative study of morphological and molecular diversity analysis among cultivated almonds (*Prunus dulcis*). *Australian Journal of Crop Science* 5:82-91.
- Kantety, R.V., La Rota, M., Matthews, D.E., and Sorrells, M.E., 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Mol. Biol.* 48:501-510.
- Kashi, Y., King, D., and Soller, M., 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet.* 13:74-78.
- Kato, S., Matsumoto, A., Yoshimura, K., Katsuki, T., Iwamoto, K., Kawahara, T., Mukai, Y., Tsuda, Y., Ishio, S., Nakamura, K., Moriwaki, K., Shiroishi, T., Gojobori, T., and Yoshimaru, H., 2014. Origins of Japanese flowering cherry (*Prunus* subgenus *Cerasus*) cultivars revealed using nuclear SSR markers. *Tree Genetics & Genomes* 10:477-487.
- Kato, S., Matsumoto, A., Yoshimura, K., Katsuki, T., Iwamoto, K., Tsuda, Y., Ishio, S., Nakamura, K., Moriwaki, K., Shiroishi, T., Gojobori, T., and Yoshimaru, H., 2012. Clone identification in Japanese flowering cherry (*Prunus* subgenus *Cerasus*) cultivars using nuclear SSR markers. *Breeding Science* 62:248-255.
- Katti, M.V., Ranjekar, P.K., and Gupta, V.S., 2001. Differential Distribution of Simple Sequence Repeats in Eukaryotic Genome Sequences. *Mol Biol Evol* 18:1161-1167.
- Kazija, D.H., Jelacic, T., Vujevic, P., Milinovic, B., Cicek, D., Bisko, A., Pejic, I., Simon, S., Mihaljevic, M.Z., Pecina, M., Nikolic, D., Grahic, J., Drkenda, P., and Gasi, F., 2014. Plum germplasm in Croatia and neighboring countries assessed by microsatellites and DUS descriptors. *Tree Genetics & Genomes* 10:761-778.
- Keep, E., 1968. Incompatibility in *Rubus* with special reference to *R. idaeus* L. *Can. J. Genet. Cytol.* 10:253-262.
- Keniry, A., Hopkins, C.J., Jewell, E., Morrison, B., Spangenberg, G.C., Edwards, D., and Batley, J., 2006. Identification and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers from *Fragaria x nanassa* expressed sequences. *Molecular Ecology Notes* 6:319-322.
- Kester, D.E., Gradziel, T.M., and Grasselly, C., 1990. Almonds, p. 699-758. In: Moore, J. N. and Ballington, J. R. (eds.), *Genetic resources of temperate fruit and nut crops*, Int. Hort. Sci., Wageningen, The Netherlands.
- Khadivi-Khub, A., Zamani, Z., Fattahi, R., and Wuensch, A., 2014. Genetic variation in wild *Prunus* L. subgen. *Cerasus* germplasm from Iran characterized by nuclear and chloroplast SSR markers. *Trees-Structure and Function* 28:471-485.

- Khan, M.A., Durel, C.-E., Duffy, B., Drouet, D., Kellerhals, M., Gessler, C., and Patocchi, A., 2007. Development of molecular markers linked to the 'Fiesta' linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection *Genome* 50:568-577.
- Kijas, J.M., Fowler, J.C., Garbett, C.A., and Thomas, M.R., 1994. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques* 16:656-660, 662.
- Kimura, T., Shi, Y.Z., Shoda, M., Kotobuki, K., Matsuta, N., Hayashi, T., Ban, Y., and Yamamoto, T., 2002. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. *Breeding Science* 52:115-121.
- Kitahara, K., Matsumoto, S., Yamamoto, T., Soejima, J., Kimura, T., Komatsu, H., and Abe, K., 2005. Molecular Characterization of Apple Cultivars in Japan by S-RNase Analysis and SSR Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130:885-892.
- Komarov, V.L., Shinskin, B.K., and Yuzepchuk, S.V., 1941. *Rosaceae-Rosoideae, Prunoideae Flora of the USSR. Vol 10.*, Israel Program for Scientific Translation (1971), Jerusalem.
- Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., Arkhipov, A., Hohn, B., and Dubrova, Y.E., 2003. Extremely complex pattern of microsatellite mutation in the germline of wheat exposed to the post-Chernobyl radioactive contamination. *Mutat. Res.* 525:93-101.
- Kovalyov, N.V. and Kostina, K.F., 1935. A contribution of the study of the genus *Prunus* Focke. Questions of taxonomy and plant breeding. *Trudy Prikl. Bot. Genet.* 8. 4:1-76.
- Krichen, L., Mnejja, M., Arùs, P., Marrakchi, M., and Trifi-Farah, N., 2006. Use of Microsatellite Polymorphisms to Develop an Identification Key for Tunisian Apricots. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:1699-1706.
- Kruglyak, S., Durrett, R.T., Schug, M., and Aquadro, C.F., 1998. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceeding of National Academy of Sciences* 95:10774-10778.
- Kuleung, C., Baenziger, P.S., and Dweikat, I., 2004. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *Theor Appl Genet* 108:1147-1150.
- Lacis, G., Kota, I., Ikase, L., and Rungis, D., 2011. Molecular characterization of the Latvian apple (*Malus*) genetic resource collection based on SSR markers and scab resistance gene *Vf* analysis. *Plant Genetic Resources-Characterization and Utilization* 9:189-192.
- Ladizinsky, G., 1999. On the origin of almond. *Gen. Res. and Crop evolution* 46:143-147.
- Lambert, P., Hagen, L.S., Arus, P., and Audergon, J.M., 2004. Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) compared with the almond Texas x peach Earlygold reference map for *Prunus*. *Theor Appl Genet* 108:1120-1130.
- Larsen, A., Asmussen, C., Coart, E., Orlík, D., and Kjær, E., 2006. Hybridization and genetic variation in Danish populations of European crab apple (*Malus sylvestris*). *Tree Genetics & Genomes* 2:86-97.
- Levinson, G. and Gutman, G.A., 1987. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucl. Acids Res.* 15:5323-5338.
- Levy, S., Sutton, G., Ng, P.C., Feuk, L., Halpern, A.L., Walenz, B.P., Axelrod, N., Huang, J., Kirkness, E.F., Denisov, G., Lin, Y., MacDonald, J.R., Pang, A.W.C., Shago, M., Stockwell, T.B., Tsiamouri, A., Bafna, V., Bansal, V., Kravitz, S.A., Busam, D.A., Beeson, K.Y., McIntosh, T.C., Remington, K.A., Abril, J.F., Gill, J., Borman, J., Rogers, Y.-H., Frazier, M.E., Scherer, S.W., Strausberg, R.L., and Venter, J.C., 2007. The Diploid Genome Sequence of an Individual Human. *PLoS Biology* 5:e254.
- Lewers, K., Saski, C., Cuthbertson, B., Henry, D., Staton, M., Main, D., Dhanaraj, A., Rowland, L., and Tomkins, J., 2008. A blackberry (*Rubus* L.) expressed sequence tag library for the development of simple sequence repeat markers. *BMC Plant Biology* 8:1-8.
- Lewers, K.S., Styan, S.M.N., Hokanson, S.C., and Bassil, N.V., 2005. Strawberry GenBank-derived and Genomic Simple Sequence Repeat (SSR) Markers and Their Utility with Strawberry, Blackberry, and Red and Black Raspberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130:102-115.
- Li, M., Zhao, Z., Miao, X., and Zhou, J., 2014. Genetic Diversity and Population Structure of Siberian apricot (*Prunus sibirica* L.) in China. *International Journal of Molecular Sciences* 15:377-400.

- Li, Q., Zhang, Q., and Chen, J., 2012. Identification of the wild germplasm of *Prunus mume* based on AFLP markers. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 28:981-994.
- Li, X., Wang, Y., Wang, B., Wang, C., Shangguan, L., Huang, Z., and Fang, J., 2010. Genetic relationships between fruiting and flowering *mei* (*Prunus mume*) cultivars using SNP markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 85:329-334.
- Li, X.-w., Meng, X.-Q., Jia, H.-j., Yu, M.-l., Ma, R.-j., Wang, L.-r., Cao, K., Shen, Z.-j., Niu, L., Tian, J.-b., Chen, M.-j., Xie, M., Arus, P., Gao, Z.-s., and Aranzana, M.J., 2013. Peach genetic resources: diversity, population structure and linkage disequilibrium. *BMC Genetics* 14.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., and Nevo, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11:2453-2465.
- Liebhart, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C.D., Tarchini, R., Van de Weg, E., and Gessler, C., 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* 10:217-241.
- Liebhart, R., Koller, B., Gianfranceschi, L., and Gessler, C., 2003. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 106:1497-1508.
- Lopes, M.S., Maciel, G.B., Mendonça, D., Gil, F.S., and Da Câmara Machado, A., 2006. Isolation and characterization of simple sequence repeat loci in *Rubus hochstetterorum* and their use in other species from the Rosaceae family. *Molecular Ecology Notes* 6:750-752.
- Lopes, M.S., Sefc, K.M., Laimer, M., and Da Câmara Machado, A., 2002. Identification of microsatellite loci in apricot. *Molecular Ecology Notes* 2:24-26.
- Lowe, A.J., Jones, A.E., Raybould, A.F., Trick, M., Moule, C.L., and Edwards, K.J., 2002. Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among Brassica species of the U triangle. *Molecular Ecology Notes* 2:7-11.
- Lu, M., Tang, H., Chen, X., Gao, J., Chen, Q., Lin, L., Lu, M., Tang, H.R., Chen, X.Y., Gao, J., Chen, Q., and Lin, L., 2010. Comparative genome mapping between apple and pear by apple mapped SSR markers. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science* 9:303-309.
- Lu, Z.X., Sosinski, B., Reighard, G.L., Baird, W.V., and Abbott, A.G., 1998. Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Genome* 41:199-207.
- Maghuly, F., Fernandez, E.B., Ruthner, S., Pedryc, A., and Laimer, M., 2005. Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographic origin and breeding history. *Tree Genetics & Genomes* 1:151-165.
- Majewski, J. and Ott, J., 2000. GT Repeats Are Associated with Recombination on Human Chromosome 22. *Genome Res.* 10:1108-1114.
- Malcolm, P., 2006. History of plum trees and their hybrids. www.Thephantomwriters.com.
- Maliepaard, C., Alston, F.H., van Arkel, G., Brown, L.M., Chevreau, E., Dunemann, F., Evans, K.M., Gardiner, S., Guilford, P., van Heusden, A.W., Janse, J., Laurens, F., Lynn, J.R., Manganaris, A.G., den Nijs, A.P.M., Periam, N., Rikkerink, E., Roche, P., Ryder, C., Sansavini, S., Schmidt, H., Tartarini, S., Verhaegh, J.J., Vrielink-van Ginkel, M., and King, G.J., 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 97:60-73.
- Manganaris, A.G., Mainou, A., Goudaras, A., and Ledbetter, C., 1999. Identification of Plum X Apricot interspecific hybrids using isoenzyme polymorphism. *Acta horticulturae (ISHS)* 488:361-368.
- Manubens, A., Lobos, S., Jadue, Y., Toro, M., Messina, R., Lladser, M., and Seelenfreund, D., 1999. DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*). *Plant Molecular Biology Reporter* 17:255-267.
- Marcotte, E.M., Pellegrini, M., Yeates, T.O., and Eisenberg, D., 1999. A census of protein repeats. *Journal of Molecular Biology* 293:151-160.
- Mariniello, L., Sommella, M.G., Sorrentino, A., Forlani, M., and Porta, R., 2002. Identification of *Prunus armeniaca* cultivars by RAPD and SCAR markers. *Biotech. Lett.* 24:749-755.
- Martín, C., Herrero, M., and Hormaza, J.I., 2011. Molecular Characterization of Apricot Germplasm from an Old Stone Collection. *Plos One* 6:e23979.

- Martínez-Gómez, P., Arulsekhar, S., Potter, D., and Gradziel, T.M., 2003a. An extended interspecific gene pool available to peach and almond breeding as characterized using simple sequence repeat (SSR) markers. *Euphytica* 131:313-322.
- Martínez-Gómez, P., Arulsekhar, S., Potter, D., and Gradziel, T.M., 2003b. Relationships among Peach, Almond, and Related Species as Detected by Simple Sequence Repeat Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:667-671.
- Martins, M., Farinha, A., Ferreira, E., Cordeiro, V., Monteiro, A., Tenreiro, R., and Oliveira, M.M., 2001. Molecular analysis of the genetic variability of Portuguese almond collections. *Acta Horticulturae* 546:449-452.
- Martins, M., Tenreiro, R., and Oliveira, M.M., 2003. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports* 22:71-78.
- Messeguer, R., Arus, P., and Carrera, M., 1987. Identification of peach cultivars with pollen isozymes. *Scientia Horticulturae* 31:107-117.
- Messier, W., Li, S.H., and Stewart, C.B., 1996. The birth of microsatellites. *Nature* 381:483.
- Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M.T., Cipriani, G., and Testolin, R., 2004a. New set of microsatellite loci isolated in apricot. *Molecular Ecology Notes* 4:432-434.
- Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M.T., Huang, W.G., Cipriani, G., and Testolin, R., 2004b. Isolation of microsatellites from almond and apricot genomic libraries and testing for their transportability across different *Prunus* species. *Proceedings of the XIth Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, Vols 1 and 2*:79-82.
- Miguel Soriano, J., Luisa Domingo, M., Zuriaga, E., Romero, C., Zhebentyayeva, T., Abbott, A.G., and Luisa Badenes, M., 2012. Identification of simple sequence repeat markers tightly linked to plum pox virus resistance in apricot. *Molecular Breeding* 30:1017-1026.
- Miller, P.J., Parfitt, D.E., and Weinbaum, S.A., 1989. Outcrossing in peach. *HortScience* 24 (2):359-360.
- Min-Young, Y., Kyaw Thu, M., Dae-Young, K., Il-Rae, R., Su, K., Ki-Taek, K., Mi-Kyoung, W., Jong-Wook, C., and Yong-Jing, P., 2012. Genetic diversity and population structure analysis of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*; Vol 15, No 2 (2012).
- MirAli, N. and Nabulsi, I., 2003. Genetic diversity of almonds (*Prunus dulcis*) using RAPD technique. *Scientia Horticulturae* 98:461-471.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., and Arús, P., 2005. Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Molecular Ecology Notes* 5:531-535.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., Badenes, M.L., and 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* 4:163-166.
- Mnejja, M., López, M., Romero, M.A., Vargas, F.J., and Battle, I., 2002. Cross design for self-compatibility in almond breeding using stylar ribonucleases. *Acta Horticulturae* 591:233-238.
- Monet, R., Guye, A., Roy, M., and Dachary, N., 1996. Peach mendelian genetics: a short review and new results. *Agronomie* 16:321-329.
- Monfort, A., Vilanova, S., Davis, T.M., and Arus, P., 2006. A new set of polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from a wild strawberry (*Fragaria vesca*) are transferable to other diploid *Fragaria* species and to *Fragaria x ananassa*. *Molecular Ecology Notes* 6:197-200.
- Morgante, M., Hanafey, M., and Powell, W., 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30:194-200.
- Moriya, S., Iwanami, H., Okada, K., Yamamoto, T., and Abe, K., 2011. A practical method for apple cultivar identification and parent-offspring analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica* 177:135-150.
- Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562.
- Muzher, B.M., Younis, R.A.A., El-Halabi, O., and Ismail, O.M., 2007. Genetic identification of some syrian local apple (*Malus* sp.) cultivars using molecular markers. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.* 3(6):704-713.
- Naseri, L., Darvishzadeh, R., Azar, M.M., and Alizadeh, A., 2011. Molecular characterisation and similarity relationships among 48 native and commercial Iranian apple (*Malus X*

- domestica Borkh.) genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 86:527-533.
- Neff, B.D. and Gross, M.R., 2001. Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55:1717-1733.
- Newcomb, R.D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Rikkerink, E.H.A., Allan, A.C., Beuning, L.L., Bowen, J.H., Gera, E., Jamieson, K.R., Janssen, B.J., Laing, W.A., McArtney, S., Nain, B., Ross, G.S., Snowden, K.C., Souleyre, E.J.F., Walton, E.F., and Yauk, Y.-K., 2006. Analyses of Expressed Sequence Tags from Apple. *Plant Physiol.* 141:147-166.
- Nier, S., Simpson, D.W., Tobutt, K.R., and Sargent, D.J., 2006. A genetic linkage map of an inter-specific diploid *Fragaria* BC1 mapping population and its comparison with the *Fragaria* reference map (FV × FN) *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 81:645-650
- Nishitani, C., Kimura, T., Ueda, E., Howad, W., Arus, P., and Yamamoto, T., 2007. Tri-/hexanucleotide microsatellite markers in peach derived from enriched genomic libraries and their application in rosaceae. *Breeding Science* 57:289-296.
- Njuguna, W., Hummer, K.E., Richards, C.M., Davis, T.M., and Bassil, N.V., 2011. Genetic diversity of diploid Japanese strawberry species based on microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58:1187-1198.
- Nourse, S.M., Fickus, E.W., Cregan, P.B., and Hokanson, S.C., 2002. Development of simple sequence repeat (SSR) molecular markers in strawberry, p. 48-53. In: Hockanson SC, J. A. (ed.), *Strawberry research to 2001*. ASHS Press, Alexandria, Va.
- Oddou-Muratorio, S., Aligon, C., Decroocq, S., Plomion, C., Lamant, T., and Mush-Demesure, B., 2001. Microsatellite primers for *Sorbus torminalis* and related species. *Molecular Ecology Notes* 1:297-299.
- Ogundiwin, E., Peace, C., Gradziel, T., Parfitt, D., Bliss, F., and Crisosto, C., 2009. A fruit quality gene map of *Prunus*. *BMC Genomics* 10:587.
- Ohashi, J. and Tokunaga, K., 2003. Power of genome-wide linkage disequilibrium testing by using microsatellite markers. *J. Hum. Genet.* 48:487-491.
- Ohta, S., Katsuki, T., Tanaka, T., Hayashi, T., Sato, Y., and Yamamoto, T., 2005. Genetic variation in flowering cherries (*Prunus* subgenus *Cerasus*) characterized by SSR markers. *Breeding Science* 55:415-424.
- Okie, W.R. and Weinberger, J.H., 1996. Plums, p. 694-704. In: Janick, J. and Paull, R. E. (eds.), *The Encyclopedia of Fruits and Nuts*. CAB International, UK.
- Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., and Vieira, M.L.C., 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29:294-307.
- Olmstead, J.W., Sebolt, A.M., Cabrera, A., Sooriyapathirana, S.S., Hammar, S., Iriarte, G., Wang, D., Chen, C.Y., van der Knaap, E., and Iezzoni, A.F., 2008. Construction of an intra-specific sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic linkage map and synteny analysis with the *Prunus* reference map. *Tree Genetics & Genomes* 4:897-910.
- Pairon, M., Jacquemart, A.L., and Potter, D., 2008. Detection and characterization of genome-specific microsatellite markers in the allotetraploid *Prunus serotina*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133:390-395.
- Pairon, M.C. and Jacquemart, A.L., 2005. Disomic segregation of microsatellites in the tetraploid *Prunus serotina* Ehrh. (Rosaceae). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130:729-734.
- Park, Y.H., Ahn, S.G., Choi, Y.M., Oh, H.J., Ahn, D.C., Kim, J.G., Kang, J.S., Choi, Y.W., and Jeong, B.R., 2010. Rose (*Rosa hybrida* L.) EST-derived microsatellite markers and their transferability to strawberry (*Fragaria* spp.). *Scientia Horticulturae* 125:733-739.
- Pascual, M., Schug, M.D., and Aquadro, C.F., 2000. High Density of Long Dinucleotide Microsatellites in *Drosophila subobscura*. *Mol Biol Evol* 17:1259-1267.
- Patocchi, A., Fernandez-Fernandez, F., Evans, K., Gobbin, D., Rezzonico, F., Boudichevskaia, A., Dunemann, F., Stankiewicz-Kosyl, M., Mathis-Jeanneteau, F., Durel, C.E., Gianfranceschi, L., Costa, F., Toller, C., Cova, V., Mott, D., Komjanc, M., Barbaro, E., Kodde, L., Rikkerink, E., Gessler, C., and van de Weg, W.E., 2009. Development and test of 21 multiplex PCRs composed of SSRs spanning most of the apple genome. *Tree Genetics & Genomes* 5:211-223.

- Patzak, J., Paprštejn, F., Henychová, A., and Sedlák, J., 2012. Comparison of genetic diversity structure analyses of SSR molecular marker data within apple (*Malus x domestica*) genetic resources. *Genome* 55:647-665.
- Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M., and Rafalski, A., 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol Biol Evol* 15:1275-1287.
- Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrera, A., and Díaz-Hernández, M., 2007. Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.) from Spain using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:405-420.
- Picañol, R., Eduardo, I., Aranzana, M.J., Howad, W., Batlle, I., Iglesias, I., Alonso, J.M., and Arús, P., 2013. Combining linkage and association mapping to search for markers linked to the flat fruit character in peach. *Euphytica* 190:279-288.
- Pierantoni, L., Cho, K.H., Shin, I.S., Chiodini, R., Tartarini, S., Dondini, L., Kang, S.J., and Sansavini, S., 2004. Characterisation and transferability of apple SSRs to two European pear F1 populations. *Theor Appl Genet* 109:1519-1524.
- Piry, S., Luikart, G., and Cornuet, J.M., 1999. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Hered.* 90:502-503.
- Poncet, V., Hamon, P., Minier, J., Carasco, C., Hamon, S., and Noirot, M., 2004. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). *Genome* 47:1071-1081.
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R.C., Oh, S., Smedmark, J.E.E., Morgan, D.R., Kerr, M., Robertson, K.R., Arsenault, M., Dickinson, T.A., and Campbell, C.S., 2007. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution* 266:5-43.
- Potts, S., Han, Y., Khan, M.A., Kushad, M., Rayburn, A.L., and Korban, S., 2012. Genetic Diversity and Characterization of a Core Collection of *Malus* Germplasm Using Simple Sequence Repeats (SSRs). *Plant Molecular Biology Reporter* 30:827-837.
- Primmer, C.R. and Merilä, J., 2000. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conservation Genetics* 3:445-449.
- Primmer, C.R., Moller, A.P., and Ellegren, H., 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Mol. Ecol. Notes* 5:365-378.
- Primmer, C.R., Raudsepp, T., Chowdhary, B.P., Moller, A.P., and Ellegren, H., 1997. Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Research* 7:471-482.
- Primmer, C.R., Saino, N., Moller, A.P., and Ellegren, H., 1998. Unraveling the process of microsatellite evolution through analysis of germ line mutations in barn swallows *Hirundo rustica*. *Mol. Biol. Evol.* 15:1047-1054.
- Prochazka, M., 1996. Microsatellite hybrid capture technique for simultaneous isolation of various STR markers. *Genome Res.* 6:646-649.
- Pupko, T. and Graur, D., 1999. Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: role of length and number of repeated units. *J. Mol. Evol.* 48:313-316.
- Qiao, Y.S., Fang, J.G., Cong, Y., Zhou, J., and Zhang, Z., 2007. Analysis of genetic diversity of Japanese plum cultivars based on RAPD, ISSR and SSR markers. *Proceedings of the International Symposium on Structural and Functional Genomics of Horticultural Plants*:177-183.
- Quarta, R., Dettori, M.T., Verde, I., Broda, Z., and Gentile, A., 1998. Genetic analysis of agronomic traits and genetic linkage mapping in a BC1 population using RFLPs and RAPDs. *Acta Horticulturae* 465:51-59.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E., and Hughes, C.R., 1993. Microsatellites and Kinship. *Trends in Ecology & Evolution* 8:285-&.
- Rahemi, A., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., Gradziel, T., Folta, K., and Chaparro, J., 2012. Genetic diversity of some wild almonds and related *Prunus* species revealed by SSR and EST-SSR molecular markers. *Plant Systematics and Evolution* 298:173-192.
- Rajapakse, S., Belthoff, L.E., He, G., Estager, A.E., Scorza, R., Verde, I., Ballard, R.E., Baird, W.V., Callahan, A., Monet, R., and Abbott, A.G., 1995. Genetic-Linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:503-510.

- Rajapakse, S., Byrne, D.H., Zhang, L., Anderson, N., Arumuganathan, K., and Ballard, R.E., 2001. Two genetic linkage maps of tetraploid roses. *Theoretical and Applied Genetics* 103:575-583.
- Rakoczy-Trojanowska, M. and Bolibok, H., 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cell Mol Biol Lett* 9:221-238.
- Rallo, P., Tenzer, I., Gessler, C., Baldoni, L., Dorado, G., and Martin, A., 2003. Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. *Theor Appl Genet* 107:940-946.
- Redston, M., 2001. Carcinogenesis in the GI tract: from morphology to genetics and back again. *Mod. Pathol.* 14:236-245.
- Rehder, A., 1954. *Manual of Cultivated Trees and Shrubs*, MacMillan and Co., Toronto.
- Resta, P., Corona, M.G., Fanizza, G., Palasciano, M., and Godini, A., 1998. Random amplified DNA polymorphism in *Amygdalus communis* L. and *A. webbii* Spach. *Acta Horticulturae* 470:82-90.
- Richard, G.F. and Paques, F., 2000. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *Embo Reports* 1:122-126.
- Richards, C., Volk, G., Reilley, A., Henk, A., Lockwood, D., Reeves, P., and Forsline, P., 2009. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genetics & Genomes* 5:339-347.
- Rico, C., Rico, I., and Hewitt, G., 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of Royal Society of London B: Biological Sciences* 263:549-557.
- Roa, A., Chavarriaga-Aguirre, P., Duque, M.C., Maya, M.M., Bonierbale, M.W., Iglesias, C., and Tohme, J., 2000. Cross species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. *American Journal of Botany* 87:1647-1655.
- Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., and Ganal, M.W., 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.
- Röder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., and Ganal, M.W., 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246:327-333.
- Rohrer, J.R., Ahmad, R., Southwick, S.M., and Potter, D., 2004. Microsatellite analysis of relationships among North American plums (*Prunus* sect. *Prunocerasus*, Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution* 244:69-75.
- Rojas, G., Mendez, M.A., Munoz, C., Lemus, G., and Hinrichsen, P., 2008. Identification of a minimal microsatellite marker panel for the fingerprinting of peach and nectarine cultivars. *Electron. J. Biotechnol.* 11:12.
- Romero, C., Llacer, G., Badenes, M.L., and Pedryc, A., 2006. Relationship among apricot cultivars from Hungary and a South European pool determined by SSR markers, p. 233-239. In: Audergon, J. M. (ed.), *Proceedings of the Xiith Isht Symposium on Apricot Culture and Decline*, Vols 1 and 2.
- Romero, C., Pedryc, A., Munoz, V., Llacer, G., and Badenes, M.L., 2003. Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. *Genome* 46:244-252.
- Rongwen, J., Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Lavi, U., and Gregan, P.B., 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90:43-48.
- Rose, O. and Falush, D., 1998. A threshold size for microsatellite expansion. *Molecular Biology and Evolution* 15:613-615.
- Rousseau-Guetin, M., Lerceteau-Kohler, E., Barrot, L., Sargent, D.J., Monfort, A., Simpson, D., Arus, P., Guerin, G., and Denoyes-Rothan, B., 2008. Comparative Genetic Mapping Between Octoploid and Diploid *Fragaria* Species Reveals a High Level of Colinearity Between Their Genomes and the Essentially Disomic Behavior of the Cultivated Octoploid Strawberry. *Genetics* 179:2045-2060.
- Saal, B. and Wricke, G., 1999. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.). *Genome* 42:964-972.
- Saha, M., Cooper, J., Mian, M., Chekhovskiy, K., and May, G., 2006. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 113:1449-1458.

- Sánchez-Pérez, R., Ballester, J., Dicenta, F., Arús, P., and Martínez-Gomez, P., 2006a. Comparison of SSR polymorphisms using automated capillary sequencers, and polyacrylamide and agarose gel electrophoresis: Implications for the assessment of genetic diversity and relatedness in almond. *Scientia Horticulturae* 108:310-316.
- Sánchez-Pérez, R., Dicenta, F., Ruiz, C., Ballester, J., Arús, A., and Martínez-Gómez, P., 2005b. Variability and inheritance of peach SSR sequences in almond genotypes. *Options Méditerranéennes Série A, Numéro 63*:275-280.
- Sánchez-Pérez, R., Howad, W., Dicenta, F., Arús, P., and Martínez-Gómez, P., 2007. Mapping major genes and quantitative trait loci controlling agronomic traits in almond. *Plant Breeding* 126:310-318.
- Sánchez-Pérez, R., Martínez-Gomez, P., Dicenta, F., Egea, J., and Ruiz, D., 2006b. Level and transmission of genetic heterozygosity in apricot (*Prunus armeniaca* L.) explored using simple sequence repeat markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:763-770.
- Sánchez-Pérez, R., Ruiz, D., Dicenta, F., Egea, J., and Martínez-Gómez, P., 2005a. Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships. *Scientia Horticulturae* 103 305-315.
- Santibáñez-Koref, M.F., Gangeswaran, R., and Hancock, J.M., 2001. A relationship between lengths of microsatellites and nearby substitution rates in mammalian genomes. *Mol. Biol. Evol.* 18:2119-2123.
- Sargent, D.J., Cipriani, G., Vilanova, S., Gil-Ariza, D., Arús, P., Simpson, D.W., Tobutt, K.R., and Monfort, A., 2008. The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference mapping population FV×FN. *Genome* 51:120-127.
- Sargent, D.J., Clarke, J., Simpson, D.W., Tobutt, K.R., Arús, P., Monfort, A., Vilanova, S., Denoyes-Rothan, B., Rousseau, M., Folta, K.M., Bassil, N.V., and Battey, N.H., 2006. An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 112:1349-1359.
- Sargent, D.J., Davis, T.M., Tobutt, K.R., Wilkinson, M.J., Battey, N.H., and Simpson, D.W., 2004a. A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 109:1385-1391.
- Sargent, D.J., Fernández-Fernández, F., Ruiz-Roja, J., Sutherland, B., Passey, A., Whitehouse, A., and Simpson, D., 2009a. A genetic linkage map of the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) and its comparison to the diploid *Fragaria* reference map. *Molecular Breeding* 24:293-303.
- Sargent, D.J., Hadonou, A.M., and Simpson, D.W., 2003. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers from *Fragaria viridis*, a wild diploid strawberry. *Molecular Ecology Notes* 3:550-552.
- Sargent, D.J., Hadonou, A.M., Wilkinson, M.J., Battey, N.H., Hawkins, J.A., and Simpson, D.W., 2004b. Cross-species amplification and phylogenetic reconstruction using *Fragaria* microsatellite primers, p. 87-92. In: Simpson, D. W. (ed.), *Proceedings of the Euro Berry Symposium - Cost 836 Final Workshop*.
- Sargent, D.J., Marchese, A., Simpson, D.W., Howad, W., Fernández-Fernández, F., Monfort, A., Arús, P., Evans, K.M., and Tobutt, K.R., 2009b. Development of "universal" gene-specific markers from *Malus* spp. cDNA sequences, their mapping and use in synteny studies within Rosaceae. *Tree Genetics & Genomes* 5:133-145.
- Sargent, D.J., Rys, A., Nier, S., Simpson, D.W., and Tobutt, K.R., 2007. The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theoretical and applied genetics* 114:373-384.
- Saveliev, A., Everett, C., Sharpe, T., Webster, Z., and Festenstein, R., 2003. DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* 422:909-913.
- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109:365-371.
- Schlötterer, C., Amos, B., and Tautz, D., 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature* 354:63-65.
- Schlötterer, C. and Harr, B., 2000. *Drosophila virilis* has long and highly polymorphic microsatellites. *Mol. Biol. Evol.* 17:1641-1646.

- Schlötterer, C. and Tautz, D., 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20:211-215
- Schlötterer, C. and Wiehe, T., 1999. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps, p. 238-248. In: GOLDSTEIN, D. and SCHLÖTTERER, C. (eds.), *Microsatellites-Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford.
- Scorza, R., Mehlenbacher, S.A., and Lightner, G.W., 1985. Inbreeding and coancestry of freestone peach cultivars of the eastern United States and implications for peach germplasm improvement. *J Am Soc Hort Sci* 110:547-552.
- Scorza, R. and Okie, W.R., 1990. Peaches (*Prunus*), p. 177-231. In: Moore, J. N. and Ballington, J. R. (eds.), *Genetic resources of temperate fruit and nut crops*. Vol. I. ISHS, Wageningen, The Netherlands.
- Scotti, I., Magni, F., Fink, R., Powell, W., Binelli, G., and Hedley, P.E., 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome* 43:41-46.
- Sehic, J., Garkava-Gustavsson, L., Fernández-Fernández, F., and Nybom, H., 2012. Genetic diversity in a collection of European pear (*Pyrus communis*) cultivars determined with SSR markers chosen by ECPGR. *Scientia Horticulturae* 145:39-45.
- Selkoe, K.A. and Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9:615-629.
- Serrano, B., Gomez-Aparisi, J., and Hormaza, J.I., 2002. Molecular fingerprinting of *Prunus* rootstocks using SSRs. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 77:368-372.
- Shimada, T., Hayama, H., Haji, T., Yamaguchi, M., and Yoshida, M., 1999. Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Euphytica* 109:143-147.
- Shimomura, K. and Hirashima, K., 2006. Development and characterization of simple sequence repeats (SSR) as markers to identify strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75:399-402.
- Shiran, B., Amirbakhtiar, N., Kiani, S., Mohammadi, S., Sayed-Tabatabaei, B.E., and Moradi, H., 2007. Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 111:280-292.
- Silfverberg-Dilworth, E., Matasci, C.L., Van de Weg, W.E., Van Kaauwen, M.P.W., Walser, M., Kodde, L.P., Soglio, V., Gianfranceschi, L., Durel, C.E., Costa, F., Yamamoto, T., Koller, B., Gessler, C., and Patocchi, A., 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics & Genomes* 2:202-224.
- Sitther, V., Zhang, D., Dhekney, S.A., Harris, D.L., Yadav, A.K., and Okie, W.R., 2012. Cultivar Identification, Pedigree Verification, and Diversity Analysis among Peach Cultivars Based on Simple Sequence Repeat Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 137:114-121.
- Skroch, P.W. and Nienhuis, J., 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor. Appl. Genet.* 91:1086-1091.
- Soriano, J.M., Romero, C., Vilanova, S., Llacer, G., and Badenes, M.L., 2005. Genetic diversity of loquat germplasm (*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl) assessed by SSR markers. *Genome* 48:108-114.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Gradziel, T., Epperson, B., Martínez-Gómez, P., and Asadi, E., 2007. Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica* 156:327-344.
- Sosinski, B., Gannavarapu, M., Hager, L.D., Beck, E., King, G.J., Ryder, C.D., Rajapakse, S., Baird, W.V., Ballard, R.E., and Abbott, A.G., 2000. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor. Appl. Genet.* 101:421-428.
- Spigler, R.B., Lewers, K.S., Johnson, A.L., and Ashman, T.-L., 2010. Comparative Mapping Reveals Autosomal Origin of Sex Chromosome in Octoploid *Fragaria virginiana*. *Journal of Heredity* 101:S107-S117.
- Spigler, R.B., Lewers, K.S., Main, D.S., and Ashman, T.L., 2008. Genetic mapping of sex determination in a wild strawberry, *Fragaria virginiana*, reveals earliest form of sex chromosome. *Heredity* 101:507-517.
- Stanys, V., Baniulis, D., Morkunaite-Haimi, S., Siksnianiene, J.B., Frercks, B., Gelvonauskiene, D., Stepulaitiene, I., Staniene, G., and Siksnianas, T., 2012.

- Characterising the genetic diversity of Lithuanian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR markers. *Scientia Horticulturae* 142:136-142.
- Staub, J.E., Serquen, F.C., and Gupta, M., 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hortscience* 31:729-741.
- Stockinger, E.J., Mulinix, C.A., Long, C.M., Brettin, T.S., and Iezzoni, A.F., 1996. A Linkage Map of Sweet Cherry Based on RAPD Analysis of a Microspore-Derived Callus Culture Population. *J Hered* 87:214-218.
- Stoeckli, S., Mody, K., Patocchi, A., Kellerhals, M., and Dorn, S., 2009. Rust mite resistance in apple assessed by quantitative trait loci analysis. *Tree Genetics & Genomes* 5:257-267.
- Stoneking, M., 2001. Single nucleotide polymorphisms: from the evolutionary past. *Nature* 409:821-822.
- Strand, M., Prolla, T.A., Liskay, R.M., and Petes, T.D., 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365:274-276.
- Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S.M., and Boritzki, M., 2003. Analysis of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivars Using SSR and AFLP Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:904-909.
- Sun, L., Yang, W., Zhang, Q., Cheng, T., Pan, H., Xu, Z., Zhang, J., and Chen, C., 2013. Genome-Wide Characterization and Linkage Mapping of Simple Sequence Repeats in Mei (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *Plos One* 8:e59562.
- Szewc-McFadden, A.K., Bliet, S., Alpha, C.G., Lamboy, W.F., and McFerson, J.R., 1995. Identification of Simple-sequence Repeats in *Malus* (Apple). *HortScience* 30:855-c.
- Szewc-McFadden, A.K., Lamboy, W.F., and McFerson, J.R., 1996. Utilization of Identified Simple Sequence Repeats (SSRs) in *Malus x domestica* (Apple) for Germplasm Characterization. *HortScience* 31:619-a.
- Tahan, O., Geng, Y.P., Zeng, L.Y., Dong, S.S., Chen, F., Chen, J., Song, Z.P., and Zhong, Y., 2009. Assessment of genetic diversity and population structure of Chinese wild almond, *Amygdalus nana*, using EST- and genomic SSRs. *Biochem. Syst. Ecol.* 37:146-153.
- Tang, J.F., Gao, L.F., Cao, Y.S., and Jia, J.Z., 2006. Homologous analysis of SSR-ESTs and transferability of wheat SSR-EST markers across barley, rice and maize. *Euphytica* 151:87-93.
- Tanksley, S.D. and Orton, T.J., 1983. *Isozyme in plant genetics and breeding*. Elsevier, New York.
- Tautz, D. and Renz, M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids Res.* 12:4127-4138.
- Tavassolian, I., Rabiei, G., Gregory, D., Mnejja, M., Wirthensohn, M., Hunt, P., Gibson, J., Ford, C., Sedgley, M., and Wu, S.-B., 2010. Construction of an almond linkage map in an Australian population Nonpareil x Lauranne. *BMC Genomics* 11:551.
- Taylor, J.S., Durkin, J.M., and Breden, F., 1999. The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. *Mol. Biol. Evol.* 16:567-572.
- Testolin, R., Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M.T., Huang, W.G., and Cipriani, G., 2004. Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. *Molecular Ecology Notes* 4:459-461.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K., and Graner, A., 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 106:411-422.
- Tobutt, K.R., Clarke, J.B., Boskovic, G., De la Rosa, R., and Boskovic, R.I., 2009. A gene for susceptibility to the fungicide azoxystrobin in apple and a tightly linked microsatellite marker. *Plant Breeding* 128:312-316.
- Treco, D. and Arnheim, N., 1986. The evolutionarily conserved repetitive sequence d(TG.AC)_n promotes reciprocal exchange and generates unusual recombinant tetrads during yeast meiosis. *Molecular and Cell Biology* 6:3934-3947.
- Trifonov, E.N., 2003. Tuning function of tandemly repeating sequences: a molecular device for fast adaptation, p. 1-24. In: Wasser, S. P. (ed.), *Evolutionary theory and processes: modern horizons, papers in honor of Eviatar Nevo*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

- Tsuda, Y., Ueno, S., Kato, S., Katsuki, T., Mukai, Y., and Tsumura, Y., 2009. Development of 13 EST-SSRs for *Cerasus jamasakura* and their transferability for Japanese flowering cherries. *Conservation Genetics* 10:685-688.
- Turkoglu, Z., Koc, A., Ercisli, S., Bilgener, S., Akbulut, M., Yildirim, N., Gercekcioğlu, R., Esitken, A., and Gunes, M., 2012. Genetic relationships among *Prunus* rootstocks for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Plant Genetic Resources-Characterization and Utilization* 10:101-107.
- Urbanovich, O.Y., Kazlouvskaia, Z.A., Yakimovich, O.A., and Kartel, N.A., 2011. Polymorphism of SSR alleles in pear cultivars grown in Belarus. *Russian Journal of Genetics* 47:305-313.
- Urrestarazu, J., Miranda, C., Santesteban, L., and Royo, J.B., 2012. Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes* 8:1163-1180.
- Valmor, J.B., Venturi, S., Fachinello, J.C., Tariatini, S., and Sansavini, S., 2002. Molecular AFLP and SSR markers resolve for genetic identification of plum cultivars. I marcatori AFLP e SSR, risolutivi nella identificazione genetica delle varietà di susino. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* 64:83-87.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., and Verbrugh, H., 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:275-293.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., and Shipley, P., 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4:535-538.
- van Treuren, R., Kemp, H., Ernsting, G., Jongejans, B., Houtman, H., and Visser, L., 2010. Microsatellite genotyping of apple (*Malus x domestica* Borkh.) genetic resources in the Netherlands: application in collection management and variety identification. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57:853-865.
- Varshney, R.K., Thiel, T., Stein, N., Langridge, P., and Graner, A., 2002. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7:537-546.
- Vassileva, V., Millar, A., Briollais, L., Chapman, W., and Bapat, B., 2002. Genes involved in DNA repair are mutational targets in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 62:4095-4099.
- Vaughan, S.P. and Russell, K., 2004. Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Molecular Ecology Notes* 4:429-431.
- Vavilov, N.I., 1930. Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan and Caucasus and the problem of the region of fruit trees, p. 271-286, 9th International Horticultural Congress report and proceedings, London.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S.K., Troggio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoy, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli, M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini, E., Eldredge, G., Fitzgerald, L.M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J.T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niazi, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaeffer, S., Krishnan, V., Wu, C., Chu, V.T., King, S.T., Vick, J., Tao, Q., Mraz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchiotti, A., Kater, M.M., Masiero, S., Lasserre, P., Lespinasse, Y., Allan, A.C., Bus, V., Chagne, D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Lavezzo, E., Fawcett, J.A., Proost, S., Rouze, P., Sterck, L., Toppo, S., Lazzari, B., Hellens, R.P., Durel, C.-E., Gutin, A., Bumgarner, R.E., Gardiner, S.E., Skolnick, M., Egholm, M., Van de Peer, Y., Salamini, F., and Viola, R., 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus [times] domestica* Borkh.). *Nat Genet* 42:833-839.
- Vendramin, E., Dettori, M.T., Giovinazzi, J., Micali, S., Quarta, R., and Verde, I., 2007. A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species. *Molecular Ecology Notes* 7:307-310.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.,

- Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Francesco, V.D., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.-R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z.Y., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M.-H., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., et al., 2001. The Sequence of the Human Genome. *Science* 291:1304-1351.
- Verde, I., Abbott, A.G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., Marroni, F., Zhebentyayeva, T., Dettori, M.T., Grimwood, J., Cattonaro, F., Zuccolo, A., Rossini, L., Jenkins, J., Vendramin, E., Meisel, L.A., Decroocq, V., Sosinski, B., Prochnik, S., Mitros, T., Policriti, A., Cipriani, G., Dondini, L., Ficklin, S., Goodstein, D.M., Xuan, P., Fabbro, C.D., Aramini, V., Copetti, D., Gonzalez, S., Horner, D.S., Falchi, R., Lucas, S., Mica, E., Maldonado, J., Lazzari, B., Bielenberg, D., Pirona, R., Miculan, M., Barakat, A., Testolin, R., Stella, A., Tartarini, S., Tonutti, P., Arus, P., Orellana, A., Wells, C., Main, D., Vizzotto, G., Silva, H., Salamini, F., Schmutz, J., Morgante, M., and Rokhsar, D.S., 2013. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat Genet* 45:487-494.
- Verde, I., Bassil, N., Scalabrin, S., Gilmore, B., Lawley, C., Gasic, K., Micheletti, D., Rosyara, U., Cattonaro, F., Vendramin, E., Main, D., Aramini, V., Blas, A.L., Mockler, T.C., Bryant, D.W., Wilhelm, L., Troggio, M., Sosinski, B., Aranzana, M.J., Arús, P., Iezzoni, A., Morgante, M., and 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 (4):e35668.
- Verde, I., Lauria, M., Dettori, M., Vendramin, E., Balconi, C., Micali, S., Wang, Y., Marrazzo, M., Cipriani, G., Hartings, H., Testolin, R., Abbott, A., Motto, M., and Quarta, R., 2005. Microsatellite and AFLP markers in the *Prunus persica* [L. (Batsch)]×*P. ferganensis* BC1 linkage map: saturation and coverage improvement. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 111:1013-1021.
- Verde, I., Vendramin, E., Dettori, M.T., Quarta, R., Wang, Y., Lecouls, A.C., and Abbott, A.G., 2004. Target SSR Development in Peach and SSRs Mapping in a Peach BC1 Progeny. *Acta Horticulturae: XI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics* 663:63-68.
- Vezevaei, A., Clarke, G., and Jackson, J., 1994. Characterisation of Australian almond cultivars and comparison with Californian cultivars by isozyme polymorphism. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 34:511-514.
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., and Eggen, A., 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34:275-305.
- Vilanova, S., Romero, C., Abbott, A.G., Llacer, G., and Badenes, M.L., 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. *Theor Appl Genet* 107:239-247.
- Vilanova, S., Sargent, D.J., Arús, P., and Monfort, A., 2008. Synteny conservation between two distantly-related Rosaceae genomes: *Prunus* (the stone fruits) and *Fragaria* (the strawberry). *BMC Plant Biology* 8:67-79.
- Vilanova, S., Soriano, J.M., Lalli, D.A., Romero, C., Abbott, A.G., Llacer, G., and Badenes, M.L., 2006. Development of SSR markers located in the G1 linkage group of apricot (*Prunus armeniaca* L.) using a bacterial artificial chromosome library. *Molecular Ecology Notes* 6:789-791.
- Vinatzer, B.A., Patocchi, A., Tartarini, S., Gianfranceschi, L., Sansavini, S., and Gessler, C., 2004. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the Vf scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm. *Plant Breeding* 123:321-326.

- Viruel, M.A., Messeguer, R., Vicente, M.C., Garcia-Mas, J., Puigdomènech, P., Vargas, F., and Arús, P., 1995. A linkage map with RFLP and isozyme markers for almond. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 91:964-971.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Wahls, W., Wallace, L.J., and Moore, D., 1990. The Z-DNA motif d(TG)₃₀ promotes reception of information during gene conversion events while stimulating homologous recombination in human cells in culture. *Molecular and Cell Biology* 10:785-793.
- Wang, D., Karle, R., Brettin, T.S., and Iezzoni, A.F., 1998. Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 97:1217-1224.
- Wang, H., Walla, J.A., Zhong, S., Huang, D., and Dai, W., 2012. Development and cross-species/genera transferability of microsatellite markers discovered using 454 genome sequencing in chokecherry (*Prunus virginiana* L.). *Plant Cell Reports* 31:2047-2055.
- Wang, Y., Georgi, L.L., Zhebentyayeva, T.N., Reighard, G.L., Scorza, R., and Abbott, A.G., 2002. High-throughput targeted SSR marker development in peach (*Prunus persica*). *Genome* 45:319-328.
- Wang, Z., Kang, M., Liu, H., Gao, J., Zhang, Z., Li, Y., Wu, R., and Pang, X., 2014a. High-Level Genetic Diversity and Complex Population Structure of Siberian Apricot (*Prunus sibirica* L.) in China as Revealed by Nuclear SSR Markers. *Plos One* 9.
- Wang, Z., Liu, H., Liu, J., Li, Y., Wu, R., and Pang, X., 2014b. Mining new microsatellite markers for Siberian apricot (*Prunus sibirica* L.) from SSR-enriched genomic library. *Scientia Horticulturae* 166:65-69.
- Warburton, M.L. and Bliss, F.A., 1996. Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 121:1012-1019.
- Ward, J., Bhangoo, J., Fernández-Fernández, F., Moore, P., Swanson, J.D., Viola, R., Velasco, R., Bassil, N., Weber, C., and Sargent, D., 2013. Saturated linkage map construction in *Rubus idaeus* using genotyping by sequencing and genome-independent imputation. *BMC Genomics* 14:1-14.
- Watkins, R., 1976. Cherry, plum, peach, apricot, and almond, p. 242-247. In: Simmonds, N. W. (ed.), *Evolution of Crop Plants*. Longman, New York.
- Webster, A.D., 1996. The taxonomic classification of sweet and sour cherries and a brief history of their cultivation, p. 3-24. In: A.D. Webster and N.E. Looney (eds.), *Cherries: Crop Physiology, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, Oxon.
- Webster, M.T., Smith, G.C., and Ellegren, H., 2002. Microsatellite evolution inferred from human - chimpanzee genomic sequence alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8748-8753.
- White, G. and Powell, W., 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. *Molecular Ecology* 6:851-860.
- Wierdl, M., Dominska, M., and Thomas, D.P., 1997. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Theor. Popul. Biol.* 53:272-283.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic-markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- Wöhrmann, T., Guicking, D., Khoshbakht, K., and Weising, K., 2011. Genetic variability in wild populations of *Prunus divaricata* Ledeb. in northern Iran evaluated by EST-SSR and genomic SSR marker analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58:1157-1167.
- Woodhead, M., McCallum, S., Smith, K., Cardle, L., Mazzitelli, L., and Graham, J., 2008. Identification, characterisation and mapping of simple sequence repeat (SSR) markers from raspberry root and bud ESTs. *Molecular Breeding* 22:555-563.
- Woolley, F.M., Collins, G.G., and Sedgley, M., 2000. Application of DNA fingerprinting for the classification of selected almond *Prunus dulcis* (Miller) D. A. Webb] cultivars. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 40:995-1001.
- Wright, T.F., Johns, P.M., Walters, J.R., Lerner, A.P., Swallow, J.G., and Wilkinson, G.S., 2004. Microsatellite variation among divergent populations of stalk-eyed flies, genus *Cyrtodopsis*. *Genet. Res.* 84:27-40.

- Wu, S.-B., Franks, T.K., Hunt, P., Wirthensohn, M.G., Gibson, J.P., and 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, S.-B., Tavassolian, I., Rabiei, G., Hunt, P., Wirthensohn, M., Gibson, J.P., Ford, C.M., and Sedgley, M., 2009. Mapping SNP-anchored genes using high-resolution melting analysis in almond. *Molecular Genetics and Genomics* 282:273-281.
- Wu, S.-B., Wirthensohn, M.G., Hunt, P., Gibson, J.P., and Sedgley, M., 2008. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 118:1-14.
- Wünsch, A., 2009. SSR markers for fingerprinting *Prunus* species. *Acta Horticulturae*:689-694.
- Wünsch, A., Carrera, M., and Hormaza, J.I., 2006. Molecular characterization of local spanish peach [*Prunus persica* (L.) batsch] germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:925-932.
- Wünsch, A. and Hormaza, J.I., 2002. Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity* 89:56-63.
- Wyman, A.R. and White, R., 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:6754-6758.
- Xie, H., Sui, Y., Chang, F.Q., Xu, Y., and Ma, R.C., 2006. SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* 112:366-372.
- Xu, Y., Ma, R.C., Xie, H., Liu, J.T., and Cao, M.Q., 2004. Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. *Genome* 47:1091-1104.
- Yakovin, N.A., Fesenko, I.A., Isachkin, A.V., and Karlov, G.I., 2011. Polymorphism of Microsatellite Loci in Cultivars and Species of Pear (*Pyrus* L.). *Russian Journal of Genetics* 47:564-570.
- Yamada, T., Koyama, T., Ohwada, S., Tago, K., Sakamoto, I., Yoshimura, S., Hamada, K., Takeyoshi, I., and Morishita, Y., 2002. Frameshift mutations in the MBD4/MED1 gene in primary gastric cancer with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Lett.* 181:115-120.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Sawamura, Y., Kotobuki, K., Ban, Y., Hayashi, T., and Matsuta, N., 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 102:865-870.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Sawamura, Y., Manabe, T., Kotobuki, K., Hayashi, T., Ban, Y., and Matsuta, N., 2002a. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica* 124:129-137.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Shoda, M., Ban, Y., Hayashi, T., and Matsuta, N., 2002b. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Molecular Ecology Notes* 2:14-16.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Shoda, M., Imai, T., Saito, T., Sawamura, Y., Kotobuki, K., Hayashi, T., and Matsuta, N., 2002c. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 106:9-18.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Terakami, S., Nishitani, C., Sawamura, Y., Saito, T., Kotobuki, K., and Hayashi, T., 2007. Integrated Reference Genetic Linkage Maps of Pear Based on SSR and AFLP Markers. *Breeding Science* 57:321-329.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Saito, T., Kotobuki, K., Matsuta, N., Liebhard, R., Gessler, C., van de Weg, W.E., and Hayashi, T., 2004. Genetic linkage maps of Japanese and European pears aligned to the apple consensus map, p. 51-56. In: Laurens, F. and Evans, K. (eds.), *Proceedings of the Xith Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*, Vols 1 and 2.
- Yamamoto, T., Mochida, K., Imai, T., Haji, T., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Matsuta, N., Ogiwara, I., and Hayashi, T., 2003. Parentage analysis in Japanese Peaches using SSR Markers. *Breeding Science* 53:35-40.
- Yamamoto, T., Mochida, K., Imai, T., Shi, Y.Z., Ogiwara, I., and Hayashi, T., 2002d. Microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] derived from an enriched genomic and cDNA libraries. *Molecular Ecology Notes* 2:298-301.

- Yao, L.H., Zheng, X.Y., Cai, D.Y., Gao, Y.A., Wang, K., Cao, Y.F., and Teng, Y.W., 2010. Exploitation of Malus EST-SSRs and the utility in evaluation of genetic diversity in Malus and Pyrus. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57:841-851.
- Yilmaz, K.U., Paydas-Kargi, S., Dogan, Y., and Kafkas, S., 2012. Genetic diversity analysis based on ISSR, RAPD and SSR among Turkish Apricot Germplasms in Iran Caucasian eco-geographical group. *Scientia Horticulturae* 138:138-143.
- Yoon, J.H., Liu, D.C., Song, W.S., Liu, W.S., Zhang, A.M., and Li, S.H., 2006. Genetic diversity and ecogeographical phylogenetic relationships among peach and nectarine cultivars based on simple sequence repeat (SSR) markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131:513-521.
- Zamani, Z., Shahi-Gharahlar, A., Fatahi, R., and Bouzari, N., 2012. Genetic relatedness among some wild cherry (*Prunus* subgenus *Cerasus*) genotypes native to Iran assayed by morphological traits and random amplified polymorphic DNA analysis. *Plant Systematics and Evolution* 298:499-509.
- Zane, L., Bargelloni, L., and Patarnello, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.
- Zeinalabedini, M., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Gradziel, T.M., and Martínez-Gómez, P., 2010. The origin and dissemination of the cultivated almond as determined by nuclear and chloroplast SSR marker analysis. *Scientia Horticulturae* 125:593-601.
- Zeinalabedini, M., Majourhat, K., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Toorchi, M., Dicenta, F., and Martínez-Gomez, P., 2007. Molecular characterization of almond cultivars and related wild species using nuclear and chloroplast DNA markers. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 5:242-247.
- Zhang, L.H., Byrne, D.H., Ballard, R.E., and Rajapakse, S., 2006. Microsatellite marker development in rose and its application in tetraploid mapping. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131:380-387.
- Zhang, L.Y., Bernard, M., Leroy, P., Feuillet, C., and Sourdille, P., 2005. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. *Theoretical and Applied Genetics* 111:677-687.
- Zhang, Q., Li, J., Zhao, Y., Korban, S., and Han, Y., 2012. Evaluation of Genetic Diversity in Chinese Wild Apple Species Along with Apple Cultivars Using SSR Markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 30:539-546.
- Zhang, Q., Yan, G., Dai, H., Zhang, X., Li, C., and Zhang, Z., 2008. Characterization of Tomentosa cherry (*Prunus tomentosa* Thunb.) genotypes using SSR markers and morphological traits. *Scientia Horticulturae* 118:39-47.
- Zhang, Q.-P., Liu, D.-C., Liu, S., Liu, N., Wei, X., Zhang, A.-M., and Liu, W.-S., 2014. Genetic diversity and relationships of common apricot (*Prunus armeniaca* L.) in China based on simple sequence repeat (SSR) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 61:357-368.
- Zhang, R.-p., Wu, J., Li, X.-g., Khan, M.A., Chen, H., Korban, S., and Zhang, S.-l., 2013. An AFLP, SRAP, and SSR Genetic Linkage Map and Identification of QTLs for Fruit Traits in Pear (*Pyrus* L.). *Plant Molecular Biology Reporter* 31:678-687.
- Zhebentyayeva, T.N., Reighard, G.L., Gorina, V.M., and Abbott, A.G., 2003. Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. *Theor Appl Genet* 106:435-444.
- Zienoddiny, S., Ryberg, D., Gazdar, A.F., and Haugen, A., 1999. DNA mismatch binding in human lung tumor cell lines. *Lung Cancer* 26:15-25.
- Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T., 2000. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience* 23:217-247.
- Zohary, D. and Hopf., M., 1993. Domestication of plants in the Old World, Oxford Univ. Press, Oxford.
- Zorrilla-Fontanesi, Y., Cabeza, A., Torres, A.M., Botella, M.A., Valpuesta, V., Monfort, A., Sanchez-Sevilla, J.F., and Amaya, I., 2011. Development and bin mapping of strawberry genic-SSRs in diploid *Fragaria* and their transferability across the *Rosoideae* subfamily. *Molecular Breeding* 27:137-156.
- Zucchi, M.I., Brondani, R.P.V., Pinheiro, J.B., Brondani, C., and Vencovsky, R., 2002. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus*, spp. to *Eugenia dysenterica* (*Myrtaceae* family). *Molecular Ecology Notes* 2:512-513.

OBJETIVOS

La presente tesis tiene como principales objetivos:

1- Desarrollar nuevos marcadores de tipo microsatélite en *Prunus* usando genotecas de ADN enriquecidas (almendro y ciruelo japonés) y secuencias microsatélites en las bases de datos de ESTs (melocotonero y almendro).

2- Estudiar la transferibilidad de los microsatélites de *Prunus* a las especies cultivadas de las rosáceas, incluyendo seis especies de *Prunus*, y tres de otros géneros: manzano (*Malus x domestica*), peral (*Pyrus comunis*) y fresa octoploide (*Fragaria x ananassa*).

3- Aplicar los microsatélites desarrollados al estudio de la variabilidad molecular del almendro y del ciruelo japonés.

CAPÍTULO I
DESARROLLO DE
MICROSATÉLITES

PRIMER NOTE

Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites

M. MNEJJA, J. GARCIA-MAS, W. HOWAD and P. ARÚS

*Departament de Genètica Vegetal, Laboratori de Genètica Molecular Vegetal, CSIC-IRTA, Carretera de Cabrils s/n; 08348 Cabrils (Barcelona), Spain***Abstract**

We report 47 new simple sequence repeats (SSRs) obtained from a CT/AG enriched genomic library of almond cv. Texas (syn. Mission). Forty-two of them were polymorphic in a sample of eight almond cultivars and 31 of these were single-locus. The average values of the number of alleles per locus (6.6), and mean observed (65%) and expected (76%) heterozygosities for these 31 SSRs indicated a high level of variability. All cultivars studied could be individually identified using any one of the five SSRs. Transportability to other *Prunus* species (peach, sweet cherry, Japanese plum and apricot) was also high (83–100%).

Keywords: almond, microsatellites, polymorphism, *Prunus dulcis*, transportability

Received 20 January 2005; revision accepted 17 February 2005

Almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb, syn. *Prunus amygdalus* Batsch] is an old crop cultivated in the Mediterranean Basin and similar climate regions of North America, Central and south-western Asia, Middle East and Australia. Due to its self-incompatible system that requires cross-pollination for seed production, and its vegetative propagation as a crop, the almond has maintained a high level of genetic variability (Byrne 1990).

Simple sequence repeats (SSRs) are highly polymorphic, codominant, easily reproducible and often single-locus markers widely used for variability analysis and other applications in genetics and breeding. SSRs have been obtained for most *Prunus* species including peach, cherry, apricot, Japanese plum and almond, and 185 of them are currently located in the reference map of this genus (Dirlewanger *et al.* 2004).

A set of 44 almond SSRs obtained from an AC-repeat enriched library was recently developed by Testolin *et al.* (2004). In this paper, we report the identification of 47 additional SSRs derived from a library enriched for AG/TC motifs, constructed with DNA from the almond cultivar 'Texas' using the method based on biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles described in Mnejja *et al.* (2004). Primer pairs were designed from the regions flanking the microsatellite,

to be 18–22 bp long with an annealing temperature between 45 °C and 65 °C (optimum 60 °C) and to give an expected product size of 100–200 bp, using the program PRIMER 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

Polymerase chain reactions (PCR) for polymorphism testing were in a total volume of 15 µL containing 20 ng of DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.001% gelatine, 0.4 µM of each specific primer, 133 µM of dATP, dTTP and dGTP, 1.6 µM dCTP, 1 U of *Taq* DNA polymerase (PE Applied Biosystems) and 0.5 µCi of α³²P dCTP. The adopted PCR profile was as follows: 94 °C for 1 min, 35 cycles at 94 °C for 30 s, annealing temperature for 30 s and 72 °C for 30 s, and a final extension step at 72 °C for 5 min. Denatured PCR products were separated by electrophoresis in denaturing 6% polyacrilamide sequencing gels at a constant power of 100 W for 2 h. A radioactively labelled 30–330 bp DNA ladder (Gibco BRL, Invitrogen) was used to define allele size. The polyacrilamide gel was transferred on to a Whatman 3 MM chromatography paper, vacuum dried and then exposed to X-ray film (CURIX RP2, AGFA) for 1–2 days.

To assess almond variability, we used DNA extracted from one individual of each of eight cultivars ('Aï', 'Cristomorto', 'Desmayo Langueta', 'Marcona', 'Nonpareil', 'Primorskyi', 'Ramillete' and 'Retsou') of diverse origin and morphology. SSR transferability across *Prunus* was evaluated with one cultivar from each of the four major diploid

Correspondence: Pere Arús, Fax: 34937533954;
E-mail: pere.arus@irta.es

© 2005 Blackwell Publishing Ltd

532 PRIMER NOTE

crop species of this genus: peach ('Alexandra'), Japanese plum ('Royal Diamond'), apricot ('Goldrich') and sweet cherry ('Lapins'). DNA extraction was from young leaves as described in Doyle & Doyle (1990), without the final RNase treatment step.

SSR terminology used was analogous to that of Mnejja *et al.* (2004) with a five-letter code (C for Cabrils, PD for *P. dulcis*, and CT for the microsatellite repeat selected) followed by a three-digit number.

After the enrichment procedure, a total of 218 of the 338 (64.5%) recombinant colonies randomly chosen contained the (CT)_n microsatellite, of which, 91 were sequenced.

Primer pairs were designed for 52 of them (57.1%). The remaining 39 sequences were discarded due to redundancy (27 clones), length of the microsatellite (< 8 repeats) (1), length of the flanking sequences (7) or poor quality of the sequences (4). Amplification was successful for 47 microsatellites (90.4%). Thirty-five of the amplified SSRs were perfect (simple and with no interruption in the repeat sequence), with a number of repeats ranging from nine to 30 CT/GA, and an average of 18 repeats per microsatellite.

Five of the 47 SSRs (10.6%) were monomorphic and 11 (23.4%) were polymorphic but detected more than one locus (Table 1). The parameters of variability shown in

Table 1 Primer sequences, repetition motif, annealing temperature (T_a), PCR product sizes and polymorphism of 47 almond microsatellites

Locus/GenBank Accession no.	Primer sequence (5'-3')	T_a (°C)	Size (bp)	Repeat motif
CPDCT001+/ AY862438	F: CCTGCGTAGAAGAAGGTAGCA R: GTATGAAATGCCTGGCCACT	47	165	(GA) ₃₀
CPDCT002+/ AY862439	F: CAGCAATGTTTATGACAGGGTAA R: TGAATAATTTGGATTGCGAAGG	47	147	(CT) ₂₇
CPDCT003/ AY862440	F: GCGCTCGCTGAATGTAGTTT R: ACTCACTCCGCATTTTCATCA	62	167	(GA) ₁₀ -(GA) ₁₁
CPDCT004/ AY862441	F: TCTCAGGTTTCGTATCCCTCT R: GCCCATTTTGTGTGTGTCAA	62	151	(CT) ₁₉
CPDCT005/ AY862442	F: TTCAAGGAGAAGGCCTGAAA R: ATTGTGGTTTCCAACCAATG	62	114	(CT) ₁₄
CPDCT006/ AY862443	F: GTCCTCTCTCCAGCTTCTCT R: GGTTTAGCGCAAAAGCTTCA	62	190	(CT) ₁₂ -(CT) ₅
CPDCT007/ AY862444	F: TGCAAGTTGAATGTGGCAAT R: CTTTGGGTAGTGCAGGGATG	62	164	(GA) ₁₉
CPDCT008/ AY862445	F: GAAGCAGCCATTCTAGTGC R: TGTTTATGGACCTTAGTAGTCTGG	62	191	(GA) ₁₈
CPDCT009+/ AY862446	F: GCTTGAAAAGGGTCTCCTA R: CCACCTCAGTTTGGACAATGAA	52	183	(GA) ₂₁
CPDCT010+/ AY862447	F: AAGACAGAGGGGACAGAGCA R: CGCGCGGAGAGATAATAGAC	62	189	(CT) ₅ -(CT) ₉ -(CT) ₅
CPDCT011*/ AY862448	F: ATGGTCTAAAAACCGCAAG R: GGAGATCAAGACCCCTGT	62	176	(TC) ₆ -(CT) ₈
CPDCT012*/ AY862449	F: CAGACCGTCGTGTGAAGTC R: GACCCGAATCGGAGTTGTAA	62	198	(GA) ₁₂
CPDCT013*/ AY862450	F: GTTTTAGAAACCTCATTCCAACTT R: AATTCTAACACTGGGTATTGT	62	100	(CT) ₁₄
CPDCT014/ AY862451	F: TGCAAAGAAAAACGGAGAGG R: GAAACTCAGTGGCACAATCG	62	154	(GA) ₂₅
CPDCT015*/ AY862452	F: GAAACTCAGTGGCACAATCG R: GCAGGAGTTTCGAAAGGAAG	62	158	(CT) ₂₀
CPDCT016/ AY862453	F: GGAAACCTGATTAGGGCACTT R: GGTCTGCTATACTGACCTAGGATT	62	196	(GA) ₁₉
CPDCT017/ AY862454	F: CGTGCCACGAGAATGAGAAT R: CCAGGACTTAGGAGGTGTCG	62	179	(GA) ₁₃
CPDCT018/ AY862455	F: AATTTCTTTTGTAGGATAATACA R: TTTGCATATGAAAATTTGTGG	47	200	(CT) ₁₅
CPDCT019/ AY862456	F: AAAACTCCTCTCCTTTTCCCTTT R: TCTTCTCACCACCTCAAGC	62	153	(CT) ₂₄
CPDCT020*/ AY862457	F: TTGAATCGGAGTTGGAAAGAA R: CGTGCTGGGAGAATCGT	62	199	(CT) ₅ -(TC) ₄ -(TC) ₆ -(CT) ₅

Table 1 Continued

Locus/GenBank Accession no.	Primer sequence (5'-3')	T _a (°C)	Size (bp)	Repeat motif
CPDCT021*/ AY862458	F: GATGGTACCTGAAGCGGAGGA R: TGGTCTAAATACCGCGAAGG	52	200	(GA) ₈ -(GA) ₄
CPDCT022/ AY862459	F: TGATCGGCGTCTCCTTTATC R: AAAGCAAGCAGGCAAATGAA	62	152	(CT) ₁₇
CPDCT023/ AY862460	F: GTGGCAAATGTTGGCAAAG R: AACACAAAGCAGCACCAAGA	62	172	(GA) ₉
CPDCT024/ AY862461	F: TGAATCTTTAAATCACCCGACT R: CTGCTTGCTTGCCTTCACCT	62	188	(CT) ₁₉ -(CT) ₃
CPDCT025/ AY862462	F: GACCTCATCAGCATCACCAA R: TTCCCTAACGTCCCTGACAC	62	172	(CT) ₁₀
CPDCT026+/ AY862463	F: AGGCTGAAGCTCCAGCACTC R: GAGGTGGAAGCCATGTTTG	58	132	(GA) ₁₅
CPDCT027/ AY862464	F: TGAGGAGAGCACTGGAGGAG R: CAACCGATCCCTCTAGACCA	62	174	(CT) ₁₉
CPDCT028/ AY862465	F: TGAACGTTGCACTCCTTCAC R: ACCACCACCATTAACCACCAT	62	171	(GA) ₁₉
CPDCT029/ AY862466	F: CAATCAAACCACCACAACCA R: CGCAACGCTGTTTCTCTTTT	62	193	(GA) ₂₁
CPDCT030*/ AY862467	F: CAAGGGGCTCTCAAAGGAT R: TTCTCCTGATTCCCATTCG	58	192	(GA) ₁₈
CPDCT031/ AY862468	F: AATTCATAAATCAACAAATCAACA R: GCAGAGCTTTTGGGTCAACT	62	179	(GA) ₂₂
CPDCT032*/ AY862469	F: TCAGTCTCTTTCTCCTCACG R: GGAAATCGGCTAGCCTTGAT	62	185	(CT) ₅ -(CT) ₆ -(CT) ₆ -(CT) ₆
CPDCT033/ AY862470	F: CAAAACACAAAACCACCA R: ATTCGGGGAGTCAATCAGG	62	132	(CT) ₁₈
CPDCT034/ AY862471	F: GAGAACCPTTTGTTTGGCCTTA R: CGTCGTATTTAGTGCCGPTG	62	165	(CT) ₄ -(CT) ₇ -(CT) ₆
CPDCT035/ AY862472	F: TCGAAGGAGGATGAAGTTGC R: ATATCACGAGGGGCAAAATG	62	146	(GA) ₁₇
CPDCT036*/ AY862473	F: GAGAGGGAAGAGAGGTGGT R: TGGCAAAAATGGTAATTTGA	58	200	(GA) ₁₅ -(GA) ₇
CPDCT037/ AY862474	F: TGCTCAACATGGCAAACATT R: CAACTCACCTTCAGCAGCAA	62	164	(CT) ₁₀ -(CT) ₄ -(CT) ₄
CPDCT038/ AY862475	F: ATCACAGGTGAAGGCTGTGT R: CAGATTCATTTGGCCATCTT	62	181	(GA) ₂₅
CPDCT039/ AY862476	F: GGGAGAGAGGAGGAGAGTGG R: CAACCTCCAATTTCTTCGACA	62	142	(GA) ₁₅
CPDCT040/ AY862477	F: TGATGAGGCTAGAAATTGGA R: CACAGCAATCAGCAAAAAGC	62	164	(GA) ₂₄
CPDCT041/ AY862478	F: TGTTTGACAGCTTTTGTAAAGC R: TGGAGGGGTACAAGGAACAA	58	141	(GA) ₃ -(GA) ₁₂ -(GA) ₅
CPDCT042/ AY862479	F: ACGCGTTACAAGTGAGATGC R: TTGAAAAATCTTGATGGACGTG	62	194	(GA) ₂₇
CPDCT043*/ AY862480	F: CCTTCGTGAGTGTCCACCTG R: AGGCTCTGACTATCCACGATCT	62	118	(GA) ₂₁
CPDCT044/ AY862481	F: ACATGCCGGTAATTAGCAA R: AAAATGCACGTTTCGTCTCC	62	175	(GA) ₂₁
CPDCT045/ AY862482	F: TGTGGATCAAGAAAGAGAACCA R: AGGTGTGCTTGCACATGTTT	62	142	(GA) ₁₆
CPDCT046*/ AY862483	F: TGGACATCGATTGAGAAAAA R: CGCAAGGTCAAACCTTTCTCA	62	166	(GA) ₂₁
CPDCT047/ AY862437	F: TCAAAAACACCCATTATGAA R: AAACATTTAGGGCTTGTTTGG	58	174	(CT) ₁₀

*Primer pairs detecting complex (> 1 locus) and polymorphic banding patterns.

+Primer pairs producing a monomorphic pattern.

534 PRIMER NOTE

Table 2 Variability parameters for 31 single-locus microsatellites evaluated in eight almond cultivars and amplification of 'Alexandra' peach, 'Lapins' sweet cherry, 'Royal Diamond' Japanese plum and 'Goldrich' apricot

Microsatellite	A*	H_O	H_E	PD	Range of allele lengths†	Peach‡	Sweet cherry‡	Japanese plum‡	Apricot‡
CPDCT003	6	0.25	0.77	0.78	150–173	148–150	134	150–156	144
CPDCT004	5	0.63	0.66	0.81	131–153	126	–	132	–
CPDCT005	8	0.50	0.84	0.84	98–144	124	112	98–124	102–122
CPDCT006	6	0.88	0.76	0.84	176–190	180	156	–	184–186
CPDCT007	6	0.75	0.64	0.84	150–184	152–156	–	168–180	+
CPDCT008	5	0.88	0.77	0.78	179–209	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CPDCT014	8	0.63	0.80	0.88	114–152	+	106–116	–	132
CPDCT016	6	0.38	0.64	0.69	172–212	190	161	152–214	198–220
CPDCT017	6	0.50	0.76	0.84	176–204	176	194–196	178–188	–
CPDCT018	5	0.63	0.70	0.81	184–206	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CPDCT019	8	0.50	0.84	0.88	133–157	114	94	–	–
CPDCT022	6	1.00	0.77	0.78	133–161	150	146–156	158–162	138
CPDCT023	4	0.75	0.66	0.81	164–172	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CPDCT024	5	0.75	0.77	0.81	160–178	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CPDCT025	8	0.75	0.84	0.88	172–194	182	190–202	194–198	186–196
CPDCT027	6	0.63	0.77	0.84	156–176	178	166	150	152–154
CPDCT028	5	0.00	0.75	0.75	165–189	142	+	148–162	160–162
CPDCT029	7	0.38	0.65	0.69	148–216	+	+	+	174–178
CPDCT031	6	0.88	0.77	0.84	177–189	178	152	155	170
CPDCT033	6	0.75	0.75	0.84	126–150	129–135	132	122–140	118–122
CPDCT034	7	1.00	0.81	0.84	157–179	150–174	153–155	134	130
CPDCT035	10	0.50	0.81	0.78	114–164	142	126	–	124
CPDCT037	6	1.00	0.73	0.81	170–186	154–156	142	158–162	128–138
CPDCT038	5	0.13	0.76	0.78	149–181	144	162	164	148
CPDCT039	6	0.75	0.64	0.81	142–164	142	142	136	140–142
CPDCT040	7	0.38	0.84	0.84	138–170	156–160	128	140–144	134
CPDCT041	4	0.88	0.61	0.56	131–149	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CPDCT042	6	0.38	0.80	0.84	164–186	157	152	176	164
CPDCT044	7	0.88	0.80	0.78	163–185	220–222	–	222–226	–
CPDCT045	8	0.38	0.86	0.88	118–170	146–150	142	146–150	130–140
CPDCT047	10	0.88	0.87	0.88	182–204	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Average	6.60	0.65	0.78	0.84					

*A = number of alleles per locus.

†, measured in bp.

‡, measured in bp; –, weak or no amplification; n.d., no data; +, more than one locus.

Table 2 were only calculated for the 31 single-locus and polymorphic SSRs. Polymorphic microsatellites detecting two or more loci were not included in this table due to the difficulty of assigning alleles to a particular locus without previous inheritance analysis. The 31 SSRs of Table 2 amplified 198 alleles (average of 6.6 alleles/locus) in the eight almond cultivar sample. The observed and expected heterozygosity values were high, with averages of 0.65 and 0.78, respectively. Testolin *et al.* (2004) found similar average values for H_O (0.65) and H_E (0.76) and a higher average number of alleles per locus (8.4), which is most likely because they used 16 cultivars and we used eight. No homozygous null alleles were detected, although the presence of nulls may explain the significant ($P < 0.01$) deviations from Hardy–Weinberg equilibrium found in

CPDCT003, 005, 028, 035, 038, 040, 042 and 045. The power of discrimination (PD) (Kloosterman *et al.* 1993), defined as $PD = 1 - \sum g_i^2$, where g_i is the frequency of the i th genotype, had an average value of 0.84, in agreement with a high level of genetic variability in almond.

All cultivars studied could be individually differentiated using any one of CPDCT014, 019, 025, 045 or 047. Only two markers (CPDCT016 and 018) behaved as nonrandomly associated ($P < 0.01$) using a chi-squared test on the contingency table (GENEPOP software; <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>). Most almond SSRs produced a strong amplification of putative homologous products in the other *Prunus* species, 100% in peach, 88% in cherry and 84% in both Japanese plum and apricot, indicating their high level of transportability to other *Prunus* species.

Acknowledgements

This research was funded in part by project RTA01-118-C2-2 from INIA (Spain).

References

- Byrne DH (1990) Isozyme variability in four diploid stone fruits compared with other woody perennial plants. *Journal of Heredity*, **81**, 68–71.
- Dirlewanger E, Graziano E, Joobeur T *et al.* (2004) Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **101**, 9891–9896.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**, 13–15.
- Kloosterman AD, Budowle B, Daselaar P (1993) PCR-amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. *International Journal of Legal Medicine*, **105**, 257–264.
- Mnejja M, Garcia-Mas J, Howad W, Badenes ML, Arús P (2004) Simple sequence repeat (SSR) marker of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 163–166.
- 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**, 459–461.

PRIMER NOTE

Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond

M. MNEJJA,* J. GARCIA-MAS,* W. HOWAD,* M. L. BADENES† and P. ARÚS*

*Laboratori CSIC-IRTA de Genètica Molecular Vegetal, Departament de Genètica Vegetal. Carretera de Cabrils s/n; 08348 Cabrils (Barcelona), Spain; †Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial 46113 Moncada, València, Spain

Abstract

Thirty-five polymorphic microsatellites were developed using a CT/AG enriched genomic library of Japanese plum cv. Santa Rosa. Twenty-seven of them detected a single locus and eight two or more loci. A high level of variability was observed in a set of eight cultivars for the 27 single-locus microsatellites: 5.7 average number of alleles per locus; 73% mean observed heterozygosity and 74% discrimination power. Most SSRs were transferable to peach (85%) and almond (78%).

Keywords: microsatellites, polymorphism, Japanese plum, *Prunus salicina*

Received 11 November 2003; revision received 19 December 2003; accepted 19 December 2003

Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) originated in China, where it has been cultivated for several thousand years. It is also a very ancient crop in Japan and Korea. Most of the cultivars currently grown in Europe and America come from the original selections made in California at the end of the nineteenth century using Japanese materials and accessions from *P. simonii* Carr. and *P. americana* Marsh. (Okie & Ramming 1999). Isozyme genes (Byrne & Littleton 1988) and random amplified DNA polymorphism (RAPD) markers (Boonprakob *et al.* 2001) have already been used for the identification of genotypes and the study of genetic diversity in Japanese plum. In this paper, we report for the first time a set of SSR (or microsatellite) markers for *P. salicina*.

Eight cultivars of Japanese plum ('Royal Diamond', 'Early Beaut', 'Bella di Barbiano', 'The Sun', 'Obilnaja', 'Byron Gold', 'Ruby Sweet' and 'Zaiger 144') of diverse origin and morphology plus the parents of the *Prunus* reference map population (Aranzana *et al.* 2003), 'Texas' almond and 'Earlygold' peach, were used to assess SSR variability. DNA extraction from young leaves was as described in Doyle & Doyle (1990) omitting the final RNase A treatment step.

DNA from *P. salicina* cultivar Santa Rosa was used to construct a genomic library of small fragments enriched for CT repeats based on the procedure of biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles developed by Kijas *et al.* (1994), using the protocol of Aranzana *et al.* (2002), with the modification that, after *EcoRI* digestion, DNA was ligated to an *EcoRI* adapter (forward primer 5'CTCGTAGACTGCGTACC3' and reverse primer 5'AATTGGTACCGAGTCTAC3'), using 5 µM of each oligonucleotide and 5 U of T4 DNA ligase for 2 h at 20 °C. The (CT)_n enriched DNA fragments obtained were ligated to the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) and transformed into JM109 Competent Cells (Promega, Madison, WI, USA). Inserts from recombinant colonies were PCR amplified, transferred onto a Hybond N⁺ nylon membrane, hybridized with a ³³P ATP-labelled (AG)₁₅ oligonucleotide and exposed to X-ray films as described by Aranzana *et al.* (2002). Clones containing the repeat motif were sequenced using the Dye Terminator Sequencing kit (PE Applied Biosystems) in an ABI/PRISM 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems). 18–22 base pairs (bp) long primer pairs were designed using the programme PRIMER3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), with an annealing temperature between 45 and 65 °C, and giving an expected product size of 100–200 bp.

Correspondence: Pere Arús. Fax: 34937533954; E-mail: pere.arus@irta.es

© 2004 Blackwell Publishing Ltd

164 PRIMER NOTE

Table 1 Primer sequences, annealing temperature (T_a), PCR product sizes and repetition motif of 35 microsatellites developed from DNA library of Japanese plum

Locus/GenBank accession no.	Primer sequence (5'-3')	T_a (°C)	Size (bp)	Repeat motif
CPSCT002/AY426191	F: CATGTGCCTCAATGCATCTT R: CGGCCACAAAATTGAACCTA	62	151	(CT) ₈
CPSCT004/AY426192	F: GCTCTGAAGCTCTGCATTGA R: TTTGAAATGGCTATGGAGTACG	62	130	(GA) ₈
CPSCT005/AY426193	F: CTGCAAGCACTGCGGATCTC R: CCCATATTTCCCAACCAITTA	62	175	(CT) ₁₆
CPSCT006/AY426194	F: ACAAACCAAGCACCGTCTC R: GGGCAAAATGCTTACCTGTTC	62	131	(CT) ₁₅
CPSCT007+/AY426195	F: GTGGCCGGACGAGAGAAC R: CGATCGAATGAAGCTCAGTG	62*	184	(GA) ₃ GC(GA) ₃ ... (GA) ₇
CPSCT008/AY426196	F: TGGATCCAATCCAAGAGTCTG R: GCAGCAAGTGTCTCTGGTTC	62	198	(GA) ₁₇
CPSCT009+/AY426197	F: GCAAAGCAGAGATGGAGAGA R: GGTTCACCAAGTGGTTTCG	62	179	(GA) ₂₀
CPSCT010/AY426198	F: TTGGGTAAATACTTTATCATTTCC R: TCCCTGAATAAGGGTTGTGC	62	199	(TA) ₉ (CT) ₁₄
CPSCT011/AY426199	F: ATTTGGGTTTGGGACTCAAG R: ACTCATCCCTTGGCCCTTCT	62	186	(CT) ₂₁
CPSCT012/AY426200	F: ACGGGAGACTTTCCAGAAAG R: CTTCTCGTTTCCCTCCCTCCT	62	156	(GA) ₁₆
CPSCT013/AY426201	F: CCTGCAAGAAAGGCAAAAAG R: GGTACGCCTATCCATGGTC	62	127	(GAA) ₂ (GA) ₈
CPSCT017+/AY426203	F: CAACTCCAAGCTCTGCTCCT R: AGAGCTACACCAGCCAAAGG	62	186	(CT) ₁₆
CPSCT018/AY426204	F: AGGACATGTGGTCCAACCTC R: GGGTTCCCGTTACTTTTCAT	52	162	(CA) ₅ (CT) ₂₀
CPSCT019+/AY426205	F: CCACACATCCCACCACTCTT R: AATTCTAACACTTGGGTATTGTT	62	126	(CT) ₁₉
CPSCT021/AY426206	F: GCCACTTCGGCTAAAGAGA R: TCCATATCTCCTCCTGCTTGA	46	139	(GA) ₁₅
CPSCT022/AY426207	F: TGTCTGCCCTCTCATCTTAACCA R: TTCTTGAGCAGCCCATCTTCT	62	173	(GA) ₁₃
CPSCT023+/AY426208	F: CGGGTTGACTCAGTTCCCTTC R: ATTTGAGCAGAAGCCAGAA	46	135	(CT) ₈
CPSCT024/AY426209	F: TGGTCTGCTCTTTTATCGTG R: CCTCACCAAAACGGTAGTCAG	46	176	(GA) ₂₀
CPSCT025/AY426210	F: GCATTGCAAGCATTGAAGA R: GATGCTATCTTTCCGCATC	46	180	(CCT) ₃ (CT) ₁₃
CPSCT026/AY426211	F: TCTCACACGCTTTCGTCAAC R: AAAAAGCCAAAAGGGTTGT	46	195	(CT) ₁₆
CPSCT027/AY426212	F: CCCATGCTCCTGTGGTAAAGT R: TTTAGAATCCCAACCCACA	62	166	(GA) ₂₃
CPSCT029/AY426214	F: ATGGGCTAGAAGTGGTGGTG R: ATTCCGACTCGAAACGAAGA	62	157	(GA) ₂₀
CPSCT030/AY426215	F: CAACAGCGAGTGTACGTTT R: AGGCAACGGACAAAATCTG	46	191	(CT) ₁₂
CPSCT031+/AY426216	F: TTCAGATGAAAAGAAAAGAAAGT R: AAAGAAACGCTTGTCTTGCAC	46	191	(GA) ₁₈
CPSCT032/AY426217	F: CATCATCATCTCACCCAAA R: TGCTGATCCGTGAGATCTTG	62	197	(GA) ₁₀
CPSCT033/AY426218	F: TCCTCATTTGAGTGTGTGGA R: TGCCCAATTTGAAAACCTTTGT	62	158	(GT) ₁₁ (GA) ₁₃
CPSCT034/AY426219	F: AGGTGGACAATAGCCGTGAT R: TTTCCAGACCTGAGAAAGC	62	182	(CT) ₅ GT(CT) ₆ ... (CA) ₅
CPSCT035/AY426220	F: TCTTTGATTACACCATGAGCAA R: TGGGGAACACATTTGATCTT	62	191	(GA) ₂₃

Table 1 Continued

Locus/GenBank accession no.	Primer sequence (5'–3')	T _a (°C)	Size (bp)	Repeat motif
CPST036/AY426221	F: TCGAAGACAGACCAGACAAAGA R: TTGCCTTATGCCGTAATTT	62	134	(GA) ₅ ... (GA) ₃ CGG(GA) ₇
CPST037/AY426222	F: TCAAATAAAAAGAGAGAAAGAGAGAG R: GCTTTGCTTAATTTTCTATGATCG	62	118	(GA) ₁₇
CPST038+/AY426223	F: CAGGAACCCCTATTCCCACAA R: TCAATGGCACCCATTTTACA	62	200	(GA) ₁₈
CPST039/AY426224	F: GCCGCAACTCGTAAGGAATA R: TCCACCGTTGATTACCCTTC	62	122	(GA) ₁₈
CPST041+/AY426225	F: ACGATGCATGAAATCCCATATA R: TCTAACCAATCCCCCACATC	62	136	(GA) ₁₃
CPST042/AY426226	F: TGGCTCAAAAAGCTCGTAGTG R: CCAACCTTTCGTTTCGTCTC	62	164	(GA) ₁₀
CPST044/AY426228	F: CCAGCACAGAGAAAACGATG R: GAGCTCTACTCTGAGTCTGTAATA	62	200	(GT) ₈ (AT) ₄ ... (GA) ₇ CA(GA) ₄

+ Polymorphic primers detecting more than one locus.

*Only 1.5 mM of MgCl₂ was used in the PCR product instead of 2.5 mM.

SSRs were amplified in a total volume of 15 µL containing 20 ng of DNA, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.001% gelatine, 0.4 µM of each specific primer, 133 µM of dATP, dTTP and dGTP, 1.6 µM dCTP, 1 U of *Taq* DNA polymerase (PE Applied Biosystems) and 0.5 µCi of α³²P dCTP, using the following temperature profile: 94 °C for 1 min, 35 cycles of 94 °C for 30 s, annealing temperature for 30 s and 72 °C for 30 s, and a final extension step at 72 °C for 5 min.

PCR products were denatured adding 10 µL of blue dye (95% formamide, 20 µM EDTA, 0.05% Bromophenol blue and 0.05% Xylene cyanol) and heating for 3 min at 94 °C. Denatured PCR products were separated by electrophoresis in 6% polyacrylamide sequencing gels at a constant power of 100 W for 2 h. A radioactively labelled 30–330 bp DNA ladder (Gibco BRL, Invitrogen, San Diego) was used to define allele size. The polyacrylamide gel was transferred on to a Whatman 3 MM chromatography paper, vacuum dried, and then exposed to X-ray film (CURIX RP2, AGFA, Mortsel, Belgium) for 1–2 days.

The terminology used was as in Aranzana *et al.* (2002) with a five-letter code (C for *Cabrils*, PS for *P. salicina*, and CT for the microsatellite repeat selected) followed by a three-digit number.

From 323 recombinant colonies randomly chosen, 233 (72.1%) contained the (CT)_n microsatellite of which 85 were sequenced. For 45 of them (52.9%) primers for SSR analysis were designed. The 40 remaining were discarded because they corresponded to redundant clones (25), their flanking sequences were too short (8), they had less than eight consecutive CT repeats (3) or their sequences were unreadable (4). Amplification was successful for 38 microsatellites

(84.4%). Twenty-seven of the amplified SSRs were perfect (simple and with no interruption in the repeat sequence), with a number of repeats ranging from eight to 23 CT/GA, and an average of 16 repeats per microsatellite.

Eight of the 38 SSRs (21.1%) amplified polymorphic patterns corresponding to more than one locus and three (7.9%) were monomorphic. The 35 polymorphic microsatellites are described in Table 1. The parameters of variability shown in Table 2 were only calculated for the 27 single-locus and polymorphic SSRs. The total number of alleles amplified on these 27 SSRs was 54, with an average of 5.7 alleles per locus. Observed and expected heterozygosity values were high, with averages of 0.73 and 0.70, respectively. No homozygous null alleles were detected, although the presence of nulls may explain the significant ($P < 0.01$) departures from Hardy–Weinberg equilibrium found in CPST013, CPST029 and CPST037. The discrimination power (Kloosterman *et al.* 1993), DP, average value was equal to 0.73, and all cultivars studied could be individually differentiated with either CPST025 or CPST034. Only two markers (CPST022 and CPST030) behaved as nonindependent ($P < 0.01$) using a chi-squared test on the contingency table (GENEPOP software; <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>). Most Japanese plum SSRs produced a strong amplification of putative homologous products in peach (85%) and almond (78%), suggesting that their transportability in other *Prunus* species is high.

Acknowledgements

This research was funded in part by project RTA01-118-C2-2 from INIA (Spain).

166 PRIMER NOTE

Table 2 Variability parameters for 27 single locus microsatellites evaluated in 8 Japanese plum cultivars and amplification of 'Texas' (T) almond and 'Earlygold' (E) peach genotypes

Microsatellite	A*	H _O	H _E	Range of allele length†	DP	T‡	E‡
CPSCT002	2	0.25	0.22	149–151	0.38	151	151
CPSCT004	5	1.00	0.76	122–134	0.75	126, 128	126, 130
CPSCT005	5	1.00	0.75	171–191	0.75	—	205
CPSCT006	5	0.88	0.73	113–139	0.78	113	131
CPSCT008	6	0.75	0.73	192–240	0.84	—	186, 195
CPSCT010	9	1.00	0.85	185–227	0.84	—	199
CPSCT011	6	1.00	0.81	156–188	0.81	156	184
CPSCT012	9	0.88	0.86	150–184	0.84	126, 150	142
CPSCT013	2	0.00	0.50	127–131	0.50	—	—
CPSCT018	7	1.00	0.78	126–176	0.84	150	162
CPSCT021	4	0.50	0.61	125–151	0.75	143	139
CPSCT022	5	0.88	0.66	161–179	0.75	151	—
CPSCT024	6	1.00	0.73	154–176	0.69	150, 152	152
CPSCT025	8	1.00	0.82	178–200	0.88	161	161
CPSCT026	7	1.00	0.81	177–213	0.84	171	173
CPSCT027	6	0.75	0.72	136–188	0.78	150	146
CPSCT029	4	0.13	0.65	137–161	0.69	—	—
CPSCT030	5	1.00	0.77	181–191	0.66	189	171, 173
CPSCT032	4	0.25	0.54	197–223	0.66	192	186
CPSCT033	8	0.63	0.79	144–194	0.84	174, 184	160, 164
CPSCT034	5	0.75	0.75	184–212	0.88	230	212
CPSCT035	7	0.63	0.81	161–211	0.84	161	161
CPSCT036	3	0.25	0.23	132–138	0.41	136	138
CPSCT037	4	0.13	0.60	94–134	0.59	—	—
CPSCT039	8	1.00	0.75	102–130	0.78	114	124
CPSCT042	7	1.00	0.81	168–186	0.84	173	175
CPSCT044	7	1.00	0.77	192–218	0.78	175, 185	173
Average	5.7	0.73	0.70		0.74		

*A = number of alleles per locus; †Measured in base pairs only for the eight Japanese plum cultivars studied; ‡Measured in base pairs; — weak; or no amplification.

References

- Aranzana MJ, Garcia-Mas J, Carbó J, Arús P (2002) Development and variability of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding*, **121**, 87–92.
- Aranzana MJ, Pineda A, Cosson P *et al.* (2003) A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theoretical and Applied Genetics*, **106**, 819–825.
- Boonprakob U, Byrne DH, Graham CJ, Okie WR, Beckman T, Smith BR (2001) Genetic relationships among cultivated diploid plums and their progenies as determined by RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **126**, 451–461.
- Byrne DH, Littleton TH (1988) Electrophoretic characterization of diploid plums of the southeastern United States. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **113**, 918–924.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**, 13–15.
- Kijas JMH, Fowler JCS, Garbet CA, Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques*, **16**, 656–662.
- Kloosterman AD, Budowle B, Daselaar P (1993) PCR-amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. *International Journal of Legal Medicine*, **105**, 257–264.
- Okie WR, Ramming DW (1999) Plum breeding worldwide. *Horticulture*, **9**, 162–176.

CAPÍTULO II
TRANSFERIBILIDAD

Prunus microsatellite marker transferability across rosaceous crops

Mourad Mnejja · Jordi Garcia-Mas ·
Jean-Marc Audergon · Pere Arús

Received: 12 November 2009 / Revised: 7 February 2010 / Accepted: 17 February 2010 / Published online: 30 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract A total of 145 microsatellite primer pairs from *Prunus* DNA sequences were studied for transferability in a set of eight cultivars from nine rosaceous species (almond, peach, apricot, Japanese plum, European plum, cherry, apple, pear, and strawberry), 25 each of almond genomic, peach genomic, peach expressed sequence tags (EST), and Japanese plum genomic, 22 of almond EST, and 23 of apricot (13 EST and 10 genomic), all known to produce single-locus and polymorphic simple-sequence repeats in the species where they were developed. Most primer pairs (83.6%) amplified bands of the expected size range in other *Prunus*. Transferability, i.e., the proportion of microsatellites that amplified and were polymorphic, was also high in *Prunus* (63.9%). Almond and Japanese plum were the most variable among the diploid species (all but the hexaploid European plum) and peach the least polymorphic. Thirty-one microsatellites amplified and were polymorphic in all *Prunus* species studied, 12 of which, covering its whole genome, are proposed as the “universal *Prunus* set”. In contrast, only 16.3% were transferable in species of other Rosaceae genera (apple, pear, and strawberry). Polymorphic *Prunus* microsatellites also detected lower levels

of variability in the non-congeneric species. No significant differences were detected in transferability and the ability to detect variability between microsatellites of EST and genomic origin.

Keywords Transferability · Rosaceae · Universal *Prunus* SSR set

Introduction

Microsatellites were first described in plants by Morgante and Olivieri (1993). Since then, the markers derived from microsatellites, usually referred to as simple-sequence repeat (SSR) markers, have progressively substituted other non-sequence-specific PCR-based markers and are widely used in plant genetics and breeding today. They have many advantages, including codominance, a high level of polymorphism, method simplicity, and robustness, and are ubiquitous in the genome. Initially, the main limitation to their use was the availability of SSR-containing DNA sequences in most species. This was first addressed by the development of methods to produce microsatellite-enriched DNA libraries (Squirrell et al. 2003). Later, as a consequence of the drop in DNA sequencing costs, large collections of expressed sequence tag (EST) and genomic DNA were obtained in many species, where high numbers of microsatellite sequences can be mined (Morgante et al. 2002; Horn et al. 2005; Luro et al. 2008).

Due to their codominant and usually single-locus nature, SSR loci can be identified and their alleles recognized in different genotypes of the same species, and often in those of other close relatives. This means that a specific set of SSRs can be used in different sets of genotypes or mapping populations, making them particularly useful for variability

Communicated by E. Dirlwanger

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11295-010-0284-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Mnejja · J. Garcia-Mas · P. Arús (✉)
IRTA, Centre de Recerca en Agrigenòmica CSIC-IRTA-UAB,
Carretera de Cabrils Km 2,
08348 Cabrils (Barcelona), Spain
e-mail: pere.arus@irta.cat

J.-M. Audergon
INRA, Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes,
84143 Montfavet, France

analysis, fingerprinting, and map construction. Transferability, being able to use an SSR developed in one species in other species, is then a desired characteristic. In a strict sense, transferability means that the SSR has to be able to amplify a single locus (or a few loci) in the other species and be polymorphic in that species. In general, SSRs are more transferable between species of the same genus, or between closely related genera, than between distant genera of the same family (Peakall et al. 1998; Zhang et al. 2005; Hendre et al. 2008; Luro et al. 2008), although there are examples of congeneric species with a low level of SSR transferability (Palop et al. 2000; Garcia-Mas et al. 2004).

Since the first SSRs were described in peach (Cipriani et al. 1999), they have been developed in many other Rosaceae, including other members of the subfamily Spiraeoideae tribe Amygdaleae (formerly subfamily Prunoideae; see Potter et al. 2007 and Shulaev et al. 2008), such as almond (Mnejja et al. 2005), apricot (Hagen et al. 2004), Japanese plum (Mnejja et al. 2004), and cherry (Vaughan and Russell 2004). SSRs are also available for the major cultivated species of the subfamily Spiraeoideae, tribe Pyreae (formerly subfamily Maloideae), such as apple (Liebhard et al. 2002) and pear (Yamamoto et al. 2002), and those of the Rosoideae subfamily, such as strawberry (Monfort et al. 2006), raspberry (Graham et al. 2002), and rose (Kimura et al. 2006). Transferability has been frequently reported, particularly for peach SSRs. These were developed first in relatively large numbers, and many were mapped on the *Prunus* reference map (Aranzana et al. 2003a; Dirlewanger et al. 2004a; Howad et al. 2005). Some of these markers were successfully used for variability analysis in other cultivated *Prunus*, including cherry (Wünsch and Hormaza 2002; Dirlewanger et al. 2002) and apricot (Hormaza 2002), and for mapping in apricot (Vilanova et al. 2003; Dondini et al. 2007; Soriano et al. 2008), cherry (Dirlewanger et al. 2004a), plum (Dirlewanger et al. 2004b), and almond (Sánchez-Pérez et al. 2007) progenies. Apple SSRs have also proven useful for studying variability in pear (Yamamoto et al. 2001), loquat (Soriano et al. 2005), and quince (Yamamoto et al. 2004) and for mapping in pear (Pierantoni et al. 2004; Terakami et al. 2006). SSRs from different diploid *Fragaria* wild species and the cultivated octoploid (*Fragaria* × *ananassa*) were used by Sargent et al. (2008) and Rousseau-Gueutin et al. (2008) to construct and compare diploid and octoploid maps.

While sequences from model species may be a source of large numbers of microsatellites in less studied relatives, one drawback with using SSRs from one species to another is that only a proportion of the SSRs will be transferable. Dirlewanger et al. (2002) studied 41 SSRs from a peach CT-enriched genomic library in a collection of cherry cultivars and found that 34 (83%) in peach and only 14

(34%) in cherry were single locus and polymorphic; Decroocq et al. (2003) developed 10 EST SSRs from apricot, but only one of them was transferable across several *Prunus* species, apple, and pear. Wünsch (2009) studied 13 *Prunus* SSRs known to be transferable to certain *Prunus* species, tested them in 10 *Prunus*, and found that three were transferable to all of them and eight to all but one species. Another limitation is the quality of the markers, as SSRs obtained in other species may be less variable and the presence of null alleles more frequent than those from the same species. In this paper, we provide a systematic analysis of the transferability of *Prunus* SSRs in non-source species DNA of six *Prunus* crops and in apple, pear, and strawberry. We used sets of markers from genomic libraries of peach, apricot, almond, and Japanese plum and from ESTs of peach, apricot, and almond. Our results provide information on the rates of transferability in different species, relative degrees of SSR variability between *Prunus* species, and relative degrees of polymorphism depending on the SSR source (genomic vs. EST-derived). Additionally, we detected SSRs that were particularly transferable across species, identifying a set of SSRs that can be used for variability analysis in all cultivated *Prunus*.

Materials and methods

Plant material and DNA extraction

We used eight cultivars of each of nine species: peach (*Prunus persica*), almond (*Prunus dulcis*), apricot (*Prunus armeniaca*), Japanese plum (*Prunus salicina*), European plum (*Prunus domestica*), cherry (*Prunus avium*), apple (*Malus* × *domestica*), pear (*Pyrus communis*), and strawberry (*F.* × *ananassa*), for a total of 72 genotypes (Table 1). The choice of cultivars was to sample the broadest possible spectrum of the cultivated variation of each species.

For genomic DNA extraction, the CTAB extraction method of Doyle and Doyle (1990) was used, omitting the final RNase treatment step.

SSR markers

To assess the transferability of SSRs from four crops, peach, almond, apricot, and Japanese plum, we used 145 SSRs from six different sources (Table 2): 25 genomic almond SSRs (CPDCT; Mnejja et al. 2005), 22 EST-derived almond SSRs (EPDCU; Table 1S), 25 genomic peach SSRs (CPPCT and BPPCT; Aranzana et al. 2002; Dirlewanger et al. 2002), 25 EST-derived peach SSRs (EPPCU; Table 2S), and 25 genomic Japanese plum SSRs (CPSCT; Mnejja et al. 2004). For the 23 apricot SSRs used,

Table 1 Cultivars of the nine rosaceous species used in this study

	Almond	Peach	Japanese plum	Apricot	Cherry	European plum	Pear	Apple	Strawberry
Al	Alexandra	Royal Diamond	Goldrich	Bing 2129	Anna Späth	Abate Fetel	Galaxy	Arena	
Cristomorto	Baby Gold 7	Early Beaut	Harcot	Celeste	Arandana	Blanquilla	Golden Reiters	Cegnidarem	
Desmayo Langueta	Big Top	Bella di Barbina	Jordan	Duroni 3	d'Ente GF 303	Concorde	Granny Smith	Chandler	
Marcona	Calante	The sun	Modesto	Lapins	Laxton Cropper	Conférence	Breabum Hilwell	Darselect	
Nonpareil	Flavor Top	Obilmaja	Moniquí	New Star	Martin	Doyenne du Comice	Fuji Nagafu-6	Tudla	
Primorskyi	Large White	Byron Gold	Palsieyn	Rainier	President	Ercolini	Pink Lady	Pajaro	
Ramillete	Royal Glory	Ruby Sweet	Pepito del Rubio	Santina	Reina Claudia Verde	Limonera IG 2000	Reina de Reinetas	Seascape	
Retsou	Snow Queen	Zaiger 144	Spring Giant	Summit	Victoria	Williams	Scarlet Spur	Sweet Charlie	

10 were genomic (AMPA92 to AMPA110) and 13 EST-derived (AMPA112 to AMPA127) (Hagen et al. 2004). Twenty of these have been described by Hagen et al. (2004) and the remaining three were unpublished. Their respective forward (F) and reverse (R) primers are: AMPA113 (F: AAAATTAGAAATACATCGAGAATAGCC; R: CGTCAAGTTTCCTAGATGAGG); AMPA 126 (F: AAAATTAGAAATACATCGAGAATAGCC; R: CGGAGAGGACGAGTTCTACATC), and AMPA 127 (F: GGCACGTTGAAAGTGTGTATTC; R: AGGAAGCTAATTACCCAAAACG). All the SSR markers used were single locus and polymorphic in the species from which they were obtained. Each SSR primer pair was used to amplify the DNA for all genotypes except those of its own species. All the SSR markers used were single locus and polymorphic in the species from which they were obtained. Each SSR primer pair was used to amplify the DNA for all genotypes except those of its own species.

For PCR, we used 20 ng of template DNA, 10 mM Tris-HCl pH 8.3; 2.5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0.001% gelatin; 0.4 μM of each specific primer; 133 μM of dATP, dTTP, and dGTP; 1.6 μM dCTP; 1 U of *Taq* DNA polymerase (PE Applied Biosystems); and 0.5 μCi of α³³P dCTP. The PCR program was 1 min of DNA denaturation at 94°C followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, annealing temperature for 30 s and 72°C for 30 s, and a final extension step at 72°C for 5 min. The annealing temperature used to assess the transferability was the same as the one used in the original species. Denatured PCR products were separated by electrophoresis in 6% polyacrylamide sequencing gels at a constant 100 W for 2 h. A radioactively labeled 30–330-bp DNA ladder (Gibco BRL, Invitrogen, San Diego, CA, USA) was used to define allele size. The polyacrylamide gel was transferred to Whatman 3-mm chromatography paper, vacuum-dried, and then exposed to X-ray film (CURIX RP2, AGFA, Mortsel, Belgium) for 1–2 days.

Scoring of amplification and polymorphism

Two samples with DNA of the original species amplified with primers obtained with this species were included in each gel as controls of amplification. A primer pair was considered with no (or poor) amplification for a particular sample in any of the following cases: (1) when its most intense bands were less than approximately half the intensity of the controls, (2) when the size of the bands was outside the expected range (the lower boundary being the amplified fragment without the microsatellite and the upper boundary this fragment plus twice the size of the longest microsatellite in the original species), (3) when less than five of the eight plants used yielded amplified products, and (4) when amplification produced multiple bands (many bands of similar intensity corresponding to four or more loci).

Table 2 Microsatellites used and their position in the TxE reference *Prunus* linkage map

SSR ^a	Almond	LG ^b	Position ^c	Peach	LG ^b	Position ^c	Apricot	LG ^b	Position ^c	Japanese plum	LG ^b	Position ^c
G	CPDCT003	–	–	BPPCT001	G2	21	AMPA92	–	–	CPSCT004	G7	9
G	CPDCT004	G2	28	BPPCT006	G8	14	AMPA93	–	–	CPSCT005	G4	54
G	CPDCT005	–	–	BPPCT007	G3	11	AMPA94	–	–	CPSCT006	G5	22
G	CPDCT006	–	–	BPPCT008	G6	30	AMPA100	–	–	CPSCT008	G1	9
G	CPDCT007	–	–	BPPCT011	–	–	AMPA101	–	–	CPSCT010	–	–
G	CPDCT014	–	–	BPPCT014	G5	44	AMPA103	–	–	CPSCT011	G5	5
G	CPDCT016	G5	31	BPPCT015	G4	44	AMPA105	–	–	CPSCT012	G6	36
G	CPDCT017	G1	40	BPPCT016	G1	55	AMPA107	–	–	CPSCT018	G8	0
G	CPDCT019	G1	31	BPPCT017	G5	20	AMPA109	–	–	CPSCT021	G2	39
G	CPDCT022	–	–	BPPCT020	G1	53	AMPA110	–	–	CPSCT022	G5	41
G	CPDCT025	G3	36	BPPCT023	G4	45				CPSCT024	G1	37
G	CPDCT027	G3	46	BPPCT025	G6	56				CPSCT025	–	–
G	CPDCT028	G5	27	BPPCT033	G8	19				CPSCT026	G7	22
G	CPDCT029	–	–	BPPCT037	G5	26				CPSCT027	G1	29
G	CPDCT031	–	–	BPPCT038	G5	33				CPSCT029	–	–
G	CPDCT033	–	–	CPPCT005	G4	10				CPSCT030	G5	36
G	CPDCT034	G8	17	CPPCT006	G8	25				CPSCT032	G3	19
G	CPDCT035	–	–	CPPCT014	–	–				CPSCT033	G7	28
G	CPDCT037	–	–	CPPCT017	G7	62				CPSCT034	G2	49
G	CPDCT038	G1	26	CPPCT022	G7	19				CPSCT035	–	–
G	CPDCT039	–	–	CPPCT028	G4	11				CPSCT036	G1	29
G	CPDCT040	–	–	CPPCT029	G1	65				CPSCT037	–	–
G	CPDCT042	G1	07	CPPCT030	G6	80				CPSCT039	G4	2
G	CPDCT044	G2	12	CPPCT031	–	–				CPSCT042	G7	41
G	CPDCT045	G4	17	CPPCT033	G7	39				CPSCT044	G2	26
E	EPDCU5062	–	–	EPPCU9268	G4	4:46	AMPA112	–	–			
E	EPDCU4658	G2	21	EPPCU9300	G6	6:25	AMPA113	–	–			
E	EPDCU4466	–	–	EPPCU9566	–	–	AMPA114	–	–			
E	EPDCU4017	–	–	EPPCU9773	G2	2:45	AMPA115	–	–			
E	EPDCU3392	G7	65	EPPCU0532	G3	3:49	AMPA116	–	–			
E	EPDCU3122	G2	2	EPPCU1106	G4	4:46	AMPA118	–	–			
E	EPDCU3083	G3	20	EPPCU1198	G6	0	AMPA119	–	–			
E	EPDCU2862	G1	66	EPPCU2000	G4	4:46	AMPA121	–	–			
E	EPDCU2584	G6	39	EPPCU2256	G3	3:22	AMPA122	–	–			
E	EPDCU5100	G1	14	EPPCU2957	G6	6:84	AMPA123	–	–			
E	EPDCU5046	–	–	EPPCU4921	G6	6:25	AMPA124	–	–			
E	EPDCU4805	–	–	EPPCU4962	G5	5:08	AMPA126	–	–			
E	EPDCU3647	–	–	EPPCU5191	–	–	AMPA127	–	–			
E	EPDCU3547	–	–	EPPCU6216	G4	4:46						
E	EPDCU3537	–	–	EPPCU7340	G7	7:25						
E	EPDCU3516	G8	23	EPPCU9054	–	–						
E	EPDCU3454	G8	47	EPPCU9168	G7	7:04						
E	EPDCU3158	–	–	EPPCU0491	–	–						
E	EPDCU3146	–	–	EPPCU1966	G1	1:50						
E	EPDCU3117	G8	55	EPPCU2288	G2	2:45						
E	EPDCU2931	–	–	EPPCU3088	G1	1:50						
E	EPDCU2804	–	–	EPPCU4726	G8	8:41						
				EPPCU5176	G7	7:56						
				EPPCU8702	G3	3:49						
				EPPCU1098	G2	2:45						

^a Origin of the SSR: *G* genomic, *E* EST^b *LG* linkage group, G1–G8^c Position as in Dirlwanger et al. (2004a, b); markers with a number followed by a semicolon and another number were bin-mapped (Howad et al. 2005)

A locus was considered polymorphic when having at least two alleles at any frequency. A primer pair was scored as having more than one locus when at least one plant had more than two alleles (one locus 1–2 alleles; two loci 3–4; and three loci 5–6), with the least intense bands at least half that of the most intensely stained bands.

We also determined the number of alleles per locus in all SSR/species combinations and the observed heterozygosity (number of heterozygous loci/total loci studied) for the five *Prunus* diploid species. These parameters are likely to be slightly biased by the fact that we have not been able to detect the presence of null alleles. For the comparison between mean values of different parameters, we used two-tailed *t* tests. Goodness-of-fit to expected proportions was assessed using chi-square tests.

Results

Data from each of the 1,160 (145×8) SSR/species combinations analyzed with respect to amplification, polymorphism, number of loci, number of alleles, and observed heterozygosity (where performed) are shown in Table 3S, presented as supplementary information.

Cross-species amplification

A high percentage (83.6%) of the primer pairs produced a good amplification in *Prunus* DNA (Table 3), with 100% amplification in four species/SSR-origin combinations: peach/almond genomic SSRs, apricot and Japanese plum/almond EST SSRs, and European plum/Japanese plum genomic SSRs. Microsatellites designed from almond ESTs produced the highest amplification rate (94.5%), ranging from 86.4% for cherry to 100% for both apricot and

Japanese plum. Peach DNA had the highest amplification percentage for the *Prunus* SSRs used (91.6%), and cherry had the lowest (76.6%).

Amplification of *Prunus* SSRs in species of other subfamilies decreased notably, with an average of 37.9% cross-species amplification, ranging from 22.7% for genomic almond SSRs to 57.3% for genomic peach SSRs. Amplification rates were higher in apple (44.8%) and pear (38.6%) than in strawberry (30.3%).

Eighty-nine of 145 (61.4%) SSRs produced clear amplicons in all *Prunus* species, whereas only 19 (13.1%) amplified the DNA in the three other Rosaceae species studied, of which 16 (11.0%) amplified the DNA of all the species studied. Three SSRs (2.1%), AMPA92 of apricot and CPPCT017 and EPPCU1198 of peach, are considered species specific as they produced no amplification in any other species studied.

Cross-species transferability

Most of the SSRs that produced amplification products were polymorphic in *Prunus* (76.4%). Considering those able to amplify and produce polymorphism in other species as transferable markers, 63.9% were transferable to other *Prunus* crops (Table 4). The highest rates of transferability were observed in the hexaploid European plum, with SSRs from Japanese plum (100%), and almond genomic (88.0%) and EST-derived (86.4%) SSRs. For the diploid species, peach genomic SSRs in almond (84.0%) and almond EST-derived SSRs in Japanese plum (81.8%) gave the highest rates of polymorphism. The highest levels of transferability were observed in European plum (83.4%), almond (73.5%), and Japanese plum (73.3%) and the lowest in cherry (40.7%). The genomic Japanese plum SSRs showed the highest rate of transferability (70.4%), whereas the lowest (59.1%) was found using the apricot SSRs.

Table 3 Percentage amplification of *Prunus* SSRs in other *Prunus* and rosaceous crops

SSRs ^a	GPD	GPS	GPP	PA	EPD	EPP	Mean species
Almond	–	88.0	88.0	78.3	–	80.0	83.7
Peach	100.0	92.0	–	82.6	90.9	–	91.6
Apricot	84.0	88.0	72.0	–	100.0	72.0	82.8
Japanese plum	84.0	–	76.0	65.2	100.0	80.0	80.8
European plum	92.0	100.0	88.0	78.3	95.5	76.0	88.3
Cherry	80.0	80.0	64.0	69.6	86.4	80.0	76.6
All <i>Prunus</i>	88.0	89.6	77.6	74.8	94.5	77.6	83.6
Apple	32.0	56.0	60.0	43.5	40.9	36.0	44.8
Pear	16.0	44.0	68.0	26.1	45.5	32.0	38.6
Strawberry	20.0	24.0	44.0	30.4	40.9	24.0	30.3
All non- <i>Prunus</i> rosaceous	22.7	41.3	57.3	33.3	42.4	30.7	37.9

^a G genomic, E EST, PD *P. dulcis*, PS *P. salicina*, PP *P. persica*, PA *P. armeniaca*

Table 4 Percentage polymorphism of *Prunus* SSRs in other *Prunus* and rosaceous crops

SSRs ^a	GPD	GPS	GPP	PA	EPD	EPP	Mean species
Almond	–	72.0	84.0	60.9	–	76.0	73.5
Peach	48.0	40.0	–	52.2	31.8	–	43.2
Apricot	72.0	80.0	56.0	–	68.2	60.0	67.2
Japanese plum	80.0	–	68.0	60.9	81.8	76.0	73.3
European plum	88.0	100.0	76.0	73.9	86.4	76.0	83.4
Cherry	36.0	60.0	36.0	47.8	31.8	32.0	40.7
All <i>Prunus</i>	64.8	70.4	64.0	59.1	60.0	64.0	63.9
Apple	24.0	52.0	12.0	13.0	18.2	24.0	24.1
Pear	16.0	28.0	20.0	8.7	9.1	16.0	16.6
Strawberry	0.0	8.0	4.0	13.0	9.1	16.0	8.3
All non- <i>Prunus</i> rosaceous	13.3	29.3	12.0	11.6	12.1	18.7	16.3

^a G genomic, E EST, PD *P. dulcis*, PS *P. salicina*, PP *P. persica*, PA *P. armeniaca*

When *Prunus* microsatellites were tested in the other three genera of the Rosaceae family, the rates of transferability were much lower (16.3% overall). Apple and pear had similar percentages (24.1% and 16.6%), and only 12 of the tested 145 loci (8.3%) were polymorphic in strawberry.

Thirty-one primer pairs (21.4%) were polymorphic in all six *Prunus* species studied (Table 5). Twelve of these showed a polymorphic pattern in at least one of the other rosaceous species and no microsatellite produced polymorphisms in all studied species. Seven SSRs were only transferable in the source species: the three SSRs mentioned in the previous section that did not amplify any non-source DNA and four additional microsatellites (CPDCT019, BPPCT006, AMPA122, and AMPA127) that amplified in other species but were not polymorphic in any of them.

SSR number, diversity and origin

The majority of the SSRs detected a single locus in the diploid *Prunus* species, and a few detected two loci with an average of 1.05 loci per amplified primer pair (Table 6). The highest average number of loci per amplified primer pair was 1.23 when using the EST-derived almond microsatellites in Japanese plum DNA. Two to three loci were typically found in the hexaploid plum (avg. 2.36 loci/primer pair). For the other rosaceous species, all polyploids, the pattern was generally of one to two loci per SSR in apple (1.28) and pear (1.16) and one in strawberry (1.05).

The average allele number per polymorphic locus using the different primer pairs in *Prunus* was 3.7 (Table 7). Almond and Japanese plum gave the highest allele numbers per polymorphic locus (5.8 and 4.5 alleles). European plum (3.3), apricot (3.2), and cherry (3.1) were intermediate and the lowest number of alleles was in peach with only 2.6.

Due to the difficulty of assigning alleles to specific loci in the hexaploid plum, the observed heterozygosity (Ho)

parameter was calculated only for the diploid *Prunus* species (Table 8). The pattern of variability was consistent with the average allele number, with almond and Japanese plum giving the highest Ho (0.62), apricot and cherry intermediate (0.55 and 0.51, respectively), and peach the lowest (0.41) value.

Although differences in amplification, polymorphism, and population variability parameters were evident between different sets of SSRs, the values obtained for all the parameters studied were very similar overall for the 85 genomic and 60 EST-derived SSRs (Table 9). The trend was towards a slight decrease in amplification rates in genomic SSRs with respect to EST-derived SSRs and a higher level of variability in genomic SSRs (higher polymorphism, number of alleles per locus, and heterozygosity), although no significant differences were detected.

Discussion

SSR transferability

Transferability across different species was studied with *Prunus* SSRs in six *Prunus* crops and three crops from other Rosaceae subfamilies. From the 1,160 species/SSR combinations studied (9,240 datapoints) we found amplification in 771 (66.5%), but only 534 (69.3% of the amplified SSRs, 46.0% of the total) were polymorphic, indicating that about 30% of the SSRs that amplified did not produce polymorphism in the species studied. Possible causes for the lower polymorphism may be the loss or the small size of the SSR and the presence of interrupted repeats in the microsatellite sequence, resulting in lower variability than long and perfect microsatellites (Smulders et al. 1997; Peakall et al. 1998; Dirlewanger et al. 2002), or an overall lower level of variability in the species studied.

Table 5 Universal *Prunus* microsatellites: allele number (A) and observed heterozygosity (Ho) per polymorphic locus

SSRs	Almond		Peach		Japanese plum		Apricot		Cherry	
	A	Ho	A	Ho	A	Ho	A	Ho	A	Ho
Genomic almond										
CPDCT016			2	0.13	4	0.63	5	0.86	2	0.50
CPDCT022			4	0.50	5	1.00	2	0.25	5	0.88
CPDCT034			4	0.63	3	0.13	2	0.50	2	0.63
CPDCT037			2	0.63	8	0.75	3	0.75	5	0.71
*CPDCT045			3	0.88	4	0.88	4	0.68	4	0.50
EST almond										
EPDCU3392			2	0.13	5	0.75	3	0.63	3	0.63
EPDCU3083			3	0.50	7/3	0.63/0.00	4	0.63	2	0.38
*EPDCU5100			2	0.50	3	0.63	3	0.50	2	0.00
EPDCU2931			2	0.50	5	0.63	3	0.75	4	0.65
Genomic peach										
*BPPCT007	7	0.75			6	0.88	5	0.25	2	0.75
BPPCT008	6/5	0.50/0.50			7	0.63	4	0.88	3	0.75
BPPCT011	7	1.00			3	0.38	3	0.63	3	0.38
*BPPCT038	6	0.75			7	0.75	5	0.75	5	0.63
*CPPCT006	9	0.88			4	0.88	3	0.88	4	0.63
*CPPCT033	6	0.75			5	1.00	2	0.25	4	0.38
EST peach										
*EPPCU9300	9	1.00			7	1.00	4	0.50	4	1.00
EPPCU9773	7	0.63			3	0.50	2	0.50	2	0.50
EPPCU2256	9	0.75			9	1.00	4	0.50	3/2	0.38/0.63
*EPPCU9168	6	0.63			4	0.75	5	0.63	3	0.63
*EPPCU3088	6	0.88			4	0.88	2	0.25	4	0.63
Genomic Japanese plum										
*CPSCT012	8	0.88	3	0.50			3	0.50	2	0.63
*CPSCT018	8	0.57	2	0.13			2	0.25	5	0.63
*CPSCT021	5	0.25	2	0.13			4	0.63	2	0.25
CPSCT033	6	0.88	4	0.63			4	0.50	4/2	0.25/0.63
CPSCT039	6/4	0.83/0.63	3	0.38			6	0.75	2	0.25
Apricot										
AMPA101	7	0.50	2	0.63	6	1.00			5	0.88
AMPA103	6	0.75	3	0.13	5	0.75			2	0.25
AMPA107	6	0.50	3	0.88	6	0.57			2	0.38
AMPA110	8	0.75	2	0.38	7	1.00			2	0.14
AMPA113	8	0.75	3	0.13	5	0.63			4	0.75
AMPA115	8	0.63	2	0.25	5	0.25			5	0.25

For SSR primers that detected two loci, data for each locus is separated by a slash. SSRs marked with an asterisk were selected as the “universal *Prunus* set”

The degree of transferability was inversely proportional to the genetic distance between the species of origin of the SSRs and the tested species. This was clear when comparing the results between *Prunus*, with an average amplification of 83.6% and transferability of 63.9%, and other Rosaceae, where these values dramatically decreased to 37.9% and 16.3%, respectively. The relationship between

distance and transferability is also evident when comparing the results within *Prunus*. The six species studied belong to three subgenera: *Amygdalus* (almond and peach), *Prunophora* (apricot and Japanese and European plum) and *Cerasus* (cherry). Different species of the same subgenus are usually intercrossable, and certain crosses between *Amygdalus* and *Prunophora* are also possible (Scorza and

Table 6 Mean number of loci amplified by *Prunus* SSRs in other *Prunus* and rosaceous crops

SSRs ^a	GPD	GPS	GPP	PA	EPD	EPP	Mean species
Almond	–	1.09	1.14	1.06	–	1.00	1.07
Peach	1.08	1.04	–	1.00	1.00	–	1.03
Apricot	1.14	1.05	1.06	–	1.05	1.00	1.06
Japanese plum	1.00	–	1.11	1.00	1.23	1.00	1.07
Cherry	1.05	1.05	1.00	1.00	1.05	1.05	1.04
All diploid <i>Prunus</i>	1.07	1.06	1.08	1.01	1.08	1.01	1.05
European plum	2.13	2.60	2.35	2.44	2.33	2.26	2.36
Apple	1.13	1.57	1.13	1.20	1.11	1.44	1.28
Pear	1.25	1.27	1.12	1.00	1.00	1.38	1.16
Strawberry	1.00	1.00	1.09	1.14	1.00	1.00	1.05

^a G genomic, E EST, PD *P. dulcis*, PS *P. salicina*, PP *P. persica*, PA *P. armeniaca*

Sherman 1996). *Cerasus* is more distant, species do not intercross with those of the other two subgenera (Watkins 1995), and their genetic distance based on DNA sequence data is also greater (Wen et al. 2008). The highest values of amplification and polymorphism were generally found using SSRs and DNA from the same subgenus or from *Prunophora* and *Amygdalus* (85.0% average amplification and 69.7% transferability), whereas lower values were observed in cherry DNA (76.6% amplification and 40.7% transferability) where only SSRs from other subgenera were used, with values of transferability being significantly different ($P \leq 0.05$).

Comparing *Prunus* species variability

The analysis allowed comparison of the level of variability between different species with a partly overlapping set of markers, previously only feasible using isozymes. Arulsekhar et al. (1986) studied 12 isozyme genes and found nine of

them polymorphic in almond and only one in peach. Using 12 isozymes of peach, Japanese plum, and apricot and nine of almond, Byrne (1990) found that the most variable species was almond followed by Japanese plum, apricot, and finally peach as the least variable. There is no comparative analysis with cherry but from the isozyme patterns described by Granger et al. (1993), we estimate a value of 56% polymorphism for the nine substrate-specific enzyme systems that they used, with the cultivated cherry having a similar level of isozyme variability as apricot.

The results on SSR variability of the five diploid *Prunus* species studied here are in close agreement with those of isozyme analysis with respect to the ranking of variability in different species (Table 10). This provides additional support to the reason attributed by Arulsekhar et al. (1986) and Byrne (1990) for the different levels of variability among species, being the contrasting features of the mating system of different *Prunus*, with almond and Japanese plum that are outcrossing due to the existence of a strong

Table 7 Average allele number per polymorphic locus of *Prunus* SSRs in other *Prunus* and rosaceous crops

SSRs ^a	GPD	GPS	GPP	PA	EPD	EPP	Mean species
Almond	–	4.7	5.9	6.2	–	6.5	5.8
Peach	2.9	2.6	–	2.5	2.1	–	2.6
Apricot	3.2	3.5	3.2	–	2.9	3.3	3.2
Japanese plum	4.8	–	5.0	4.6	3.1	5.2	4.5
European plum	3.4	3.6	3.3	3.6	2.5	3.2	3.3
Cherry	3.2	2.7	3.6	3.6	2.4	3.4	3.1
All <i>Prunus</i>	3.6	3.6	4.1	4.0	2.6	4.2	3.7
Apple	2.3	2.8	4.0	3.3	2.3	3.4	2.9
Pear	2.0	3.2	3.0	2.0	2.5	3.0	2.8
Strawberry	0.0	3.5	2.0	2.3	2.0	2.3	2.4
All non- <i>Prunus</i> Rosaceae	2.2	2.9	3.2	2.7	2.3	3.0	2.8

^a G genomic, E EST, PD *P. dulcis*, PS *P. salicina*, PP *P. persica*, PA *P. armeniaca*

Table 8 Mean observed heterozygosity per polymorphic locus of *Prunus* SSRs in other diploid *Prunus*

SSRs ^a	GPD	GPS	GPP	PA	EPD	EPP	Average
Almond	–	0.60	0.63	0.60	–	0.66	0.62
Peach	0.49	0.38	–	0.40	0.38	–	0.41
Apricot	0.60	0.57	0.50	–	0.53	0.52	0.55
Japanese plum	0.62	–	0.72	0.54	0.49	0.74	0.62
Cherry	0.61	0.45	0.63	0.50	0.32	0.55	0.51
All diploid <i>Prunus</i>	0.58	0.52	0.63	0.50	0.46	0.64	0.56

^a G genomic, E EST, PD *P. dulcis*, PS *P. salicina*, PP *P. persica*, PA *P. armeniaca*

gametophytic self-incompatibility system, therefore able to maintain a high level of variability, and with peach as the least variable species because of selfing (Miller et al. 1989), a consequence of its self-compatibility. The small number of individuals used in the original US peach breeding programs may have created a bottleneck effect (Arulsekar et al. 1986; Hesse 1975), additionally enhancing the low level of variability of this species. For cherry, the presence of self-compatible genotypes, preferred as they produce more stable crops, plus bottlenecks created by recent events in its breeding history may explain the intermediate level of variability observed (Tavaud 2002). Some of the apricot cultivars are also self-compatible, which would explain its mixed mating system and intermediate level of variability.

Results summarized in Table 10 also show that one of the critical features that differentiate isozymes and SSRs is the higher level of variability of the latter. This is evident with the higher percentage of polymorphism, average number of alleles per polymorphic locus, and observed heterozygosity of SSRs in almost all comparisons. The differences in variability levels between isozymes and SSRs were particularly evident in the least variable species, peach, where the proportion of polymorphic loci is much greater with SSRs (8% with isozymes compared to 43–47% with SSRs). This data clearly shows the enormous capability of SSRs for detecting genetic polymorphism, especially in crops with low variability, and are a demonstration of why these markers have become such a

Table 10 Variability parameters for SSRs of the six *Prunus* species studied

Species	Parameters ^a						
	Isozymes			SSRs			
	P	A	Ho	Pa	P	A	Ho
Almond	78	2.29	0.28	88	74	5.8	0.62
Japanese plum	67	2.75	0.25	91	73	4.5	0.62
Apricot	58	2.29	0.13	81	67	3.2	0.55
Cherry	56 ^b	–	–	53	41	3.1	0.51
Peach	8	2.00	0.02	47	43	2.6	0.41
European plum	–	–	–	95	83	3.3	–

^a P percentage of polymorphic loci, A average number of alleles per polymorphic locus, Ho observed heterozygosity of polymorphic SSRs, Pa percentage of polymorphic SSR from those that amplified

^b Based on Granger et al. (1993); the remaining isozyme data are based on Byrne (1990)

useful tool for variability studies, mapping, genetic analysis, and marker-assisted breeding.

A universal SSR set for *Prunus*

The genus *Prunus* encompasses a group of closely related crop species that have a highly syntenic genome (Arús et al. 2005). SSR markers transferable between *Prunus* species may be useful for comparative variability studies and for the construction of linkage maps with common markers. Here we found 31 SSRs (21.4% of the total) that were polymorphic in all six species tested. This set of universal *Prunus* markers included SSRs from all different origins, with numbers of each SSR origin proportional to the number of SSRs of each origin studied (chi square=0.68; n.s.). Two SSRs of this set (BPPCT007 and CPPCT006) were also identified as universal for *Prunus* by Wünsch (2009). The SSRs of known map positions (21) gave good coverage of the genome, with two or more markers per linkage group. The majority were highly informative, with 98 of the 129 SSR/species combinations (76%) having an observed heterozygosity value ≥ 0.50 and 99 (77%) with three or more alleles in the eight plants studied.

Table 9 Variability parameters for SSRs derived from genomic and EST sequences

GSSRs genomic SSRs, ESSRs EST SSRs
^a Calculated excluding European plum data

Parameter	GSSRs <i>Prunus</i>	ESSRs <i>Prunus</i>	GSSRs All species	ESSRs All species
Amplification	83.1	84.3	66.0	67.1
Polymorphism	66.1	60.7	47.7	43.8
Number of loci	1.06 ^a	1.04 ^a	1.32	1.26
Number of alleles/locus	3.8	3.5	3.6	3.4
Observed heterozygosity	0.57 ^a	0.54 ^a	–	–

From these 31 SSRs, we have selected a subset of 12 (Table 5) detecting a unique polymorphic locus in all species and evenly separated in the *Prunus* chromosomes (one in G2, G3, G5, and G7 and two in G1, G4, G6, and G8 that are at least 10 cM apart) that we propose as the “universal *Prunus* set”, to be used for the characterization of genetic resources in these species.

Genomic vs. EST-derived SSRs

EST-derived SSRs in various plant species have been identified as being more transferable among distantly related species and less variable than genomic SSRs (Varshney et al. 2005). This is to be expected as there is more DNA sequence conservation in transcribed than in non-transcribed regions. Our results suggest that the EST-derived SSRs used here are slightly less variable and more transferable than genomic SSRs, but these differences were not found to be significant. Even comparing the numbers of EST SSRs (11) and genomic SSRs (20) that were on the list of transferable SSRs among all *Prunus*, there was no significant difference ($\chi^2=0.57$) from those expected assuming equal frequencies of transferability.

EST SSRs from peach and almond origin differed in their capability to produce polymorphism, with almond EST SSRs being more transferable (94.5 vs. 77.6%) than peach EST SSRs (Table 3), which in turn were generally more polymorphic (Tables 7 and 8). This can be explained by the way in which these microsatellites were selected from databases. For peach EST SSRs, all but one were dinucleotidic, and 17 out of 18 that presented a clear homology with database protein sequences were located in the untranslated regions (14 in the 5' UTR and three in the 3' UTR). The only SSR with a trinucleotidic repeat was EPPCU1098, located in the coding region. For almond, nine out of the 16 EST SSRs that were clearly homologous to protein sequences were located in the untranslated regions (eight in the 5' UTR and one in the 3' UTR), and the remaining seven, located in the coding region, all with a trinucleotidic repeat. Overall, our results are consistent with that published on the comparison between genomic and EST SSRs (Varshney et al. 2005), with almond EST SSRs, generally from coding regions, having a higher proportion of cross-species amplification but lower polymorphism, while peach EST SSRs, similar to genomic SSRs, were less transferable but more variable.

Prunus SSRs in other Rosaceae

Only a small proportion of the SSRs tested were transferable to apple, pear, and strawberry. The larger proportion in apple and pear is consistent with the higher similarity expected between genera belonging to tribes Amygdaleae (*Prunus*) and Pyreae (apple and pear), both within the

Spiroideae subfamily, than between genera belonging to two subfamilies, Spiroideae and Rosoideae (strawberry). In apple and pear, some of the *Prunus* SSR primer pairs detected more than one locus, resulting in 28% and 16% more loci than expected assuming one locus per primer pair, respectively, similar to results (14% and 13%) obtained with SSRs from the same species (Liebhard et al. 2002; Yamamoto et al. 2002). Finding more than one locus per SSR is in agreement with the recent polyploid nature of these species. For octoploid strawberry, SSR primer pairs based on the *Fragaria* DNA sequence detect, on average, more than two loci (Viruel et al. 2002; Rousseau-Gueutin et al. 2008). This figure was much lower when using *Prunus* SSR primer pairs (1.05), similar to that of a diploid species. This may be a result of the greater distance between *Prunus* and *Fragaria*, where there is only occasionally sufficient homology between *Prunus* SSR primers and *Fragaria* homologous and homoeologous sequences to amplify the microsatellite region.

Apple, pear, and strawberry had a low level of variability with the transferable *Prunus* SSRs. Apple, a highly variable species (Weeden and Lamb 1985; Liebhard et al. 2002), had a number of alleles for each polymorphic SSR locus (2.9), similar to peach (2.6), known to be a species with low levels of variability and the least variable of the *Prunus* (Byrne 1990; Aranzana et al. 2003b). The same parameter for isozymes was 2.0 for peach and 2.9 for apple (Weeden and Lamb 1985; Byrne 1990). Liebhard et al. (2002) tested 140 apple SSRs in eight genotypes (the same number as in this work) and found an average of 6.1 alleles/locus, more than twice the number that we found. Similar results (6.6–4.0 alleles/locus) were obtained by Silfverberg-Dilworth et al. (2006) with a different sample of apple SSRs in nine genotypes of this species. This suggests that another effect of using SSRs from distant species is the loss of variability. Possible causes could be the presence of null alleles at intermediate frequencies or the higher proportions of short or imperfect microsatellites.

Comparative mapping between species of different subfamilies usually requires restriction fragment length polymorphism or single-nucleotide polymorphism markers, both based on DNA sequence comparisons. Transferable SSRs can be used, but to an extremely limited extent: only one of the transferable SSRs *Prunus*–strawberry identified here segregated in the maps used to compare the diploid genomes of these two genera (Vilanova et al. 2008). While *Prunus* SSRs are clearly useful for genetic studies in any *Prunus* species, their application to other species is more limited and other markers are needed.

Acknowledgments This research was partly funded by a project of the Spanish Ministry of Education (AGL2006-07767/AGR). The group of IRTA is a member of the CONSOLIDER Center for Basic Genomics and Agro-food Orientation (CSD2007-00036).

References

- Aranzana MJ, Garcia-Mas J, Carbó J, Arús P (2002) Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breed* 121:87–92
- Aranzana MJ, Pineda A, Cosson P, Dirlwanger E, Ascasibar J, Cipriani G, Ryder CD, Testolin R, Abbott A, King GJ, Iezzoni AF, Arús P (2003a) A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theor Appl Genet* 106:819–825
- Aranzana MJ, Carbó J, Arús P (2003b) Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch.]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. *Theor Appl Genet* 106:1341–1352
- Arulsekar S, Parfitt DE, Kester DE (1986) Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. *J Heredity* 77:272–274
- Arús P, Yamamoto T, Dirlwanger E, Abbott AG (2005) Synteny in the Rosaceae. In: Janick J (ed) *Plant Breeding Reviews* 27:175–211
- Byrne DH (1990) Isozyme variability in four diploid stone fruits compared with other woody perennial plants. *J Heredity* 81:68–71
- Cipriani G, Lot G, Huang WG, Marrazzo MT, Peterlunger E, Testolin R (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor Appl Genet* 99:65–72
- Decroocq V, Favé MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theor Appl Genet* 106:912–922
- Dirlwanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana MJ, Poizat C, Zanetto A, Arús P, Laigret F (2002) Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor Appl Genet* 105:127–138
- Dirlwanger E, Graziano E, Joobeur T, Garriga-Calderé F, Cosson P, Howad W, Arús P (2004a) Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9891–9896
- Dirlwanger E, Cosson P, Howad W, Capdeville G, Bosselut N, Clavierie M, Voisin R, Poizat C, Lafargue B, Baron O, Laigret F, Kleinhentz M, Arús P, Esmenjaud D (2004b) Microsatellite genetic linkage maps of myrobalan plum and an almond–peach hybrid—location of root-knot nematode resistance genes. *Theor Appl Genet* 109:827–838
- 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 Genet Genomes* 3:239–249
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15
- Garcia-Mas J, Monforte AJ, Arús P (2004) Phylogenetic relationships among *Cucumis* species based on the ribosomal internal transcribed spacer sequence and microsatellite markers. *Plant Syst Evol* 248:191–203
- Graham J, Smith K, Woodhead M, Russell J (2002) Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species. *Mol Ecol Notes* 2:250–252
- Granger AR, Clarke GR, Jackson JF (1993) Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism. *Theor Appl Genet* 86:458–464
- Hagen LS, Chaib J, Fady B, Decroocq V, Bouchet JP, Lambert P, Audergon JM (2004) Genomic and cDNA microsatellites from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Mol Ecol Notes* 4:742–745
- Hendre PS, Phanindranath R, Annapurna V, Lalremruata A, Aggarwal RK (2008) Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies. *BMC Plant Biol* 8:51
- Hesse C (1975) Peaches. In: Janick J, Moore J (eds) *Advances in fruit breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, pp 285–335
- Hormaza JI (2002) Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theor Appl Genet* 104:321–328
- Horn R, Lecouls AC, Callahan A, Dandekar A, Garay L et al (2005) Candidate gene database and transcript map for peach, a model species for fruit trees. *Theor Appl Genet* 110:1419–1428
- Howad W, Yamamoto T, Dirlwanger 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
- Kimura T, Nishitani C, Iketani H, Ban Y, Yamamoto T (2006) Development of microsatellite markers in rose. *Mol Ecol Notes* 2:250–252
- Liebhart R, Gianfranceschi L, Koller B, Ruder CD, Tarchini R, Weg EVD, Gessler C (2002) Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Mol Breed* 10:217–241
- Luro FL, Constantino G, Terol J, Argout X, Allario T, Wincker P, Talón M, Ollittraut P, Morillon R (2008) Transferability of the ESR-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics* 9:287
- Miller PJ, Parfitt DE, Weinbaum SA (1989) Outcrossing in peach. *HortScience* 24:359–360
- Mnejma M, Garcia-Mas J, 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. *Mol Ecol Notes* 4:163–166
- Mnejma M, Garcia-Mas J, Howad W, Arús P (2005) Development and transportability across *Prunus* species of forty-two polymorphic almond microsatellites. *Mol Ecol Notes* 5:531–535
- Monfort A, Vilanova S, Davis TM, Arús P (2006) A new set of polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from a wild strawberry (*Fragaria vesca*) are transferable to other diploid *Fragaria* species and to *Fragaria x ananassa*. *Mol Ecol Notes* 6:197–200
- Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 3(1):175–182
- Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30:194–200
- Palop M, Palacios C, González-Candelas F (2000) Development and across-species transferability of microsatellite markers in the genus *Limonium* (*Plumbaginaceae*). *Conserv Genet* 1:177–179
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A (1998) Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple-sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol Biol Evol* 15:1275–1287
- Pierantoni L, Cho KH, Shin IS, Chiodini R, Tartarini S, Dondini L, Kang SJ, Sansavini S (2004) Characterisation and transferability of apple SSRs to two European pear F1 populations. *Theor Appl Genet* 109:1519–1524
- Potter D, Eriksson T, Evans RC, Oh S, Smedmark JEE, Morgan DR, Kerr M, Robertson KR, Arsenault M, Dickinson TA, Campbell CS (2007) Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Syst Evol* 266:5–43
- Rousseau-Gueutin M, Lerceteau-Köhler E, Barrot L, Sargent DJ, Monfort A, Simpson D, Arús P, Guérin G, Denoyes-Rothan B

- (2008) Comparative genetic mapping between octoploid and diploid *Fragaria* species reveals a high level of colinearity between their genomes and the essentially disomic behavior of the cultivated octoploid strawberry. *Genetics* 179:2045–2060
- Sánchez-Pérez R, Howad W, 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
- Sargent DJ, Cipriani G, Vilanova S, Gil-Ariza D, Arús P, Simpson DW, Tobutt KR, Monfort A (2008) The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map. *Genome* 51:120–127
- Scorza R, Sherman WB (1996) Peaches. In: Janick J, Moore JN (eds) *Fruit breeding: tree and tropic fruits*. Wiley, New York, pp 325–440
- Shulaev V, Korban SS, Sosinski B et al (2008) Multiple models for Rosaceae genomics. *Plant Physiol* 147:985–1003
- Silfverberg-Dilworth E, Matasci CL, van de Weg WE, van Kaauwen MPW, Walser M, Kodde LP, Soglio V, Gianfranceschi L, Durel C-E, Costa F, Yamamoto T, Koller B, Gessler C, Patocchi A (2006) Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genet Genomes* 2:202–224
- Smulders MJM, Bredemeijer G, Rus-Kortekaas W, Arens P, Vosman B (1997) Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor Appl Genet* 94:264–272
- Soriano JM, Romero C, Vilanova S, Llácer G, Badenes ML (2005) Genetic diversity of loquat germplasm (*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl) assessed by SSR markers. *Genome* 48:108–114
- Soriano JM, Vera-Ruiz EM, Vilanova S, Martínez-Calvo J, Llácer G, Badenes ML, Romero C (2008) Identification and mapping of a locus conferring plum pox virus resistance in two apricot-improved linkage maps. *Tree Genet Genomes* 4:391–402
- Squirrell J, Hollingsworth PM, Woodhead M, Russell J, Lowe AJ, Gibby M, Powell W (2003) How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Mol Ecol* 12:1339–1348
- Tavaud M (2002) Diversité génétique du cerisier doux (*Prunus avium* L.) sur son aire de répartition : Comparaison avec ses espèces apparentées (*P. cerasus* et *P. gondouinii*) et son compartiment sauvage. Ph.D. thesis. École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (France)
- Terakami S, Shoda M, Adach Y, Gonai T, Kasumi M, Sawamura Y, Iketani H, Kotobuki K, Patocchi A, Gessler C, Hayashi T, Yamamoto T (2006) Genetic mapping of the pear scab resistance gene *Vnk* of Japanese pear cultivar Kinchaku. *Theor Appl Genet* 113:743–752
- Varshney RK, Graner A, Sorrels M (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotech* 23:48–55
- Vaughan SP, Russell K (2004) Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Mol Ecol Notes* 4:429–431
- Vilanova S, Romero C, Abbott AG, Llacer 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. *Theor Appl Genet* 107:239–247
- Vilanova S, Sargent DJ, Arús P, Monfort A (2008) Synteny conservation between two distantly-related Rosaceae genomes: *Prunus* (the stone fruits) and *Fragaria* (the strawberry). *BMC Plant Biol* 8:67
- Viruel MA, Sánchez D, Aranzana MJ, Garcia-Mas J, Arús P (2002) Aislamiento, caracterización y herencia de loci microsatélites en fresón (*Fragaria x ananassa* Dutch.). *Acta Hort* 34:615–620
- Watkins R (1995) Cherry, plum, peach apricot and almond. In: Smartt J, Simmonds NW (eds) *Evolution of crop plants*, 2nd edn. Longman Scientific and Technical, Burnt Mill
- Weeden NF, Lamb RC (1985) Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *J Am Soc Hort* 34:509–515
- Wen J, Berggren ST, Lee CH, Ickert-Bond S, Yi TS, Yoo KO, Xie L, Shaw J, Potter D (2008) Phylogenetic inferences in *Prunus* (Rosaceae) using chloroplast *ndhF* and nuclear ribosomal ITS sequences. *J Syst Evol* 46:322–332
- Wünsch A (2009) Cross-transferable polymorphic SSR loci in *Prunus* species. *Sci Hort* 120:348–352
- Wünsch A, Hormaza JI (2002) Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) SSR sequences. *Heredity* 89:56–63
- Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Kotobuki K, Ban Y, Hayashi T, Matsuta N (2001) SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor Appl Genet* 102:865–870
- Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, Ban Y, Hayashi T, Matsuta N (2002) Development of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Mol Ecol Notes* 2:14–16
- Yamamoto T, Kimura T, Soejima J, Sanada T, Ban Y, Hayashi T (2004) Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. *Breed Sci* 54:239–244
- Zhang LY, Bernard M, Leroy P, Feuillet C (2005) High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. *Theor Appl Genet* 111:677–687

Table 1S: EST-derived almond microsatellites

Locus (GenBank accession no)	Primer sequence (5'-3')	Ta ¹	Size (bp)	Repeat motif
EPDCU5062 (BU575062)	F: GTCAATGCTCCCCAACTCAT R: TGTTGTCCCTGTCTCCTTC	57	166	(GCA) ₆
EPDCU4658 (BU574658)	F: GGGCGTGAAGGTGTTACTGT R: GGTGACACAGAAGAGAGCAGAA	57	184	(TC) ₂₄
EPDCU4466 (BU574466)	F: ACCCCACCACAAGTCCAATA R: CTGCTGATGCTGATGCTGAT	60	133	(CA) ₂ -(CAG) ₆ - (CAA) ₃ -(CAG) ₈
EPDCU4017 (BU574017)	F: CTGAGCCCACCTCTGTTCTC R: CAAGCAGGTGGTTGTGTCTG	57	152	(CGG) ₇
EPDCU3392 (BU573392)	F: CTTTTCATGGGTTCCCTCACC R: ATCAACCAGTTCACGCACAA	57	123	(GA) ₁₇
EPDCU3122 (BU573122)	F: AGCGGAGTGTACAGCAAGGT R: TATGTTGTTTCCGGCATTGA	57	177	(CAA) ₈
EPDCU3083 (BU573083)	F: TCTTCTCCCTCTCCCTCAGC R: CCCATGACCCTCTTCTTCAA	57	121	(TC) ₁₁
EPDCU2862 (BU572862)	F: GTGGAAAACCTGCTCCAGA R: TCATTCTCTTCCCAGATGC	57	146	(GAC) ₂ -(GAT) ₇ - (GCT) ₃
EPDCU2584 (BU572584)	F: TTCAGCTCATCTAGTTTCATCACC R: CACGGTTCGAACAACATCTG	57	132	(TTC) ₄ -(CTT) ₂ - (TTC) ₃
EPDCU5100 (BU575100)	F: CTCTTCTCGCCTCCCAATTT R: TGCTTAGCCCTGGGTACAAG	57	174	(GA) ₇ -(GA) ₄
EPDCU5046 (BU575046)	F: CGAAATCGGCCTACAGAGAC R: CGAAAAAGGCCACTGTCAAT	60	182	(GA) ₉
EPDCU4805 (BU574805)	F: ATGTTGGTTGGGGAGTTGAG R: CCCCTCCTCATCGTCTGTA	57	187	(AT) ₈
EPDCU3647 (BU573647)	F: GGGGCGTTTCTCACTCTTAAT R: AAACCAAAAAGAGAAGGGCTTT	47	110	(TC) ₉
EPDCU3547 (BU573547)	F: AGGGGTGTTCTAAGGGCAGT R: TTCATGCTGCTGCTCTTGTT	57	162	(CAA) ₅
EPDCU3537 (BU573537)	F: ACGCGAAGCCAAAACAAATA R: GAAACGAAAAGAGGGGAAGC	57	135	(GA) ₈
EPDCU3516 (BU573516)	F: ACCGTTAACGAGGCTCAGTC R: ACCTCCACTGCCATATCCAC	57	183	(GCG) ₅
EPDCU3454 (BU573454)	F: GAGGCGGAGGAAGAAGAGGAT R: TGCTGCTGATGAAGGAGATG	57	122	(CAG) ₅
EPDCU3158 (BU573158)	F: GTTCGGAGTCCAATGACGAT R: ATTGCCAGCTGATCTTGGAG	57	110	(GAT) ₅
EPDCU3146 (BU573146)	F: CTAGGGGCAGTGTTCTCTGG R: TGCTGCTGCTCTTGTTGTCT	57	152	(CAA) ₅
EPDCU3117 (BU573117)	F: CAGAGGGAACAGTGTGAGCA R: TGTTGTTGTCGACCCTGAAA	57	164	(GAG) ₆
EPDCU2931 (BU572931)	F: AAATCCCTGCAGCATTTTTG R: CCTCATGAGCAAATCTTCCTG	57	142	(TA) ₁₂
EPDCU2804 (BU572804)	F: TTCCCTCGGACACTCTCACT R: TCGTCCGCCATTATTATCC	47	196	(CT) ₉

¹ Ta = annealing temperature (°C)

Table 2S. EST-derived peach microsatellites

Locus (GenBank accession no)	Primer sequence (5'-3')	Ta ¹	Size (bp)	Repeat motif
EPPCU9268 (BU039268)	F: CTCCGTCCCACCTAAAAAT R: ACAATGACGAAACCGAGGAG	60	195	(CT)11
EPPCU9300 (BU039300)	F: TTCCCAACTGTGAAGCTGTT R: TGCTTTTCTTTCTCCTGGGCTA	60	148	(AG)23
EPPCU9566 (BU039566)	F: TCGACTACGTCTCCGTCTCC R: AGCCGAATGCTGTCCTTAGA	60	146	(TC)18
EPPCU9773 (BU039773)	F: GCAGAGAAGCGCCTTATTTT R: AGCTGATCAAGGAAGCTGGA	60	177	(CT)14
EPPCU0532 (BU040532)	F: AAAGGGCGATGTTTCAGAGTG R: TGACGAGTTTGTCCGGTTTTG	60	173	(AG)13
EPPCU1106 (BU041106)	F: CGAAGCTGAATCGAGATTATGA R: CCGAAACACAATACTCTTGCAAT	60	199	(TC)18
EPPCU1198 (BU041198)	F: TTGCCAGTTCATCATTGTTTG R: ACCATTATGCCTTGGTCACAGG	57	200	(TC)18
EPPCU2000 (BU042000)	F: CACTTTGTTTCTCTCCTTGCTTC R: TCCTATAGCCTTGCCCTCGAC	60	120	(TC)12
EPPCU2256 (BU042256)	F: TTCACCATCCTCACTTTCACA R: CTAGGCCAGTTTTGGACAGC	60	175	(TC)23
EPPCU2957 (BU042957)	F: AAGTCTCCACCTTTGTTAAGTTTCA R: TGTCCAGCGTATTCTTCAGC	60	144	(CT)9
EPPCU4921 (BU044921)	F: AATTTTCTCTTTCATTTCTCATATC R: CCTCCTCGTCTTCTCTGTGC	60	133	(CT)12
EPPCU4962 (BU044962)	F: TCCCGATCTGAGACTAACCCCTA R: ATTCGCTCCAAAACCAATG	60	195	(TC)19
EPPCU5191 (BU045191)	F: TAGAGCCCAACCGAAAGAAA R: GGCACCAAAGGAAATTTTTG	57	170	(CT)13
EPPCU6216 (BU046216)	F: GAGGGAGAAACAGAGAGACAGAG R: CAGCCAAAAGCAATGACA	60	200	(AG)5- (AG)3- (AG)13
EPPCU7340 (BU047340)	F: AACTCATCACCCATCCATCC R: TCGTGGATTCTCTGCTTT	60	172	(CT)3-(CT)10
EPPCU9054 (BU039054)	F: CGGTAGGCTGATGGATTTGT R: CGCTGGAGAATACATAGGG	60	187	(AT)15
EPPCU9168 (BU039168)	F: TCCTTTCTCCATGTTTTCCA R: GGAATCGGCATAAGCAAAA	60	188	(TA)4-(TA)13
EPPCU0491 (BU040491)	F: ACCGCAGCTGCTTAATCAAT R: GGAACAAATTGCGAAAAGGA	60	166	(TA)9-C-(TA)2
EPPCU1966 (BU041966)	F: CTGCTTGCCTACAAAGAATA R: GTTTTCAAGCGCCCAAGTAA	60	180	(TA)13-(AG)16
EPPCU2288 (BU042288)	F: TTGAGTGATAAATCAGACATTTG R: ATGGAGCCCATCTCGTCTAA	60	147	(AT)12
EPPCU3088 (BU043088)	F: AAATCAGCTCCCATCACTCC R: AGCTGAGTGGAACCAGAGGA	60	169	(TA)12
EPPCU4726 (BU044726)	F: GCAGGAATTGGATGATTTTG R: AGGGAATGCTTGCTCTATGC	60	179	(AT)19
EPPCU5176 (BU045176)	F: AATCACCCACCTCTCTCT R: TTCTATGCCTGCTGCTGATG	60	123	(TA)11
EPPCU8702 (BU048702)	F: GCAATGGCTTTGGCTAGGTA R: CATGCAACTAATTAACACAATGA	60	119	(TA)9
EPPCU1098 (BU041098)	F: GGAGGAAGGTGGGTTCTGTT R: GGCCTCATTGGTGTATGTCC	60	199	(ATC)12

¹ Ta = annealing temperature (°C)

Table 3S. Variability of 145 *Prunus* SSRs in nine rosaceous species

SSR	Sp ¹	O ²	Almond			Peach			Apricot			Japanese plum			European plum			Cherry			Apple			Pear			Strawberry									
			Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵							
CPDCT003	Al	G				1	3	0.38	1	1	-	1	5	0.63	3	10	n.c.	1	2	0.38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT004	Al	G				1	1	-	-	-	-	1	2	0.38	2	8	n.c.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT005	Al	G				1	1	-	1	5	1.00	1	6	0.88	2	8	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT006	Al	G				1	2	0.00	1	4	0.75	-	-	-	2	6	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT007	Al	G				1	2	0.25	2	3/2	0.50/0.38	1	5	0.38	2	9	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT014	Al	G				2	2/2	0.38/0.38	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT016	Al	G				1	2	0.13	1	5	0.86	1	4	0.63	2	9	n.c.	1	2	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT017	Al	G				1	1	-	-	-	-	1	3	0.75	2	5	n.c.	1	3	0.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT019	Al	G				1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT022	Al	G				1	4	0.50	1	2	0.25	1	5	1.00	2	7	n.c.	1	5	0.88	1	1	-	1	2	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT025	Al	G				1	1	-	1	2	0.50	1	4	0.88	2	12	n.c.	1	3	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT027	Al	G				1	1	-	1	2	0.38	1	3	0.75	2	3	n.c.	1	1	-	1	2	0.00	1	2	0.38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT028	Al	G				1	1	-	1	4	0.88	1	5	0.75	2	7	n.c.	2	3/1	0.75/-	1	2	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT029	Al	G				2	2/3	0.50/0.88	2	6	n.c.	1	3	0.50	2	4	n.c.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT031	Al	G				1	1	-	1	5	1.00	1	1	-	2	5	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT033	Al	G				1	6	1.00	1	4	1.00	1	7	1.00	3	10	n.c.	1	1	-	-	-	-	1	3	0.75	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT034	Al	G				1	4	0.63	1	2	0.50	1	3	0.13	3	6	n.c.	1	2	0.63	1	4	0.50	2	3	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT035	Al	G				1	1	-	2	2/3	0.57/0.29	-	-	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT037	Al	G				1	2	0.63	1	3	0.75	1	8	0.75	1	7	0.75	1	5	0.71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT038	Al	G				1	1	-	1	1	-	1	7	0.25	2	5	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT039	Al	G				1	1	-	1	3	0.38	1	4	0.25	2	9	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT040	Al	G				1	4	0.38	1	2	0.38	1	4	0.63	2	4	n.c.	1	1	-	2	4	n.c.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT042	Al	G				1	1	-	1	5	0.38	1	6	0.38	3	10	n.c.	1	1	-	1	2	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT044	Al	G				1	1	-	-	-	-	1	7	0.63	2	9	n.c.	-	-	-	1	2	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPDCT045	Al	G				1	3	0.88	1	4	0.63	1	4	0.88	3	9	n.c.	1	4	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU5062	Al	E				1	1	-	1	2	0.38	1	2	0.50	2	4	n.c.	1	2	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU4658	Al	E				1	2	0.50	1	4	0.88	1	5	0.88	3	10	n.c.	1	1	-	1	1	-	1	3	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU4466	Al	E				1	1	-	1	1	-	1	3	0.88	1	2	0.75	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU4017	Al	E				1	1	-	1	2	0.50	1	2	0.50	2	4	n.c.	1	2	0.13	1	2	0.5	1	1	-	1	2	0.13	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU3392	Al	E				1	2	0.13	1	3	0.63	1	5	0.75	3	11	n.c.	1	3	0.63	-	-	-	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU3122	Al	E				1	1	-	1	1	-	1	3	0.75	3	8	n.c.	1	1	-	1	2	0.5	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 3S (continued)

SSR	Sp ¹	O ²	Almond			Peach			Apricot			Japanese plum			European plum			Cherry			Apple			Pear			Strawberry		
			Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵
EPDCU3083	AI	E				1	3	0.50	1	4	0.63	2	7/3	0.63/0	2	11	n.c.	1	2	0.38	-	-	-	-	-	-	1	1	-
EPDCU2862	AI	E				1	2	0.25	1	3	0.75	1	1	-	1	1	-	1	1	-	2	3/1	0.25/-	1	1	-	1	1	-
EPDCU2584	AI	E				1	1	-	1	1	-	1	1	-	1	3	0.63	1	1	-	1	2	0.63	1	1	-	1	1	-
EPDCU5100	AI	E				1	2	0.50	1	3	0.50	1	3	0.63	2	3	n.c.	1	2	0.00	1	1	-	1	1	-	-	-	-
EPDCU5046	AI	E				1	1	-	1	1	-	1	2	0.25	3	9	n.c.	1	2	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU4805	AI	E				1	1	-	1	3	0.50	1	2	0.38	4	4	n.c.	1	1	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-
EPDCU3647	AI	E				-	-	-	1	5	0.38	2	1/4	-0.63	4	10	n.c.	2	1/1	-/-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
EPDCU3547	AI	E				1	1	-	1	2	0.13	2	2/2	0.50/0.13	3	8	n.c.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU3537	AI	E				-	-	-	1	3	0.75	2	4/1	0.88/-	2	6	n.c.	-	-	-	-	-	-	1	2	0.25	-	-	-
EPDCU3516	AI	E				1	1	-	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	2	0.13
EPDCU3454	AI	E				1	1	-	2	1/2	-0.38	1	1	-	2	2	n.c.	1	1	-	1	1	-	1	1	-	-	-	-
EPDCU3158	AI	E				1	1	-	1	1	-	2	2/1	0.38/-	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU3146	AI	E				1	1	-	1	1	-	1	2	0.00	2	4	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU3117	AI	E				1	2	0.25	1	3	0.38	1	2	0.50	2	5	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU2931	AI	E				1	2	0.50	1	3	0.75	1	5	0.63	2	4	n.c.	1	4	0.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPDCU2804	AI	E				1	1	-	1	2	0.38	1	2	0.13	4	8	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPPCT001	P	G	1	6	0.63				1	2	0.25	1	4	0.63	3	11	n.c.	1	1	-	1	1	-	2	3/1	0.50/-	-	-	-
BPPCT006	P	G	-	-	-				1	1		1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-
BPPCT007	P	G	1	7	0.75				1	5	0.25	1	6	0.88	3	11	n.c.	1	2	0.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPPCT008	P	G	2	5/6	0.50/0.50				2	4/1	0.88/-	2	7/1	0.63/-	5	19	n.c.	1	3	0.75	1	1	-	1	1	-	1	1	-
BPPCT011	P	G	1	7	1.00				1	3	0.63	1	3	0.38	2	6	n.c.	1	3	0.38	1	1	-	1	1	-	1	1	-
BPPCT014	P	G	1	3	0.50				1	1		1	6	1.00	3	10	n.c.	1	2	0.50	2	11	n.c.	2	7	n.c.	-	-	-
BPPCT015	P	G	2	8	n.c.				-	-		-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
BPPCT016	P	G	1	1	-				1	2	0.13	-	-	-	2	5	n.c.	-	-	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-
BPPCT017	P	G	1	7	1.00				1	3	0.88	1	5	0.88	1	9	0.75	1	1	-	1	1	-	1	1	-	2	4	n.c.
BPPCT020	P	G	1	6	0.63				-	-		-	-	-	2	4	n.c.	-	-	-	1	1	-	1	2	0.13	-	-	-
BPPCT023	P	G	1	7	0.63				-	-		1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPPCT025	P	G	1	8	0.63				1	3	0.63	1	5	0.13	3	13	n.c.	-	-	-	1	1	-	1	2	0.00	-	-	-
BPPCT033	P	G	-	-	-				1	1		1	3	0.25	2	1/2	-0.38	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
BPPCT037	P	G	1	5	0.38				-	-		1	3	0.88	2	3	n.c.	1	5	1.00	1	1	-	1	1	-	-	-	-

Table 3S (continued)

SSR	Sp ¹	O ²	Almond			Peach			Apricot			Japanese plum			European plum			Cherry			Apple			Pear			Strawberry		
			Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵
BPPCT038	P	G	1	6	0.75				1	5	0.75	1	7	0.75	3	12	n.c.	1	5	0.63	-	-	-	1	1	-	1	1	-
CPPCT005	P	G	1	7	0.38				1	2	0.25	1	7	1.00	4	13	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	
CPPCT006	P	G	1	9	0.88				1	3	0.88	1	4	0.88	3	9	n.c.	1	4	0.63	2	3/1	0.63/-	1	4	0.88	-	-	-
CPPCT014	P	G	1	8	1.00				1	3	0.38	1	3	0.75	2	5	n.c.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPPCT017	P	G	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPPCT022	P	G	1	5	0.38				1	4	0.38	1	6	0.75	3	10	n.c.	1	1	-	1	2	0.25	-	-	-	-	-	-
CPPCT028	P	G	1	9	0.75				-	-	-	2	6/1	0.88/-	1	1	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-
CPPCT029	P	G	2	9	n.c.				-	-	-	-	-	-	2	6	n.c.	1	4	0.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPPCT030	P	G	1	5	0.50				1	4	0.50	1	5	0.63	3	10	n.c.	1	1	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-
CPPCT031	P	G	1	2	0.13				1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-	
CPPCT033	P	G	1	6	0.75				1	2	0.25	1	5	1.00	3	8	n.c.	1	4	0.38	1	1	-	1	1	-	1	1	-
EPPCU9268	P	E	1	5	0.50				1	2	0.13	1	1	-	1	2	0.13	1	5	0.38	2	5	n.c.	-	-	-	-	-	-
EPPCU9300	P	E	1	9	1.00				1	4	0.50	1	7	1.00	3	13	n.c.	1	4	1.00	3	6/1	n.c./-	2	6	n.c.	-	-	-
EPPCU9566	P	E	1	7	0.50				1	5	1.00	1	6	0.75	2	5	n.c.	1	1	-	-	-	-	3	8	n.c.	-	-	-
EPPCU9773	P	E	1	7	0.63				1	2	0.50	1	3	0.50	2	11	n.c.	1	2	0.50	1	2	0.25	1	3	0.38	-	-	-
EPPCU0532	P	E	1	6	0.75				1	3	0.38	1	6	0.88	3	10	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPPCU1106	P	E	1	1	-				1	1	-	1	9	1.00	2	9	n.c.	1	4	0.38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPPCU1198	P	E	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPPCU2000	P	E	1	7	0.75				1	2	0.50	1	3	0.25	3	5	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPPCU2256	P	E	1	9	0.75				1	4	0.50	1	9	1.00	3	13	n.c.	2	3/2	0.38/0.63	1	1	-	1	1	-	1	2	0.13
EPPCU2957	P	E	1	3	0.50				1	3	1.00	1	7	0.88	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
EPPCU4921	P	E	1	6	0.88				1	1	-	1	6	1.00	2	8	n.c.	1	1	-	1	1	-	1	1	-	-	-	-
EPPCU4962	P	E	-	-	-				1	5	0.63	1	7	0.63	3	6	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPPCU5191	P	E	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	0.38	1	2	0.63	
EPPCU6216	P	E	1	7	0.88				1	4	0.75	1	6	0.88	1	2	0.13	1	1	-	1	5	0.50	-	-	-	-	-	-
EPPCU7340	P	E	1	6	0.50				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPPCU9054	P	E	-	-	-				-	-	-	-	-	-	1	2	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	0.13
EPPCU9168	P	E	1	6	0.63				1	5	0.63	1	4	0.75	2	5	n.c.	1	3	0.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPPCU0491	P	E	-	-	-				1	4	0.25	-	-	-	-	-	-	1	4	0.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPPCU1966	P	E	1	7	0.50				-	-	-	1	7	0.75	2	4	n.c.	-	-	-	2	6	n.c.	-	-	-	-	-	-
EPPCU2288	P	E	1	9	0.88				-	-	-	1	2	0.50	3	14	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 3S (continued)

SSR	Sp ¹	O ²	Almond			Peach			Apricot			Japanese plum			European plum			Cherry			Apple			Pear			Strawberry		
			Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵
EPPCU3088	P	E	1	6	0.88				1	2	0.25	1	4	0.88	2	5	n.c.	1	4	0.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPPCU4726	P	E	1	8	0.63				1	1	-	1	3	0.75	3	10	n.c.	1	1	-	1	3	0.63	1	1	-	-	-	-
EPPCU5176	P	E	1	7	0.63				-	-	-	1	3	1.00	2	4	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	1	3	0.50	
EPPCU8702	P	E	1	3	0.20				1	2	0.13	1	4	0.63	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EPPCU1098	P	E	1	6	0.63				1	2	0.63	1	2	0.13	3	10	n.c.	1	1	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-
CPST004	JP	G	1	2	0.25	1	2	0.13	1	2	0.38				1	2	0.13	1	1	-	2	4	n.c.	2	4	n.c.	1	2	0.00
CPST005	JP	G	-	-	-	1	2	0.38	1	3	0.63				2	9	n.c.	-	-	-	2	5	n.c.	-	-	-	-	-	-
CPST006	JP	G	1	4	0.88	1	2	0.13	1	3	0.25				2	10	n.c.	1	1	-	2	7	n.c.	2	7	n.c.	1	5	0.50
CPST008	JP	G	1	6	1.00	1	1	-	1	4	0.29				2	6	n.c.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPST010	JP	G	1	7	0.75	1	4	1.00	1	3	0.50				2	10	n.c.	1	1	-	-	-	-	1	2	0.63	-	-	-
CPST011	JP	G	1	2	0.13	1	1	-	1	5	1.00				3	12	n.c.	-	-	-	-	-	-	2	6	n.c.	-	-	-
CPST012	JP	G	1	8	0.88	1	3	0.50	1	3	0.50				3	10	n.c.	1	2	0.63	2	6	n.c.	-	-	-	-	-	-
CPST018	JP	G	1	8	0.57	1	2	0.13	1	2	0.25				3	10	n.c.	1	5	0.63	2	3	n.c.	1	4	0.13	-	-	-
CPST021	JP	G	1	5	0.25	1	2	0.13	1	4	0.63				2	11	n.c.	1	2	0.25	-	-	-	1	3	0.13	1	1	-
CPST022	JP	G	1	2	0.38	1	2	0.38	1	1	-				3	7	n.c.	1	2	0.63	1	4	0.38	1	6	0.75	-	-	-
CPST024	JP	G	1	2	0.63	1	1	-	1	4	0.63				3	10	n.c.	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
CPST025	JP	G	1	1	-	1	1	-	1	5	0.63				3	8	n.c.	-	-	-	1	2	0.38	1	1	-	1	1	-
CPST026	JP	G	1	1	-	2	1/1	-	2	5/3	0.63/0.50				4	14	n.c.	1	2	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPST027	JP	G	1	6	0.75	1	1	-	-	-	-				2	9	n.c.	1	2	0.63	2	5	n.c.	-	-	-	-	-	-
CPST029	JP	G	1	1	-	1	1	-	1	1	-				1	5	0.63	1	5	0.75	-	-	-	1	1	-	1	1	-
CPST030	JP	G	1	5	0.50	1	1	-	1	3	1.00				3	12	n.c.	1	1	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-
CPST032	JP	G	2	2/5	0.25/0.38	-	-	-	1	2	0.63				3	10	n.c.	1	3	0.63	1	5	0.50	1	1	-	-	-	-
CPST033	JP	G	1	6	0.88	1	4	0.63	1	4	0.50				3	12	n.c.	2	2/4	0.25/0.63	2	6	n.c.	-	-	-	-	-	-
CPST034	JP	G	-	-	-	-	-	-	1	3	0.50				3	11	n.c.	1	2	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPST035	JP	G	1	2	0.13	1	1	-	-	-	-				2	9	n.c.	1	3	0.38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPST036	JP	G	1	1	-	1	1	-	1	2	0.50				3	7	n.c.	1	2	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPST037	JP	G	-	-	-	1	1	-	-	-	-				3	7	n.c.	1	3	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPST039	JP	G	2	6/4	0.83/0.63	1	3	0.38	1	6	0.75				3	10	n.c.	1	2	0.25	1	4	0.63	-	-	-	-	-	-
CPST042	JP	G	1	6	1.00	1	1	-	1	4	0.88				3	10	n.c.	-	-	-	1	3	0.38	-	-	-	-	-	-
CPST044	JP	G	1	5	0.88	1	1	-	1	3	0.50				3	14	n.c.	1	2	0.63	2	4	n.c.	-	-	-	-	-	-

Table 3S (continued)

SSR	Sp ¹	O ²	Almond			Peach			Apricot			Japanese plum			European plum			Cherry			Apple			Pear			Strawberry		
			Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵	Am ³	A ⁴	Ho ⁵
AMPA92	Ap	G	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMPA93	Ap	G	1	6	0.00	1	3	0.50				-	-	-	2	7	n.c.	1	5	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMPA94	Ap	G	1	3	0.25	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	
AMPA100	Ap	G	1	6	0.63	1	1	-				1	3	0.63	3	8	n.c.	1	1	-	2	6	n.c.	-	-	-	-	-	
AMPA101	Ap	G	1	7	0.50	1	2	0.63				1	6	1.00	3	12	n.c.	1	5	0.88	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMPA103	Ap	G	1	6	0.75	1	3	0.13				1	5	0.75	3	12	n.c.	1	2	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMPA105	Ap	G	1	8	0.88	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	2	3/1	0.63/-	-	-	-	-	-	-	
AMPA107	Ap	G	1	6	0.50	1	3	0.88				1	6	0.57	1	5	0.63	1	2	0.38	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMPA109	Ap	G	-	-	-	1	4	0.38				-	-	-	4	17	n.c.	1	3	0.63	-	-	-	-	-	-	1	1	
AMPA110	Ap	G	1	8	0.75	1	2	0.38				1	7	1.00	3	11	n.c.	1	2	0.14	1	1	-	-	-	-	-	-	
AMPA112	Ap	E	1	5	0.75	1	2	0.25				1	3	0.25	1	2	0.13	1	1	-	-	-	-	-	-	2	5	n.c.	
AMPA113	Ap	E	1	8	0.75	1	3	0.13				1	5	0.63	2	7	n.c.	1	4	0.75	1	4	0.63	1	2	0.13	-	-	
AMPA114	Ap	E	1	1	-	1	1	-				1	2	0.25	2	7	n.c.	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	
AMPA115	Ap	E	1	8	0.63	1	2	0.25				1	5	0.25	3	8	n.c.	1	5	0.25	1	1	-	1	1	-	1	1	
AMPA116	Ap	E	1	4	0.63	1	2	0.38				1	3	0.38	2	9	n.c.	1	1	-	1	1	-	1	1	-	1	1	
AMPA118	Ap	E	1	1	-	1	1	-				1	1	-	1	1	-	1	3	0.50	1	1	-	1	2	0.00	1	1	
AMPA119	Ap	E	1	1	-	1	2	0.13				1	7	0.75	3	13	n.c.	1	2	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMPA121	Ap	E	1	8	0.75	1	2	0.25				-	-	-	3	8	n.c.	1	6	1.00	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMPA122	Ap	E	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	
AMPA123	Ap	E	-	-	-	1	1	-				1	4	0.75	3	7	n.c.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	0.13
AMPA124	Ap	E	2	4/1	0.50/-	1	1	-				1	4	0.13	4	17	n.c.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	
AMPA126	Ap	E	-	-	-	1	1	-				1	4	0.25	1	3	0.13	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	
AMPA127	Ap	E	1	1	-	1	1	-				-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	

¹ Sp. SSR source species: Al = almond; P = peach; Ap = apricot; JP = Japanese plum

² O. origin of the microsatellite: G = from genomic DNA; E = from ESTs

³ Am. amplification: - = no amplification; 1-3 = estimated number of amplified loci

⁴ A. number of alleles detected for the primer pair. For primer pairs that detect two loci that can be individually interpreted the data for each locus is separated by a slash. For primer pairs with three loci or two loci with unclear allele assignment, the total number of alleles is shown.

⁵ Ho. observed heterozygosity for single-locus SSRs. For primer pairs that detect two loci that can be individually interpreted the data for each locus is separated by a slash. n.c. = not calculated (for primer pairs detecting two or three loci of unclear interpretation).

CAPÍTULO III
VARIABILIDAD

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL ALMENDRO USANDO MARCADORES MICROSATÉLITE

Introducción

El almendro, (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb), es la única especie del género *Prunus* cultivada por su semilla siendo su fruto una drupa típica de este género. Originario de Asia Central (Vavilov, 1930; Kovalyov, 1935), el cultivo del almendro fue expandiéndose desde su centro de origen hacia la cuenca mediterránea al principio y luego hacia todas las zonas de clima mediterráneo.

Durante dos mil años en diversos países de la cuenca mediterránea, el almendro fue multiplicado únicamente por semilla, eso ejerció sobre este cultivo durante muchas generaciones la presión de selección del clima y del hombre, formando de esta manera diversas poblaciones geográficas. Durante la domesticación, el hombre fue seleccionando genotipos que dan frutos dulces, de gran calibre (Grasselly y Duval, 1997) y con cáscaras fáciles de romper (Browicz y Zohary, 1996).

Estados Unidos, la cuenca mediterránea y Asia son las tres principales regiones del cultivo de almendro en el mundo, concentrándose más de la tercera parte de la producción mundial de almendras en los Estados Unidos (FAOSTAT data, 2013, <http://faostat.fao.org>) y de manera particular en California.

La especie *P. dulcis* presenta el sistema de autoincompatibilidad gametofítico típico de la familia de las Rosáceas (Fryxell, 1957; Keep, 1968). En base a la diversidad morfológica y molecular, el almendro se considera una de las especies frutales más polimórficas (Hauagge *et al.*, 1987; Byrne, 1990; Kester *et al.*, 1991; Socías i Company y Felipe, 1992; Bartolozzi *et al.*, 1998). El mantenimiento de esta variabilidad ha sido posible gracias en parte a la existencia de este sistema de autoincompatibilidad que ha impedido la autofecundación y la consiguiente pérdida de variabilidad (Gottlieb, 1981). Sin embargo, hay variedades autocompatibles de almendro, algunas

identificadas casi un siglo atrás (Lutri, 1935). La autocompatibilidad suele estar producida por un alelo (*Sf*) del locus de autoincompatibilidad que ha sido caracterizado (Fernández i Martí *et al.*, 2009; 2011) y usado para la obtención de variedades autocompatibles (Batlle *et al.*, 2001; López *et al.*, 2001; Mnejja *et al.*, 2002; López *et al.*, 2005a).

Para estudiar la variabilidad molecular del almendro, se han usado diferentes tipos de marcadores. Los primeros estudios se realizaron con isoenzimas (Arulsekar *et al.*, 1986; Hauagge *et al.*, 1987; Cerezo *et al.*, 1989; Byrne, 1990; Vezvaei *et al.*, 1994; Čolić *et al.*, 2010). Los RFLPs, que fueron los primeros marcadores basados en la secuencia del ADN, se usaron también en estudios de variabilidad de almendro (Viruel, 1995) y también de otras especies de *Prunus* como el albaricoquero (de Vicente *et al.*, 1998) o el melocotonero (Quarta *et al.*, 2001). Con el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa, se desarrollaron otros marcadores que fueron usados para el análisis de variabilidad e identificación varietal en el almendro, como los RAPDs (Bartolozzi *et al.*, 1998; Resta *et al.*, 1998; Woolley *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2003; MirAli y Nabulsi, 2003; Shiran *et al.*, 2007) y los AFLPs (Martins *et al.*, 2001; Aradhya *et al.*, 2004; Sorkheh *et al.*, 2007).

Los microsatélites son uno de los mejores marcadores para estudiar la variabilidad y diversidad genética (Tautz, 1989) por presentar un alto nivel de polimorfismo, por ser abundantes y por mostrar una herencia codominante (Gupta *et al.*, 1996; Gianfranceschi *et al.*, 1998; Sefc *et al.*, 1998). También los microsatélites son reproducibles y fáciles de usar y automatizar. En el almendro se han realizado varios estudios de variabilidad usando microsatélites (Martínez-Gómez *et al.*, 2003a; b; Xu *et al.*, 2004; Sánchez-Pérez *et al.*, 2005; Sánchez-Pérez *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2006; Shiran *et al.*, 2007; Zeinalabedini *et al.*, 2007; Fathi *et al.*, 2008; Dangl *et al.*, 2009; Gouta *et al.*, 2010; Zeinalabedini *et al.*, 2010; Kadkhodaei *et al.*, 2011; Gouta *et al.*, 2012; Rahemi *et al.*, 2012). Antes del año 2011, todos ellos, salvo el de Xu *et al.* (2004) y Xie *et al.* (2006) que emplearon algunos microsatélites obtenidos de secuencias de ESTs de almendro, usaron esencialmente microsatélites desarrollados a partir de ADN de melocotonero.

Sea cual sea el tipo de marcador usado para estudiar la diversidad y variabilidad genética en el almendro, todos los estudios coincidieron en que se trata de una especie altamente variable y heterocigótica. En esta investigación usaremos marcadores microsatélites derivados de secuencias de ESTs de almendro obtenidas de las bases de datos y otros obtenidos a partir de ADN genómico descritos en Mnejja *et al.* (2005) para estudiar la diversidad genética de una colección de cultivares, la estructura poblacional de dicha colección y evaluar la eficacia relativa de los SSRs de almendro comparados con los de melocotonero y la de los SSRs genómicos respecto a los derivados de ESTs en la detección de la variabilidad.

Materiales y métodos

Un total de 30 variedades de almendro de diferentes orígenes, especialmente mediterráneo y californiano, fueron elegidas para este estudio (ver Tabla 1). El ADN fue extraído de tejido foliar usando el método CTAB de Doyle y Doyle (1990), omitiendo el tratamiento final con RNAsas.

Se usaron 47 SSRs originados de ADN de almendro, todos polimórficos y amplificando un único locus en esta especie, de los cuales 25 son genómicos (CPDCT; Mnejja *et al.*, 2005) y los otros 22 derivados de ESTs de las bases de datos del almendro (EPDCU; Mnejja *et al.*, 2010) (ver Tabla 2).

Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen total de 15 μ l formado por 20 ng de ADN, 10 mM de Tris-HCl a 8,3 de pH, 2,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 0,001 % de gelatina, 0,4 μ M de cada cebador, 133 μ M de dATP, dTTP y dGTP, 1,6 μ M de dCTP, 1 U de la Taq polimerasa (PE Applied Biosystems) y 0,5 μ Ci del α^{33} P dCTP. El programa de PCR usado fue el siguiente: 1 min a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a temperatura de hibridación específica de cada pareja de cebadores y 30 s a 72°C, y finalmente 5 min de extensión a 72°C. Los productos desnaturalizados de PCR fueron separados en geles del 6% de poliacrilamida bajo una corriente constante de 100 W durante 2h. Para

definir los tamaños de los alelos, se utilizó en cada gel un marcador de peso molecular marcado, el 30-330 bp “DNA ladder” (Gibco BRL, Invitrogen, San Diego). El gel de poliacrilamida fue transferido a un papel de cromatografía Whatman 3 MM, luego secado al vacío y al final expuesto durante 2 días a un film de radiografía (CURIX RP2, AGFA, Mortsel, Belgium).

Para el estudio de variabilidad, calculamos diferentes parámetros: número total de alelos por locus (A), número efectivo de alelos por locus ($A_e=1/\sum p_i^2$, donde p es la frecuencia de cada alelo), la heterocigosidad observada (H_o =número de individuos heterocigóticos/número de individuos totales), la heterocigosidad esperada ($H_e=1-\sum p_i^2$), el índice de fijación de Wright ($F=1-H_o/H_e$) (Wright, 1951), el número total de genotipos por locus y el poder discriminatorio ($PD=1-\sum g_i^2$, siendo g la frecuencia de cada genotipo en cada SSR) (Kloosterman *et al.*, 1993).

Un dendrograma de las 30 variedades de almendro fue construido usando el programa Powermarker (Liu y Muse, 2005) adoptando el modelo Neighbour Joining (NJ) y analizando las distancias genéticas entre cultivares según el coeficiente Nei (Nei *et al.*, 1983).

La estructura poblacional fue estudiada con el programa Structure v.2.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa usa el método de agrupamiento que identifica K subgrupos de individuos con distintas frecuencias alélicas. Los individuos pueden ser miembros de múltiples sub-poblaciones con distinto coeficiente sumando un total de 1. Para averiguar la estratificación poblacional en nuestra muestra, usamos el programa asumiendo el modelo de mezcla (“admixture”) con alelos correlacionados. Se ejecutaron 1.000.000 interacciones después de una iniciación de 100.000. Seleccionamos el número K de sub-poblaciones según Evanno *et al.* (2005).

Se determinó el desequilibrio de ligamiento entre todas las parejas de marcadores usando el programa GenePop (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Para establecer el nivel de significación se aplicó la corrección de Bonferroni (Bonferroni, 1936), que para los 1.081 test realizados correspondió a $\alpha=4,6 \times 10^{-5}$.

Tabla 1: Características de las 30 variedades de almendro estudiadas

Variedad	Origen	Pedigrí	Auto-compatibilidad ¹	Dureza de la cascara	Época de floración
'Achaak'	Túnez	desconocido	AI	semidura	muy precoz
'Ai'	Francia	desconocido	AI	semidura	tardía
'Ardechoise'	Francia	desconocido	AI	semidura	semi-precoz
'Atocha'	España	desconocido	AI	dura	precoz
'Belle d'Aurons'	Francia	desconocido	AI	semidura	tardía
'Carmel'	EE.UU.	'Texas' x 'Nonpareil'	AI	blanda	semi-precoz
'Cristomorto'	Italia	desconocido	AI	dura	tardía
'Desmayo Largueta'	España	desconocido	AI	dura	precoz
'Falsa Barese'	Italia	desconocido	AC	dura	tardía
'Ferragnès'	France	'Cristomorto' x 'Ai'	AI	semidura	tardía
'Francolí'	España	'Cristomorto' x 'Tuono'	AC	semidura	tardía
'Gabaix'	España	desconocido	AI	dura	semi-precoz
'Garbí'	España	'Cristomorto' (polinización abierta)	AI	dura	tardía
'Garrigues'	España	desconocido	AI	dura	precoz
'Genco'	Italia	desconocido	AC	dura	tardía
'Glorieta'	España	'Primorskiy' x 'Cristomorto'	AI	dura	tardía
'Guara'	España	desconocido	AC	dura	tardía
'Johnston prolific'	Australia	desconocido	AI	semi-blanda	semi-precoz
'Lauranne'	Francia	'Ferragnès' x 'Tuono'	AC	semidura	tardía
'Marcona'	España	desconocido	AI	dura	semi-precoz
'Masbovera'	España	'Primorskiy' x 'Cristomorto'	AI	dura	tardía
'Nonpareil'	EE.UU.	desconocido	AI	blanda	semi-precoz
'Primorskiy'	Ucrania	'Princesse 2077' x 'Nikitski 53'	AI	semi-mollar	tardía
'Ramillete'	España	desconocido	AI	dura	precoz
'Retsou'	Grecia	desconocido	AI	blanda	semi-precoz
'Ripon'	EE.UU.	desconocido	AI	blanda	muy tardía
'Tarragonès'	España	'Cristomorto' x 'Primorskiy'	AI	dura	tardía
'Texas'	EE.UU.	desconocido	AI	semidura	tardía
'Titan'	EE.UU.	'Tardy Nonpareil' (polinización abierta)	AI	semi-blanda	tardía
'Tuono'	Italia	desconocido	AC	dura	tardía

¹ AC: variedad auto-compatibile; AI: variedad auto-incompatibile

Tabla 2: Características de los 47 microsatélites de almendro usados en el estudio

Tipo SSR	Microsatélite	Repetición	Localización del SSR en el EST ¹	Posición en el mapa de <i>Prunus</i> ²	Posición en el genoma de <i>Prunus</i>
Genómico dinucleótido	CPDCT042	(GA)27	n.a.	G1(7,1)	1:3433583..3433219
	CPDCT038	(GA)25	n.a.	G1(25,8)	1:11670930..11670575
	CPDCT039	(GA)15	n.a.	s.d.	1:13379032..13378843
	CPDCT019	(CT)24	n.a.	G1(31,2)	1:23212424..23212034
	CPDCT017	(GA)13	n.a.	G1(40,5)	1:31119427..31119946
	CPDCT005	(CT)14	n.a.	s.d.	1:39553454..39553761
	CPDCT044	(GA)21	n.a.	G2(12,5)	2:14069755..14070103
	CPDCT004	(CT)19	n.a.	G2(27,8)	2:19912907..19913385
	CPDCT033	(CT)18	n.a.	s.d.	3:3222824..3222956
	CPDCT047	(CT)10	n.a.	s.d.	3:3921124..3921510
	CPDCT008	(GA)18	n.a.	G3(28,4)	3:10023959..10024546
	CPDCT025	(CT)10	n.a.	G3(36,4)	3:16942524..16942962
	CPDCT040	(GA)24	n.a.	s.d.	3:20905605..20905764
	CPDCT027	(CT)19	n.a.	G3(46,4)	3:21673731..21674224
	CPDCT045	(GA)16	n.a.	G4(16,8)	4:6205903..6206307
	CPDCT037	(CT)10-(CT)4-(CT)4	n.a.	s.d.	4:16220884..16220361
	CPDCT028	(GA)19	n.a.	G5(26,7)	5:12699037..12699598
	CPDCT016	(GA)19	n.a.	G5(30,7)	5:13147442..13147897
	CPDCT022	(CT)17	n.a.	s.d.	5:16745854..16746316
	CPDCT003	(GA)10-(GA)11	n.a.	s.d.	6:16499948..16499169
	CPDCT006	(CT)12-(CT)5	n.a.	s.d.	6:19187002..19187535
	CPDCT007	(GA)19	n.a.	s.d.	7:16265474..16265912
	CPDCT034	(CT)4-(CT)7-(CT)6	n.a.	G8(16,8)	8:7943526..7944032
CPDCT014	(GA)25	n.a.	s.d.	alineamiento con varios scaffolds con una similitud >90%	
CPDCT029	(GA)21	n.a.	s.d.	alineamiento con varios scaffolds con una similitud >90%	
EST dinucleótido	EPDCU5100	(GA)7-(GA)4	5' UTR	G1(14,5)	1:11172334..11171059
	EPDCU3537	(GA)8	5' UTR	s.d.	1:37300453..37302230
	EPDCU2804	(CT)9	5' UTR	s.d.	1:37668504..37669472
	EPDCU5046	(GA)9	5' UTR	s.d.	1:37706625..37707956
	EPDCU3083	(TC)11	5' UTR	G3(19,8)	3:6458850..6461707
	EPDCU4805	(AT)8	Desconocida	s.d.	5:12189149..12189474
	EPDCU4658	(TC)24	Desconocida	G2(20,9)	5:14489300..14489483
	EPDCU3647	(TC)9	3' UTR	s.d.	5:17630046..17630579
	EPDCU2931	(TA)12	Desconocida	s.d.	7:15250259..15251140
	EPDCU3392	(GA)17	5' UTR	G7(64,7)	7:21681912..21682739
EST trinucleótido	EPDCU3122	(CAA)8	Codificante	G1(2,5)	1:1207146..1207815
	EPDCU2862	(GAC)2-(GAT)7-(GCT)3	Codificante	G1(66,5)	1:39371824..39373769
	EPDCU4017	(CGG)7	Codificante	s.d.	2:15974268..15974896
	EPDCU3158	(GAT)5	Codificante	s.d.	4:18622060..18625356
	EPDCU2584	(TTC)4-(CTT)2-(TTC)3	Codificante	G6(39,3)	5:12311900..12311767
	EPDCU3516	(GCG)5	Codificante	G8(22,8)	8:12116301..12117046
	EPDCU4466	(CA)2-(CAG)6-(CAA)3-(CAG)8	5' UTR	s.d.	8:13906192..13908364
	EPDCU3454	(CAG)5	Codificante	G8(46,7)	8:18639388..18640031
	EPDCU5062	(GCA)6	Codificante	s.d.	8:19437665..19438397
	EPDCU3146	(CAA)5	Codificante	s.d.	8:19442280..19443197
EPDCU3547	(CAA)5	Codificante	s.d.	8:19442950..19443457	
EPDCU3117	(GAG)6	Codificante	G8(54,7)	8:20218634..20219399	

¹ n.a.= no aplica al tratarse de secuencias en zonas intergénicas

² Notación para marcadores situados en el mapa de referencia de *Prunus* (Dirlewanger *et al.*, 2004): G1-G8, grupos de ligamiento del 1 al 8; en paréntesis posición en el mapa en cM.

³ s.d.= sin determinar.

Resultados y discusión

Todos los 47 marcadores microsatélite usados, genómicos o derivados de ESTs, fueron polimórficos y amplificaron un único locus en las variedades de almendro estudiadas según lo esperado. Los resultados de los parámetros de variabilidad se resumen en la Tabla 3. En ella puede verse que se trata de una especie con un alto nivel de variabilidad tal como ya adelantaban observaciones anteriores (Byrne, 1990; Mnejja *et al.*, 2010). El número total de alelos identificados fue de 341 ($A=7,26$ alelos/locus), la mayor parte de los cuales tenían frecuencias intermedias, como indica un alto valor promedio de $A_e=3,98$. La heterocigosidad observada promedio fue de $H_o=0,59$, valor muy próximo al esperado $H_e=0,62$, por lo que el índice de fijación de Wright se situó muy cerca de cero ($F=0,04$), indicando que la distribución de frecuencias genotípicas es parecida a la que esperaríamos encontrar en una población en equilibrio Hardy-Weinberg. En general los valores de F para cada locus estuvieron cerca de cero con algunas excepciones con valores positivos y elevados ($\geq 0,30$), como CPDCT004, CPDCT005, CPDCT006, CPDCT014, CPDCT045 y EPDCU2804, lo que indica la presencia de alelos nulos a frecuencias medias en estos loci. Los alelos nulos fueron más habituales entre los marcadores procedentes de secuencias genómicas que en los obtenidos de ESTs con promedios de F de 0,11 y -0,04, respectivamente.

La capacidad de identificar variabilidad de estos marcadores medida con el número de genotipos y por el parámetro PD fue muy alta, con valores promedio de 11,11 y 0,74, respectivamente por locus. Un dato indicativo de esta alta capacidad discriminadora es que algo más de un tercio (16) de los SSRs usados pudieron identificar cada uno de ellos a la mitad o más de las variedades estudiadas.

Los 25 SSRs genómicos (CPDCT) amplificaron 237 alelos, con un promedio de $A=9,48$ alelos/locus. El promedio de alelos/locus obtenido en este trabajo está dentro del amplio rango ($A=7,4-15,9$) encontrado por otros autores que estudiaron la variabilidad del almendro usando microsatélites

genómicos (Xu *et al.*, 2004; Sánchez-Pérez *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2006; Shiran *et al.*, 2007; Fathi *et al.*, 2008; Dangl *et al.*, 2009; Gouta *et al.*, 2010; Zeinalabedini *et al.*, 2010; Kadkhodaei *et al.*, 2011; Gouta *et al.*, 2012; Rahemi *et al.*, 2012). Las diferencias entre las estimas de diferentes autores se deben a cuestiones relacionadas con el número y origen, tanto de los microsatélites como de las variedades objeto del estudio. En general, cuanto mayor es el número de genotipos, más aumenta el número de alelos por locus al incrementarse la probabilidad de detectar alelos que se encuentran a baja frecuencia. De acuerdo con esta observación los resultados de este trabajo sugieren un nivel de polimorfismo especialmente alto ya que nuestro tamaño de muestra (N=30) está entre los más bajos de los estudiados: solamente Sánchez-Pérez *et al.* (2006) y Dangl *et al.* (2009) usaron menos variedades. Los dos elementos en común entre los trabajos que detectan más alelos/locus es que usaron un número relativamente pequeño de SSRs (6-16) y que están entre las publicaciones más recientes (Sánchez-Pérez *et al.*, 2006; Gouta *et al.*, 2010; Zeinalabedini *et al.*, 2010; Kadkhodaei *et al.*, 2011; Gouta *et al.*, 2012), lo que indica que estos autores seleccionaron algunos SSRs especialmente variables en almendro a partir de la información obtenida anteriormente. En este contexto, nuestro valor de $A=9,48$ puede considerarse comparativamente alto ya que utilizamos un número de SSRs genómicos polimórficos (25) igual al de (Fathi *et al.*, 2008), que encontraron un polimorfismo ligeramente inferior ($A=8,76$) usando 56 cultivares. Además, nuestros SSRs no fueron previamente seleccionados por tener un elevado número de alelos. El hecho de que en este estudio usamos SSRs derivados de almendro mientras que casi todos los demás se realizaron con microsatélites desarrollados en otras especies de *Prunus* puede ser una de las causas del elevado polimorfismo encontrado. Los SSRs desarrollados en otras especies próximas pueden ser en general menos polimórficos que los obtenidos de la especie estudiada, tal como ya se había observado anteriormente (Maghuly *et al.*, 2005; Mnejja *et al.*, 2010), lo que parece un elemento a tener en cuenta a la hora de escoger microsatélites cuando el criterio central es su polimorfismo.

Los 25 SSRs genómicos fueron más polimórficos que los 22 derivados de ESTs (Tabla 3): el promedio de alelos por locus en los primeros ($A=9,48$) fue más del doble que el de los segundos ($4,73$). Los promedios de la heterocigosidad observada (H_o) y del poder de discriminación PD también reflejan esta misma tendencia (H_o y PD de SSRs genómicos de $0,70$ y $0,88$, respectivamente, frente a $0,46$ y $0,58$, respectivamente, de SSRs basados en ESTs). Aunque el SSR más polimórfico (EPDCU3083 con 14 alelos) pertenecía al grupo de los derivados de ESTs, cinco de los SSRs de ESTs mostraron sólo dos alelos por locus, contrariamente a los SSRs genómicos que presentaron como mínimo seis alelos por locus. Todos los SSRs genómicos usados contienen motivos dinucleotídicos (CT) $_n$, lo que es consecuencia de cómo se elaboró la genoteca de la que fueron seleccionados (Mnejja *et al.*, 2005), pero de los 22 SSRs derivados de ESTs sólo 10 presentaron motivos dinucleotídicos y el resto (12) motivos trinucleotídicos. Si diferenciamos los parámetros de los SSRs derivados de ESTs según el motivo que contienen, notamos que el polimorfismo de los SSRs derivados de ESTs con motivos dinucleotídicos ($A=6,70$) es menor pero se acerca más al de los SSRs genómicos ($A=9,48$) que los SSRs derivados de ESTs con motivos trinucleotídicos, que fueron muy poco polimórficos ($A=3,08$). La variabilidad menor de estos últimos coincide por lo general con su localización en el EST. Tal como puede verse en la Tabla 2, todos los SSRs dinucleotídicos cuya posición pudo identificarse están, lógicamente, en regiones no codificantes, mientras que la mayoría de los SSRs trinucleotídicos se encuentran en zonas codificantes (11 de 12). Parece por tanto razonable que estos últimos sean menos variables al estar sometidos a selección.

Esta diversidad de comportamiento de los SSR procedentes de ESTs, tiene que tenerse en cuenta a la hora de comparar los resultados entre diferentes autores. Los 22 SSRs derivados de ESTs de almendro (EPDCU) amplificaron $A=4,73$ alelos/locus, que está por debajo de los valores encontrados por Xu *et al.* (2004) y por Xie *et al.* (2006) que usaron el primero 8 y el segundo 11 microsatélites derivados de ESTs con los que calcularon valores de $A= 5,45$ y $7,8$, respectivamente. Considerando que los

microsatélites usados por estos autores se hallan en su mayoría en zonas no codificantes, estos datos son comparables con los que hemos obtenido usando SSRs dinucleotídicos procedentes de ESTs, para los que hemos estimado un valor de $A = 6,70$. En el presente estudio se pudieron identificar individualmente todas las variedades evaluadas tanto con los SSRs genómicos como con los derivados de ESTs.

El número medio de microsatélites con diferente genotipo entre dos variedades fue de 35,85. Las dos variedades más próximas 'Guara' y 'Tuono' pudieron ser diferenciadas por solo dos microsatélites, uno de cada tipo (CPDCT003 y EPDCU3083). También Sánchez-Pérez *et al.* (2006) y Kadkhodaei *et al.* (2011) observaron una gran similitud entre estos dos cultivares usando 6 y 18 microsatélites polimórficos, respectivamente. Los SSRs son marcadores con una tasa de mutación elevada que ha permitido encontrar diferencias entre algunos "sports" conocidos de melocotonero (Aranzana *et al.*, 2010). Por otra parte, la probabilidad de encontrar por azar un genotipo casi idéntico a otro procedente de la reproducción sexual usando la enorme variabilidad muestreada con los SSRs usados en este trabajo es muy baja. Por consiguiente, nuestros datos son más consistentes con el origen de 'Guara' como el resultado de la variabilidad somática de 'Tuono' que como un descendiente de esta o una variedad de origen distinto.

Los SSRs genómicos mostraron el doble de alelos raros que los derivados de ESTs (44 alelos frente a 22), lo que demuestra de nuevo que estos últimos son menos polimórficos porque muchos de ellos están localizados en zonas codificantes y evolucionan más lentamente. Las dos variedades 'Achaak' de Túnez y 'Retsou' de Grecia son las que más alelos raros presentaron (10 cada una) seguidos de 'Garrigues' (7), 'Gabaix' y 'Ramillete' (6 cada una). Todas son variedades antiguas del Mediterráneo, que es uno de los centros de diversificación del almendro. 'Primorskiy', una variedad originaria del Este de Europa no tenía ningún alelo raro, lo que sugiere un origen común con las variedades más meridionales. 'Johnston's Prolific', la única variedad Australiana, presentó solamente cinco alelos raros, lo que se explicaría por su reciente origen a partir de material europeo, quizás derivada de la variedad española 'Ramillete' (Channuntapipat *et al.*,

2003), que el presente estudio también identifica como variedades genéticamente próximas.

En el dendrograma obtenido (Figura 1), se diferenciaron seis grupos: A1.1, A1.2, A2.1, A2.2, A2.3. y B. En el subgrupo A1 se encuentran dos grupos, el primero de ellos (A1.1) con todas las variedades californianas estudiadas, lo que sugiere que posiblemente están emparentadas y sometidas a selección divergente a partir de los materiales europeos originales. El segundo (A1.2) incluye variedades europeas precoces de distintos orígenes y particularmente las únicas dos originarias de Murcia que forman parte de este estudio ('Atocha' y 'Ramillete'). Ya en el subgrupo A2, formado por tres grupos, se incluyen todas las variedades europeas de floración tardía. En el pequeño grupo A2.1 encontramos dos variedades tardías francesas. En A2.2 se juntan todas las variedades autocompatibles y de floración tardía, menos la variedad 'Francolí' que se agrupa con su progenitor femenino ('Cristomorto'). Este clúster está formado por todas las variedades de la región italiana de Apulia, además de la variedad francesa 'Lauranne', un descendiente de 'Tuono', y de 'Guara' que como hemos visto antes podría tratarse de un "sport" de 'Tuono'. Dentro de A2.3 se encuentran algunas de las variedades obtenidas por el IRTA ('Francolí', 'Tarragonès', 'Masbovera' y 'Glorieta') y por el INRA ('Ferragnès') con algunos de sus parentales ('Cristomorto' y 'Primorskiy'). Ya en un cluster diferente (B) se encuentran cuatro variedades clásicas del Mediterráneo: 'Desmayo Largueta', 'Marcona', 'Gabaix' y 'Retsou' que serían las más separadas del conjunto estudiado.

El programa "Structure" agrupó nuestras 30 variedades en 5 subpoblaciones (Figura 1 y 2) que coinciden casi siempre con los grupos encontrados en el dendrograma, sobre todo si contamos sólo con las variedades que presentan al menos un coeficiente de 0,8 de pertenencia a una subpoblación. Los dos grupos A1.2 y B en nuestro dendrograma, formaron un único grupo en el histograma de Structure, eso es porque todas estas variedades son variedades antiguas del mediterráneo y con floración temprana. Es interesante observar que los híbridos entre individuos pertenecientes a dos subpoblaciones ('Francolí', 'Ferragnès', 'Garbí' o

‘Lauranne’) tienen, tal como habría que esperar, una componente parecida de la subpoblación a la que pertenece cada uno de los parentales.

Según el dendrograma y la estructura poblacional de nuestras 30 variedades de almendro, vemos que la época de floración fue un criterio determinante en la formación de los clústeres o de las subpoblaciones, pero no parece haber ninguna relación de estos grupos con el carácter dureza de la cascara. Esta separación genética por época de floración tiene sentido ya que de manera natural habría favorecido el cruzamiento entre individuos de floración agrupada, tendiendo a aislar entre sí grupos de variedades de floración habitualmente no solapada. También notamos la influencia de la procedencia de las variedades en la formación de los grupos. De hecho las variedades estadounidenses formaron un grupo diferenciado tanto en el dendrograma como en la estructura poblacional, lo que significa que, desde la introducción a América de sus antecesores europeos, fueron seleccionadas por su adaptación a las exigencias de su ambiente y mercado hasta formar un grupo que parece claramente diferenciado de las variedades mediterráneas. También las variedades de la región italiana de Apulia y las de la región de Murcia aparecen en los mismos grupos. En el caso de las variedades antiguas francesas, la separación parece tener una componente geográfica y también de época de floración, donde ‘Ai’ y ‘Belle d’Aurons’ forman un grupo diferenciado dentro de las variedades tardías y ‘Ardechoise’ se situaría más cerca de otras variedades europeas de floración temprana. Las otras dos variedades francesas (‘Lauranne’ y ‘Ferragnès’) son de obtención reciente y pedigrí conocido y se sitúan en la proximidad de alguno de sus progenitores.

Aunque los 45 SSRs estudiados no fueron seleccionados con el objetivo de que cubrieran la mayor parte del genoma, su distribución fue bastante amplia con marcadores en todos los grupos de ligamiento (Tabla 2), aunque algunos grupos como el G1 o el G8 con 12 y 8 SSRs, respectivamente, estaban mucho más representados que otros como el G6 (2 SSRs), G2 (3) y G7 (3). En un primer intento para analizar el desequilibrio de ligamiento del almendro hemos examinado la independencia entre la variabilidad de los loci analizados y hemos identificado un total de 16 parejas

que eran significativamente no-independientes, lo que significa un 3,1% de las comparaciones realizadas. De ellas, 16 correspondieron a parejas de loci que estaban dentro del mismo grupo de ligamiento y 18 a comparaciones entre loci de diferentes grupos. La mayor parte de las primeras (13) se encontraron en las comparaciones entre los siete marcadores localizados en el G3 que cubrían la mayor parte de la distancia en este grupo, mientras que otras tres parejas que fueron significativamente no-independientes dos se encontraban en G1 (EPDCU504-EPDCU280 y CPDCT005-CPDCT039) y una en G8 (EPDCU3146-EPDCU3547). Excepto CPDCT005-CPDCT039, que están separadas por 26 Mbp, las otras dos parejas se encontraban en fragmentos cromosómicos cortos (6 y 38 kb). Considerando que hemos detectado una importante estructura poblacional, nuestros datos sugieren que el nivel de conservación del desequilibrio de ligamiento encontrado es poco importante, particularmente cuando se compara con los elevados niveles de conservación observados en melocotonero (Aranzana *et al.*, 2010). Estos resultados pueden explicarse por el sistema de autoincompatibilidad del almendro, que habría garantizado un comportamiento esencialmente alógamo, y por una historia de la especie después de la domesticación que no habría incluido episodios de cuellos de botella que hubieran favorecido una mayor conservación del DL. La excepción de G3 podría deberse a que uno o más genes de este cromosoma hubieran sido sometidos a selección direccional durante el proceso de domesticación.

En conjunto, nuestros datos confirman la gran diversidad genética del almendro, su comportamiento como una especie típicamente alógama, con una distribución de su variabilidad acorde con su selección en diversos ambientes durante largos períodos de tiempo, lo que la habría llevado a una fuerte estructura poblacional determinada por elementos de tipo geográfico (adaptación al medio ambiente local) y fenológico (coincidencia de época de floración). Además, la estructura poblacional es un factor a tener en cuenta en caso de que se pudieran plantear en el futuro estudios de genética de asociación. Esta enorme variabilidad asegura la efectividad de la mejora genética en la búsqueda de caracteres nuevos y es una fuente de

variabilidad potencial para otras especies, compatibles con el almendro, pero mucho más erosionadas genéticamente como el melocotonero.

Tabla 3: Parámetros de variabilidad genética calculados para 47 SSRs en 30 variedades de almendro.

Tipo SSR	Microsatélites	A	Ae	Ho	He	F	Nº genotipos	PD
Genómicos dinucleotídicos	CPDCT042	11	7,41	0,87	0,87	0,00	22	0,94
	CPDCT038	10	5,59	0,77	0,82	0,07	15	0,86
	CPDCT039	7	2,67	0,73	0,63	-0,17	10	0,84
	CPDCT019	11	8,65	0,90	0,88	-0,02	13	0,88
	CPDCT017	7	4,04	0,67	0,75	0,11	14	0,87
	CPDCT005	11	6,72	0,40	0,85	0,53	17	0,92
	CPDCT044	9	7,03	0,73	0,86	0,15	18	0,93
	CPDCT004	6	2,69	0,33	0,63	0,47	8	0,76
	CPDCT033	11	4,27	0,73	0,77	0,04	13	0,89
	CPDCT047	11	6,16	0,87	0,84	-0,03	17	0,92
	CPDCT008	7	4,68	0,63	0,79	0,19	13	0,90
	CPDCT025	10	4,11	0,73	0,76	0,03	13	0,89
	CPDCT040	12	7,26	0,93	0,86	-0,08	20	0,93
	CPDCT027	11	5,57	0,90	0,82	-0,10	15	0,92
	CPDCT045	11	6,95	0,47	0,86	0,45	18	0,92
	CPDCT037	9	6,36	1,00	0,84	-0,19	15	0,91
	CPDCT028	10	5,59	0,83	0,82	-0,01	17	0,91
	CPDCT016	8	2,17	0,37	0,54	0,32	11	0,69
	CPDCT022	8	5,08	0,97	0,80	-0,20	16	0,89
	CPDCT003	12	7,73	0,70	0,87	0,20	22	0,94
	CPDCT006	9	2,92	0,33	0,66	0,49	11	0,75
	CPDCT007	9	3,08	0,63	0,68	0,06	13	0,85
	CPDCT034	8	5,00	0,90	0,80	-0,13	14	0,88
CPDCT014	9	5,71	0,57	0,83	0,31	15	0,91	
CPDCT029	10	4,58	0,63	0,78	0,19	13	0,85	
ESTs dinucleotídicos	EPDCU5100	4	1,52	0,40	0,34	-0,17	4	0,57
	EPDCU3537	4	1,96	0,57	0,49	-0,16	6	0,67
	EPDCU2804	5	1,91	0,33	0,48	0,30	6	0,63
	EPDCU5046	8	4,00	0,70	0,75	0,07	13	0,88
	EPDCU3083	14	6,79	0,87	0,88	0,01	21	0,94
	EPDCU4805	4	1,91	0,40	0,48	0,16	5	0,65
	EPDCU4658	12	7,86	0,87	0,87	0,01	21	0,94
	EPDCU3647	4	2,62	0,70	0,62	-0,13	7	0,70
	EPDCU2931	3	2,20	0,67	0,55	-0,22	5	0,62
	EPDCU3392	9	6,64	1,00	0,85	-0,18	17	0,92
ESTs Trinucleotídicos	EPDCU3122	3	1,31	0,27	0,24	-0,13	3	0,41
	EPDCU2862	2	1,10	0,10	0,10	-0,05	2	0,18
	EPDCU4017	5	1,51	0,30	0,34	0,11	6	0,51
	EPDCU3158	2	1,07	0,07	0,06	-0,03	2	0,12
	EPDCU2584	3	2,04	0,53	0,51	-0,05	5	0,70
	EPDCU3516	3	1,23	0,13	0,18	0,28	3	0,29
	EPDCU4466	6	2,33	0,67	0,57	-0,17	8	0,70
	EPDCU3454	2	1,30	0,20	0,23	0,13	3	0,37
	EPDCU5062	4	1,66	0,53	0,40	-0,35	4	0,58
	EPDCU3146	2	1,30	0,27	0,23	-0,15	2	0,39
EPDCU3547	2	1,30	0,27	0,23	-0,15	2	0,39	
EPDCU3117	3	1,50	0,33	0,34	0,00	4	0,53	
Promedio Genómicos	9,48	5,28	0,70	0,78	0,11	14,92	0,88	
Promedio ESTs	4,73	2,50	0,46	0,44	-0,04	6,77	0,58	
Promedio ESTs (di)	6,70	3,74	0,65	0,63	-0,03	10,50	0,75	
Promedio ESTs (tri)	3,08	1,47	0,31	0,29	-0,05	3,67	0,43	
Promedio Total (di)	8,69	4,84	0,69	0,74	0,07	13,66	0,84	
Promedio Total	7,26	3,98	0,59	0,62	0,04	11,11	0,74	

Figura 1: Dendrograma de 30 variedades de almendro estudiadas para 47 SSRs basado en distancia genética y usando el modelo Neighbour Joining, y correspondencia con las subpoblaciones según el estudio de estructura poblacional

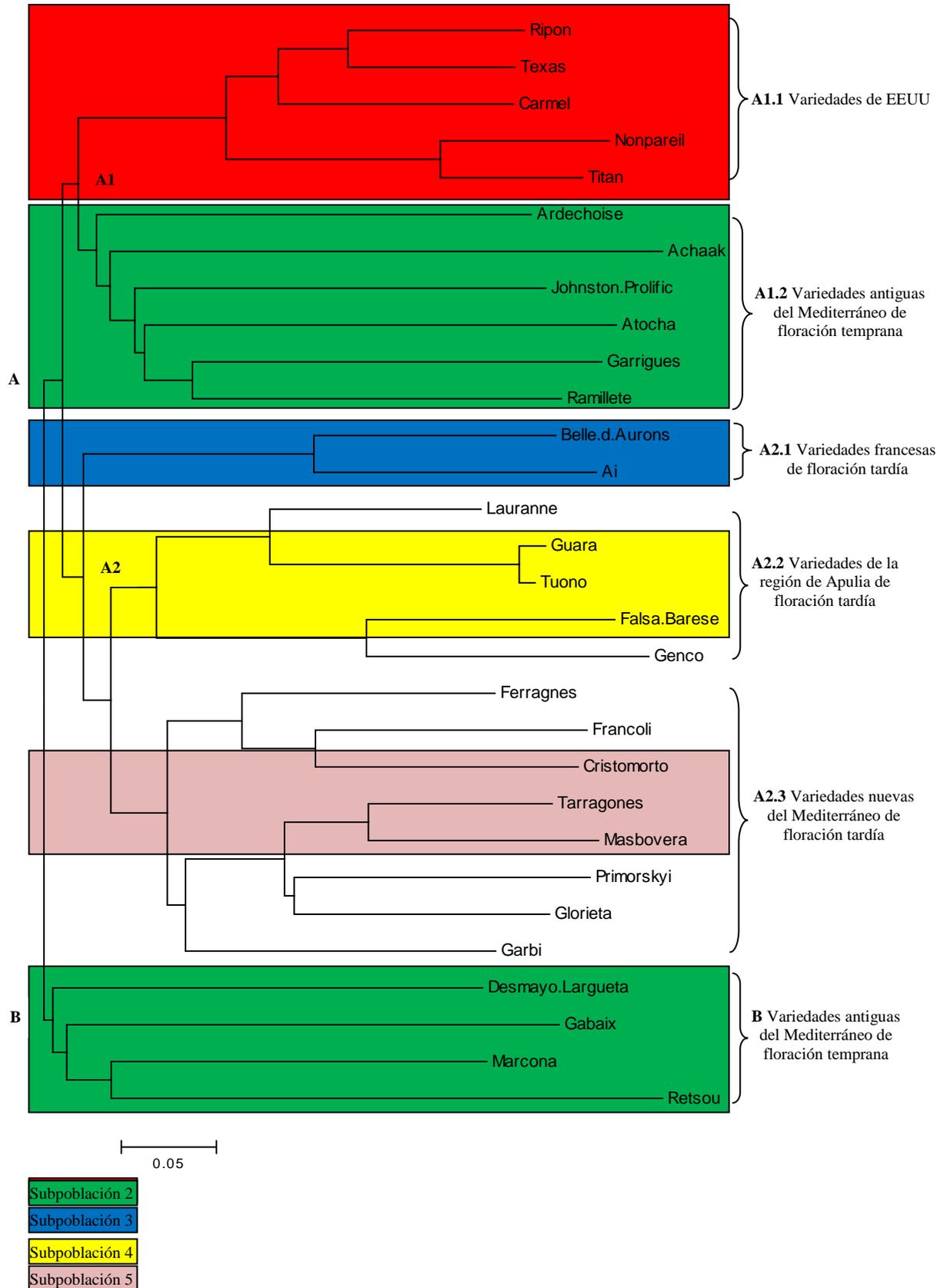
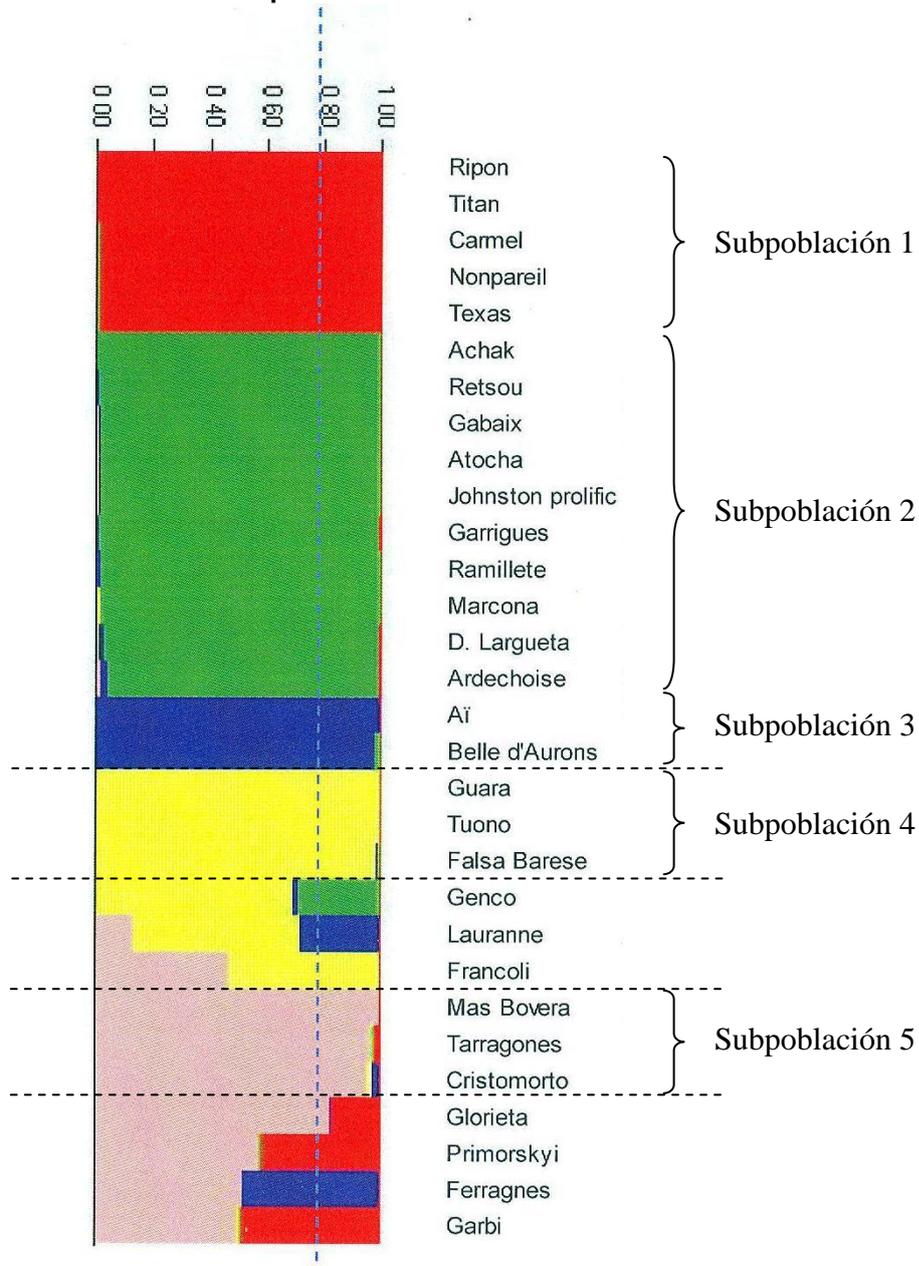


Figura 2: Estructura poblacional de las 30 variedades estudiadas de almendro, con un número de subpoblaciones de K=5



Referencias

- Aradhya, M.K., Weeks, C., and Simon, C.J., 2004. Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. *Scientia Horticulturae* 103:131-144.
- Aranzana, M., Abbassi, E.-K., Howad, W., and Arus, P., 2010. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. *BMC Genetics* 11:69.
- Arulsekhar, S., Parfitt, D.E., and Kester, D.E., 1986. Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. *Journal of Heredity* 77:272-274.
- Bartolozzi, F., Warburton, M.L., Arulsekhar, S., and Gradziel, T.M., 1998. Genetic Characterization and Relatedness among California Almond Cultivars and Breeding Lines Detected by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:381-387.
- Batlle, I., Mnejja, M., López, M., Romero, M.A., and Vargas, F.J., 2001. Mejora del almendro para autocompatibilidad mediante la aplicación de ribonucleasas estilares. *Actas de Horticultura* 132.
- Bonferroni, C.E., 1936. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. *Publicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze* 8:3-62.
- Browicz, K. and Zohary, D., 1996. The genus *Amygdalus* L. (Rosaceae): Species relationships, distribution and evolution under domestication. *Gen. Res. and Crop evolution* 43:229-247.
- Byrne, D.H., 1990. Isozyme Variability in Four Diploid Stone Fruits Compared with Other Woody Perennial Plants. *Journal of Heredity* 81:68-71.
- Cerezo, M., Socias i Compani, R., and Arús, P., 1989. Identification of almond cultivars by pollen isoenzymes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114:164-169.
- Channuntapipat, C., Wirthensohn, M., Ramesh, S.A., Batlle, I., Arús, P., Sedgley, M., and Collins, G., 2003. Identification of incompatibility genotypes in almond (*Prunus dulcis* Mill.) using specific primers based on the introns of the S-alleles. *Plant Breeding* 122:164-168.
- Čolić, S., Milatović, D., Nikolić, D., and Zec, G., 2010. Isoenzyme polymorphism of almond genotypes selected in the region of northern Serbia. *Horticultural Science* 37:56-61.
- Dangl, G.S., Yang, J., Golino, D.A., and Gradziel, T., 2009. A practical method for almond cultivar identification and parental analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica* 168:41-48.
- de Vicente, M.C., Truco, M.J., Egea, J., Burgos, L., and Arús, P., 1998. RFLP variability in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Breeding* 117:153-158.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study, p. 2611-2620. Blackwell Science Ltd.
- Fathi, A., Ghareyazi, B., Haghazari, A., Ghaffari, M.R., Pirseyedi, S.M., Kadkhodaei, S., Naghavi, M.R., and Mardi, M., 2008. Assessment of the genetic diversity of almond (*Prunus dulcis*) using microsatellite markers and morphological traits. *Iranian Journal of Biotechnology* 6:98-106, 130.
- Fernández i Martí, A., Hanada, T., Alonso, J., Yamane, H., Tao, R., and Socias i Company, R., 2009. A modifier locus affecting the expression of the S-RNase gene could be the cause of breakdown of self-incompatibility in almond. *Sexual Plant Reproduction* 22:179-186.
- Fernández i Martí, À., Howad, W., Tao, R., Alonso Segura, J., Arús, P., and Socias i Company, R., 2011. Identification of quantitative trait loci associated with self-compatibility in a *Prunus* species. *Tree Genetics & Genomes* 7:629-639.
- Fryxell, P.A., 1957. Mode of reproduction in higher plants. *Bot. Rev.* 23:135-233.
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., and Gessler, C., 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 96:1069-1076.
- Gottlieb, L.D., 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. *Phytochemistry* 7:1-45.

- Gouta, H., Ksia, E., Buhner, T., Moreno, M.A., Zarrouk, M., Mliki, A., and Gogorcena, Y., 2010. Assessment of genetic diversity and relatedness among Tunisian almond germplasm using SSR markers. *Hereditas* 147:283-292.
- Gouta, H., Ksia, E., Buhner-Zaharieva, T., Mliki, A., and Gogorcena, Y., 2012. Development of an SSR-based identification key for Tunisian local almonds. *Scientia Agricola* 69:108-113.
- Grasselly, C. and Duval, H., 1997. *L'Amandier*. CTIFL, Paris.
- Gupta, P.K., Balyan, H.S., sharma, P.C., and Ramesh, B., 1996. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Curr. Sci.* 70:45-54.
- Hauagge, R., Kester, D.E., Arulsekhar, S., Parfitt, D.E., and Liu, L., 1987. Isozyme variation among California almond cultivars: II. Cultivar characterization and origins. *J Am Soc Hort Sci* 112:693-698.
- Kadkhodaei, S., Shahnazari, M., Nekouei, M.K., Ghasemi, M., Etmnani, H., Imani, A., and Ariff, A.B., 2011. A comparative study of morphological and molecular diversity analysis among cultivated almonds (*Prunus dulcis*). *Aust. J. Crop Sci.* 5:82-91.
- Keep, E., 1968. Incompatibility in *Rubus* with special reference to *R. idaeus* L. *Can. J. Genet. Cytol.* 10:253-262.
- Kester, D.E., Gradziel, T.M., and Grasselly, C., 1991. Almonds (*Prunus*), p. 701-758. In: More, J. N., Ballington, J.R. (ed.), *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*. ISHS, Belgium.
- Kloosterman, A.D., Budowle, B., and Daselaar, P., 1993. PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. *Int J Legal Med* 105:257-264.
- Kovalyov, N.V. and Kostina, K.F., 1935. A contribution of the study of the genus *Prunus* Focke. Questions of taxonomy and plant breeding. *Trudy Prikl. Bot. Genet.* 8. 4:1-76.
- López, M., Mnejja, M., Romero, M.A., Vargas, F.J., Arús, P., and Batlle, I., 2005. Use of Sf-specific PCR for early selection of self-compatible seedlings in almond breeding. *Options Méditerranéennes Série A* 63:269-274
- López, M., Mnejja, M., Romero, M.A., Vargas, F.J., and Batlle, I., 2001. Diseño de cruzamientos en almendro para mejora por autocompatibilidad utilizando ribonucleasas estilares. *ITEA* 97(3):226-232
- Lutri, I., 1935. Self sterility and self-fertility of the almond. *Italia Agric* 72:139-155.
- Maghuly, F., Fernandez, E.B., Ruthner, S., Pedryc, A., and Laimer, M., 2005. Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographic origin and breeding history. *Tree Genetics & Genomes* 1:151-165.
- Martínez-Gómez, P., Arulsekhar, S., Potter, D., and Gradziel, T.M., 2003a. An extended interspecific gene pool available to peach and almond breeding as characterized using simple sequence repeat (SSR) markers. *Euphytica* 131:313-322.
- Martínez-Gómez, P., Arulsekhar, S., Potter, D., and Gradziel, T.M., 2003b. Relationships among Peach, Almond, and Related Species as Detected by Simple Sequence Repeat Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:667-671.
- Martins, M., Farinha, A., Ferreira, E., Cordeiro, V., Monteiro, A., Tenreiro, R., and Oliveira, M.M., 2001. Molecular analysis of the genetic variability of Portuguese almond collections. *Acta Horticulturae* 546:449-452.
- Martins, M., Tenreiro, R., and Oliveira, M.M., 2003. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports* 22:71-78.
- MirAli, N. and Nabulsi, I., 2003. Genetic diversity of almonds (*Prunus dulcis*) using RAPD technique. *Scientia Horticulturae* 98:461-471.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Audergon, J.-M., and Arús, P., 2010. *Prunus* microsatellite marker transferability across rosaceous crops. *Tree Genetics & Genomes* 6:689-700.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., and Arús, P., 2005. Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Molecular Ecology Notes* 5:531-535.
- Mnejja, M., López, M., Romero, M.A., Vargas, F.J., and Batlle, I., 2002. Cross design for self-compatibility in almond breeding using stylar ribonucleases. *Acta Horticulturae* 591:233-238.
- Nei, M., Tajima, F., and Tateno, Y., 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19:153-170.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P., 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155:945-959.

- Quarta, R., Dettori, M.T., Verde, I., Marchesi, U., and Palombi, M.A., 2001. Characterization and evaluation of genetic diversity in peach germplasm using RAPD and RFLP markers. *Acta Hort. (ISHS)* 546:489-496.
- Rahemi, A., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., Gradziel, T., Folta, K., and Chaparro, J., 2012. Genetic diversity of some wild almonds and related *Prunus* species revealed by SSR and EST-SSR molecular markers. *Plant Systematics and Evolution* 298:173-192.
- Resta, P., Corona, M.G., Fanizza, G., Palasciano, M., and Godini, A., 1998. Random amplified DNA polymorphism in *Amygdalus communis* L. and *A. webbii* Spach. *Acta Horticulturae* 470:82-90.
- Sanchez-Perez, R., Ballester, J., Dicenta, F., Arus, P., and Martinez-Gomez, P., 2006. Comparison of SSR polymorphisms using automated capillary sequencers, and polyacrylamide and agarose gel electrophoresis: Implications for the assessment of genetic diversity and relatedness in almond. *Scientia Horticulturae* 108:310-316.
- Sánchez-Pérez, R., Dicenta, F., Ruiz, C., Ballester, J., Arús, A., and Martínez-Gómez, P., 2005. Variability and inheritance of peach SSR sequences in almond genotypes. *Options Méditerranéennes Série A, Numéro 63*:275-280.
- Sefc, K.M., Steinkellner, H., Glössl, J., Kampfer, S., and Regner, F., 1998. Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 97:227-231.
- Shiran, B., Amirbakhtiar, N., Kiani, S., Mohammadi, S., Sayed-Tabatabaei, B.E., and Moradi, H., 2007. Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 111:280-292.
- Socias i Company, R. and Felipe, A.J., 1992. Almond: A Diverse Germplasm. *HortScience* 27:718-863.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Gradziel, T., Epperson, B., Martínez-Gómez, P., and Asadi, E., 2007. Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica* 156:327-344.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res* 17:6463 - 6471.
- Vavilov, N.I., 1930. Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan and Caucasus and the problem of the region of fruit trees, p. 271-286, 9th International Horticultural Congress report and proceedings, London.
- Vezvaei, A., Clarke, G., and Jackson, J., 1994. Characterisation of Australian almond cultivars and comparison with Californian cultivars by isozyme polymorphism. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 34:511-514.
- Viruel, M.A., 1995. Construcción de un mapa genético en almendro (*Prunus amygdalus*). Universidad de Barcelona (Facultad de Biología), Barcelona Tesis doctoral.
- Woolley, F.M., Collins, G.G., and Sedgley, M., 2000. Application of DNA fingerprinting for the classification of selected almond *Prunus dulcis* (Miller) D. A. Webb] cultivars. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 40:995-1001.
- Wright, S., 1951. The genetic structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354.
- Xie, H., Sui, Y., Chang, F.Q., Xu, Y., and Ma, R.C., 2006. SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* 112:366-372.
- Xu, Y., Ma, R.C., Xie, H., Liu, J.T., and Cao, M.Q., 2004. Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. *Genome* 47:1091-1104.
- Zeinalabedini, M., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Gradziel, T.M., and Martínez-Gómez, P., 2010. The origin and dissemination of the cultivated almond as determined by nuclear and chloroplast SSR marker analysis. *Scientia Horticulturae* 125:593-601.
- Zeinalabedini, M., Majourhat, K., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Toorch, M., Dicenta, F., and Martínez-Gomez, P., 2007. Molecular characterization of almond cultivars and related wild species using nuclear and chloroplast DNA markers. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 5:242-247.

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD Y COMPROBACIÓN DE PEDIGRÍS EN CIRUELO JAPONÉS USANDO MARCADORES MICROSATÉLITE

Introducción

El ciruelo japonés, *Prunus salicina* Lindl. es, como el melocotonero, albaricoquero, cerezo y ciruelo europeo, un frutal de hueso cuyo fruto es una drupa que se destina mayoritariamente al consumo en fresco. El centro de origen de esta especie es China, donde su cultivo data de hace varios miles de años, aunque nunca tuvo la importancia comercial y cultural que tuvo el melocotonero (Okie y Ramming, 1999). Las antiguas variedades de este cultivo fueron mejoradas en un principio en Japón y posteriormente, hacia finales del siglo XIX, en los Estados Unidos usando el material japonés y diferentes genotipos de especies de origen chino, como *P. simonii* Carr., europeo, como *P. cerasifera* Ehrh. y americano, como *P. americana* Marsh., *P. angustifolia* y *P. munsoniana* Wight and Hedr. (Howard, 1945; Byrne, 1989). Este moderno y exitoso programa de mejora, basado en buena parte en materiales procedentes de cruzamientos interespecíficos (Byrne, 1989; Ramming y Cociu, 1990), fue inicialmente obra del botánico y mejorador Luther Burbank (Dreyer, 1985), que obtuvo muy buenos cultivares, algunos de los cuales se siguen comercializando actualmente. Posteriormente se desarrollaron varios programas de mejora en todo el mundo, contribuyendo a que este cultivo se extendiera, al ofrecer nuevos cultivares de alta calidad, adaptados a diferentes medios y usos (Okie y Ramming, 1999; Okie y Hancock, 2008).

Los primeros datos sobre caracterización molecular del ciruelo japonés y de sus híbridos se obtuvieron con isoenzimas (Parfitt *et al.*, 1985; Byrne y Littleton, 1988; Byrne, 1990; Manganaris *et al.*, 1999), lo que ya permitió constatar su elevado nivel de variabilidad, sólo comparable al del almendro entre los *Prunus* cultivados. Con el descubrimiento de la reacción en cadena

de la polimerasa (PCR), se usaron otros marcadores, como los RAPDs (random amplified polymorphic DNA) (Ortiz *et al.*, 1997; Bellini *et al.*, 1998; Shimada *et al.*, 1999; Boonprakob *et al.*, 2001; Qiao *et al.*, 2007; Ben Tamarzizt *et al.*, 2009), y los AFLPs (amplified fragment length polymorphisms) (Goulão *et al.*, 2001; Ilgin *et al.*, 2009). Los marcadores RAPDs y AFLPs son abundantes y solventaron el problema de la escasez de los marcadores isoenzimáticos, sin embargo, su herencia es dominante y son poco reproducibles.

Los marcadores basados en la variabilidad de las secuencias microsatélite, llamados marcadores SSR (simple-sequence repeats), son particularmente eficientes en los estudios de variabilidad y para diferentes aplicaciones a la mejora genética de plantas gracias a su herencia codominante, alto nivel de polimorfismo, gran número y presencia en todo el genoma. Además, los SSRs son fáciles de usar, reproducir y automatizar (Rakoczy y Bolibok, 2004). Estos marcadores pueden ser transferibles entre especies cercanas siempre que exista una alta conservación de las regiones flanqueantes a los microsatélites, tal como se ha demostrado tanto en animales (Schlötterer *et al.*, 1991; Rico *et al.*, 1996) como en plantas (Isagi y Suhandono, 1997; Cipriani *et al.*, 1999; Mnejja *et al.*, 2010).

Varios trabajos muestran la transferibilidad de los microsatélites desarrollados en diferentes especies del género *Prunus* al ciruelo japonés (Cipriani *et al.*, 1999; Struss *et al.*, 2003; Mnejja *et al.*, 2005; Nishitami *et al.*, 2007; Wünsch, 2009). Gracias a esta transferibilidad, los SSRs obtenidos en diferentes especies del género *Prunus* se usaron para el estudio de la variabilidad de los ciruelos. En su estudio de variabilidad del ciruelo japonés usando marcadores microsatélites, Ahmad *et al.* (2004) encontraron que el 76% de los 25 SSRs de cerezo y el 100% de los 3 de melocotonero usados fueron polimórficos en una muestra de variedades de ciruelo japonés y de pluots (variedades de ciruelo originariamente procedentes de cruzamientos interespecíficos entre ciruelo japonés y albaricoquero). Para el estudio de la variabilidad de los ciruelos americanos, Rohrer *et al.* (2004) usaron también SSRs desarrollados en cerezo y melocotonero, todos fueron polimórficos en las 23 accesiones de ciruelos americanos. Estudios más recientes de

variabilidad también con SSRs derivados de otros *Prunus* (Qiao *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2009) permitieron a estos autores usar la gran mayoría de los marcadores testados. En el presente trabajo estudiamos por primera vez la variabilidad de ciruelo japonés usando solamente marcadores microsátélites desarrollados en esta especie ya obtenidos en nuestro laboratorio (Mnejja *et al.*, 2004).

Materiales y métodos

Se extrajo ADN a partir de hojas jóvenes de 38 cultivares de ciruelo japonés y un pluot (ver Tabla 1) que obtuvimos de los campos de ensayo de la Estación Experimental del IRTA en Lleida. El método de extracción usado fue el de Doyle y Doyle (1990), omitiendo el tratamiento final con RNAsas.

Para el análisis de esta muestra, se usaron los 27 SSRs polimórficos en *P. salicina* y que amplificaban un sólo locus de los 35 obtenidos a partir de ADN genómico de ciruelo japonés cv. Santa Rosa (Mnejja *et al.*, 2004). Estos SSRs se describen en la Tabla 2 juntamente con su posición en el genoma, usando para ello la secuencia del melocotonero (Verde *et al.*, 2013) a partir de la base de datos de las Rosáceas (<http://www.rosaceae.org/>).

La metodología usada para realizar las reacciones de PCR consistió en añadir 20 ng de ADN, 10 mM de Tris-HCl a 8,3 de pH, 2,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 0,001 % de gelatina, 0,4 µM de cada cebador, 133 µM de dATP, dTTP y dGTP, 1,6 µM de dCTP, 1 U de la Taq polimerasa (PE Applied Biosystems) y 0,5 µCi del α³³P dCTP en un volumen total de 15 µl. Las condiciones de amplificación del ADN en el termociclador fueron las siguientes: 1 min a 94°C seguido por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a la temperatura de hibridación específica para cada pareja de cebadores y 30 s a 72°C, terminando con 5 min de extensión a 72°C. Se separaron los productos desnaturalizados procedentes de la PCR en geles de poliacrilamida (6%) bajo una corriente constante de 100 W durante 2h. Se usó en cada gel como control para determinar el tamaño de los fragmentos separados un marcador de peso molecular marcado, el 30-330 bp "DNA

ladder" (Gibco BRL, Invitrogen, San Diego). Al final de la electroforesis, se transfirió el gel de poliacrilamida a un papel de cromatografía Whatman 3 MM, secándose luego al vacío y exponiéndolo durante 2 días a un film de radiografía (CURIX RP2, AGFA, Mortsel, Belgium).

Se calcularon diversos parámetros poblacionales para caracterizar la información proporcionada por los SSR, estos fueron los siguientes: número total de alelos por locus (A), número efectivo de alelos por locus ($A_e = 1/\sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia del alelo i), heterocigosidad observada ($H_o = \text{número de individuos heterocigóticos} / \text{número de individuos totales}$), heterocigosidad esperada ($H_e = 1 - \sum p_i^2$), índice de fijación de Wright ($F = 1 - H_o/H_e$) (Wright, 1951) y poder discriminatorio ($PD = 1 - \sum g_i^2$, siendo g_i la frecuencia del genotipo i) (Kloosterman *et al.*, 1993).

Usamos el programa Powermarker (Liu y Muse, 2005) para construir el dendrograma de las 38 variedades analizadas en este estudio. Se adoptó el modelo Neighbour Joining (NJ) y se analizaron las distancias genéticas entre cultivares según el coeficiente Nei (Nei *et al.*, 1983).

Para estudiar la estructura poblacional de nuestra muestra, usamos el programa Structure v.2.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa adopta el método de agrupamiento que identifica K subgrupos de individuos con distintas frecuencias alélicas. Los individuos pueden ser miembros de múltiples sub-poblaciones con distinto coeficiente sumando un total de 1. Elegimos el modelo de mezcla con alelos correlacionados con el fin de examinar la estratificación poblacional en nuestra muestra. Ejecutamos 1.000.000 de interacciones después de una iniciación de 100.000. Seleccionamos el número K de sub-poblaciones que mejor se ajusta a nuestra colección de variedades según el método Evanno *et al.* (2005). Se consideraron como pertenecientes a una subpoblación aquellas variedades con un porcentaje de pertenencia a ella de al menos un 80%.

Para el estudio del desequilibrio de ligamiento entre parejas de loci se empleó el programa GenePop (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Se determinó el umbral de aceptación de que una pareja de loci estaban en desequilibrio de ligamiento cuando la probabilidad de independencia fue inferior a

$\alpha=1,4 \times 10^{-4}$, lo que corresponde a $\alpha=0,05$ tras la corrección de Bonferroni (Bonferroni, 1936) para el total de 351 parejas de loci comparadas.

Tabla 1: Material vegetal usado en este estudio

Cultivar	Origen	Pedigrí	Fuente
'Angeleno'	Garabedian, California, EEUU (1967)	'Queen Ann' (PA)	Okie y Ramming, 1999
'Au-Rosa'	Norton, Auburn University, Alabama, EEUU (1989)	Cruce entre 2 selecciones de un BC de 'Starcher#1' x 'Santa Rosa'	Okie y Ramming, 1999
'Autumn Giant'	Zaiger, California, EEUU (1986)	'Roysum' (mutación 'Late Santa Rosa') x 'King David'	Okie y Ramming, 1999
'Bella di Barbiano'	Cotignola, Italia	desconocido	
'Blackamber'	USDA Fresno, California, EEUU (1980)	'Friar' x 'Queen Rosa' + (2)	Okie y Ramming, 1999
'Black Diamond'	SunWorld Inc, Superior Farms, Ca. EEUU (1982)	'Angeleno' (PA) + (1)	Okie y Ramming, 1999
'Black Gold'	Weinberger, USDA Fresno, California, EEUU	'Angeleno' (PA) + (1)	M. Badenes (com. pers.)-
'Black Ruby'	Okie, USDA-ARS, Byron, Georgia, EEUU (1994)	('Queen Ann' x 'Santa Rosa') (PA)	Okie y Ramming, 1999
'Black Star'	SunWorld Inc, Superior Farms, Ca. EEUU	desconocido	
'By-68-1262'	USDA-ARS Byron, Georgia, EEUU	desconocido	
'By-8154-58'	USDA-ARS Byron, Georgia, EEUU	('Mariposa' x 'Methley') (PA)	Okie, 2006
'By-8155-70'	USDA-ARS Byron, Georgia, EEUU	desconocido	
'By-8334-16'	USDA-ARS Byron, Georgia, EEUU	desconocido	
'Byrongold'	Thompson, USDA-ARS Byron, Georgia, EEUU (1985)	['Gaviota' (<i>P. salicina</i> x <i>P. americana</i>) x ('Ozark Premier' x <i>P. angustifolia</i>)] (PA)	Okie y Ramming, 1999
'Calita'	Weinberger, USDA Fresno, California, EEUU	'Gaviota' x 'Eldorado'	M. Badenes (com. pers.)
'Catalina'	Krause, California, EEUU (1982)	'Angeleno' (PA)+ (1)	Okie y Ramming, 1999
'Early Beaut'	Bradford, California, EEUU	'Red Beaut' (PA)	M. Badenes (com. pers.)
'Flavorosa'	Zaiger, California, EEUU	Pluot	
'Fortune'	USDA Fresno, California, EEUU (1988)	'Laroda' x ('Queen Ann' x 'Late Santa Rosa')	Okie y Ramming, 1999
'Freedom'	USDA Fresno, California, EEUU (1980)	'Laroda' x ('Queen Ann' x 'Late Santa Rosa')	Okie y Ramming, 1999
'Friar'	Weinberger, USDA Fresno, California, EEUU (1968)	'Gaviota' x 'Nubiana'	Okie y Ramming, 1999
'Golden Globe'	Zaiger, California, EEUU (1991)	'Laroda' x 'Queen Ann'	Okie y Ramming, 1999
'Golden Japan'	Burbank, California, EEUU	desconocido	
'Golden plum'	EEUU	desconocido	
'Laetitia'	Sudafrica (1985)	'Golden King' (PA)	Okie y Ramming, 1999
'MidniteSun'	Chamberlin, California, EEUU (1987)	desconocido	
'Obilnaja'	URSS	'Burbank' x 'Tavrisheskaja' (<i>P. cerasifera</i>)	M. Badenes (com. pers.)

Tabla 1: Continuación

Cultivar	Origen	Pedigrí	Fuente
'Ozark Premier'	SFES, Missouri, EEUU (1946)	'Burbank' x 'Methley' (<i>P. salicina</i> x <i>P. cerasifera</i>)	Byrne y Littleton, 1988
'Pabeida'	URSS	'Burbank' x 'Tavrisheskaja' (<i>P. cerasifera</i>)	M. Badenes (com. pers.)
'Primetime'	Wuhl, USDA Fresno, California, EEUU (1994)	'Challenger' x 'Show Time' - (5)	Okie y Ramming, 1999
'Queen Rosa'	USDA Fresno, California, EEUU (1972)	'Santa Rosa' x 'Queen Ann' - (5)	Okie y Ramming, 1999
'Royal Diamond'	Kitahara, California, EEUU (1989)	'Angeleno' (PA) + (3)	Okie y Ramming, 1999
'Rubysweet'	USDA-ARS Byron, Georgia, EEUU	'Mariposa' x 'Morris' (autofecundación 'Methley')	Okie y Ramming, 1999
'Santa Rosa'	Burbank, California, EEUU (1906)	desconocido	
'Showtime'	Wuhl, USDA Fresno, California, EEUU (1992)	'Santa Rosa' (PA) - (5)	Okie y Ramming, 1999
'Simka'	Kazarian, California, EEUU (1959)	'Santa Rosa' (PA) + (2)	*Página web
'Songold'	Sudafrica (1972)	'Golden King' x 'Wickson' ('Kelsey' x 'Burbank')	Okie y Ramming, 1999
'T.C.Sun'	Chamberlin, California, EEUU	desconocido	

(PA): polinización abierta

+: pedigrí confirmado con los marcadores estudiados, entre paréntesis el número de alelos discrepantes.

-: pedigrí rechazado, entre paréntesis el número de alelos discrepantes

*http://www.naturalhub.com/grow_fruit_cultivars_plum.htm

Tabla 2: Microsatélites de ciruelo usados en el estudio y su posición en el mapa y el genoma de *Prunus*

Microsatélite	Repetición	Posición en el mapa de <i>Prunus</i>	Posición en el genoma de <i>Prunus</i>
CPST008	(GA)17	G1(9,0) ³	4:16691678..16691398
CPST036	(GA)5...(GA)3 CGG (GA)7	G1(28,6) ¹	1:21862226..21862868
CPST027	(GA)23	G1(29,2)	1:22035955..22036425
CPST024	(GA)20	G1(36,6)	1:27083599..27084298
CPST044	(GT)8 (AT)4...(GA)7 CA (GA)4	G2(23,6)	2:17217107..17217616
CPST021	(GA)15	G2(39,4)	2:23734599..23735532
CPST034	(CT)5 GT (CT)6...(CA)5	G2(48,6)	2:26348777..26349357
CPST037	(GA)17	s.d. ²	3:3973631..3973987
CPST025	(CCT)3 (CT)13	s.d.	3:5849272..5849933
CPST032	(GA)10	G3(18,9)	3:10161417..10161812
CPST035	(GA)23	s.d.	3:19413890..19414046
CPST039	(GA)18	G4(1,8)	4:420318..420916
CPST005	(CT)16	G4(53,8)	4:29887942..29888421
CPST011	(CT)21	G5(5,2)	5:4162458..4163392
CPST006	(CT)15	G5(21,7)	5:11533644..11534049
CPST030	(CT)12	G5(35,6)	5:15126681..15127320
CPST022	(GA)13	G5(40,7)	5:16626112..16626607
CPST012	(GA)16	G6(36,2)	6:16098467..16098872
CPST002	(CT)8	G6(6:25 ⁴)	6:2289012..2289812
CPST010	(TA)9 (CT)14	s.d.	6:28364097..28364300
CPST004	(GA)8	G7(9,5)	7:6681998..6682453
CPST026	(CT)16	G7(22,7)	7:10978397..10978874
CPST033	(GT)11 (GA)13	G7(28,4)	7:14096733..14097221
CPST042	(GA)10	G7(41,3)	7:17083611..17084210
CPST018	(CA)5 (CT)20	G8(0,0)	8:123201..124141
CPST029	(GA)20	s.d.	alineamiento con varios scaffolds con una similitud >80%
CPST013	(GAA)2 (GA)8	s.d.	Sin homologías >80% en el genoma de melocotonero

¹ Notación para marcadores situados en el mapa de referencia de *Prunus* (Dirlewanger *et al.*, 2004): G1-G8, grupos de ligamiento del 1 al 8; en paréntesis posición en el mapa en cM.

² s.d.= sin determinar.

³ La posición correcta es la del mapa genético. La región donde se encuentra CPST008 está mal situada en la secuencia del melocotonero v1.0 (l. Verde com. pers.)

⁴ Notación para marcadores situados con la estrategia de "bin mapping" (Howad *et al.*, 2005): número del grupo de ligamiento: posición inicial del "bin" en el mapa de referencia de *Prunus*.

Resultados y discusión

Los parámetros poblacionales estudiados (Tabla 3) indican que el ciruelo japonés es una especie que presenta un alto nivel de variabilidad, lo que confirma los resultados de otros trabajos (Byrne, 1990; Mnejja *et al.*, 2010, Carrasco *et al.*, 2012) y es congruente con el origen de buena parte de los materiales estudiados a partir de cruzamientos interespecíficos en los que han intervenido diversas especies de *Prunus* además de *P. salicina*. Los microsatélites usados produjeron de 2 a 13 alelos por locus con un promedio de $A=7,19$ y de 2 a 26 genotipos por locus con un promedio de 13,04 de un total de 38 genotipos. Esta variabilidad sitúa al ciruelo japonés junto al almendro, como la especie más variables dentro de las cultivadas del género *Prunus* (Byrne 1990; Mnejja *et al.* 2010). En nuestro trabajo de variabilidad del almendro usando microsatélites desarrollados en la misma especie (Capítulo 2) observamos una media de 7,26 alelos y 11,11 genotipos por locus de un total de 30 genotipos. Aunque los valores de los parámetros de variabilidad son parecidos entre ciruelo japonés y almendro, en almendro usamos un número parecido de SSRs procedentes de secuencias genómicas y de ESTs, siendo estos últimos menos variables. Si tomamos únicamente los datos de los SSRs genómicos de almendro, los valores de estos parámetros fueron de 9,48 alelos/locus y 14,92 genotipos/locus, más de dos puntos por encima en cada caso de los valores encontrados en ciruelo japonés, lo que situaría al almendro en un nivel de variabilidad ligeramente superior al resto de los *Prunus* cultivados.

Algunos trabajos anteriores de análisis de la variabilidad en ciruelo japonés se realizaron con microsatélites desarrollados en especies cercanas del género *Prunus*. Usando 25 SSRs de *P. avium* y otros 3 de *P. persica*, Ahmad *et al.* (2004) hallaron un promedio de alelos menor, $A=4,3$ en los 14 cultivares de ciruelo y 6 de pluots. También en nuestro anterior estudio de transferibilidad de los microsatélites obtuvimos una media de $A= 4,5$ alelos por locus en una muestra de 8 cultivares de ciruelo japonés analizada con 120 SSRs de otros *Prunus* (Mnejja *et al.*, 2010; Capítulo 4). Hayashi *et al.* (2009) usaron 12 de los 39 SSRs de melocotonero y albaricoquero que

amplificaron en el ciruelo japonés, para estudiar la variabilidad de 22 cultivares y encontraron un promedio de 6,1 alelos por locus. Más recientemente, Carrasco *et al.* (2012) usando ocho de los SSRs desarrollados en este trabajo en 29 variedades de ciruelo japonés identificaron niveles más altos de variabilidad de los que hemos encontrado nosotros ($A=12,2$). Las causas más probables de las diferencias entre estos trabajos hay que buscarlas en el tamaño de la muestra, el origen de las variedades estudiadas y la variabilidad de los microsatélites usados. A mayor número de variedades y de más diverso origen, mayor debería ser el número de alelos encontrado al ser posible identificar algunos de los alelos que se encuentran a baja frecuencia. El origen de los microsatélites también influye en su variabilidad, siendo habitualmente más polimórficos los desarrollados en la misma especie (Maghuly *et al.*, 2005; Mnejja *et al.*, 2010). Tratándose de que el número de variedades estudiadas en los diferentes trabajos fue bastante similar, la causa más evidente de las diferencias de polimorfismo observadas sería el origen de los SSRs ya que los datos de variabilidad encontrados fueron más altos en los trabajos realizados con SSRs de *P. salicina* (Carrasco *et al.*, 2012 y esta investigación) que los que usaron SSRs procedentes de otros *Prunus* (Ahmad *et al.*, 2004, Hayashi *et al.*, 2009 y Mnejja *et al.*, 2010).

El valor promedio de la heterocigosidad observada $H_o=0,67$ fue muy elevado y próximo al de la heterocigosidad esperada $H_e=0,70$, siendo el promedio del índice de fijación de Wright muy próximo a cero $F=0,06$, lo que significa que nuestros datos se asemejan a los esperados en una población en equilibrio Hardy-Weinberg. La mayoría de los loci presentaron unos valores de F cerca de cero salvo algunos como CPSCT013, CPSCT029, CPSCT032, CPSCT033 y CPSCT037 que produjeron índices positivos y elevados ($\geq 0,30$), lo que indica que contienen alelos nulos a frecuencias medias, aunque no hayamos detectado ningún genotipo en homocigosis para el alelo nulo en este estudio. El valor F del locus CPSCT013 fue de 1, ya que la heterocigosidad observada fue 0. En este locus sólo se encontraron dos alelos que estaban siempre en homocigosis. Este es un resultado inesperado visto el comportamiento del resto de loci, pero puede

explicarse por la presencia de dos alelos en CPSCT013, uno de los cuales amplifica preferentemente cuando ambos están presentes, de modo que sólo un alelo puede detectarse después de la PCR con la metodología usada. El alelo que amplifica preferencialmente se comporta, por tanto, como dominante ya que el heterocigoto se confunde con el homocigoto. Situaciones parecidas, fueron descritas en el mapeo de SSRs en el mapa genético de referencia de *Prunus* (Howad *et al.*, 2005) y pueden causar, además de los alelos nulos ya comentados anteriormente, los valores positivos de F encontrados en algunos SSRs.

Los altos valores observados para el poder de discriminación (media de PD=0,81, lo que significa que la probabilidad de que dos variedades tomadas al azar sean distintas para el SSR promedio es del 81%) y de los genotipos identificados por locus (media de 13,04 genotipos/locus sobre 38 posibles) muestran una alta capacidad de los marcadores usados para identificar variedades, lo que es particularmente destacable porque no fueron elegidos por ser especialmente polimórficos en esta especie. Además, un tercio de los marcadores usados consiguieron identificar individualmente al menos a 15 genotipos, que es algo más del 40% de las variedades estudiadas. Otro dato que confirma esta elevada capacidad de discriminación es que el número medio de microsatélites con distinto genotipo entre dos variedades fue de 22,5 de un total posible de 27.

Los 27 microsatélites utilizados fueron capaces de diferenciar todas las variedades estudiadas. Dos parejas de variedades fueron sin embargo mucho más próximas genéticamente que el promedio: 'Friar' y 'Midnite Sun', que difirieron en tan sólo dos alelos de estos marcadores (uno alelo de CPSCT022 y otro de CPSCT035), y 'Golden Plum' y 'Golden Globe' en tres alelos (uno de cada uno de CPSCT004, CPSCT037 y CPSCT044). Estos resultados sugieren fuertemente que se tratan de la misma variedad o de algún mutante somático ("sport") de la misma y que las diferencias encontradas en los marcadores son debidas a mutaciones somáticas en los microsatélites o a un error de interpretación por nuestra parte. Aranzana *et al.* (2003) encontraron diferencias en algunos alelos de microsatélites entre conocidos sports de melocotonero y estimaron una alta tasa de mutación

para estos marcadores (1,1 % de los alelos observados), lo que explicaría que pudiera detectarse alguna diferencia entre los SSRs de diferentes clones de la misma variedad sin que deban considerarse distintas. Por otra parte, cualquier pareja de variedades separadas por una o más meiosis, aunque estuvieran estrechamente emparentadas (hermanos completos, parental-descendiente), sería claramente diferenciable al tener un número muy superior de diferencias entre sí con los SSRs que hemos usado en este trabajo.

Los datos obtenidos son una oportunidad para comprobar los pedigrís de algunas variedades que encontramos en la bibliografía. Esto fue posible en nueve variedades en las que conocemos el genotipo para los SSRs de uno (8) o dos (1) de sus putativos parentales, lo que nos ha permitido confirmar o descartar el pedigrí disponible (Tabla 1). Con el mismo criterio que para las posibles duplicaciones o mutantes somáticos hemos aceptado como bueno cualquier pedigrí en el que hubiera ≤ 3 alelos no esperados. El único caso en el que tenemos la información completa es el de la variedad 'Blackamber' con los dos supuestos progenitores 'Friar' x 'Queen Rosa', en los que encontramos dos discrepancias con los 27 SSRs estudiados y por lo tanto consideramos confirmado. De los ocho casos restantes, cinco fueron confirmados y los otros tres no (los de 'Prime Time', 'Queen Rosa' y 'Show Time').

Para estudiar el desequilibrio de ligamiento del ciruelo japonés, exploramos la independencia de las parejas de loci estudiadas. Se identificaron 30 parejas de loci en desequilibrio de ligamiento de un total de 351 posibles, eso significa el 8,5%. De estas 30 parejas, ocho correspondieron a loci pertenecientes al mismo grupo de ligamiento, repartidos como sigue; una pareja en G3, dos parejas en cada uno en G5 y G6, y tres parejas en G7. Las distancias físicas entre las parejas en DL oscilaron entre 1,9 y 12,3 Mbp (con un promedio de 5,6 Mbp). Con las limitaciones de trabajar con un pequeño conjunto de marcadores, estos resultados no son indicativos de un DL masivo. Esta situación se esperaría de hallarnos en un escenario en el que las variedades estudiadas procedieran de muy pocos fundadores tras dos o tres generaciones de

intercruzamiento, por lo que nuestros datos sugieren que la variabilidad de partida fue suficientemente amplia como para que no hayamos detectado altos niveles de DL.

El dendrograma obtenido con nuestros datos se encuentra en la Figura 1, en la que se identifica un clúster (B) con cuatro variedades claramente diferenciadas de las demás: 'Pabeida' y 'Obilnaja', ambas procedentes de programas de la extinta Unión Soviética, aunque con un parental procedente del programa californiano ('Burbank'). Las otras dos variedades de este clúster, 'Flavorosa' y 'Golden Japan', tienen un origen muy diverso. La más alejada de todas fue 'Flavorosa', separada del resto de los cultivares por un promedio de distancia genética de 0,80, cuando el promedio general de distancia genética entre dos variedades de esta muestra fue de 0,57. Que 'Flavorosa' sea la variedad más alejada del resto no es sorprendente ya que es el único pluot de la muestra, incluyendo por tanto al albaricoquero en su pedigrí a diferencia del resto de variedades. 'Flavorosa' es la que más alelos únicos presentó (12 de los 54 posibles), de los cuales podría ser que algunos procedieran del progenitor albaricoquero. La variedad más cercana a 'Flavorosa' resultó ser 'Golden Japan', a una distancia genética de 0,61 y con cuatro alelos únicos. 'Golden Japan' es una de las antiguas variedades obtenidas por L. Burbank y según los pocos datos de pedigrí que tenemos no parece haber intervenido como parental de las variedades de este estudio, aunque los datos disponibles no descartan que pudiera ser uno de los ancestros de 'Flavorosa'. El grupo compuesto por 'Obilnaja' y 'Pabeida', dos variedades procedentes del mismo cruzamiento y con una distancia relativamente pequeña (0,39), presentaba cuatro alelos comunes que eran únicos en la población estudiada, alguno de los cuales podría proceder de *P. cerasifera*, ya que junto a 'Ozark Premier' son las únicas variedades de las analizadas que tienen esta especie en su pedigrí. 'Obilnaja' presentó además tres alelos únicos y 'Pabeida' ninguno.

Dentro ya del clúster A, se separa A2 con 'Ozark Premier' y una de las variedades de Byron (Georgia) de la que no se obtuvo información de pedigrí (By-8334-07). Tratándose de que 'Ozark Premier' tiene ancestros de *P. cerasifera*, y además 'Burbank' es el otro parental que comparte con

‘Obilnaja’ y ‘Pabeida’, podría tratarse de un grupo de transición con las variedades del clúster B. En el clúster A1 se encuentran la mayor parte de las variedades. Uno de sus subgrupos (A1.2) incluye ‘Santa Rosa’, una de las variedades más antiguas del programa de L. Burbank que ha sido usada como parental en muchos de los otros programas, ‘Simka’, uno de sus descendientes, y dos variedades más procedentes de programas Sudafricanos (‘Songold’ y ‘Laetitia’), ambas descendientes de ‘Golden King’. La variedad italiana ‘Bella di Barbiano’ ocupa el subclúster A1.1.2 y el resto de variedades, la mayoría de origen californiano, se sitúan en diferentes clústers dentro de A1.1.1 con la excepción de un subclúster que contiene la mayor parte de las variedades del programa de Byron (Georgia). Una de estas variedades, ‘Byron Gold’, tiene seis alelos únicos, lo que podría deberse a su complejo pedigrí en el que intervienen, además del *P. salicina*, dos especies más (*P. angustifolia* y *P. americana*),

En general nuestros resultados estuvieron en sintonía con los de otros grupos usando diferentes tipos de marcadores para el estudio de variabilidad del ciruelo. Detallamos a continuación algunos ejemplos. Las variedades ‘Angeleno’ y ‘Catalina’ están cerca en nuestro dendrograma tal como en el estudio de Ahmad *et al.* (2004). Eso es explicable puesto que ‘Catalina’ es el resultado de una polinización abierta de ‘Angeleno’. Goulão *et al.* (2001) con AFLPs y ISSRs encontraron tal como nosotros hemos observado que ‘Golden Japan’ se separaba del resto de las variedades estudiadas. Las variedades ‘Queen Rosa’ y ‘Freedom’ por una parte y ‘Angeleno’, ‘Black Amber’, ‘Friar’, ‘Black Diamond’, ‘Royal Diamond’ y ‘Black Star’ por otra, fueron cercanas genéticamente según nuestros datos, y lo fueron también en este estudio. ‘Simka’ y ‘Santa Rosa’ también estaban en el mismo grupo en el estudio de Boonprakob *et al.* (2001) con RAPDs y en el nuestro, el grupo contenía también la variedad ‘Ozark Premier’ y ‘Au Rosa’, esta última localizada por nosotros en un clúster bastante distante.

Las variedades estudiadas se agruparon en dos subpoblaciones según el programa “Structure” (Figura 2). En general estas agrupaciones fueron consistentes con las agrupaciones obtenidas en el dendrograma, sobre todo si tomamos únicamente las variedades con un 80% de pertenencia a una

sola población. Lo más destacable es que las variedades de los clusters B y A2 del dendrograma, junto a cuatro variedades más, formaron una misma subpoblación (subpoblación 2), donde encontramos todas las variedades que provienen de cruzamientos interespecíficos entre *P. salicina* y otros *Prunus* ('Flavorosa', 'Obilnaja', 'Pabeida', 'By-8154-58', 'Ozark Premier', 'Rubysweet' y 'Byron Gold'). En dos de estas variedades, 'By-8154-58' y 'Rubysweet' incluyen en su pedigrí la variedad 'Methley', que es un cruzamiento entre *P. salicina* y *P. cerasifera*. La única variedad de esta subpoblación, de pedigrí conocido, que no parece provenir de un cruce interespecífico es 'Songold', aunque no se sabe mucho de la proveniencia de sus antecesores. Según nuestros resultados, esta variedad, junto con las otras dos de la subpoblación 2 de las que no disponemos de datos de pedigrí ('By-8334-16' y 'Golden Japan'), podrían tener en su historia algún episodio de hibridación interespecífica de ciruelo japonés con otras especies distintas. La otra subpoblación 1, incluye a la mayoría de las variedades californianas, que estaban separadas en un grupo mayor y otro más pequeño en el dendrograma.

Nuestros datos demuestran una gran diversidad genética del ciruelo japonés. Esta alta variabilidad se debe al resultado de dos elementos importantes de su historia reciente. En primer lugar la variación propia de *P. salicina* a la que se suma la aportada por varias especies de ciruelo como *P. americana*, *P. angustifolia*, *P. simonii* y *P. cerasifera*. En realidad, el ciruelo japonés cultivado es una amalgama de especies en las que, de acuerdo con Boonprakob *et al.* (2001) predominan las especies chinas, *P. salicina* (29-36%) y *P. simonii* (21-26%), y europeas, *P. cerasifera* (21-28%), siendo el resto (10-29%) compuesto por ciruelos de origen americano. Por otra parte, esta enorme variabilidad inicial ha sido modelada por los programas de mejora genética hacia la selección de tipos comercialmente interesantes y adaptados a las condiciones locales y esto hasta el momento se ha hecho con un número limitado de genitores y muy pocas meiosis (la mayoría de las variedades estudiadas están en su primera o segunda generación después de los cruzamientos iniciales de L. Burbank y otros mejoradores Norteamericanos), lo que explica su débil estructuración subpoblacional

basada esencialmente en los diversos programas de mejora genética, y en los materiales usados en cada uno de ellos, más que en otros aspectos de tipo morfológico o geográfico. El enorme pool genético encontrado demuestra el gran potencial de mejora de este cultivo, casi desconocido a nivel genético, que tiene por delante un futuro muy prometedor si la mejora genética es capaz de usar esta variabilidad para obtener variedades productivas, con formas y sabores nuevos, así como fuente de compuestos biosaludables, que las hagan atractivas para productores y consumidores.

Tabla 3: Parámetros de variabilidad genética calculados para 27 SSRs en 38 variedades de ciruelo japonés.

Microsatélite	A	Ao	Ho	He	F	PD	Nº genotipos
CPST002	4	1,55	0,34	0,35	0,04	0,54	5
CPST004	5	3,72	0,82	0,73	-0,12	0,87	10
CPST005	5	4,62	0,87	0,78	-0,11	0,89	11
CPST006	6	4,18	0,89	0,76	-0,18	0,88	13
CPST008	6	3,21	0,63	0,69	0,08	0,84	11
CPST010	12	6,55	0,95	0,85	-0,12	0,92	21
CPST011	7	5,50	0,97	0,82	-0,19	0,92	16
CPST012	13	5,83	0,76	0,83	0,08	0,93	26
CPST013	2	1,87	0,00	0,47	1,00	0,47	2
CPST018	10	4,70	0,84	0,79	-0,07	0,88	17
CPST021	6	2,27	0,57	0,56	-0,01	0,69	6
CPST022	6	3,23	0,71	0,69	-0,03	0,83	12
CPST024	9	4,85	0,95	0,79	-0,19	0,88	15
CPST025	12	5,41	0,89	0,82	-0,10	0,93	20
CPST026	9	5,89	0,87	0,83	-0,05	0,93	20
CPST027	10	3,35	0,63	0,70	0,10	0,84	16
CPST029	4	3,41	0,37	0,71	0,48	0,83	10
CPST030	7	4,60	0,95	0,78	-0,21	0,84	13
CPST032	5	2,58	0,39	0,61	0,35	0,74	7
CPST033	8	5,42	0,42	0,82	0,48	0,89	17
CPST034	5	3,98	0,66	0,75	0,12	0,89	11
CPST035	8	4,85	0,71	0,79	0,11	0,89	16
CPST036	3	1,14	0,13	0,12	-0,06	0,23	3
CPST037	8	3,39	0,24	0,70	0,66	0,78	12
CPST039	8	3,61	0,79	0,72	-0,09	0,87	15
CPST042	7	4,38	0,89	0,77	-0,16	0,87	13
CPST044	9	3,44	0,76	0,71	-0,08	0,84	14
Total	194	107,55					352
Promedio	7,19	3,98	0,67	0,70	0,06	0,81	13,04

Figura 1: Dendrograma de las 38 variedades de ciruelo estudiadas por 27 SSRs basado en la distancia genética y usando el modelo Neighbour Joining y correspondencia con las 2 subpoblaciones resultantes del estudio de la estructura poblacional con un coeficiente de pertenencia superior al 0,8. En fondo rojo las variedades de la subpoblación 1 y en verde las de la subpoblación 2.

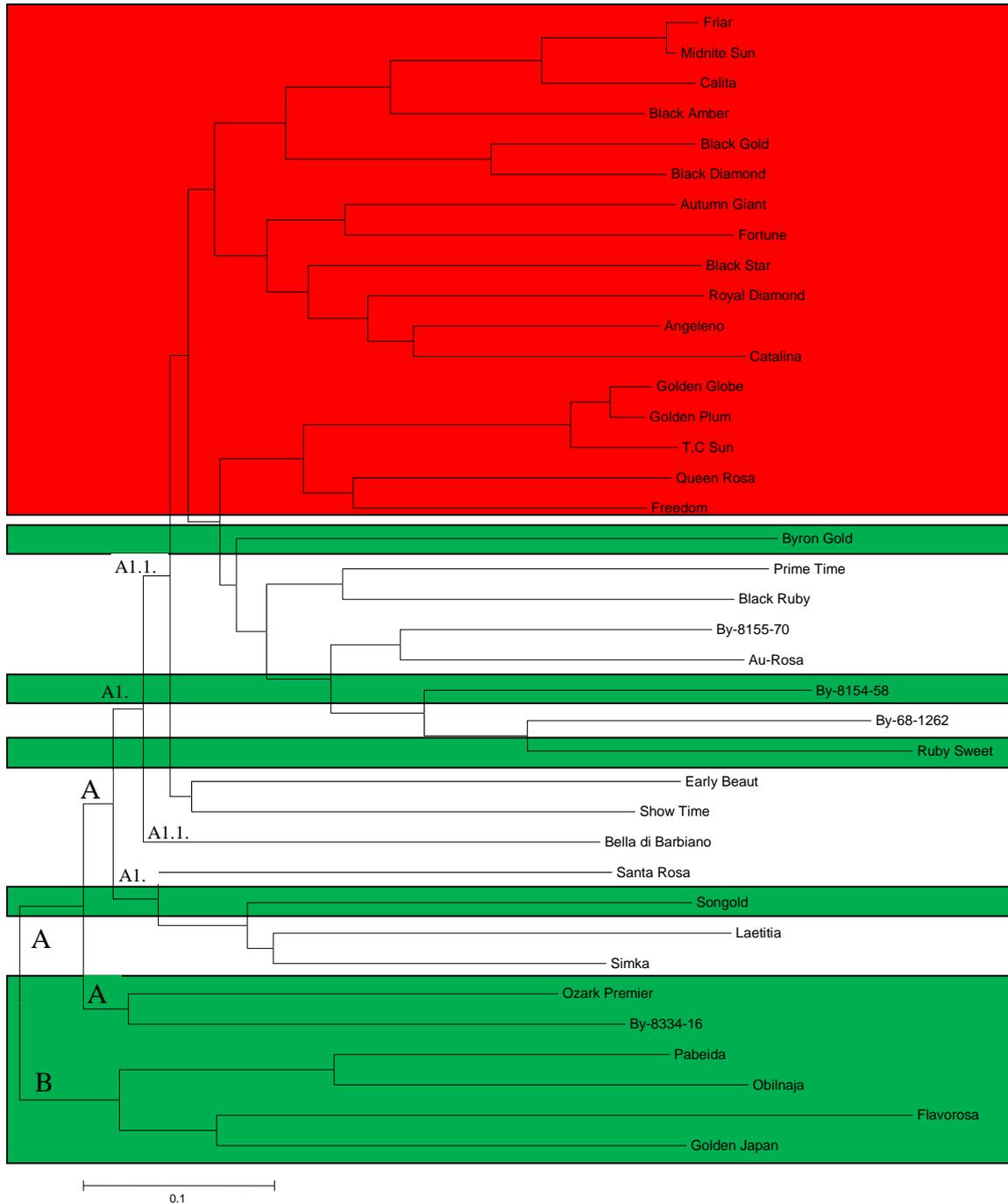
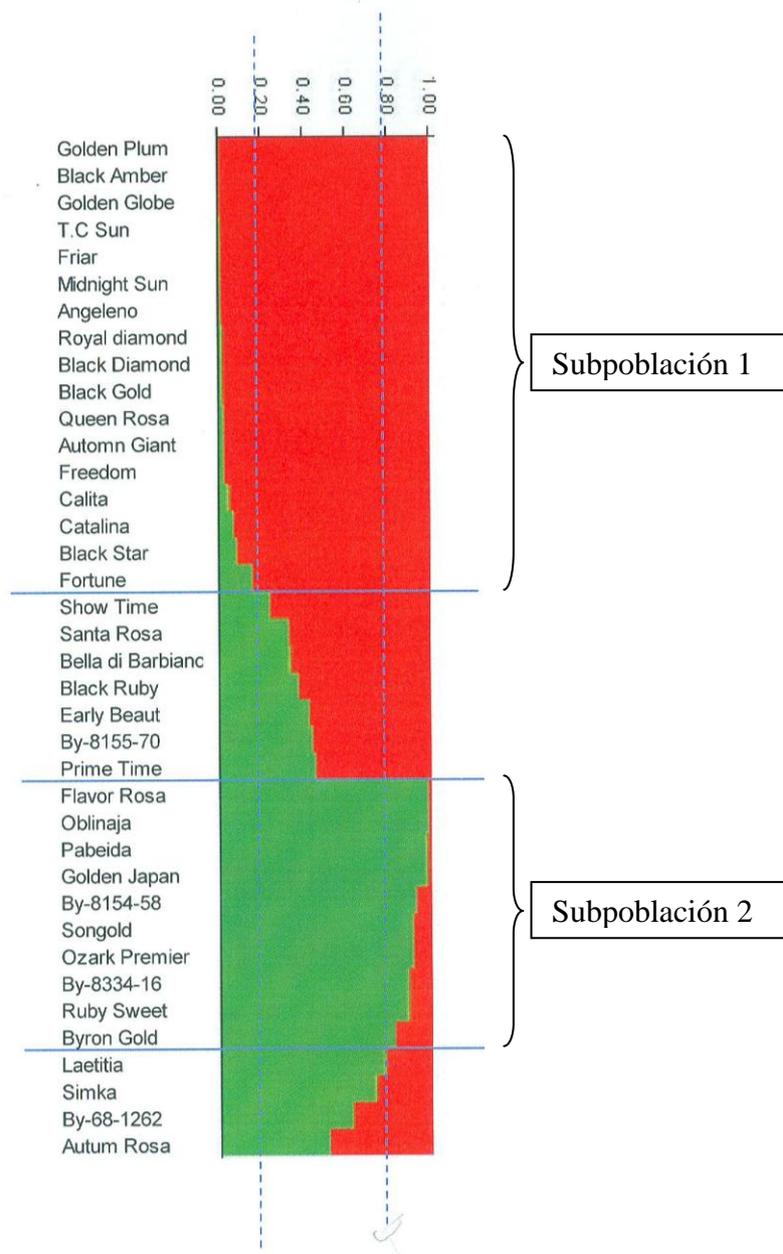


Figura 2: Estructura poblacional de las 38 variedades estudiadas de ciruelo japonés con K=2



Referencias

- Ahmad, R., Potter, D., and Southwick, S.M., 2004. Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 79:164-169.
- Aranzana, M.J., Carbo, J., and Arus, P., 2003. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. *Theor Appl Genet* 106:1341-1352.
- Bellini, E., Giordani, E., Nencetti, V., and Paffetti, D., 1998. Genetic relationships in Japanese plum cultivars by molecular markers. *Acta Hort. (ISHS)* 478:53-60.
- Ben Tamarzizt, H., Baraket, G., Ben Mustapha, S., Marrakchi, M., Trifi, M., and Salhi-Hannachi, A., 2009. Genetic relatedness among Tunisian plum cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis and evaluation of phenotypic characters. *Sci. Hortic.* 121:440-446.
- Bonferroni, C.E., 1936. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. *Publicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze* 8:3-62.
- Boonprakob, U., Byrne, D.H., Graham, C.J., Okie, W.R., Beckman, T., and Smith, B.R., 2001. Genetic Relationships among Cultivated Diploid Plums and Their Progenitors as Determined by RAPD Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:451-461.
- Byrne, D.H., 1989. Inbreeding, coancestry, and founding clones of Japanese-type plums of California and southeastern United States. *J Am Soc Hort Sci* 114:699-705.
- Byrne, D.H., 1990. Isozyme Variability in Four Diploid Stone Fruits Compared with Other Woody Perennial Plants. *Journal of Heredity* 81:68-71.
- Byrne, D.H. and Littleton, T.G., 1988. Electrophoretic characterization of diploid plums of the southeastern United States. *J Am Soc Hort Sci* 113:918-924.
- Carrasco, B., Díaz, C., Moya, M., Gebauer, M., and García-González, R., 2012. Genetic characterization of Japanese plum cultivars (*Prunus salicina*) using SSR and ISSR molecular markers. *Ciencia e investigación agraria* 39:533-543.
- Cipriani, G., Lot, G., Huang, W.G., Matarazzo, M.T., Peterlunger, E., and Testolin, R., 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation, characterisation and cross species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* 99:65-72.
- Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Garriga-Caldere, F., Cosson, P., Howad, W., and Arus, P., 2004. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:9891-9896.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Dreyer, P., 1985. *A gardener touched with genius: the life of Luther Burbank*. Berkeley: University of California Press.
- Evanno, G., Rengnaut, S., and Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Blackwell Sciences Ltd*:2611-2620.
- Goulão, L., Monte-Corvo, L., and Oliveira, C.M., 2001. Phenetic Characterization of Plum Cultivars by High Multiplex Ratio Markers: Amplified Fragment Length Polymorphisms and Inter-simple Sequence Repeats. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:72-77.
- Hayashi, K., Shimazu, K., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Nishitani, C., and Yamamoto, T., 2009. Genetic diversity of mume, apricot and Japanese plum cultivars assessed by SSR markers *Acta Hort. (ISHS)* 814:629-634.
- Howad, W., Yamamoto, T., Dirlewanger, E., Testolin, R., Cosson, P., Cipriani, G., Monforte, A.J., Georgi, L., Abbott, A.G., and Arús, P., 2005. Mapping With a Few Plants: Using Selective Mapping for Microsatellite Saturation of the *Prunus* Reference Map. *Genetics* 171:1305-1309.
- Howard, W.L., 1945. Luther Burbank's plant contributions. *Calif. Agr. Expt. Sta. Bul.* 691.
- Ilgin, M., Kafkas, S., and Ercisli, S., 2009. Molecular characterization of plum cultivars by AFLP markers. *Biotechnol. and Biotechnol. Eq.*:1189-1193.
- Isagi, Y. and Suhandono, S., 1997. PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology* 6:897-899.

- Kloosterman, A.D., Budowle, B., and Daselaar, P., 1993. PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. *Int J Legal Med* 105:257-264.
- Liu, K. and Muse, S.V., 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21:2128-2129.
- Maghuly, F., Fernandez, E.B., Ruthner, S., Pedryc, A., and Laimer, M., 2005. Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographic origin and breeding history. *Tree Genetics & Genomes* 1:151-165.
- Manganaris, A.G., Mainou, A., Goudaras, A., and Ledbetter, C., 1999. Identification of Plum X Apricot interspecific hybrids using isoenzyme polymorphism. *Acta horticulturae* (ISHS) 488:361-368.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Audergon, J.-M., and Arús, P., 2010. *Prunus* microsatellite marker transferability across rosaceous crops. *Tree Genetics & Genomes* 6:689-700.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., and Arús, P., 2005. Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Molecular Ecology Notes* 5:531-535.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., Badenes, M.L., and 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* 4:163-166.
- Nei, M., Tajima, F., and Tateno, Y., 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19:153-170.
- Nishitani, C., Kimura, T., Ueda, E., Howad, W., Arus, P., and Yamamoto, T., 2007. Tri-/hexanucleotide microsatellite markers in peach derived from enriched genomic libraries and their application in rosaceae. *Breeding Science* 57:289-296.
- Okie, W.R., 2006. Introgression of *Prunus* species in Plum. *New York Fruit Quarterly* 14:29-37.
- Okie, W.R. and Hancock, J.F., 2008. Plums, p. 337-358. In: Hancock, J. F. (ed.), *Temperate Fruit Crop Breeding, Germplasm to Genomics*. Springer, New York.
- Okie, W.R. and Ramming, D.W., 1999. Plum Breeding Worldwide. *HortTechnology* 9:162-176.
- Ortiz, A., Renaud, R., Calzada, I., and Ritter, E., 1997. Analysis of plum cultivars with RAPD markers. *Journal of Horticultural Science and biotechnology* 72 (1):1-9.
- Parfitt, D.E., Arulsekar, S., and Ramming, D.W., 1985. Identification of plum x peach hybrids by isoenzyme analysis. *Horticultural Science* 20:246-248.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P., 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155:945-959.
- Qiao, Y.S., Fang, J.G., Cong, Y., Zhou, J., and Zhang, Z., 2007. Analysis of genetic diversity of Japanese plum cultivars based on RAPD, ISSR and SSR markers. *Acta Hort* 763:177-183.
- Rakoczy-Trojanowska, M. and Bolibok, H., 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cell Mol Biol Lett* 9:221-238.
- Ramming, D.W. and Cociu, V., 1990. Plums (*Prunus*), p. 233-287. In: Moore, J. N. and Ballington Jr, J. R. (eds.), *Genetic resources of temperate fruit and nut crops*. Inter. Soc. for Hort. Sci., Wageningen, The Netherlands.
- Rico, C., Rico, I., and Hewitt, G., 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of Royal Society of London B: Biological Sciences* 263:549-557.
- Rohrer, J.R., Ahmad, R., Southwick, S.M., and Potter, D., 2004. Microsatellite analysis of relationships among North American plums (*Prunus* sect. *Prunocerasus*, Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution* 244:69-75.
- Schlötterer, C., Amos, B., and Tautz, D., 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature* 354:63-65.
- Shimada, T., Hayama, H., Haji, T., Yamaguchi, M., and Yoshida, M., 1999. Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Euphytica* 109:143-147.
- Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S.M., and Boritzki, M., 2003. Analysis of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivars Using SSR and AFLP Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:904-909.

- Verde, I., Abbott, A.G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., Marroni, F., Zhebentyayeva, T., Dettori, M.T., Grimwood, J., Cattonaro, F., Zuccolo, A., Rossini, L., Jenkins, J., Vendramin, E., Meisel, L.A., Decroocq, V., Sosinski, B., Prochnik, S., Mitros, T., Policriti, A., Cipriani, G., Dondini, L., Ficklin, S., Goodstein, D.M., Xuan, P., Fabbro, C.D., Aramini, V., Copetti, D., Gonzalez, S., Horner, D.S., Falchi, R., Lucas, S., Mica, E., Maldonado, J., Lazzari, B., Bielenberg, D., Pirona, R., Miculan, M., Barakat, A., Testolin, R., Stella, A., Tartarini, S., Tonutti, P., Arus, P., Orellana, A., Wells, C., Main, D., Vizzotto, G., Silva, H., Salamini, F., Schmutz, J., Morgante, M., and Rokhsar, D.S., 2013. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat Genet* 45:487-494.
- Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354.
- Wünsch, A., 2009. Cross-transferable polymorphic SSR loci in *Prunus* species. *Sci. Hortic.* 120:348-352.

DISCUSIÓN GENERAL

1. Desarrollo de los microsatélites

En la presente tesis se utilizaron dos métodos para desarrollar nuevos microsatélites: uno a partir de genotecas de ADN enriquecidas, con el que se obtuvieron 31 SSRs en almendro y 27 en ciruelo japonés y otro usando las secuencias de ESTs existentes en las bases de datos de almendro y del melocotonero, con el que se descubrieron 47 SSRs (22 en almendro y 25 en melocotonero).

De los 91 clones positivos secuenciados de la genoteca enriquecida para las secuencias CT/AG de almendro, 64 secuencias únicas de microsatélites fueron identificadas, de las cuales se pudieron diseñar 52 pares de cebadores. De este juego de cebadores, 47 amplificaron correctamente en ADN de almendro y de ellos 31 fueron polimórficos y amplificaron un único locus en un grupo de ocho cultivares de esta especie.

Para la especie *Prunus salicina*, se secuenciaron 85 clones positivos de una genoteca enriquecida para secuencias CT/AG. De estas secuencias, 56 fueron identificadas por contener microsatélites únicos, con las cuales se diseñaron 45 pares de cebadores. De estos juegos de cebadores, 38 amplificaron correctamente el ADN de ciruelo japonés, 27 de los cuales fueron polimórficos, amplificando un único locus en ocho cultivares seleccionados de esta especie.

Basándonos en estos valores, para desarrollar 10 SSRs funcionales (polimórficos en su propia especie y amplificando un único locus) para el almendro y el ciruelo japonés, necesitamos, respectivamente, la secuenciación de 30 y 32 clones, la identificación de 21 y 20 secuencias microsatélites y el diseño de 17 pares de cebadores para ambos. El trabajo necesario para el desarrollo de 10 microsatélites en ambos casos fue muy parecido. Si comparamos nuestros resultados de desarrollo de microsatélites a otros recopilados en la publicación de Squirrell *et al.* (2003), resulta que fuimos más eficientes, cuando de media para desarrollar 10 microsatélites útiles, se necesita el diseño de 20 pares de cebadores, la identificación de

38 microsatélites y la secuenciación de 60 clones. Estas diferencias se deben a que en este estudio se juntan trabajos que usaron genotecas enriquecidas, no enriquecidas y otras de cDNA, RAPDs, AFLPs y marcadores de otros tipos. También pueden deberse al método de enriquecimiento usado, al motivo de repeticiones elegido y a la facilidad de desarrollar microsatélites en una especie u otra.

En el caso de las cuatro especies de *Brassica* incluidas en la revisión de Squirrell *et al.* (2003), para desarrollar 10 microsatélites útiles, de media se necesitó el diseño de 16 pares de cebadores, la identificación de 29 microsatélites y la secuenciación de 39 clones. Datos que se asemejan más a nuestros resultados aunque se trata de especies poliploides o genomas mucho más complejos que los de *Prunus* donde el descarte de los microsatélites polimórficos presentando multiloci no puede ser contabilizado de la misma manera que en nuestro caso. Para una mejor apreciación de nuestros resultados es mejor compararlos con el desarrollo de SSRs en una especie cercana a las nuestras. Un buen ejemplo es el trabajo de Aranzana *et al.* (2002) realizado además en nuestro mismo laboratorio sobre el desarrollo de microsatélites con una genoteca de ADN enriquecida para el mismo motivo CT/AG del melocotonero. Para llegar a tener 10 microsatélites útiles de melocotonero, se necesitó el diseño de 19 pares de cebadores, la identificación de 20 microsatélites y la secuenciación de 25 clones. Para la misma especie, Dirlewanger *et al.* (2002) necesitaron, para los 10 microsatélites útiles, diseñar 13 pares de cebadores, identificar 15 microsatélites únicos y secuenciar 28 clones. Nuestros datos fueron ligeramente peores considerando que fueron necesarios 25 y 28 clones en melocotonero frente a unos 30 clones en almendro y 32 en ciruelo japonés para obtener 10 SSRs útiles.

2. Variabilidad de los microsatélites desarrollados

2.1. Variabilidad en almendro

Los 31 microsatélites genómicos de almendro desarrollados en esta tesis (CPDCT), amplificaron en la muestra de ocho variedades de almendro 198 alelos, con un promedio de 6,6 alelos por locus. Los valores de la heterocigosidad observada y esperada fueron altos, con un promedio de 0,65 y 0,78 respectivamente. Cuando se usaron 25 de estos microsatélites para el estudio de la variabilidad de una colección de almendro de 30 cultivares, el promedio de alelos por locus fue de 9,48. Los valores de la heterocigosidad observada y esperada resultaron también altos, con un promedio de 0,70 y 0,78, respectivamente. En este mismo estudio, cuando incluimos 22 microsatélites adicionales derivados de ESTs, los 47 microsatélites amplificaron un total de 341 alelos, con un promedio de 7,26 alelos por locus, la mayor parte de los cuales estaban a frecuencias intermedias, como lo indica el valor promedio del número efectivo de alelos por locus $A_e=3,98$. Los promedios de la heterocigosidad observada y esperada fueron muy próximos: 0,59 y 0,62, respectivamente, por lo que el índice de fijación de Wright se acercó de cero ($F=0,04$), es decir, a las frecuencias esperadas para una población en panmixia. En general, para cada locus los valores del índice de fijación de Wright estuvieron cerca de cero salvo en siete SSR donde se registraron valores positivos y elevados ($\geq 0,30$), lo que indica la presencia de alelos nulos a frecuencias medias. Los alelos nulos fueron más habituales entre los marcadores procedentes de secuencias genómicas que de los ESTs con promedios de F de 0,11 y -0,04, respectivamente.

Otros autores estudiaron la variabilidad del almendro usando microsatélites genómicos y encontraron un promedio de alelos/locus variando desde 7,4 hasta 15,9 (Xu *et al.*, 2004; Sánchez-Pérez *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2006; Shiran *et al.*, 2007; Fathi *et al.*, 2008; Dangl *et al.*, 2009; Gouta *et al.*, 2010; Zeinalabedini *et al.*, 2010; Kadkhodaei *et al.*, 2011). El valor encontrado en nuestro estudio usando sólo los microsatélites

genómicos fue de 9,48 alelos por locus, un valor intermedio si lo comparamos con estos trabajos. En general, al aumentar el número de genotipos, se incrementa la probabilidad de detectar alelos que se encuentran a baja frecuencia, lo que se traduce en un aumento del número de alelos por locus. Los trabajos que detectaron más alelos/locus en almendro coinciden en usar un número relativamente pequeño de SSRs (6-16) y de haber sido publicados recientemente (Sánchez-Pérez *et al.*, 2006; Gouta *et al.*, 2010; Zeinalabedini *et al.*, 2010; Kadkhodaei *et al.*, 2011), esto indica que estos autores seleccionaron algunos SSRs especialmente variables en almendro a partir de resultados obtenidos en anteriores trabajos. Efectivamente, en el trabajo de Gouta *et al.* (2010) donde se registró el promedio de alelos por locus más alto (15,9), se usaron 10 microsatélites de los cuales nueve son los descritos en esta tesis (Mnejja *et al.*, 2004) y están entre los más polimórficos. Puesto que los SSRs que hemos usado en este trabajo no fueron previamente seleccionados por tener un elevado número de alelos, nuestro valor de $A=9,48$ puede considerarse comparativamente alto ya que utilizamos un número de SSRs genómicos polimórficos (25) igual al de Fathi *et al.* (2008), que encontraron un polimorfismo ligeramente inferior ($A=8,76$) usando casi el doble de cultivares (56). Por lo tanto, atribuimos el elevado polimorfismo encontrado en este estudio a que los SSRs derivados de almendro son más polimórficos en almendro que los desarrollados en otras especies de *Prunus* tal como ya observó Maghuly *et al.* (2005) en albaricoque o también hemos constatado en nuestro estudio de transferibilidad en *Prunus* (Mnejja *et al.*, 2010).

Los valores medios del parámetro PD y del número de genotipos fueron elevados: 0,74 y 11,11, respectivamente, lo que demuestra la alta capacidad de identificar variabilidad de estos marcadores. Un dato indicativo es que algo más de un tercio de los SSRs usados (16) pudieron identificar cada uno la mitad o más de las variedades estudiadas. El valor promedio del poder de discriminación también fue alto ($PD=0,84$) al estudiar el polimorfismo de los 31 microsatélites genómicos de almendro en ocho cultivares. Este valor de PD es aún más alto que el encontrado en el estudio

de variabilidad porque los ocho genotipos utilizados fueron elegidos por ser distantes filogenéticamente y por consiguiente fácilmente diferenciables.

Los microsatélites se distinguen por su elevada tasa de mutabilidad, lo que permite a veces detectar pequeñas diferencias entre algunos “sports” (Aranzana *et al.*, 2010). En nuestro estudio de variabilidad, sólo dos de nuestros microsatélites pudieron diferenciar entre dos variedades muy próximas genéticamente ‘Guara’ y ‘Tuono’. Esta gran similitud ya fue detectada en estudios anteriores (Sánchez-Pérez *et al.*, 2006; Kadkhodaei *et al.*, 2011). Esto sugiere que la variedad ‘Guara’ es un clon de ‘Tuono’ y que la variación observada (a nivel de fenotipo y genotipo) es de origen somático. Aunque estos variantes de SSRs podrían ser utilizados para la identificación de “sports”, sería necesario en primer lugar comprobar que las diferencias encontradas son estables en una amplia muestra de clones de los “sports” a comparar. La alta mutabilidad de los SSRs los hace poco adecuados para la identificación de “sports”, que podría hacerse de manera más adecuada con otro tipo de marcadores como los SNPs (Fernández i Martí *et al.*, 2012).

La agrupación de las variedades estudiadas en función de su distancia genética (dendrograma) o de la existencia de estructuras subpoblacionales fue bastante similar. Destaca en primer lugar la separación entre variedades de floración precoz y floración tardía, lo que indica que se habría favorecido de manera natural el cruzamiento entre individuos que tienen fechas de floración solapadas, diferenciándolos de los que presentan fechas de floración distintas. Un segundo nivel de diferenciación fue la procedencia geográfica de las variedades. Efectivamente, las variedades Estadounidenses formaron un grupo diferenciado tanto en el dendrograma como en la estructura poblacional lo que significa que, aún teniendo antecesores europeos, las variedades americanas fueron seleccionadas para adaptarse a las exigencias de su nuevo ambiente y mercado hasta formar un grupo diferenciado de las variedades mediterráneas. También las variedades de la región Italiana de Apulia se clasificaron en el mismo grupo tanto en el dendrograma como en la estructura poblacional. Finalmente, hay un grupo que corresponde esencialmente al programa de mejora del IRTA, y

otras variedades modernas de pedigrí conocido que se agruparon en general de manera congruente con su origen.

2.2. Variabilidad en ciruelo japonés

Los 27 microsatélites genómicos de ciruelo japonés se probaron inicialmente en un juego de ocho cultivares de la misma especie y detectaron un total de 54 alelos con un promedio de 5,7 alelos/locus. Los valores promedio de la heterocigosidad observada y esperada fueron altos y muy cercanos; 0,73 y 0,70 respectivamente. Cuando se usaron para el estudio de variabilidad de 38 genotipos de la misma especie, produjeron un total de 194 alelos, con un promedio de 7,19 alelos/locus. El ciruelo en general, y el ciruelo japonés en particular, han sido poco estudiados con SSRs. Ahmad *et al.* (2004) caracterizaron 14 cultivares de ciruelo japonés y seis pluots usando 28 microsatélites de cerezo y melocotonero, mientras que Hayashi *et al.* (2009) usaron 12 SSRs de melocotonero y albaricoquero para estudiar la diversidad genética en 22 cultivares de ciruelo. El promedio de alelos/locus que encontraron fue de 4,3 y 6,1, respectivamente, lo que considerando el número de variedades analizadas lo interpretamos como unos datos de polimorfismo inferiores a los que hemos obtenido. Ambos estudios coinciden en usar microsatélites no propios de la especie estudiada y por eso detectan menos polimorfismo; la misma conclusión a la que llegamos en el almendro. Nuestro estudio de transferibilidad confirma también esta observación, ya que al usar microsatélites de diferentes orígenes de *Prunus* (almendro, albaricoquero y melocotonero) en ocho cultivares de ciruelo japonés observamos un porcentaje de polimorfismo del 73,3% y un promedio de 4,5 alelos/locus, inferior (100% y 5,7) a los datos obtenidos usando SSRs de ciruelo japonés. Esto debería ser un elemento a tener en cuenta a la hora de escoger microsatélites cuando el polimorfismo es el criterio esencial de selección.

La heterocigosidad observada fue $H_o=0,67$ y la esperada $H_e=0,70$, por lo que el índice de fijación de Wright fue muy cercano a cero $F=0,06$, lo que demuestra que nuestros datos se parecen a los esperados en una población

en equilibrio Hardy-Weinberg. Los 27 microsatélites estudiados fueron capaces de diferenciar individualmente a todos los 38 genotipos de almendro, dando valores altos del poder de discriminación (22 de los 27 SSRs presentaron un $PD > 0,75$), con un promedio de $PD = 0,81$. Estos microsatélites identificaron de promedio a 13,04 genotipos de los 38 posibles. El número medio de microsatélites con diferente genotipo entre dos variedades fue alto, de 22,49 de un total de 27 microsatélites. Todos estos parámetros confirman la alta capacidad discriminatoria y de identificación de variabilidad que ofrecen los microsatélites de ciruelo japonés desarrollados.

Aunque se hayan podido diferenciar todos los cultivares estudiados, encontramos dos parejas que diferían tan sólo en dos o tres alelos: 'Friar' y 'Midnite Sun' y 'Golden Plum' y 'Golden Globe', respectivamente. Tal como en el caso de las dos variedades de almendro 'Guara' y 'Tuono', nuestros resultados apuntan a que cada pareja es en realidad la misma variedad o el resultado de una mutación somática ("sport") de la otra, aunque no encontramos en la bibliografía nada que confirmase o rechazase estas conclusiones.

Los genotipos de los SSRs nos permitieron en algunos casos confirmar los pedigrís conocidos de las variedades. Con ello tuvimos una estima de la verosimilitud de estos datos disponibles en la bibliografía. De los 10 casos que pudimos analizar (uno con datos de los dos parentales y nueve con los de solamente uno), confirmamos seis y rechazamos cuatro, indicando la necesidad de una revisión a fondo de esta información, lo que podría hacerse con suficiente precisión tras el análisis de un grupo de 10-15 SSRs de los usados en este estudio con una muestra más amplia de la variabilidad que incluyera también los parentales propuestos de muchas de estas variedades.

Usando los datos de los SSRs se realizaron estudios de agrupación basados en la distancia genética y análisis de la estructura poblacional con el programa Structure. Nuestros resultados estuvieron en sintonía con los de otros grupos usando diferentes tipos de marcadores, encontrando elevados niveles de similitud entre los mismos grupos de variedades. En general las variedades estudiadas, mayoritariamente de origen de EEUU, se agruparon

por los programas de los diferentes estados. Concretamente, detectamos un gran grupo de variedades californianas obtenidas por diversos programas de mejora públicos y privados. Una razón para esta diferenciación la podemos situar en la selección para adaptación a las particulares condiciones de California, aunque también es cierto que muchas de ellas proceden de cruzamientos entre un número reducido de parentales entre los que destacan 'Santa Rosa', 'Queen Ann' y varios de sus descendientes. Otro grupo incluye las variedades del Sur de los EEUU (Georgia, Alabama y Missouri), que presentan en general niveles de variabilidad superior al grupo californiano, tal como ya observaron antes Boonprakob *et al.* (2001). El análisis de la estructura subpoblacional detectó dos subpoblaciones, una constituida por el grupo de variedades de California ya separada en el dendrograma. La segunda reunió a diversos cultivares del Sur de EEUU con otras variedades de origen diverso, como las rusas ('Obilnaja' y 'Pabeida') o el pluot 'Flavorosa', todas ellas teniendo en común su origen próximo a partir de cruzamientos interespecíficos.

Aunque partiendo de un nivel de variabilidad muy elevado, ciruelo japonés y almendro representan dos historias muy diferentes desde su domesticación. En el almendro, la variabilidad de la especie original procedente de China se fue modelando por la selección a lo largo de muchas generaciones a través de la geografía asiática primero, mediterránea más adelante y, finalmente americana. El resultado es el mantenimiento de una gran variabilidad con la ayuda del sistema de autoincompatibilidad y una clara estructura subpoblacional basada en parte en la geografía y en parte en la coincidencia de épocas de floración. En cambio, el conjunto de variedades de ciruelo japonés que hemos analizado, que comprende esencialmente las variedades originadas en los programas norteamericanos, se inicia con el cruzamiento reciente (dentro del s. XX) entre varias especies (*P. salicina*, *P. simonii*, *P. cerasifera*, principalmente, y en menor medida algunos ciruelos de América del Norte) y en la selección de sus descendientes en unas condiciones ambientales distintas (Sur y Oeste de los EEUU) durante un corto número de generaciones. Esta historia conocida es corroborada por nuestros datos en los que se detecta una gran

variabilidad genética, suma de las diferentes especies componentes, y una débil estructuración subpoblacional que se concreta esencialmente en los grupos de procedencia de California y del Sur de los EEUU.

Otro elemento interesante a considerar es el aportado por el desequilibrio de ligamiento, que esperaríamos más conservado en el ciruelo japonés (han transcurrido muy pocas generaciones desde los cruzamientos iniciales que produjeron las variedades actuales), que en almendro (especie alógama con una larga historia de cruzamientos y selección desde su domesticación). Nuestros datos con los SSR estudiados son poco concluyentes en el sentido de que no muestran una clara diferencia entre las dos especies. Sin embargo, esto no es sorprendente dada el escaso número de marcadores y genotipos que hemos estudiado. Solamente una investigación en mayor profundidad, usando una densidad suficiente de marcadores podría esclarecer estas cuestiones. En melocotonero se ha desarrollado ya un chip de SNPs de alta densidad (Verde *et al.*, 2012), aunque aproximaciones del tipo GBS (genotyping by sequencing) (Elshire *et al.*, 2011) podrían ser más razonables, dado que la importancia relativamente menor de estas dos especies no justificaría a día de hoy el costo que supondría el desarrollo de chips de SNPs específicos para cada una de ellas.

3. Transferibilidad de los microsatélites

En nuestro estudio de la transferibilidad de los microsatélites de *Prunus* a diferentes especies de la familia de las rosáceas, usamos 145 pares de cebadores que amplificaban microsatélites originados en cuatro especies de *Prunus*. Estos pares de cebadores fueron ensayados en seis especies de *Prunus* y otras tres de rosáceas de otros géneros (manzano, peral y fresa). En total realizamos 1.160 combinaciones especie/SSR y generamos 9.280 datos. De estas combinaciones, 771 (67%) resultaron en la amplificación del ADN pero sólo en 534 casos (46%) detectaron polimorfismo en la especie estudiada. Esta diferencia del 31% corresponde a microsatélites

monomórficos, lo que pudo ocurrir por diversas causas, como el pequeño tamaño de la secuencia del microsatélite y la presencia de secuencias imperfectas o interrumpidas que desfavorecen la variabilidad (Smulders *et al.*, 1997; Peakall *et al.*, 1998; Dirlewanger *et al.*, 2002), o porque las especies testadas eran menos variables que la especie origen.

En general, la transferibilidad de los microsatélites es inversamente proporcional a la distancia genética entre la especie origen y especie ensayada (Peakall *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2005; Hendre *et al.*, 2008; Luro *et al.*, 2008). Eso supone que los microsatélites son más transferibles entre especies del mismo género o de géneros muy próximos que entre especies más distantes. Esto fue evidente al comparar nuestros resultados de transferibilidad entre especies de *Prunus*, donde observamos un promedio de amplificación cruzada del 83,6% y de polimorfismo del 63,9%, mientras que entre *Prunus* y otras especies de la familia *Rosaceae*, estos promedios fueron de 37,9% y 16,3%, respectivamente, denotando una drástica pérdida de transferibilidad. Entre las especies de *Prunus* también se confirma esta relación de transferibilidad y distancia genética. Las seis especies estudiadas de *Prunus* pertenecen a tres subgéneros: *Amygdalus* (almendro y melocotonero), *Prunophora* (albaricoquero, ciruelo japonés y ciruelo europeo) y *Cerasus* (cerezo). Las especies del mismo subgénero suelen ser intercompatibles, como también lo son algunas especies de *Amygdalus* con otras de *Prunophora* (Scorza y Sherman, 1996), lo que denota su cercanía genética, pero las especies de *Cerasus* no se pueden inter cruzar con los otros dos subgéneros (Watkins, 1995) y quedan más alejadas genéticamente. En efecto, las tasas más elevadas de transferibilidad fueron usando microsatélites y ADN del mismo subgénero o de *Prunophora* y *Amygdalus*. En el cerezo se obtuvieron tasas más bajas con microsatélites de los otros dos subgéneros (76,6% de promedio de amplificación y 40,7% de polimorfismo).

3.1. Comparación de la variabilidad entre especies de *Prunus*

Este trabajo nos permitió evaluar y comparar la variabilidad de las seis especies de *Prunus* económicamente más importantes, usando marcadores microsatélite de diferentes orígenes. Para poder hacer esta comparación era necesario disponer de un juego de marcadores codominantes, polimórficos y homólogos entre especies, lo cual solamente había podido hacerse con isoenzimas (Arulsekhar *et al.*, 1986; Byrne, 1990) anteriormente. Otros marcadores como los RAPDs o AFLPs ni son codominantes en general ni permiten asegurar la homología entre bandas de tamaño parecido. Con RFLPs hubiera sido posible pero no nos consta que se haya hecho. En cualquier caso, siendo los RFLPs marcadores mucho menos polimórficos que los SSR, la información obtenida por marcador hubiera sido bastante menor. Los SSRs parecían, por lo tanto, una excelente opción de poder examinar la variabilidad relativa y compararla con la obtenida con isoenzimas.

El almendro resultó ser la especie más variable al mostrar los valores más altos de polimorfismo ($P=74\%$), número de alelos/locus ($A=5,8$) y heterocigosidad observada ($H_o=0,62$), seguido de muy cerca por el ciruelo japonés, que mostró valores de variabilidad también elevados ($P=73\%$, $A=4,5$ y $H_o=0,62$). Estas dos especies de polinización cruzada, evolucionaron con un estricto sistema de autoincompatibilidad gametofítico, lo que favoreció su elevada variabilidad. Los estudios de variabilidad presentados en esta tesis, con un mayor número de cultivares y solamente con marcadores desarrollados en la misma especie confirman estos datos en almendro (47 SSRs en 30 cultivares) y en ciruelo japonés (27 SSRs en 38 cultivares), con promedios altos de número de alelos/locus (7,26 y 7,19) y de heterocigosidad observada (0,59 y 0,67), respectivamente.

En contraste, el melocotonero es la especie menos variable de los *Prunus* estudiados ($P=47\%$, $A=2,6$ y $H_o=0,41$) lo que se debe a su autofertilidad y autogamia (Miller *et al.*, 1989). Además, la variabilidad de las variedades europeas y norteamericanas se ha visto afectada por un cuello de botella ocurrido al inicio de los programas de mejora genética en EEUU,

que usaron un número reducido de fundadores (Hesse, 1975; Arulsekhar *et al.*, 1986), lo que erosionó adicionalmente su pool genético.

Para el cerezo, la existencia de genotipos autocompatibles, preferidos por ser más productivos, además de otros posibles cuellos de botella ocurridos en su historia de mejora (Tavaud, 2002), explican el nivel intermedio de variabilidad observado ($P=41\%$, $A=3,1$ y $H_o=0,51$). Una situación parecida ocurre en el albaricoquero, donde también encontramos genotipos autocompatibles y autoincompatibles. Esto hace que además de la polinización cruzada puede ser posible la autofecundación, lo que explica en parte su nivel intermedio de variabilidad ($P=67\%$, $A=3,2$ y $H_o=0,55$).

Cuando las especies estudiadas con isoenzimas por Byrne (1990) se ordenaron por el parámetro del polimorfismo (porcentaje de loci polimórficos) el almendro fue la especie más variable ($P=78\%$) seguida del ciruelo japonés ($P=67\%$), el albaricoquero ($P=58\%$) y finalmente el melocotonero ($P=8\%$). El cerezo no estaba incluido en este estudio, pero otros datos parecidos (Granger *et al.*, 1993) permitían situarle algo por debajo del albaricoquero ($P=56\%$). El orden de polimorfismo que encontramos con SSRs fue idéntico, aunque en este caso los valores fueron más elevados con SSRs, especialmente en las especies menos variables y, en general, en otros parámetros como el número de alelos por locus o la heterocigosidad observada. Esto se debe a que el nivel de polimorfismo de los SSRs es muy superior al de los isoenzimas. Estos resultados, por tanto, confirman y dan mayor consistencia a los datos ya disponibles sobre variabilidad relativa entre este grupo de cultivos.

3.2. Microsatélites genómicos y derivados de ESTs

En nuestro estudio de variabilidad del almendro, los microsatélites genómicos resultaron ser más variables que los derivados de ESTs, pero si diferenciamos estos últimos según el motivo que contienen, vemos que los dinucleotídicos, que están en zonas no codificantes, presentan una variabilidad parecida a la encontrada con los genómicos. Por el contrario, los

microsatélites derivados de ESTs con motivos trinucleotídicos sí que presentaron una baja variabilidad al compararlos con los genómicos puesto que están sometidos a selección cuando se encuentran en regiones codificantes. Así que al comparar datos de microsatélites derivados de ESTs, hay que tener en cuenta su localización en el EST.

En cuanto a la transferibilidad de los microsatélites derivados de ESTs en comparación con los genómicos, no encontramos diferencias significativas, aunque los de ESTs fueron algo más transferibles. En varias especies de plantas, los microsatélites derivados de ESTs fueron identificados como más transferibles que los genómicos (Cho *et al.*, 2000; Cordeiro *et al.*, 2001; Rahemy *et al.*, 2012), lo que es de esperar al haber secuencias de ADN más conservadas en las regiones transcritas (Varshney *et al.*, 2005). En nuestro estudio de transferibilidad no detectamos esta diferencia, lo que ocurre porque una buena parte de los microsatélites derivados de ESTs usados se encuentran en regiones no transcritas, por lo que se comportan como si fueran genómicos. En el estudio de transferibilidad, observamos que los microsatélites derivados de ESTs de almendro amplificaron mejor en el resto de las especies que los de melocotonero, aunque estos últimos eran más polimórficos. La explicación de estas diferencias es que la gran mayoría de los SSRs de melocotonero tenían motivos dinucleotídicos y se encontraban en zonas no codificantes, mientras que casi la mitad de los de almendro eran trinucleotídicos y se encontraban en regiones codificantes, por lo tanto el comportamiento de los de almendro se ajustaba mejor al esperable en SSRs derivados de EST mientras que los del melocotonero actuaban de una manera parecida a los genómicos.

4. Aplicaciones a la genética y mejora de frutales

Desde el desarrollo de los primeros marcadores microsatélite (Cipriani *et al.*, 1999) hasta ahora se han descrito y mapeado varios cientos de estos marcadores que han tenido una amplia utilización en genética y mejora del

melocotón y otras especies de *Prunus* (Arús *et al.*, 2012). Una de sus principales aplicaciones ha sido la de construir mapas fácilmente comparables entre poblaciones y especies con unos marcadores de alta calidad que además han representado una mejora en cuanto a costos, simplicidad de análisis, o ambas cosas, con respecto a los disponibles anteriormente. En esta tesis describimos el desarrollo de juegos de SSRs para almendro y ciruelo japonés que han sido ya usados por la comunidad científica. También analizamos la transferibilidad de 145 SSRs en el conjunto de especies de *Prunus*, produciendo una información adicional útil para la selección de SSRs a usar en función de cuál sea la especie de nuestro interés y el objetivo del análisis genético que quiera realizarse.

En base a los resultados de transferibilidad obtenidos, ha sido posible identificar un juego de 31 SSRs que amplifica y es polimórfico en las seis especies testadas. De ellos se han seleccionado 12 que además son altamente polimórficos y tienen una amplia cobertura del genoma, que consideramos adecuados como juego de referencia para la caracterización de germoplasma, particularmente cuando se trata de colecciones de *Prunus* de diferentes especies. Además estos marcadores pueden ser útiles para la identificación varietal en caso de acciones de protección de derechos de obtentor o control de la calidad (identidad) del material suministrado por parte de viveristas o comerciantes.

Los SSRs desarrollados han sido usados en la caracterización de la variabilidad de dos especies relativamente poco conocidas y sin embargo en alza dentro de los cultivos de *Prunus*, el almendro y el ciruelo japonés. La información obtenida ha permitido evaluar el efecto de determinados aspectos biológicos (autoincompatibilidad, época de floración, etc.) e históricos en la cantidad y organización de su variabilidad genética. Esta información es relevante para la comprensión de la genética de la especie, sus posibilidades de mejora y la selección de parentales para la creación de la variabilidad necesaria para la selección de variedades más productivas o con nuevos atributos.

El abaratamiento de las técnicas de secuenciación que ha ocurrido durante los últimos cuatro años está aumentando a gran velocidad nuestro

conocimiento sobre los genomas y su variabilidad. Uno de los resultados más espectaculares ha sido la reciente secuenciación de muchos genomas enteros, entre ellos los de dos especies del género *Prunus*, el melocotonero (Verde *et al.*, 2013) y *P. mume* (Zhang *et al.*, 2012), además de la resecuencia de diversas variedades cultivadas y accesiones silvestres de *P. persica* (Verde *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2014). Estos desarrollos han revolucionado la manera de realizar los estudios genéticos que ahora pueden hacerse con una profundidad impensable pocos años atrás.

Los SSRs han sido los marcadores predominantes en genética y mejora de frutales durante la primera década de este siglo. La secuencia de los genomas ha permitido conocer la posición física y características de la inmensa mayoría de los SSRs del genoma, información que se encuentra disponible en las bases de datos públicas (http://services.appliedgenomics.org/fgb2/iga/prunus_public/gbrowse/prunus_public/), por lo que es fácil desarrollarlos para cualquier región cromosómica. Al mismo tiempo, es posible identificar otros tipos de variantes de ADN, particularmente SNPs, con facilidad, lo que permite el desarrollo de chips para realizar análisis de variabilidad con cobertura del genoma entero (Verde *et al.*, 2012). Los SNPs son mucho menos polimórficos (típicamente bialélicos) que los SSRs, pero por su ubicuidad son imprescindibles para aproximaciones como la genética de asociación y particularmente útiles para la localización de marcadores diagnóstico (el alelo del marcador predice siempre el fenotipo para el carácter estudiado) para genes mayores, es decir, óptimos para la selección asistida por marcadores. Además los análisis de genotipos (parentales de un programa de mejora, por ejemplo) con una cobertura prácticamente continua del genoma son mucho más informativos que los basados en un número discreto de marcadores. En consecuencia, los SNPs (y otros marcadores derivados de secuencia) van tomando progresivamente un papel dominante en los estudios genéticos y su aplicación a los programas de mejora.

Los SSRs son unos marcadores de gran calidad, cuyo uso a pequeña escala sigue siendo competitivo desde el punto de vista de costes y sobre los que existe una información acumulada en muchas especies que los sigue

haciendo útiles para determinadas aplicaciones, como la construcción de mapas de baja/intermedia densidad y la selección de determinados genes para los que ya existen SSRs fuertemente asociados a los genes de interés, como es el caso en melocotón de los genes de acidez de la pulpa (Eduardo *et al.*, 2014) o de la forma del fruto (Picañol *et al.*, 2013). Es por tanto previsible que, para muchas aplicaciones, compartan uso con SNPs y otros marcadores durante los próximos años.

Referencias

- Ahmad, R., Potter, D., and Southwick, S.M., 2004a. Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 79:164-169.
- Aranzana, M.J., Abbassi, E.-K., Howad, W., and Arús, P., 2010. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. *BMC Genetics* 11:69.
- Aranzana, M.J., Garcia-Mas, J., Carbó, J., and Arús, P., 2002. Development and variability of microsatellite markers in peach. *Plant Breed.* 121:87-92.
- Arulsekar, S., Parfitt, D.E., and Kester, D.E., 1986. Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. *Journal of Heredity* 77:272-274.
- Arús, P., Verde, I., Sosinski, B., Zhebentyayeva, T., and Abbott, A., 2012. The peach genome. *Tree Genetics & Genomes* 8:531-547.
- Boonprakob, U., Byrne, D.H., Graham, C.J., Okie, W.R., Beckman, T., and Smith, B.R., 2001. Genetic Relationships among Cultivated Diploid Plums and Their Progenitors as Determined by RAPD Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:451-461.
- Byrne, D.H., 1990. Isozyme Variability in Four Diploid Stone Fruits Compared with Other Woody Perennial Plants. *Journal of Heredity* 81:68-71.
- Cao, K., Zheng, Z., Wang, L., Liu, X., Zhu, G., Fang, W., Chen, S., Zeng, P., Chen, C., Wang, X., Xie, M., Li, Y., Wang, X., Zhao, P., Zhong, X., Bian, C., Zhu, Y., Zhang, J., Ma, G., Chen, C., Li, Y., Huang, G., Liu, W., Fang, G., Yuan, H., Chen, W., Xu, X., and Wang, J., 2014. Comparative population genomics reveals the domestication history of the peach (*Prunus persica*) and human influences on perennial fruit crops. *Genome Biology* 15:415.
- Channuntapipat, C., Wirthensohn, M., Ramesh, S.A., Batlle, I., Arús, P., Sedgley, M., and Collins, G., 2003. Identification of incompatibility genotypes in almond (*Prunus dulcis* Mill.) using specific primers based on the introns of the S-alleles. *Plant Breeding* 122:164-168.
- Cho, Y.G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S.R., Park, W.D., Ayres, N., and Cartinhour, S., 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:713-722.
- Cordeiro, G.M., Casu, R., McIntyre, C.L., Manners, J.M., and Henry, R.J., 2001. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *erianthus* and *sorghum*. *Plant Science* 160:1115 - 1123.
- Dangl, G.S., Yang, J., Golino, D.A., and Gradziel, T., 2009. A practical method for almond cultivar identification and parental analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica* 168:41-48.
- Dirlwanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, J., Poizat, C., Zanetto, A., Arus, P., and Laigret, F., 2002a. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor Appl Genet* 105:127-138.
- Eduardo, I., López-Girona, E., Batlle, I., Reig, G., Iglesias, I., Howad, W., Arús, P., and Aranzana, M.J., 2014. Development of diagnostic markers for selection of the subacid trait in peach. *Tree Genetics & Genomes*:1-15.
- Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., and Mitchell, S.E., 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *Plos One* 6:e19379.
- Fathi, A., Ghareyazi, B., Haghazari, A., Ghaffari, M.R., Pirseyedi, S.M., Kadkhodaei, S., Naghavi, M.R., and Mardi, M., 2008. Assessment of the genetic diversity of almond (*Prunus dulcis*) using microsatellite markers and morphological traits. *Iranian Journal of Biotechnology* 6:98-106, 130.
- Fernández i Martí, A., Howad, W., Tao, R., Alonso Segura, J., Arús, P., and Socias i Company, R., 2011. Identification of quantitative trait loci associated with self-compatibility in a *Prunus* species. *Tree Genetics & Genomes* 7:629-639.
- Gouta, H., Ksia, E., Buhner, T., Moreno, M.A., Zarrouk, M., Mliki, A., and Gogorcena, Y., 2010. Assessment of genetic diversity and relatedness among Tunisian almond germplasm using SSR markers. *Hereditas* 147:283-292.

- Granger, A.R., Clarke, G.R., and Jackson, J.F., 1993. Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics* 86:458-464.
- Hayashi, K., Shimazu, K., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Nishitani, C., and Yamamoto, T., 2009. Genetic diversity of mume, apricot and japanese plum cultivars assessed by SSR markers *Acta Hort. (ISHS)* 814:629-634.
- Hendre, P., Phanindranath, R., Annapurna, V., Lalremruata, A., and Aggarwal, R., 2008. Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies. *BMC Plant Biology* 8:51.
- Hesse, C., 1975. Peaches, p. 285–335. In: Janick, J. and Moore, J. (eds.), *Advances in fruit breeding*, Purdue University Press, West Lafayette.
- Kadkhodaei, S., Shahnazari, M., Nekouei, M.K., Ghasemi, M., Etmiani, H., Imani, A., and Ariff, A.B., 2011. A comparative study of morphological and molecular diversity analysis among cultivated almonds (*Prunus dulcis*). *Australian Journal of Crop Science* 5:82-91.
- Luro, F., Costantino, G., Terol, J., Argout, X., Allario, T., Wincker, P., Talon, M., Ollitrault, P., and Morillon, R., 2008. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics* 9:287.
- Maghuly, F., Fernandez, E.B., Ruthner, S., Pedryc, A., and Laimer, M., 2005. Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographic origin and breeding history. *Tree Genetics & Genomes* 1:151-165.
- Miller, P.J., Parfitt, D.E., and Weinbaum, S.A., 1989. Outcrossing in peach. *HortScience* 24 (2):359-360.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Audergon, J.-M., and Arús, P., 2010. *Prunus* microsatellite marker transferability across rosaceous crops. *Tree Genetics & Genomes* 6:689-700.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., Badenes, M.L., and 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* 4:163-166.
- Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M., and Rafalski, A., 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol Biol Evol* 15:1275-1287.
- Picañol, R., Eduardo, I., Aranzana, M.J., Howad, W., Batlle, I., Iglesias, I., Alonso, J.M., and Arús, P., 2013. Combining linkage and association mapping to search for markers linked to the flat fruit character in peach. *Euphytica* 190:279-288.
- Rahemi, A., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., Gradziel, T., Folta, K., and Chaparro, J., 2012. Genetic diversity of some wild almonds and related *Prunus* species revealed by SSR and EST-SSR molecular markers. *Plant Systematics and Evolution* 298:173-192.
- Sánchez-Pérez, R., Ballester, J., Dicenta, F., Arus, P., and Martínez-Gómez, P., 2006a. Comparison of SSR polymorphisms using automated capillary sequencers, and polyacrylamide and agarose gel electrophoresis: Implications for the assessment of genetic diversity and relatedness in almond. *Scientia Horticulturae* 108:310-316.
- Scorza, R. and Sherman, W.B., 1996. Peaches, p. 325-440. In: Janick, J. and Moore, J. N. (eds.), *Fruit breeding: tree and tropic fruits*. Wiley, New York.
- Shiran, B., Amirbakhtiar, N., Kiani, S., Mohammadi, S., Sayed-Tabatabaei, B.E., and Moradi, H., 2007. Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 111:280-292.
- Smulders, M.J.M., Bredemeijer, G., Rus-Kortekaas, W., Arens, P., and Vosman, B., 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theoretical and Applied Genetics* 94:264-272.
- Squirrell, J., Hollingsworth, P.M., Woodhead, M., Russell, J., Lowe, A.J., Gibby, M., and Powell, W., 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology* 12:1339-1348.
- Tavaud, M., Zanetto, A., Valancogne, P., and Dirlwanger, E., 2002. Genetic diversity in wild and cultivated French cherry trees (*Prunus avium* L.) revealed by AFLP and microsatellite markers. Broad variation and precise characterization - limitation for the

- future. Proceedings of the XVIth EUCARPIA Genetic Resources Section workshop, Poznan, Poland, 16-20 May 2001:285-287.
- Varshney, R.K., Graner, A., and Sorrells, M.E., 2005. Genetic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* 23:1.
- Verde, I., Abbott, A.G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., Marroni, F., Zhebentyayeva, T., Dettori, M.T., Grimwood, J., Cattonaro, F., Zuccolo, A., Rossini, L., Jenkins, J., Vendramin, E., Meisel, L.A., Decroocq, V., Sosinski, B., Prochnik, S., Mitros, T., Policriti, A., Cipriani, G., Dondini, L., Ficklin, S., Goodstein, D.M., Xuan, P., Fabbro, C.D., Aramini, V., Copetti, D., Gonzalez, S., Horner, D.S., Falchi, R., Lucas, S., Mica, E., Maldonado, J., Lazzari, B., Bielenberg, D., Pirona, R., Miculan, M., Barakat, A., Testolin, R., Stella, A., Tartarini, S., Tonutti, P., Arus, P., Orellana, A., Wells, C., Main, D., Vizzotto, G., Silva, H., Salamini, F., Schmutz, J., Morgante, M., and Rokhsar, D.S., 2013. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat Genet* 45:487-494.
- Verde, I., Bassil, N., Scalabrin, S., Gilmore, B., Lawley, C.T., Gasic, K., Micheletti, D., Rosyara, U.R., Cattonaro, F., Vendramin, E., Main, D., Aramini, V., Blas, A.L., Mockler, T.C., Bryant, D.W., Wilhelm, L., Troggio, M., Sosinski, B., Jose Aranzana, M., Arus, P., Iezzoni, A., Morgante, M., and 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.
- Watkins, R., 1995. Cherry, plum, peach, apricot and almond. In: Smartt, J. and Simmonds, N. W. (eds.), *Evolution of crop plants*. Longman Scientific and Technical, Burnt Mil.
- Xie, H., Sui, Y., Chang, F.Q., Xu, Y., and Ma, R.C., 2006. SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* 112:366-372.
- Xu, Y., Ma, R.C., Xie, H., Liu, J.T., and Cao, M.Q., 2004. Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. *Genome* 47:1091-1104.
- Zeinalabedini, M., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Gradziel, T.M., and Martínez-Gómez, P., 2010. The origin and dissemination of the cultivated almond as determined by nuclear and chloroplast SSR marker analysis. *Scientia Horticulturae* 125:593-601.
- Zhang, Q., Chen, W., Sun, L., Zhao, F., Huang, B., Yang, W., Tao, Y., Wang, J., Yuan, Z., Fan, G., Xing, Z., Han, C., Pan, H., Zhong, X., Shi, W., Liang, X., Du, D., Sun, F., Xu, Z., Hao, R., Lv, T., Lv, Y., Zheng, Z., Sun, M., Luo, L., Cai, M., Gao, Y., Wang, J., Yin, Y., Xu, X., Cheng, T., and Wang, J., 2012. The genome of *Prunus mume*. *Nat Commun* 3:1318.

Conclusiones

1- Se desarrollaron 47 microsatélites de genotecas genómicas enriquecidas por secuencias CT/AG de almendro y 38 de ciruelo japonés, de los cuales 31 y 27, respectivamente, fueron polimórficos, amplificando un único locus en sus respectivas especies. Estos microsatélites detectaron un elevado número de alelos y mostraron una elevada capacidad de diferenciación varietal.

2- Se desarrollaron también 25 microsatélites de melocotonero y otros 22 de almendro a partir de las secuencias ESTs disponibles en las bases de datos.

3- Se estudió la transferibilidad de 145 microsatélites de *Prunus*, todos produciendo un único locus polimórfico en la especie origen, en nueve especies de Rosáceas (seis *Prunus*, una *Pyrus*, una *Malus* y otra *Fragaria*). Estos SSRs mostraron una alta transferibilidad dentro del mismo género *Prunus*, con un promedio de amplificación del 83,6% y de polimorfismo del 63,9%. Esta transferibilidad cayó drásticamente al probar estos SSRs en las tres especies diferentes de *Prunus*, registrando unos promedios del 37,9% y del 16,3% de amplificación y polimorfismo, respectivamente.

4- Los mayores valores de transferibilidad en *Prunus* fueron encontrados cuando los SSRs y el material a estudiar fueron del mismo subgénero o de los dos subgéneros más próximos (*Prunophora* y *Amygdalus*), con un promedio de amplificación del 85% y un promedio de polimorfismo del 69,7%. Estos valores fueron claramente más bajos en la única especie del subgénero *Cerasus* (cerezo), con un 76,6% de amplificación y 40,7% de transferibilidad. En conjunto, nuestros resultados confirman que el grado de transferibilidad es inversamente proporcional a la distancia genética entre la especie origen del SSR y la especie objeto del estudio.

5- Almendro y ciruelo japonés resultaron ser las especies más variables de las cinco de *Prunus* estudiadas, seguidas de muy cerca por el albaricoquero.

El cerezo fue relativamente poco variable y el melocotonero la especie menos variable de las estudiadas del género *Prunus*. Estas diferencias radican esencialmente en los sistemas de reproducción de cada especie y en su historia después de la domesticación.

6- Un total de 31 SSRs fueron polimórficos en las seis especies de *Prunus* ensayadas, de los cuales propusimos un juego de 12 marcadores, altamente polimórficos en todas las especies y que detectan un único locus polimórfico en cada una de ellas, cubriendo los ocho cromosomas del genoma *Prunus*. Este juego de marcadores puede ser útil para la caracterización de germoplasma de este género y para estudios de variabilidad comparativa.

7- Aunque no encontramos diferencias destacables en la transferibilidad de microsatélites de diferentes orígenes (genómicos o de ESTs), nuestros datos indicaron que los microsatélites de ESTs que no están en zonas transcritas se comportaron como los genómicos, pero aquellos que sí lo están resultaron más transferibles pero menos polimórficos que los genómicos.

8.- La comparación de nuestros resultados en almendro y ciruelo japonés, en los que hemos usado SSRs obtenidos en la misma especie, con los de otros autores usando marcadores SSR procedentes de otros *Prunus* sugieren que los marcadores desarrollados en la misma especie son en general más polimórficos que los obtenidos en otras especies próximas.

9- La agrupación de variedades basada en la distancia genética, y la detectada en el estudio de la estructura poblacional, tanto del almendro como del ciruelo japonés, fueron en general concordantes, dividiendo los 38 cultivares de ciruelo japonés en dos grupos mayoritarios y las 30 variedades de almendro en cinco (estructura poblacional) o seis grupos (dendrograma).

10- Las variedades de almendro presentaron una fuerte estructura poblacional y se agruparon según la época de floración y su situación geográfica, contrariamente a las variedades de ciruelo japonés que tuvieron

una débil estructura poblacional, asociada principalmente al origen de los programas de mejora de donde procedían las variedades.

11- Los marcadores usados permitieron la identificación individual de cada una de las variedades estudiadas. En algunos grupos de variedades que diferían por muy pocos SSRs pudimos concluir que algunas variedades proceden muy probablemente de la mutación somática de otras, como el ejemplo de 'Guara' y 'Tuono' en almendro, o 'Friar' y 'Midnite Sun' y 'Golden Plum' y 'Golden Globe' en ciruelo japonés. También pudimos confirmar seis pedigrís de los nueve descritos en la bibliografía de las variedades estudiadas de ciruelo japonés.