

DOI:10.18684/BSAA(14)69-77

ANÁLISIS INTERESPECÍFICO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Pyrus* spp. y *Malus* spp.

INTERSPECIFIC ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN *Pyrus* spp. and *Malus* spp.

ANÁLISE INTERESPECÍFICA DA DIVERSIDADE GENÉTICA NA *Pyrus* spp. e *Pyrus* spp.

ANA CRUZ MORILLO-CORONADO¹, YACENIA MORILLO-CORONADO²,
LEONARDO ARIEL GONZÁLEZ-MENDOZA³, IVÁN ADIEL ÁVILA MORALES⁴

RESUMEN

*Boyacá es uno de los departamentos de Colombia pionero en la producción nacional de caducifolios, especialmente duraznos, ciruelos, peras y manzanas. Con ocho cebadores Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs) se evaluaron once materiales de manzana (*Malus communis*), siete de peras (*Pyrus communis*), dos de albaricoque (*Prunus armeniaca* L.) y uno de almendro (*Prunus amygdalus* L.), que hacen parte de la colección de caducifolios que tiene la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Se generaron un total de 128 bandas con pesos moleculares entre 250 y 1300 Kb. A un nivel de similitud de 0,55 se formaron dos grandes grupos y subgrupos de acuerdo principalmente a la especie a la cual pertenece y a las características del fruto. El número de loci polimórficos varió entre 96 y 123 para los cebadores ACA y CGA, respectivamente. El valor promedio de heterocigosidad fue de 0,34, más bajo que los encontrados en estudios de diversidad genética en el género *Malus* y *Pyrus*. Los índices de similitud y las distancias genéticas corroboran la sintenia que existe entre estos genomas la cual puede*

Recibido para evaluación: 24 de Febrero de 2015. **Aprobado para publicación:** 24 de Diciembre de 2015.

- 1 Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Grupo de investigación CIDE. PhD. Fitomejoramiento. Tunja, Colombia.
- 2 Universidad de los Llanos, Grupo de investigación Biotecnología. PhD. Fitomejoramiento. Villavicencio, Colombia,
- 3 Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Grupo de investigación Ecofisiología Vegetal. Estudiante de Maestría en Fisiología Vegetal. Tunja, Colombia.
- 4 Universidad de Santander, Grupo de investigación en Biotecnología. Estudiante de Maestría en Gestión Pública y Gobierno. Bucaramanga, Santander.

Correspondencia: ana.morillo@uptc.edu.co

ser aprovechada para la identificación de genes, mapeo comparativo e hibridación interespecífica.

ABSTRACT

Boyacá is one of the departments of Colombia pioneer in the national production of deciduous, especially peaches, plums, pears and apples. Eight Random Amplified Microsatellite primers (RAMs) were evaluated in eleven apple (*Malus communis*), seven pears (*Pyrus communis*), two apricots (*Prunus armeniaca* L.) and one almond (*Prunus amygdalus* L.) materials from deciduous collection of the Pedagogical and Technological University of Colombia. A total of 128 bands were generated with molecular weights ranging between 250 and 1300 Kb. Two groups and subgroups were formed, a similarity coefficient of 0,55, according to specie and fruit characteristics. The number of polymorphic loci ranged between 96 and 123 for CGA and ACA primers, respectively. The average value of heterozygosity was 0,34, much lower than values found in other genetic diversity studies in the genus *Malus* and *Pyrus*. Similarity index and genetic distances corroborate the synteny between these genomes which can be taken advantage for identifying of genes, comparative mapping and interspecific hybridization.

RESUMO

Boyacá é um dos departamentos da Colômbia pioneiro na produção nacional de folha caduca, especialmente pêssegos, ameixas, peras e maçãs. Foram avaliados oito primers Random Amplified microssatélites (RAMs) materiais onze macieira (*Malus communis*), sete pêra (*Pyrus communis*), dois de damasco (*Prunus armeniaca* L.) e um amêndoa (*Prunus amygdalus* L.), que fazem parte do conjunto de sites de folha caduca que tem a Universidade Pedagógica e Tecnológica da Colômbia. Um total de 128 bandas com pesos moleculares 250-1300 Kb foram gerados. Em um nível de similaridade de 0,55 dois grupos e subgrupos de acordo principalmente com a espécie a que pertence e características dos frutos foram formados. O número de loci polimórficos variou entre 96 e 123 para o ACA e iniciadores CGA, respectivamente. O valor médio dos heterozygosity foi de 0,34, inferior aos encontrados em estudos de diversidade genética do gênero *Malus* e *Pyrus*. Índices de similaridade e distâncias genéticas corroboram sintenia entre esses genomas que podem ser exploradas para a identificação de genes, mapeamento comparativo e interespecífica hibridação.

INTRODUCCIÓN

La familia Rosaceae contiene más de 3000 especies, muchas de ellas árboles frutales de importancia económica tales como la manzana, pera, albaricoque, cereza, durazno y ciruelo. Las peras son uno de los principales frutos pepita más cultivados en las regiones templadas. Las peras chinas (*Pyrus pyrifolia* Nakai) y las peras Europeas (*Pyrus communis* L.) son las dos especies de peras más comerciales en todo el mundo [1]. Las principales regiones productoras son, Asia (77,9%), Europa (11%) y Amé-

PALABRAS CLAVES:

Diversidad genética, Microsatélites RAMs, Caducifolios

KEYWORDS:

Genetic Diversity, Microsatellites RAMs, Deciduous.

PALAVRAS-CHAVE:

Diversidade genética, Microssatélites RAMs, Decídua.

rica (7,5%) [2]. La manzana es una de las especies de fruta dulce de mayor difusión a escala mundial debido a su facilidad de adaptación a diferentes climas y suelos, su valor alimenticio, nutricional, terapéutico, calidad y diversidad de productos que se obtienen en su industria transformadora. En cuanto a su distribución geográfica, Asia es el continente que más toneladas produce, (64,2%), siendo China el país más productor. La segunda área geográfica más productiva es Europa, con 19,6%, seguido por América (12,1%), África (3,1%) y Oceanía (1%) [2].

Colombia es un país megadiverso con enorme potencial para aumentar la producción de frutas y el área con frutales, debido a su gran oferta edafoclimática [3]. Boyacá es uno de los departamentos pioneros en la producción nacional de caducifolios, especialmente los municipios de Nuevo Colón (100%) y Jenesano (81,2%), en donde se han encontrado las mayores producciones de peras y manzanas respectivamente [3]. Dada la vocación frutícola del departamento de Boyacá, la facultad de agronomía de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) y la Universidad Técnica de Berlín desarrolló en la Granja Experimental de Tinguavita, Paipa, un proyecto para el establecimiento de una colección de materiales caducifolios importados de diferentes pisos térmicos. En el 2008 Puentes y colaboradores [4], realizaron un estudio de caducifolios, teniendo en cuenta sus ventajas comerciales y hallaron que estos son una alternativa económicamente rentable para el departamento de Boyacá.

La mayoría de las especies frutales son perennes, con un ciclo vegetativo largo, lo cual es un obstáculo para lograr progresos rápidos en el mejoramiento convencional, además los caracteres fenotípicos son de fácil observación, están muy influenciados por el ambiente [5]. Por lo cual, la identificación molecular usando marcadores de ADN se ha convertido en la principal herramienta para la caracterización de colecciones de germoplasma.

Los marcadores moleculares más utilizados para la caracterización de colecciones de germoplasma son los de Secuencia Simple Repetida (SSR) o microsatélites en el género *Pyrus* y *Malus* se han usado en la identificación de cultivares [6], estudios de autoincompatibilidad [7] mapeo genético [8], identificación de QTLs [9], análisis de secuencias [10] y en la selección asistida por marcadores [11]. Una de las ventajas de los marcadores SSRs es su capacidad de transfe-

ribilidad entre las principales especies frutales de la familia Rosaceae [12].

Los estudios de mapeo comparativo suponen que hay un grado de conservación genómica entre las especies lo cual permite la transferencia de información genética, tales como la posición de genes (QTLs). Prácticamente el mapeo comparativo determina el ligamiento entre genes homólogos de taxas relacionadas por alineamiento de los mapas genómicos usando marcadores moleculares ortólogos [13]. En *Malus* y *Pyrus* su número cromosómico idéntico ($2n=2x=34$) y su tamaño de genoma similar (manzana 1,57 pg/2C [14]; pera 1,11 pg/2C [15]) sugieren que sus genomas pueden ser co-lineales y con relaciones genéticas estrechas entre los dos [13].

Entre los marcadores microsatélites los RAMs son muy útiles para medir la diversidad genética en plantas y animales e identificar relaciones entre familias, especies y al interior de la especie, además es una metodología factible para pequeños laboratorios, no requiere información previa [16]. Trabajos sobre la diversidad genética en especies frutales caducifolias [17] sugieren que la técnica es útil para identificar duplicados y establecer relaciones entre las especies. Dentro de este contexto, esta investigación tuvo como objetivo caracterizar la diversidad genética con RAMs presente en la colección de manzanas y peras de la UPTC, como una aproximación al planteamiento de estrategias que conduzcan al mejoramiento genético de estas especies.

MÉTODO

Se evaluaron once materiales de manzana (*Malus communis*), siete de peras (*Pyrus communis*), dos de albaricoque (*Prunus armenica*) y uno de almendro (*Prunus dulcis*), que hacen parte de la colección in situ de caducifolios que tiene la UPTC en la Granja Experimental de Tinguavita en Paipa, ubicada a 36 KM de la ciudad de Tunja con una latitud norte de 5° 47' 04" y longitud oeste de 73° 07' 04", temperatura promedio de 15 °C (Cuadro 1).

Caracterización molecular

La caracterización molecular se realizó en los laboratorios de investigación en Biología Molecular de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Dellaporta *et al.*, 1983, este se visualizó

Cuadro 1. Materiales utilizados para la caracterización molecular con Microsatélites RAMs.

Materiales de Manzana	Materiales de Pera
Anna	Triunfo
Belgolden	Mantequilla
Mutzu	Membrillo
Salamina	Kiffer
Grany Smith	Lecontee
Gala	Smith
M-106	New Colon
Dorsett Golden	Otros materiales
Fuji	Albaricoque Bulida
Primicia	Albaricoque Canina
MM-111	Almendro

en geles de agarosa al 0,8% en una cámara Maxicell Primo EC-340 Electroforesis Gel System. La determinación de su concentración se hizo en el fluorómetro Hoefer Dyna Quant 200 y se diluyó en agua HPLC a un volumen total de 100 μ L a 10 ng/ μ L y se almacenó a -20°C. Para el análisis RAMs se utilizaron ocho cebadores sintetizados por Technologies Inc. Bioneer (Cuadro 2).

Cuadro 2. Primers utilizados en la técnica Microsatélites RAMS.

Cebadores	Secuencia (5' a 3')
CCA	DDB(CCA)5
CGA	DHB(CGA)5
ACA	BDB(ACA)5
GT	VHV(GT)5G
AG	HBH(AG)7A
CT	DYD(CT)7C
TG	HVH(TG)7T
CA	DBDA(CA)7

Las siguientes designaciones son usadas para los sitios degenerados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); V (G ó A ó C) y D (G ó A ó T).

Para la amplificación se preparó el cóctel en un tubo estéril de microcentrifuga (1,5 mL) para un volumen final de 25 μ L. La mezcla de reacción se preparó con buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq Polimerasa 1U, cebador 2 μ M y ADN genómico 10 ng.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller de MJ Research, Inc. La desnaturalización inicial fue de 95°C

durante 5 minutos; 37 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, Hibridación: 58°C (Primer GT, CGA), 50°C (Primer AG, CA, ACA), y 55°C (Primer CCA, TG, CT) durante 45 segundos. Con una extensión de 72°C por 2 minutos y la extensión final a 72°C durante 7 minutos. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 1,5% a 90 voltios durante 3 horas visualizándose en un transiluminador.

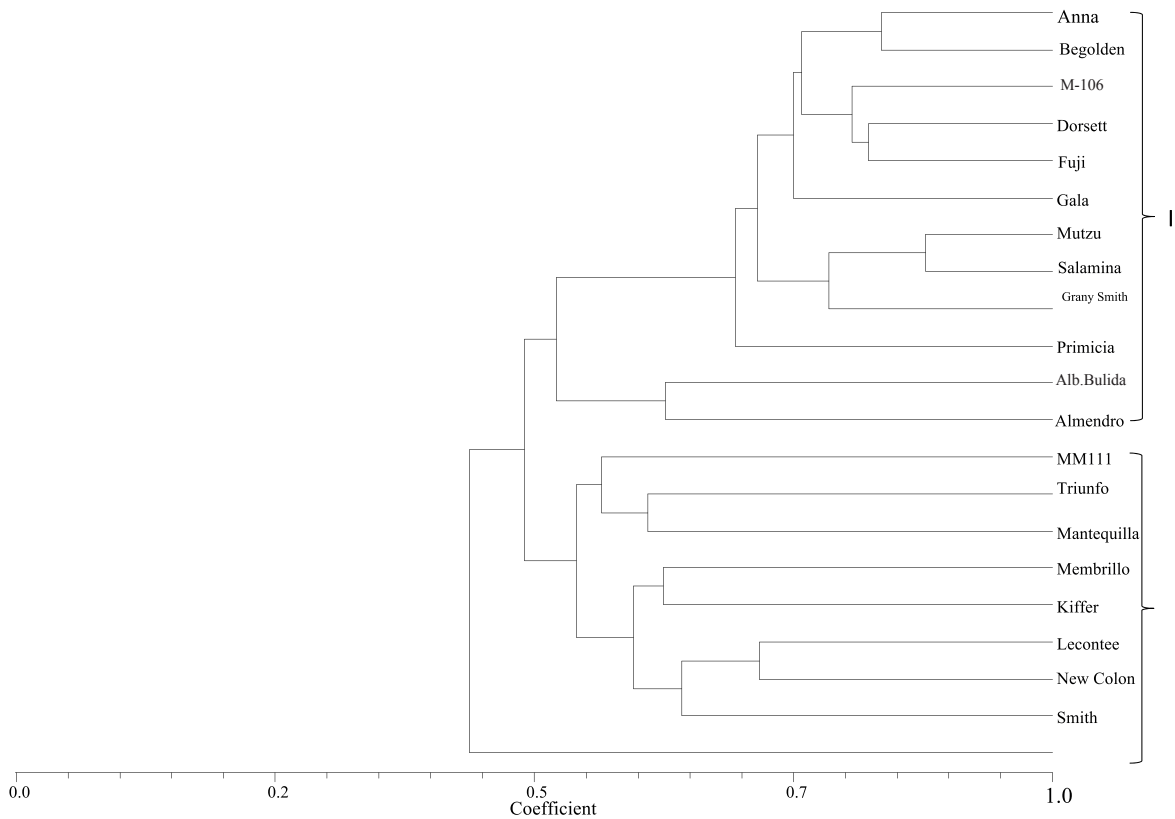
Análisis estadístico de datos

Se generó una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0). La similitud genética entre los materiales evaluados se calculó con el coeficiente de Nei y Li [18]. El análisis de agrupamiento se realizó por el método UPGMA y se generó un dendrograma empleando el paquete estadístico NTSYS (Numerical Taxonomy System for personal Computer, versión 2.02 PC). Los parámetros de diversidad genética que se estimaron con el programa TFPGA (Tools For Population Genetic Analysis, versión 1.3, 1997) fueron el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosidad insesgada. Se determinó el valor de "F" estadístico insesgado con un intervalo de confianza de 95%. El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) se hizo con programa GenAlEx 6.41.

RESULTADOS

El análisis mediante el coeficiente de Nei-Li a un nivel de similitud de 0,55 diferenció a los materiales en dos grandes grupos (Figura 1). En el Grupo I a una similitud de 0,75 se encuentran variedades importantes de manzana como Anna, de piel roja, textura mediana con una producción precoz y prolífica. La manzana Dorsett Golden, de piel amarilla con tonos rojizos y buen contenido de pruina. Aunque se establece principalmente como polinizante de la manzana Anna, sus frutos se comercializan fácilmente, los que tienen un sabor agridulce [19]. La Fuji, originaria del Japón, es una manzana dulce, de textura firme y muy sabrosa. El MM 106, originario de la estación de East Malling de Inglaterra, es el patrón que se viene utilizando en los últimos años. Tiene como características especiales raíces poco profundas pero bien desarrolladas, transmite un vigor medio a las plantas, resistente al pulgón lanigero *Eriosoma lanigerum*, pero es muy susceptible al hongo *Phytophthora cactorum*, como consecuencia de los encharcamientos [19].

Figura 1. Dendrograma de los materiales de *Pyrus*, *Malus* y *Prunus* (coeficiente de similitud de Nei-Li).



Al 0,70 de similitud se encontró a las variedades de manzana Mutsu, Salamina y Grany Smith y un poco más alejada a Primicia. Salamina se caracteriza por tener una piel rosada a roja, tamaño mediano y de producción regular. La Mutsu de textura firme, de madurez muy tardía, se puede almacenar hasta cuatro meses, requiere de 600 horas frío. La Grany Smith, Golden Delicious y Red Delicious, hacen parte de las manzanas que se han venido importando al país. La Grany Smith es originaria de Nueva Zelanda; con un fruto de textura firme, agría con una madurez tardía [19]. A un nivel de similitud de 0,60 se encuentran los materiales albaricoque (*Prunus armenica*), su importancia económica reside en sus frutos con más de 100 especies cultivadas, dentro de las variedades más importantes se encuentra Bulida, de origen español, adaptado a diferentes tipos de suelos y alto contenido de jugo; la otra variedad es Canina, con frutos de alta calidad y buena comercialización [20] siendo la de menor similitud con el resto de los materiales evaluados.

El almendro es una especie rústica, de climas templados, floración temprana con alta afinidad con el

albaricoque [21] como se puede ver en el dendrograma. En el grupo a un nivel de similitud de 0,65 encontramos los materiales de pera conocidos como Mantequilla y Triunfo de Viena. Esta última hace parte de las comerciales existentes en el país, que son de origen asiático y no tienen ningún tipo de clasificación [19]. Se caracteriza por ser de piel color café claro con fondo amarillo, sin pruina, de tamaño grande con un peso promedio de 359 g. Dentro de este grupo a 0,50, encontramos al patrón MM111, considerado un portainjerto moderadamente vigoroso, presenta resistencia a pulgón lanífero y a pudrición de cuello, y se adapta bien a suelos pesados, con problemas de drenaje [22]. El membrillo y la variedad Kiffer presentaron una similitud de 0,60. El membrillo (*Cydonia oblonga* Pers.) se utilizan básicamente como portainjerto de perales, induciendo menor vigor, mayor precosidad y prolificidad, no es compatible con todas las variedades de peral, se utiliza mucho en las variedades BA 29, Quince A y Adams [23]. La pera Kieffer es un híbrido entre *Pyrus communis* y *P. pyrifolia*. Es extremadamente rústico y produce frutos verde-amarillentos y gordos, prospera en las zonas de

rusticas, se autopoliniza, crece entre 3 a 4,5 m [24]. En general, se puede observar las diferentes relaciones genéticas que existen dentro de los materiales de la misma especie como de especies diferentes. El índice de Nei-Li y el agrupamiento UPGMA, dio como resultado en total cuatro grupos asociados de acuerdo con la especie a la cual pertenecen y dentro de ellos por las características del fruto. El índice de similitud es alto y muestra el grado de homogeneidad que existe entre los materiales de pera y manzana, lo cual puede ser corroborado por los valores de distancias genéticas (0,70 a 0,88).

Los ocho cebadores RAMs utilizados para la caracterización molecular de los materiales de manzana, pera, albaricoque y almendro, generaron una matriz de 1280 entradas y se obtuvieron 128 bandas, de las cuales se seleccionaron 124 las cuales reflejaron el 97% de polimorfismo. El número de bandas por cebador varió de 11 para el AG y 25 para el CGA, con pesos moleculares entre 250 y 1300 Kb. El número de bandas se considera adecuado para estimar parámetros genéticos al compararlos con los resultados obtenidos en otros trabajos de diversidad genética en donde se han utilizado estos marcadores mandarina (106 bandas [25], cacao (127 bandas, [26]), durazno (121 bandas, [17]) entre otros.

El porcentaje de loci polimórficos para los ocho cebadores estuvieron en un rango comprendido entre 75% (ACA) al 96% (CGA), con una heterocigosidad promedio esperada de 0,29 a 0,40 para los cebadores TG y CGA, respectivamente. El cebador CCA fue el que mayor aporte hizo a la variación encontrada, F_{st} de 0,46 (Cuadro 1), lo cual significa que puede ser útil para la diferenciación de materiales de género *Pyrus* y *Malus*.

Para la población total el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosidad promedio esperada (H_e) fueron de 88% y 0,34 respectivamente. El coeficiente de diferenciación genética obtenido (F_{st}) obtenido al evaluar los materiales de pera, manzana, albaricoque y almendro, con los ocho microsatélites RAMs fue de 0,37 con una desviación estándar de 0,04 (Cuadro 1). Según Wright (1978) [27] valores mayores de 0,25 muestran una gran diferenciación genética, la cual está asociada con el nivel de estructuración de la población que tiende a estabilizarse.

En trabajos de caracterización de la diversidad genética en *Pyrus* spp, con microsatélites codominantes, se han obtenido altos porcentajes de loci polimórficos

y altos valores de heterocigosidad asociados posiblemente a la naturaleza misma de los materiales, ya que se incluyen tanto materiales cultivados como silvestres, procedentes de distintas regiones productoras además los procesos de autoincompatibilidad [28].

Evaluaciones de la diversidad genética en manzana y especies relacionadas usando marcadores Microsatélites codominantes, han mostrado altos valores de loci polimórficos y heterocigosidad [29, 30]. Sin embargo ya hace ya algunos años atrás, se mencionaba que la base genética de la manzana había sido erosionada dramáticamente, en algún tiempo cerca de 7000 cultivares fueron descritos en la literatura (1804-1904); ahora la mayoría de las producciones en el mundo están basadas solamente en dos cultivares: Delicious y Golden Delicious. Además, de la expansión creciente de sus plántulas: Gala, Mutsu, Jonagold de Golden Delicious y Empire y Fuji de Delicious [31]. Esto significó una reducción en el número de programas de mejoramiento. Con el fin de incrementar la oferta de materiales de siembra en manzana, se han generado híbridos interespecíficos fértiles entre las especies de *Malus* y hay un amplio precedente que muestra las contribuciones significativas que han hecho al mejoramiento genético de los cultivares comerciales de manzana [32].

Estudios de diversidad genética y mapeo, muestran la sintenia que existe entre los materiales de manzana y de pera. Por lo anterior para el género *Pyrus* existen varios estudios de identificación de genotipos, establecimiento de relaciones genéticas entre especies y variedades de peral, utilizando microsatélites desarrollados para manzana [12]; la buena transferibilidad de marcadores microsatélites de la manzana a la pera

Cuadro 3. Parámetros de Diversidad Genética.

Cebador	N° Loci Polim	H_e estimada	% Loci polimórficos (95%)	F_{st}	SD
ACA	96	0,31	75	0,40	0,05
AG	104	0,30	81	0,39	0,04
CA	106	0,32	83	0,33	0,04
CCA	104	0,32	81	0,46	0,06
CGA	123	0,40	96	0,39	0,05
CT	120	0,35	94	0,34	0,07
GT	119	0,35	93	0,34	0,06
TG	105	0,29	82	0,25	0,04
Total		0,34	88	0,37	0,03

permitió la realización del mapa genético de esta última especie [33] y reafirmar la homología que existen entre los dos genomas, como se puede corroborar en este estudio por los índices de similitud, valores de heterocigosidad y distancias genéticas, incluso se puede observar las relaciones entre los género *Malus*, *Pyrus* y *Prunus* la cual ya sido también ampliamente documentada [34]. El mapeo comparativo, la identificación de locus como el de la autoincompatibilidad y el posicionamiento de genes asociados a enfermedades de importancia económica en los géneros *Pyrus* y *Malus*, son algunas de las ventajas obtenidas por la sintenia entre los genomas [35]. Con el fin de incrementar la oferta de materiales de siembra en estas especies, se han generado híbridos interespecíficos fértiles y hay un amplio precedente que muestra las contribuciones significativas que han hecho al mejoramiento genético de cultivares comerciales de manzana y de peras [36].

Colombia es uno de los países con la mayor oferta de suelo y clima del mundo para el cultivo de frutas tropicales durante todo el año desde el nivel del mar hasta los 2800 metros de altitud. Esto constituye gran parte de las ventajas comparativas y competitivas que tiene el país para desarrollar la fruticultura, especialmente en el departamento de Boyacá. Por lo anterior cultivos como la manzana y la pera puede ser una alternativa económicamente rentable para la región, siempre y cuando se cuente con la disponibilidad de materiales adaptados con buenas características organolépticas, que respondan a las exigencias del mercado.

CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares RAMs permitieron la identificación de las relaciones genéticas intra e interespecíficas en los géneros *Pyrus* y *Malus* corroborando la sintenia reportada en estos genomas la cual se observó en los altos índices de similitud y de heterocigosidad y distancias genéticas pequeñas, estos hallazgos pueden ser utilizados en el mapeo comparativo, la identificación de genes de interés y en la formación de híbridos lo cual contribuye significativamente a los programas mejoramiento genético de estas especies.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos por la colaboración prestada a los laboratorios de investigación en Biología Molecular, Bioplasma y Gebimol, a la Gran-

ja Experimental Tinguavita, al Grupo de Investigación Competitividad Innovación y Desarrollo Empresarial (CIDE), y a la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

REFERENCIAS

- [1] HUANG, C., YU, B., TENG, Y., SU, J., SHU, Q., CHENG, Z. and ZENG, L. Effects of fruit bagging on coloring and related physiology, and qualities of red Chinese sand pears during fruit maturation. *Revista Scientia Horticulturae*, 121(3), 2009, p. 149–158.
- [2] FAOSTAT. FAO statistics database on the worldwide web [on line]. 2014. Disponible:<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/S>. [citado 12 de Diciembre de 2015].
- [3] COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2007-2011 y sus calendarios de siembras y cosechas. Resultados Evaluaciones Agropecuarias Municipales 2011. Bogotá (Colombia): 2012, 301 p.
- [4] PUENTES, G.A., RODRÍGUEZ, L.F., y BERMÚDEZ, L.T. Análisis de grupo de las empresas productoras de frutales caducifolios del departamento de Boyacá. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 2008, p. 146-154.
- [5] PINZÓN, E., MORILLO, A y FISCHER, G. Aspectos fisiológicos del duraznero (*Prunus pérsica* [L.] en el trópico alto: Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 2014, 17(2), p. 401-411.
- [6] IWATA, H., HAYASHI, T., TERAKAMI, S., TAKADA, N., SAWAMURA, Y. and YAMAMOTO, T. Potential assesment of genome-wide association study and genomic selection in Japanese pear *Pyrus pyrifolia*. *Breeding Science*, 63(1), 2013, p. 125-140.
- [7] WU, J., GU, C., KHAN, A., WU, J., GAO, Y., WANG, C., KORBAN, S. and ZHANG, S. Molecular determinants and mechanisms of gametophytic self-incompatibility in fruit trees of Rosaceae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2013, 32(1), p. 54-63.
- [8] MONTANARI, S., SAEED, M., KNÄBEL, M., KIM, Y., TROGGIO, M. and MALNOY, M. Identification of *Pyrus* Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and Evaluation for Genetic Mapping in European Pear and Interspecific *Pyrus* Hybrids. *PLoS ONE*, 8(10), 2013, p. 34-45.

- [9] COSTA, F., CAPPELLIN, L., FARNETI, B., TADIELLO, A., ROMANO, A., SOUKOULIS, C., SANSAVINI, S., VELASCO, R. and BIASIOLI, F. Advances in QTL mapping for ethylene production in Apple (*Malus x domestica* Borkh). *Postharvest Biology and Technology*, 87(4), 2014, p. 126-132.
- [10] YUE, X., LIU, G., ZONG, Y., TENG, Y. and CAI, D. Development of genic SSR markers from transcriptome sequencing of pear buds. *Journal of Zhejiang University Science B*, 15(4), 2014, p. 303-312.
- [11] KUMAR, S., BINK, M.C., CHAGNÉ, D. VOLZ, R., WHITWORTH, C. and CARLISLE, C. Breeding for Apple (*Malus x domestica*) fruit quality traits in the genomics era. In: *Genomics of Plant Genetic Resources*. TUBEROSA, R., GRANER, A. and FRISON, E. Roma (Italy): Springer, 2014, p. 387-416.
- [12] FAN, L., ZHANG, M., LIU, Q., LI, L., SONG, Y., WANG, L., ZHANG, S. and WU, J. Transferability of newly developed pear SSR markers to other Rosaceae species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(6), 2013, p. 1271-1282.
- [13] KHAN, M., ZHAO, Y. and KORBAN, S. Identification of genetic loci associated with fire blight resistance in *Malus* through combined use of QTL and association mapping. *Physiology Plant*, 148(3), 2013, p. 344-353.
- [14] TATUM, T.C., STEPANOVIC, S., BIRADAR, D.P., RAYBURN, A.L. and KORBAN, S.S. Variation in nuclear DNA content in *Malus* species and cultivated apples. *Genome*, 48(5), 2005, p. 924-930.
- [15] ARUMANAGATHA, K. and EARLE, E. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 1991, p. 208-218.
- [16] MUÑOZ, J., MORILLO, A. y MORILLO, Y. Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica*, 57(4), 2008, p. 219-226.
- [17] MORILLO, A., MORILLO, Y. y PINZÓN, E. Caracterización con RAMs de la colección de durazno (*Prunus pérsica* L.) Batsch existente en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 2014, p. 367-376.
- [18] NEI, M. and LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restricción endonucleasa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 1979, p. 5269-5273.
- [19] MIRANDA, D., FISCHER, G., y CARRANZA, C. Los frutales caducifolios en Colombia: Situación actual, sistemas de cultivo y plan de desarrollo. 1 ed. Bogotá (Colombia): Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, 2013, 234 p.
- [20] ROMERO, L., ARROYO, F., SANTAMARÍA, J., HERENCIA, J. and DAZA, A. Growth, phenology and fruit set of *Prunus armeniaca* L. (cv.Ninfa) grafted on two rootstocks in organic and conventional management. *Horticulturae Science*, 41(3), 2014, p. 101-106.
- [21] CALLEJA, I., DE LA CRUZ, S., PEGELES, N., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, R. and GARCÍA, T. Sensitive and specific detection of almond (*Prunus dulcis*) in commercial food products by real-time PCR. *LWT-Food Science and Technology*, 56(1), 2014, p. 31-39.
- [22] WEBSTER, T. Dwarfing Rootstocks: Past, Present and Future. *Compact Fruit Tree*, 35(3), 2002, p.67-72.
- [23] MARINO, P., SCHICCHI, R., BARONE, E., RAIMONDO, F. and DOMINA, G. First results on the phenotypic analysis of wild and cultivated species of *Pyrus* in Sicily. *Flor Mediterránea*, 23(4), 2013, p. 237-243.
- [24] CERVANTES, M., CASTILLO, J. and AGUIRRE, H. Agronomía y ambiente de la pera (*Pyrus communis* L.) en la región central de Veracruz. *Revista de Geografía Agrícola*, 12(2), 2014, p. 51-55.
- [25] MORA, S., MORILLO, Y., MORILLO, A., CAICEDO, A. y MUÑOZ, J. Caracterización molecular con Microsatélites aleatorios RAMs de 30 accesiones de mandarina (*Citrus reticulata*) del Banco de Germoplasma de Corpoica- Palmira. *Investigación Agropecuaria*, 10(2), 2013, p.161-172.
- [26] MORILLO, Y., MORILLO, A., MUÑOZ, J., BALLESTEROS, W. and GONZÁLEZ, A. Molecular characterization of 93 genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) with random amplified microsatellites RAMs. *Agronomía Colombiana*, 32(3), 2014, p. 315-325.
- [27] WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations. Chicago (USA): University of Chicago Press, 1978, 566 p.
- [28] DEQUIGIOVANNI, G., RECH, F., GATTI, F., SOMENSI, I., FAORO, I., DÍAZ, P., QUECINI, V. and RITSCHER, P. Identification of a Simple Sequence Repeat molecular-marker set for large-scale Analyses of pear germoplasm. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 12(2), 2012, p. 118-125.
- [29] GASI, S., SIMON, S., POJSKIC, N., KURTOVIC, M., PEJIC, I., MELAND, M. and KAISER, C. Evaluation of Apple (*Malus x domestica*) Genetic Resources

- in Bosnia and Herzegovina using microsatellite markers. *HortScience*, 48(1), 2013, p. 13-21.
- [30] SIKORSKAITE, S., GELVONAUSKIENE, D., STANYS, V. and BANIULIS, D. Characterization of microsatellite loci in apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars. *Žemdirbystė Agriculture*, 99(2), 2012, p. 131-13
- [31] JANICK, J., CUMMINS, J.N., BROWN, S.K., and HEMMAT, M. Apples. In: *Fruit breeding*. New York (USA): J. Janick & J.N. Moore (Eds.), *Tree and Tropical Fruits Wiley*, 1996, p. 1-76.
- [32] GROSS, B., HENK, A., FORSLINE, P., RICHARDS, C. and VOLK, G. Identification of interspecific hybrids among domesticate apple and its wild relatives. *Tree Genetics and Genomes*, 8(6), 2012, p. 1223-1235.
- [33] CHEN, H., LI, L., KHAN, A., LI, X., KORBAN-WU, J. and ZHANG, S. Construction of a high-density simple sequence repeat consensus genetic map for pear (*Pyrus* spp). *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(2), 2015, p. 316-325.
- [34] SARGENT, D., MARCHESE, A., SIMPSON, D., HOWAD, W., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F., MONFORT, A., ARÚS, P., EVANS, K. and TOBUTT, K. Development of “universal” gene-specific markers from *Malus* spp. cDNA sequences, their mapping and use in synteny studies within Rosaceae. *Tree Genetics and Genomes*, 5(1), 2012, p. 133-145.
- [35] TROGGIO, M., GLEAVE, A., SALVI, D., CHAGNÉ, D., CESTARO, S., KUMAR, S., CROWHURST, R. and GARDINER, E. Apple, from genome to breeding. *Tree Genetics and Genomes*, 8(3), 2012, p. 509-529.
- [36] FISCHER, T., MALNOY, M., HOFMANN, T., SCHWAB, W., PALMIERI, L., WEHRENS, R., SCHUCH, A., MÜLLER, M., SCHIMMELPFENG, H. and VELASCO, R. F₁ hybrid of cultivated apple (*Malus x domestica*) and European pear (*Pyrus communis*). *Molecular Breeding*, 34(3), 2014, p. 817-828.