

La mejora genética del manzano: el ejemplo de Nueva Zelanda (y II)

HortResearch ha desarrollado 18 marcadores moleculares asociados a genes de resistencia a plagas y enfermedades

En esta segunda parte se describen los subprogramas del estudio y mantenimiento de la biodiversidad y el de identificación e incorporación de resistencias a plagas y enfermedades a las variedades comerciales, con una especial referencia a la selección asistida mediante la utilización de marcadores moleculares.

Ignacio Iglesias Castellarnau.

Doctor Ingeniero Agrónomo. IRTA-Estación Experimental de Lleida.



Alta variabilidad en frutos procedentes de semillas recolectadas de Kazajistán (Rusia) en 1992-1994, dentro del subprograma de evaluación y mantenimiento de la biodiversidad, realizado por HortResearch de Nueva Zelanda en colaboración con otros institutos europeos y norteamericanos.

El programa de estudio y mantenimiento de la biodiversidad del manzano, iniciado por D. Noiton y actualmente a cargo de N. Oranguzie, tiene como objetivo mantener la biodiversidad del manzano realizando una prospección de genotipos en diferentes partes del mundo o núcleo de la biodiversidad de la especie, para después proceder a su evaluación y selección en base a aquellas características deseables y susceptibles de ser mantenidas o incorporadas a las nuevas variedades. Esto ha permitido tener localizada una fuente de germoplasma variada o "pool" de genes, capturar el amplio rango de genes disponibles en la población y disponer de individuos que combinen los mejores, susceptibles de ser utilizados para incorporarlos a las nuevas variedades obtenidas en el subprograma de mejora de variedades comerciales del HortResearch, especialmente en lo referido a fuentes de resistencia a plagas y enfermedades (moteado, fuego bacteriano, pulgón lanigero, etc.).

El programa supone un ciclo de evolución y selección que permite mejorar la población de partida y mantener la biodiversidad presente en poblaciones procedentes de Kazajistán (Rusia), de donde es originaria esta especie y por tanto donde se encuentra la mayor biodiversidad. Las semillas (frutos) se re-

colectaron en 1992 con una prospección realizada por investigadores de diferentes institutos de investigación (USA, Europa y Nueva Zelanda) y constituyeron la sublínea 94, formada por 3.000 semillas correspondientes a 84 familias. Cada familia la componen los descendientes de un mismo árbol de polinización abierta (sólo se conoce el parental femenino). Actualmente se trabaja en la evaluación y selección de 4 sublíneas con diferentes familias o cultivares habiéndose constatado la presencia de genes mayores de resistencia a diferentes plagas y enfermedades (Bus et al., 2000; Oranguzie et al., 2000).

Identificación e incorporación de resistencias a plagas y enfermedades

El subprograma de resistencias se inició en el año 1995, siendo su responsable V. Bus. Tiene como objetivo la identificación e incorporación de fuentes de resistencia duraderas a enfermedades (moteado, oídio, fuego bacteriano) y plagas (pulgón lanigero) en va-

riedades de alta calidad, seleccionadas en el subprograma de mejora de variedades comerciales. La incorporación se realiza mediante la realización de cruzamientos (en los que el/los parental/les aporten una o varias resistencias) con las variedades comerciales, proceso que, por las técnicas de mejora clásica, requiere de 4 a 5 generaciones de retrocruzamientos entre los híbridos resistentes y las variedades comerciales pero sensibles (Moore y Janick, 1983). Cada generación implica la selección de los mejores descendientes con los caracteres de resistencia única o combinada a más de una plaga o enfermedad y con los frutos de alta calidad (gusto, aroma, textura, color, etc.).

El trabajo se realiza en estrecha e imprescindible colaboración con los otros dos subprogramas: estudio de la biodiversidad y obtención de variedades comerciales, al cual dan soporte los dos (Tabla 2, 1ª parte publicada en **Vida Rural** número 147). Ello permite un intercambio de las selecciones consideradas de mayor interés para cualquiera de los tres subprogramas. También se trabaja en co-

laboración con los centros de Palmerston North y de Auckland, dado que el proceso de selección de variedades resistentes, que incorporan uno o varios genes de resistencia a una misma enfermedad o plaga, es asistido por marcadores moleculares. Dicha tecnología permite reducir a la mitad el tiempo necesario para el desarrollo de nuevas variedades con resistencias incorporadas.

La selección se realiza en función de la combinación de varias resistencias en una misma variedad y de la calidad o aptitud comercial de los frutos, dado que el destino prioritario será la exportación. El desarrollo de variedades resistentes se realiza mediante la introducción de nuevas resistencias, ya sea de especies silvestres, de variedades comerciales o de variedades procedentes de otros programas de mejora. Dichas resistencias pueden ser a una o varias plagas/enfermedades, denominándose en este último caso resistencias múltiples.

En el caso de enfermedades, el objetivo principal se ha dirigido hacia la resistencia al moteado y oídio, mientras que en plagas han sido el pulgón lanigero y el fuego bacteriano.

Para cada generación, el proceso de cruzamiento y obtención de los descendientes o *seedlings* es similar al descrito en el programa de mejora de variedades comerciales, pasando 2 años en el vivero y entre 2 y 4 años en la parcela de selección. Una diferencia es que una vez obtenidas las plántulas, éstas se inoculan con la enfermedad o plaga que se desea incorporar, eliminando las sensibles. La duración de una generación de selección de los mejores descendientes con características interesantes de resistencia y de calidad es de entre 5 y 7 años e implica la evaluación de unos 10.000 descendientes. Para el desarrollo final de una variedad se requieren entre 4 y 5 generaciones.

El proceso de identificación e incorporación requiere el conocimiento del gen o genes que los controla, su heredabilidad, variable según la variedad, y procedencia. Los genes que aportan resistencia natural a plagas y enfermedades y que son objeto de incorporación a las nuevas variedades pueden separarse en dos grupos: genes mayores o resistencias específicas y resistencias poligénicas. En el caso de los genes mayores, solamente un gen está implicado y normalmente confiere altos niveles de resistencia o inmunidad y se ven poco afectados por factores externos tales como son las condicio-



El gen de resistencia al moteado Vf es introducido en variedades comerciales por el método del retrocruzamiento y procede de la especie *M. floribunda* 821 (*crabapple*) de pequeño calibre y sin calidad gustativa.

nes de infección. Tienen la ventaja de una elevada eficiencia en la mejora, dado que en teoría alrededor del 50% de los descendientes heredarán el mismo nivel que el parental resistente (Welsh, J.R., 1981). La mayoría de resistencias controladas por genes mayores tienen la desventaja de proceder de variedades de flor (*crabapples*), con frutos de baja calidad (calibre y gusto), aspecto que mantienen los frutos de los primeros cruzamientos o generaciones (Bus y Gardiner, 1998).

Con las técnicas de mejora tradicionales se requiere de 4 a 5 generaciones de retrocruzamientos hasta que la resistencia se combina con la buena calidad requerida para una variedad comercial, tiempo que puede reducirse a la mitad mediante la utilización de marcadores moleculares.

En las resistencias poligénicas (suma del efecto de genes menores) la expresión de un carácter se debe a la acción conjunta de todos los genes implicados, es decir, hay un efecto aditivo de los mismos que codifican un rango de resistencias que va desde muy bajo a alto

y solamente entre el 5-15% de la progenie suele heredar el carácter. Están más afectados por las condiciones externas.

La principal ventaja es que normalmente se encuentran en variedades cultivadas y por tanto de calidad (calibre, gusto, etc.), por lo que se requiere de un número menor de generaciones de mejora para incorporar los a variedades de alta calidad. Como ejemplo citar 'Red Delicious' que es altamente resistente al oídio (sensible al moteado) y al fuego bacteriano o 'Granny Smith' resistente al fuego bacteriano y a *Phytophthora* (Bus y Gardiner, 1998). Otro ejemplo de control poligénico son las características de calidad. En el caso del

manzano, los genes son heterocigóticos y, además, por ser poligénicos cada parental sólo aporta la mitad (n) de la dotación cromosómica total (2n), por lo que la probabilidad de combinar los mejores en un mismo descendiente es muy baja (alrededor del 10%). Es por ello que cuando se seleccionan dichos caracteres suele trabajarse con descendencias o familias muy numerosas (más de 3.000 descendientes) y el proceso de mejora es largo. Si solamente uno de los parentales aporta las características deseables, el tiempo requerido es el doble. Por ejemplo, el cruzamiento de 'Fuji' x 'Gala', ambas de alta calidad gustativa, solamente alrededor del 8% de los descendientes presentan características de calidad interesantes.

La mayoría de resistencias incorporadas actualmente están controladas por genes mayores, lo que implica que si sólo un único gen proporciona la resistencia, tarde o temprano aparecen resistencias, como ha ocurrido con la resistencia monogénica al moteado proporcionada por el gen Vf, procedente de *Malus floribunda* 821 e introducido en diferentes variedades en los primeros programas de mejora (Laurens, 1996). El disponer de diferentes fuentes de resistencia a una misma enfermedad o plaga permite utilizarlas como reposición en el caso de que se rompa la resistencia o incorporar más de una en la misma variedad, lo que se conoce como genes piramidales (*pyramiding of major gene resistances*), para que la resistencia sea duradera en el tiempo. Por ejemplo, en el caso del moteado se dispone actualmente de más de siete fuentes de resistencia diferentes (Vf, VM, VP, VMIS, etc.) y las últimas selecciones obtenidas incorporan tres en la misma selección en forma



Pinkie™ es un ejemplo de las numerosas nuevas variedades obtenidas en el HortResearch Hawke's Bay Centre. Es resistente al moteado, al oídio y con una buena calidad gustativa.

de resistencia piramidal, que es la deseable al reunir las características de heredabilidad de los genes mayores y la durabilidad de los genes menores, por lo que la aparición de resistencias es muy difícil, pero el proceso de mejora es más largo si se compara con la incorporación de un único gen de resistencia.

La utilización como genitores de variedades resistentes a enfermedades y/o plagas procedentes de diferentes programas desarrollados a escala mundial en los últimos 30 años es, en la actualidad, habitual. El gen más utilizado de resistencia al moteado es el Vf procedente de una especie con frutos pequeños. Las primeras variedades obtenidas fueron 'Prima' resistente al moteado (Vf) pero de baja calidad y 'Priscilla' de calidad media. Posteriormente se han obtenido otras resistentes a diferentes enfermedades y con una mejora progresiva de la calidad, en diferentes países como Estados Unidos (PRI), Alemania (Dr. Haft), Francia (INRA), Inglaterra (East Malling) y Nueva Zelanda (HortResearch). Señalar entre otras: 'Enterprise[®]', 'Jonafree[®]', 'Goldrush[®]' y 'PinkieTM' (A38R02T119) y de obtención más reciente: 'Topaz[®]', 'Initial[®]' y 'Crimson Crisp[®]' (Carli, 2002).

Actualmente la situación es muy diferente, dado que se dispone de variedades resistentes y de buena calidad gustativa, lo que permite acortar el proceso de selección para incorporar las características de calidad. Para ilustrar esta mayor ganancia genética en la calidad de los frutos, en la **Figura 1** se ilustra la distribución de este ratio correspondiente a los descendientes de siete cruzamientos de



Alta variabilidad en frutos procedentes de semillas recolectadas de Kazajistán (Rusia) en 1992-1994, dentro del subprograma de evaluación y mantenimiento de la biodiversidad, realizado por HortResearch de Nueva Zelanda en colaboración con otros institutos europeos y norteamericanos. En la línea de la izquierda descendientes de la familia (Freedom –resistente al moteado y sensible al oídio– x (Royal Gala[®] x Braeburn). con claros síntomas de ataque de oídio. A la derecha descendientes del cruzamiento Pacific Beauty[™] x Pinkie[™]. sin síntomas al ser resistentes a ambas enfermedades.

diferentes variedades de manzana, algunas resistentes y otras sensibles a diferentes enfermedades.

Por ejemplo, el cruzamiento de 'Golden' (buena calidad gustativa) x 'Priscilla' (resistente al moteado pero de baja calidad) proporciona un máximo en el valor 2,5. Si los parentales son 'ScifreshTM' (alta calidad) x A38R02T143 (buena calidad y resistente al moteado y oídio) el mayor número de descen-

dientes tienen un valor de 6. más del doble que en el caso anterior, por lo que el tiempo de selección se reduce a la mitad. Un resultado intermedio se observa con 'Red Delicious' (calidad media) x A163-42 (resistente al moteado y de calidad media).

Un esquema del procedimiento utilizado para la incorporación de diferentes fuentes de resistencia y calidad se ilustra en la **Tabla 1**, y consiste en utilizar una variedad resistente al oídio y de buena calidad gustativa (A39R02T012) y cruzarla con otras que aportan una alta calidad gustativa pero ninguna resistencia, como es el caso de A20R2T32 ('Royal Gala[®]' x 'Braeburn'), 'Fuji', 'Braeburn', 'Pacific RoseTM' o 'Royal Gala[®]'. Al ser ambos parentales variedades con frutos de buen calibre y presentación, una parte de los descendientes incorporan estos dos caracteres, mientras que un número inferior son además resistentes a oídio y de alta calidad gustativa. Es por ello que, normalmente, no es necesario realizar el retrocruzamiento (back cross) y los descendientes seleccionados se cruzan con otra variedad del "pool", que aporta otra resistencia a dos factores (moteado, fuego bacteriano, etc.). En el caso de la **Tabla 1** se han cruzado dos veces para aportar dos genes de resistencia diferentes al moteado. Para mejorar la calidad gustativa o aspecto (contenido de azúcares, firmeza, jugosidad, color, contenido de aromas, etc.) y por ser de control poligénico, es necesaria la utilización de varios retrocruzamientos con una o varias variedades que aporten estos caracteres.

Actualmente la resistencia al moteado es

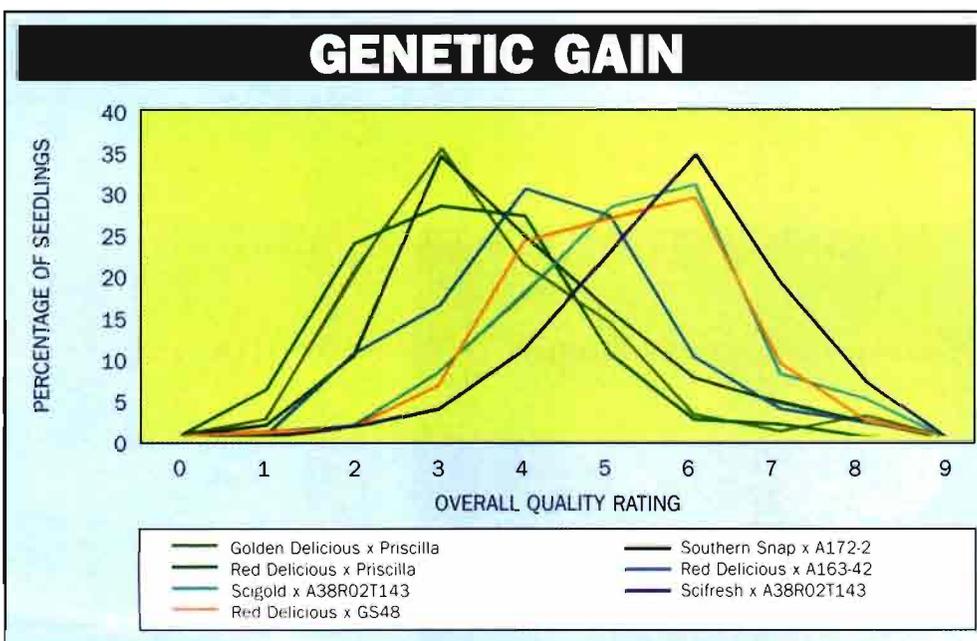
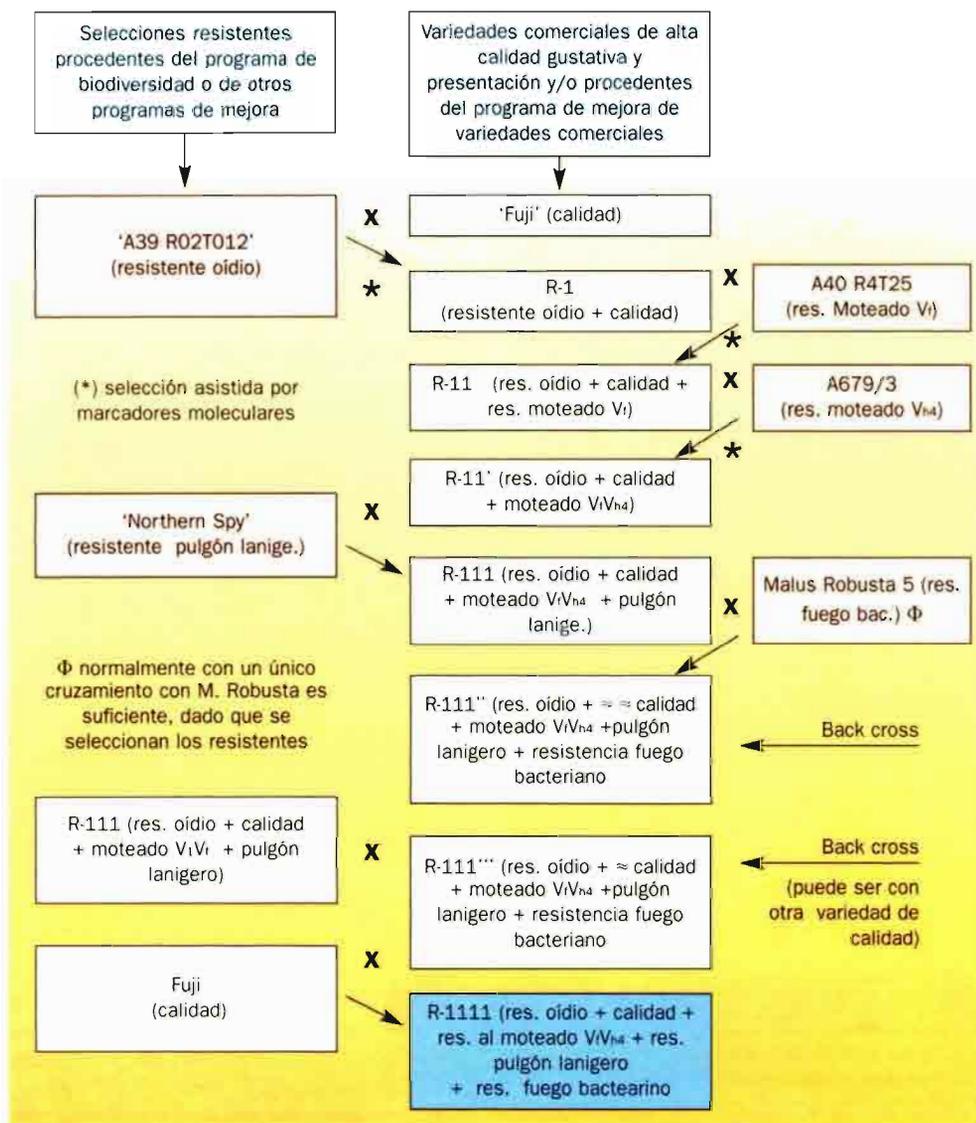


FIGURA 1: Distribución del ratio de calidad global de los frutos resultantes de siete cruzamientos, realizados en el programa de mejora genética del manzano del HortResearch (Havelock North-Nueva Zelanda). Los descendientes de cada cruzamiento se evaluaron individualmente en una escala de 10 puntos, donde '0' es la calidad más baja y '10' la más alta. (Fuente: V. Bus. HortResearch).

TABLA 1: EJEMPLO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE UNA SELECCIÓN RESISTENTE A DIFERENTES ENFERMEDADES Y PLAGAS Y DE CALIDAD COMERCIAL CON EL MÉTODO DE SEMIRETROCRUZAMIENTO Y RETROCRUZAMIENTO



la principal línea de trabajo, dado que constituye un problema importante tanto en Nueva Zelanda como en las principales zonas productoras del mundo. Los primeros trabajos se iniciaron en diferentes países durante la década de los 70 y permitieron la incorporación del gen de resistencia Vf. A principios de los años 80 se describieron en el norte de Europa las primeras razas de resistencia, por lo que se buscaron otras fuentes de control genético diferente (VMIS, VP,...). El objetivo es incorporar 3 genes piramidales de resistencia a dicha enfermedad a las variedades seleccionadas.

Selección asistida mediante marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias de DNA asociadas al gen específico de resistencia y que sirven para ser localizados fá-

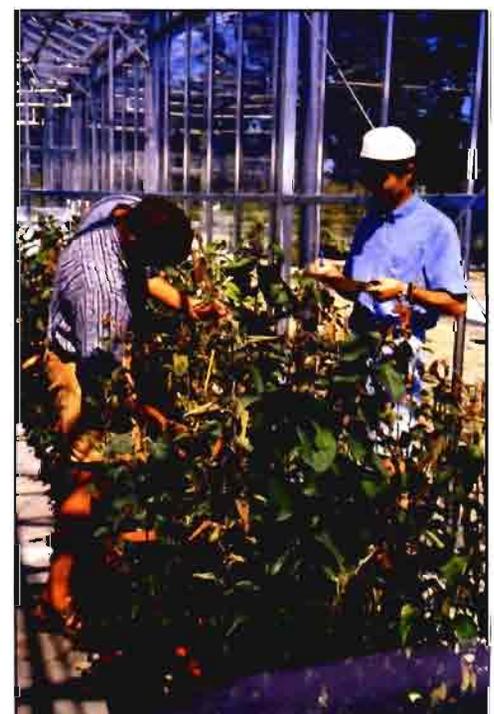
cilmente como puntos de referencia (signposts) en los cromosomas de las plantas, dado que son mucho más fáciles de detectar que el gen determinante del carácter (Sansavini y Pancaldi, 1997).

Los mejoradores utilizan el marcador para un gen de resistencia para el "screening" o selección de los descendientes susceptibles o resistentes a una o varias plagas/enfermedades (Muggleston, 1994). Ello significa que no se ha de esperar a observar directamente el síntoma de la infección por el patógeno/plaga en la planta, que debe hacerse a veces sobre frutos y otras veces que es difícil de determinar, debido a reacciones de hipersensibilidad. Lo mismo puede hacerse en líneas de mejora en que los descendientes sean portadores de dos o más genes de resistencia, dado que los marcadores son únicos y específicos de cada

gen.

Para el manzano, HortResearch ha desarrollado 18 marcadores moleculares asociados a genes de resistencia a plagas y enfermedades, 12 de ellos asociados al gen Vf. El primer paso consiste en conocer el tipo de control genético (monogénico, etc.) así como el gen responsable de la enfermedad o plaga objeto de estudio, para después buscar las fuentes de resistencia (moteado: VMS, Vf en M. floribunda 821; pulgón lanigero: Er1 en 'Northern Spy'; oídio PL1, PL2, PIMIS en descendientes de 'Mildew Inmune' en polinización abierta con 93051). Posteriormente y en colaboración con otros centros de investigación, se han obtenido diferentes marcadores moleculares para cada una de las resistencias expuestas (White et al., 1996). Por ejemplo se dispone del marcador OPAC20 para el gen de resistencia al oídio PIMIS ligado (link) al fenotipo inmune procedente de 'Mildew Inmune' x 93051. Menor distancia genética implica una mayor precisión del marcador en la separación de los genotipos resistentes en el proceso de mejora asistida. Si el marcador se encuentra justo donde está situado el gen la precisión de la predicción será del 100%.

La disponibilidad de diferentes marcadores, a parte de su utilidad en el proceso de selección, ha permitido conocer las distancias genéticas entre diferentes genes de resistencia y los correspondientes marcadores moleculares disponibles para el oídio (PIMIS), moteado (VMS) y pulgón lanigero (Er1), entre



Evaluación de la sensibilidad de diferentes selecciones avanzadas de manzano a la inoculación de diferentes razas de fuego bacteriano en HortResearch.

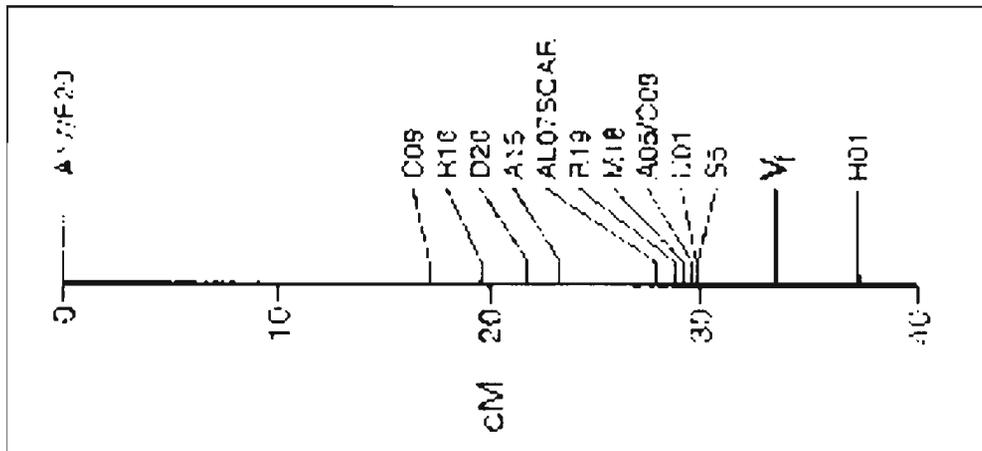


FIGURA 2: Ejemplo del mapa genético de los marcadores moleculares en la región del DNA próxima al gen de resistencia al moteado Vf, expresada en centi-Morgans (cM). (Fuente: S. Gardiner, et al., 1996).

otros. En la **Figura 2** se expone como ejemplo el mapa genético de los marcadores moleculares disponibles en la región del DNA, próxima al gen de resistencia al moteado Vf, en una distancia próxima a los 40 cM de los 1.200 cM de longitud que tiene el genoma del manzano. Los situados a menor distancia (S5, U01, A05/C09, etc.) proporcionan una mayor eficacia en la predicción y permiten saber donde está situado el gen con una mayor exactitud.

Los marcadores moleculares se han incorporado a los principales programas de mejora genética del manzano a lo largo de la última década y es una técnica muy útil dado que permite avanzar más rápidamente en el proceso de selección de variedades resistentes, ya sea para incorporación de una o varias fuentes de resistencia en una misma variedad. En este último caso se trata de genes piramidales que son los de mayor interés, como se ha expuesto anteriormente. En la **Figura 3** se observan los genotipos y fenotipos resultantes del cruzamiento de dos variedades 'Liberty' y 'h4', que aportan cada una una fuente de resistencia diferente (f o h4), con el objetivo de incorporar los dos en una misma variedad. Los fenotipos correspondientes a dos genotipos diferentes VfVh4 y VfVh4 son idénticos, al poseer como mínimo un gen de resistencia y, por los síntomas externos, no se puede saber qué planta tiene incorporados los dos genes de resistencia al moteado (F y h4) o solamente uno (F o h4), pero interesa seleccionar so-

lamente la plántula que incorpore los dos.

La utilización de marcadores moleculares permite separar fácilmente los descendientes resistentes, ya sean portadores de uno o de

dos genes de resistencia a la misma enfermedad, una vez se disponga de las plántulas (seedlings) y sin necesidad de realizar inoculación alguna ni de esperar a ver los síntomas de la infección. En el caso del moteado se han encontrado diferentes marcadores, siendo el primero en ser utilizado el asociado al gen de resistencia Vf.

En el ejemplo de la **Figura 3**, puede saberse cual es el descendiente que incorpora las dos resistencias estudiando la segregación de la descendencia, al tratarse de genes mayores de segregación mendeliana, por cruzamiento con una variedad sensible como 'Royal Gala®' (vf vh4) (relación susceptibles/resistentes 1/1 ó 1/3). Ello implica realizar el cruzamiento, la obtención de los frutos, extracción de las semillas, su siembra, germinación, crecimiento de las plántulas, inoculación y recuento del porcentaje de descendientes con síntomas de infección. Este proceso requeriría un mínimo de dos años, con el inconveniente de que en algunos casos es difícil separar con certeza los descendientes con la resistencia incorporada en función de los síntomas que presentan (hipersensibilidad, etc.).

En la **Figura 4** puede observarse la ampliación de las bandas de DNA vía PCR utilizando el marcador OPO05 SCAR+ asociado al gen de resistencia al pulgón lanigero (Er3). Cada banda corresponde a una selección; las susceptibles sólo generan una banda fluorescente (sus) y las resistentes dos (res). La segunda corresponde a la secuencia de DNA (marcador) asociada al gen Er3 e indica su presencia/resistencia o ausencia en los susceptibles. En el ejemplo de la **Figura 3** la planta con los dos genes de resistencia (VfVh4) proporcionaría una distribución con tres bandas, diferente a la que sólo lleva uno (vfVh4) con dos bandas o la que no lleva ningún gen de resistencia (vf vh4) con una banda, permitiendo su selección fácilmente.

La mayoría de marcadores moleculares disponibles para el manzano han mostrado una alta eficacia en la predicción (superior al 99%), lo que implica que la distancia entre el marcador y el gen correspondiente que codifica la resistencia es muy pequeña. Si el marcador se localiza donde el gen la eficacia es del 100%, lo que desde el punto de vista probabilis-



Ampliación de las bandas de DNA vía PCR en el proceso de selección asistida por marcadores moleculares para la incorporación de resistencia al moteado en nuevas variedades de manzano en el centro de Palmerston North (HortResearch-Nueva Zelanda).

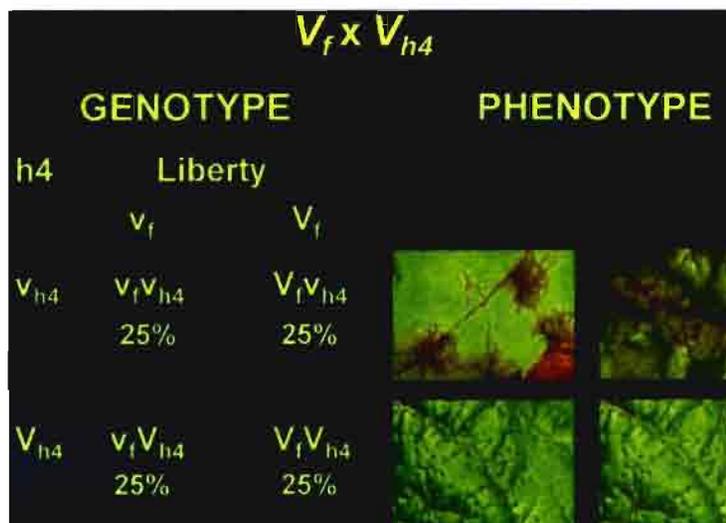


FIGURA 3: Fenotipos correspondientes a 4 genotipos resultantes del cruzamiento de las variedades 'Liberty' x 'h4' para incorporar dos genes de resistencia (f i h4) en una misma selección. (Fuente: V. Bus, HortResearch).

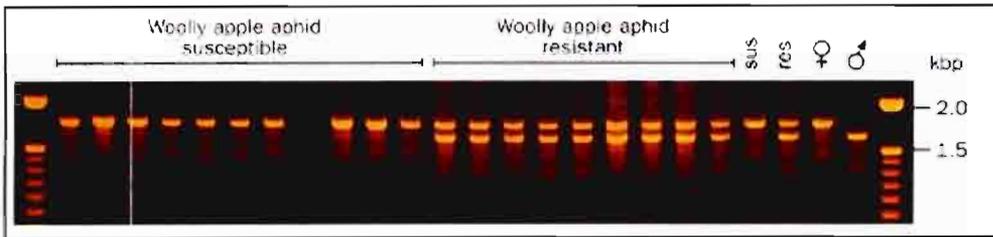


FIGURA 4: Amplificación de las bandas de DNA correspondientes a diferentes selecciones de manzana susceptibles y resistentes al pulgón lanigero (woolly aphid). Cada banda vertical corresponde a una selección. (Fuente: S. Gardiner y V. Bus, 1997).

tico es prácticamente imposible. En diferentes ensayos, realizados por el HortResearch, la práctica totalidad de las plantas seleccionadas

como resistentes en base al marcador molecular del moteado (Vf) (predicción o genotipo) no presentaron ningún síntoma de infección por el hongo después de ser inoculados (fenotipo).

Otras aplicaciones actuales de las biotecnologías en la mejora genética del manzano en el HortResearch son el desarrollo del mapa genético del manzano, el fingerprinting y la transformación genética de variedades u obtención de variedades transgénicas. ■



Plantas de Royal Gala® transgénicas en las que se ha incorporado el gen que bloquea la síntesis de la ACC o precursor del etileno por lo que su proceso de maduración es muy lento y el shelf-life largo.

Agradecimientos

- A la Direcció General de Recerca del Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, por financiar la estancia en Nueva Zelanda.

- Al HortResearch Hawke's Bay Centre y al Departamento de Mejora Genética, por poner a disposición los medios materiales y humanos para la estancia.

BIBLIOGRAFÍA

- BUS, V.; GARDINER, S., 1998. Pest and disease resistance in apple. I Sources of genetic resistance. *The Orchardist*, 71(5): 54-55.

- BUS, V.; BRADLEY, S.; HOFSTEE, M.; ALSPACH, P.; BREWER, L.; LUBY, J., 2000. Increasing genetic diversity in apple breeding to improve the durability of pest and disease resistance. *Proceedings of the Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*. ISHS. *Acta Horticulturae*, 538, Vol.1: 185-190.

- CARLI, C., 2002. Dagli USA cultivar di melo resistente a la ticchiolatura. *Terra e Vita*, 7: 57-59.

- GARDINER, S.; BUS, V.; WHITE, A.; NOITON, D.; RIKKERINK, E.; BALL, R.; FORSTER, R., 1996. An updated map around the Vf gene for resistance to apple scab and marker assisted selection for resistance. *Acta Horticulturae* 484: 481-485.

- GARDINER, S.; BUS, V., 1997. High-tec selection for black spot resistance in apple. *HortResearch Seasons*, Issue Nº. 22.

- IGLESIAS, I., 2001. El sector de la fruta dulce en Nueva Zelanda. Parte I: producción y comercialización. *Fruticultura Profesional*, 121: 7-30.

- IGLESIAS, I., 2002. El sector de la fruta dulce en Nueva Zelanda. Parte II: variedades y técnicas de producción. *Fruticultura Profesional*, 122: 7-33.

- LAURENS, F., 1996. Review of the current apple breeding programmes in the world: Objectives for scion cultivar improvement. *Acta Horticulturae* 484: 163-170.

- MOORE, J.N., JANICK, J., 1983. *Methods in fruit breeding*. Ed. Darle Griffith.

- MUGGLESTON, 1994. Research: biotechnology aids plant breeding. *The Orchardist*, May: 40-44.

- ORANGUZIE, N.C.; HOFSTEE, M.; ALSPACH, P.; BREWER, L.; HOWARD, C., 2000. Quantitative genetic studies in a recurrent selection program in apple. *Proceedings of the Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*. ISHS. *Acta Horticulturae*, 538, Vol.1: 191-195.

- SANSAVINI, S.; PANCALDI, M., 1997. Riconoscimento e rispondenza genetica delle piante da frutto con tecniche di "fingerprinting". Ed. MiPAF.

- WHITE, A.G.; BUS, V.G., 1996. Breeding commercial apple cultivars in New Zealand with resistances to pests and diseases. *Acta Horticulturae* 484: 157-161.

- WELSH, J.R., 1981. *Fundamentals of plant genetics and breeding*. Ed. Jhon Wiley & Sons, New York.

CAMPOLVA



CAMPOTEJAR

forja de muestras de armilla, s.a.
FORMASA



OLEOSUR 2002

V Feria Internacional del Aceite de Oliva y Afines
Feria de Muestras de Armilla (Granada)
del 12 al 15 de Septiembre



EX. CAJ. DIPUTACION DE GRANADA



CONSEJERIA REGIONAL DE AGRICULTURA

