

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

“GENÉTICA DE LA TOLERANCIA AL ALUMINIO EN CENTENO
(*Secale cereale* L.)”



Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas presenta
Francisco Javier Gallego Rodríguez

VºBº

DIRECTOR DE LA TESIS

Cesar Benito Jiménez

MADRID, 1997

21.668

A mis Padres y a Emilia

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Pr. Dr. Juan Ramón Lacadena Calero, Director del Departamento de Genética de la Facultad de CC Biológicas de la UCM, por las facilidades concedidas para la realización de este trabajo en dicho Departamento.

Igualmente, deseo agradecer de manera especial al Dr. César Benito Jiménez su constante ayuda y colaboración, con derroche de interés e infinita paciencia.

Al Dr. K. Richards (School of Biological Sciences, University of Auckland), por la cesión de las sondas *wali1*, *wali2* y *wali5*, y al Dr. A.J. Lukaszewski (College of Natural and Agricultural Sciences, University of California), por la de las líneas de adición trigo-centeno.

Sois muchos, muchísimos. Siempre os llevaré conmigo, y si aún no he sido capaz de demostraroslo lo siento, sinceramente, porque creo que ya es demasiado tarde.

INTRODUCCIÓN.....	1
1 TOXICIDAD DEL ALUMINIO	3
1.1 Toxicidad de las diferentes especies iónicas del aluminio	3
1.2 Efecto del aluminio en la raíz.....	4
1.3 Mecanismos de toxicidad del aluminio	5
2 TOLERANCIA AL ALUMINIO	8
2.1 Exclusión del aluminio del ápice de las raíces.....	8
2.2 Detoxificación interna.....	10
3 GENÉTICA DE LA TOLERANCIA AL ALUMINIO	11
3.1 Genética de la tolerancia al aluminio en trigo.....	12
3.2 Genética de la tolerancia al aluminio en otras especies vegetales	13
3.3 Genética de la tolerancia al aluminio en centeno	14
4 MARCADORES GENÉTICOS.....	15
4.1 Marcadores morfológicos.....	16
4.2 Marcadores cromosómicos	16
4.3 Marcadores moleculares.....	16
4.4 Empleo de marcadores moleculares en mejora vegetal.....	21
4.5 Localización cromosómica y mapas en centeno	24
OBJETIVOS	26
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
1 MATERIAL VEGETAL	29
2 TEST DE TOLERANCIA AL ALUMINIO.....	30
3 ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS	31
4 TÉCNICAS MOLECULARES.....	32
4.1 Técnicas generales	32
4.2 Aislamiento de ADN total.....	32
4.3 Valoración del ADN genómico	33
4.4 Amplificación del ADN mediante RAPDs.....	33
4.5 Experimentos tipo Southern.....	36
4.6 Obtención de cebadores específicos de centeno.....	37
4.7 Amplificación por PCR empleando cebadores específicos (SCAR).....	40
4.8 Digestiones con enzimas de restricción.....	41
5 ANÁLISIS DE LA SEGREGACIÓN Y ELABORACIÓN DE MAPAS.....	41
RESULTADOS.....	43
1 CONTROL GENÉTICO DE LA TOLERANCIA AL ALUMINIO EN CENTENO.....	44
1.1 Efecto del aluminio sobre el crecimiento de la raíz en distintas poblaciones de centeno.....	44

1.2 Estudio del control genético de la tolerancia al aluminio	52
2 LOCALIZACIÓN DE GENES DE TOLERANCIA AL ALUMINIO	56
2.1 Análisis de ligamiento entre genes de tolerancia al aluminio y varios loci isoenzimáticos	56
2.2 Obtención de marcadores moleculares ligados a genes de tolerancia al aluminio	60
2.3 Obtención de SCAR	72
3 CONSTRUCCIÓN DE MAPAS GENÉTICOS EN LOS CROMOSOMAS 6R Y 4R	77
3.1 Construcción de un mapa genético en el cromosoma 6R	77
3.2 Construcción de un mapa genético en el cromosoma 4R	80
DISCUSIÓN	81
1 TOLERANCIA AL ALUMINIO EN CENTENO	82
2 METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE MARCADORES EN REGIONES CROMOSÓMICAS ESPECÍFICAS	86
2.1 Utilidad de los RAPDs como marcadores genéticos	86
2.2 Análisis de bloques segregantes	86
2.3 Localización cromosómica de fragmentos amplificados por RAPDs en líneas de adición	88
2.4 Obtención de SCAR	89
3 LOCALIZACIÓN DEL GEN DE TOLERANCIA ALT1 Y CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA EN EL CROMOSOMA 6R ...	91
4 LOCALIZACIÓN DEL GEN DE TOLERANCIA ALT3 EN EL CROMOSOMA 4R	93
5 POSIBLES APLICACIONES	95
CONCLUSIONES	96
BIBLIOGRAFÍA	99
APENDICE I	120

Introducción

El exceso o deficiencia de ciertos metales en el suelo es uno de los factores más limitantes de la producción agrícola mundial. Aproximadamente un 25% de los suelos cultivables del mundo inducen algún tipo de estrés en las plantas por exceso o carencia de ciertos metales. El efecto producido por el estrés es el producto de la interacción entre la concentración del metal, su disponibilidad y el genotipo de la planta.

La evolución de las floras en diferentes suelos ha dado lugar al desarrollo de ecotipos adaptados a las condiciones particulares de cada lugar. La agricultura ha contribuido a reducir el efecto de este proceso natural de adaptación debido al cultivo tradicional en suelos con poca salinidad, pH moderado y donde el estrés abiótico es mínimo. Además, la aplicación de prácticas agronómicas que modifican las características ambientales, como el riego y la fertilización, ha contribuido a esta reducción en la presión selectiva.

La necesidad de un aumento de la producción agrícola en zonas menos favorables para compensar la demanda generada por el incremento de la población mundial es uno de los mayores retos de la agricultura moderna. Una parte importante de la investigación en este área se ha centrado en el estudio de la tolerancia al aluminio.

El aluminio (Al) es el metal más abundante en la corteza terrestre, suponiendo aproximadamente un 7% de su masa. La mayor parte de las especies vegetales son altamente sensibles a pequeñas concentraciones de este metal, cuando se encuentra en formas solubles en el suelo. La solubilización del aluminio se ve favorecida en medios con reducido pH, siendo esta la causa por la cual el aluminio es el factor más limitante de la producción en suelos ácidos, que comprenden un 40% de los terrenos cultivables en el mundo (Foy, 1984; Foy, 1988; Haug, 1984).

En principio, este problema se localizaba fundamentalmente en zonas tropicales y subtropicales (Foy y col., 1978; Foy, 1984). Sin embargo, debido a situaciones tales como el empleo de fertilizantes nitrogenados (Aniol y Hill, 1980) o la aparición de la denominada lluvia ácida (Haug, 1984; Kennedy, 1986) se está produciendo la acidificación de áreas agrícolas que anteriormente no sufrían la fitotoxicidad del

aluminio. Así, este proceso está afectando amplias zonas de América del Norte y de Europa Occidental.

La única estrategia para mantener la producción en suelos ácidos consiste en la aplicación de productos alcalinizantes, generalmente calcáreos. Este es un recurso temporal y de elevado coste, constituyendo una solución poco eficaz, ya que la acción neutralizante se produce aproximadamente en los primeros 25 cm del suelo y no afecta a zonas más profundas, donde penetra gran parte del sistema radicular de muchos cultivos (Guedes-Pinto, 1985).

Otra manera de atacar el problema es obtener variedades tolerantes mediante mejora tradicional o por métodos biotecnológicos, siendo necesario en ambos casos un mayor conocimiento de las bases genéticas que controlan la tolerancia al aluminio.

1 Toxicidad del Aluminio

La inhibición del crecimiento radicular es el síntoma inicial de la toxicidad por aluminio (Taylor, 1988; Delhaize y Ryan, 1995). El empleo de soluciones nutritivas con aluminio ha demostrado que este efecto es muy rápido, observándose a partir de la primera hora de tratamiento (Wallace y Anderson, 1984; Ownby y Popham, 1990). Por esta causa, es muy complicado separar las respuestas iniciales relacionadas con el crecimiento de la raíz de aquellas que aparecen como resultado del daño producido a estas. Para comprender los mecanismos de toxicidad del aluminio es necesario identificar las especies de aluminio más tóxicas y sus “dianas” en la planta, ya que estas serán las responsables de las respuestas iniciales.

1.1 Toxicidad de las diferentes especies iónicas del aluminio

Una gran parte de la dificultad en el estudio de los procesos relacionados con aluminio se debe a la complejidad de su química (Martin, 1988; Kinraide, 1991). El aluminio se encuentra en el suelo en forma de diferentes especies iónicas en función del pH. La disponibilidad de este elemento, y por lo tanto su fitotoxicidad, se produce cuando se encuentra disuelto en la fase acuosa del medio. Cuando existen condiciones

ácidas ($\text{pH} < 5$) en el suelo, el aluminio se encuentra mayoritariamente en forma de la especie soluble trivalente Al^{3+} [$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$], y a medida que aumenta el pH aparecen las especies más catiónicas, $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ [$\text{AlOH}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$] y $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ [$\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4^+$]. En condiciones de pH neutro, por sucesivas desprotonaciones, se producen $\text{Al}(\text{OH})_3$, que es insoluble, y finalmente en condiciones alcalinizantes $\text{Al}(\text{OH})_4^-$, aluminato.

El aluminio, y principalmente el catión Al^{3+} , puede formar complejos de bajo peso molecular uniéndose a varios ligandos, como son los grupos fosfato, sulfato y carboxilato. Por ello, Al^{3+} forma complejos con ácidos orgánicos, fosfato inorgánico, polifosfatos (como los nucleótidos) y sulfatos. Así, el aluminio se une a macromoléculas como las proteínas, los ácidos nucleicos y los carbohidratos (MacDonald y Martin, 1988; Martin, 1992).

Muchos cationes trivalentes son tóxicos para las plantas. Teniendo en cuenta que la toxicidad del aluminio esta restringida a condiciones ácidas, se ha supuesto que Al^{3+} es la especie más fitotóxica. Además, se ha propuesto que la toxicidad del aluminio esta más correlacionada con la suma de todas las especies hidrox-Al y Al^{3+} en lugar del Al^{3+} únicamente (Blamey y col., 1983; Alva y col., 1986). Kinraide (1991) ha realizado una revisión detallada sobre este tema.

Además del pH del suelo, que es el máximo responsable del efecto tóxico del aluminio, existen otra serie de factores como son el contenido en materia orgánica, la temperatura o los abonados del suelo que tienen una influencia en la solubilización del aluminio, y por extensión en su fitotoxicidad (Santos, 1983).

1.2 Efecto del aluminio en la raíz

Recientemente se ha demostrado que el ápice de la raíz (cofia de la raíz, meristemo y zona de elongación) es el lugar donde se producen los daños iniciales por acción del aluminio. Ryan y col. (1993) observaron que únicamente los 2-3 mm finales de las raíces de maíz deben ser expuestos al aluminio para que las plantas sufran daños irreversibles. En cambio, si toda la raíz excepto el ápice es expuesto al aluminio el crecimiento radicular es normal. En trabajos previos, se sugirió que la inhibición del

crecimiento radicular podría ser una consecuencia de señales enviadas por la cofia mediando hormonas y segundos mensajeros (Bennet y col., 1987; Bennet y Breen, 1991). Sin embargo, en el trabajo previamente citado de Ryan y col. (1993) se muestra que los efectos del aluminio son iguales en raíces con y sin cofia.

Estos resultados muestran que las interacciones deben producirse a nivel del meristemo radicular, siendo por lo tanto esta la zona de más interés en estudios futuros.

1.3 Mecanismos de toxicidad del aluminio

El aluminio puede interaccionar con muchas estructuras extra e intracelulares. Para comprender las bases de los mecanismos de toxicidad del aluminio en la raíz es necesario saber si el origen de los daños se produce en el apoplasma o en el simplasma.

El acceso del aluminio al apoplasma es muy rápido, y su interacción con las paredes y membranas celulares debe necesariamente preceder cualquier transporte al simplasma. Muchas de estas interacciones son potencialmente dañinas para la planta, pudiendo interferir, por ejemplo, con proteínas de la pared, canales de transporte o activando rutas de segundos mensajeros (Haug, 1984; Taylor, 1988; Bennet y Breen, 1991; Rengel, 1992 ; Haug y col., 1994).

El aluminio, y en especial la especie Al^{3+} , es prácticamente insoluble en las bicapas lipídicas, así que la membrana celular debería constituir una barrera a la entrada del aluminio. Pese a esto, se ha comprobado que hasta la mitad de la cantidad total de aluminio presente en los ápices radiculares se encuentra en el simplasma (Tice y col., 1992). Además, empleando espectrofotometría de masas se ha detectado la presencia de aluminio en los simplasmas de raíces de soja tras solamente 30 min. de tratamiento (Lazof y col., 1994). Todos estos datos indican que la entrada del aluminio es suficientemente rápida en los simplasmas celulares para ser el lugar inicial de los daños.

El transporte al interior celular parece producirse mediante endocitosis (Akeson y Munns, 1990) o por la permeabilización de un canal de transporte de Mg^{2+} o de Fe^{3+} (Winkler y col., 1986).

Así, se han descrito numerosos mecanismos de toxicidad del aluminio. Estos, por su sitio de acción, podrían englobarse en dos grandes grupos: mecanismos de interacción con procesos de transporte y mecanismos de interacción a nivel intracelular.

1.3.1 Interacción con procesos de transporte

Un considerable número de trabajos han tratado de encontrar las interacciones del aluminio con las membranas celulares y los procesos de transporte. Estudios electrofisiológicos han demostrado que los potenciales de membrana no sufren cambios de importancia, e incluso las bombas de H^+ y K^+ funcionan con normalidad (Kinraide, 1988; Miyasaka y col., 1989). Por lo tanto, parece que los cambios que se producen deben afectar a sistemas muy específicos de transporte de iones.

Los únicos canales de transporte que se ven inhibidos con la suficiente rapidez para estar relacionados directamente con la entrada del aluminio son los de entrada de Ca^{2+} y posiblemente los de Mg^{2+} (Huang y col., 1992a,b; Ryan y col., 1992). En primer lugar, se observó en trigo que la rápida inhibición de la toma de Ca^{2+} estaba correlacionada con la inhibición del crecimiento de la raíz, siendo además esta inhibición del aluminio sobre el calcio totalmente reversible. Con estos resultados se planteaba la posibilidad del bloqueo por parte del aluminio de los canales de entrada de Ca^{2+} en la membrana celular (Huang y col., 1992a). Con posterioridad, se ha podido caracterizar la inhibición por aluminio de los canales de toma de Ca^{2+} en raíces de trigo (Huang y col., 1994). Sin embargo, en estos estudios se ha comprobado que las diferencias entre genotipos tolerantes y sensibles no residen en el bloqueo de este canal. Se ha sugerido que, como veremos más adelante, el mecanismo de tolerancia se correspondería con la excreción por la raíz de ácidos orgánicos que quelan el aluminio, no pudiendo de este modo inactivar los canales de Ca^{2+} (Huang y col., 1996).

Por el momento, no parece demasiado claro que la inhibición de los canales de Ca^{2+} sea la causa de la inhibición del crecimiento de la raíz. Existen trabajos en los que se ha comprobado, a bajas concentraciones de aluminio (1,5 μM), que existe inhibición del crecimiento radicular, sin bloqueo de los canales de Ca^{2+} (Ryan y col., 1994). Además, se

ha comprobado que la aplicación de otros cationes (Mg^{2+} y Na^+) mejora el crecimiento de la raíz, inhibiendo al mismo tiempo la entrada de Ca^{2+} .

1.3.2 Interacción a nivel intracelular

Desde que se demostró que el aluminio puede entrar rápidamente en el simplasma (Lazof y col., 1994) parecía más factible encontrar la causa primera de su toxicidad por interacciones en el citoplasma.

Frecuentemente, se ha especulado con la posibilidad de que el aluminio interaccione mediante unión con el DNA, interfiriendo en la replicación (Matsumoto y col., 1976; Morimura y Matsumoto, 1978; MacDonald y Martin, 1988). Sin embargo, esta interacción ha sido desestimada al demostrarse que el aluminio tiene una bajísima capacidad de unión al ADN (Martin, 1992).

Posteriormente, la toxicidad del aluminio en el citosol fue desestimada debido a que al pH neutro que existe en el interior celular la mayoría del aluminio estaría como $Al(OH)_4^-$, especie que no es tóxica. Se estima que el Al^{3+} libre en el citoplasma está en un rango de concentraciones de picomolares a nanomolares (Martin, 1988). Estudios recientes han demostrado que estas concentraciones pueden ser suficientes para producir toxicidad como resultado de interacciones con sitios regulados por Mg^{2+} y no tanto por Ca^{2+} (Martin, 1988, 1992). La inhibición de procesos dependientes de Mg^{2+} y Ca^{2+} puede alterar un elevado número de procesos celulares como son: reacciones enzimáticas de transferencia de fosfato, interacciones con el citoesqueleto y procesos de transducción de señal.

Por el momento, se han encontrado numerosas pruebas de la alteración de estos procesos en células animales (MacDonald y col., 1987; MacDonald y Martin, 1988; Martin, 1988, 1992; Shi y Haug, 1992; Shi y col., 1993). En células vegetales existen únicamente datos sobre la interacción entre el aluminio y una ruta que parece estar estrechamente relacionada con el crecimiento de la raíz, como es la de transducción de señal del inositol trifosfato (IP_3). Jones y Kochian (1995) estudiaron la inhibición por aluminio de varios de los enzimas relacionados con esta ruta, comprobando que

únicamente la fosfolipasa C (PLC) era inhibida de manera significativa. Este trabajo es hasta el momento el único que ofrece evidencias de la fitotoxicidad del aluminio en una diana intracelular.

2 Tolerancia al aluminio

La gran variabilidad intraespecífica existente para la tolerancia al aluminio ha servido tanto para desarrollar nuevos cultivares tolerantes al aluminio en diferentes especies vegetales como para estudiar, a nivel fisiológico y bioquímico, este fenómeno. La mayor parte de estos trabajos se han realizado en Triticíneas, y más concretamente en trigo (revisión en Carver y Ownby, 1995). Hasta el momento, se han propuesto dos tipos de mecanismos que explican la tolerancia al aluminio: 1) las plantas tolerantes poseen un sistema de exclusión del aluminio de las raíces y/o 2) disponen de un mecanismo de detoxificación interna.

2.1 Exclusión del aluminio del ápice de las raíces

Varios estudios han aportado diferentes pruebas de que los genotipos tolerantes de trigo excluyen el aluminio de los ápices de sus raíces. Rincón y Gonzales (1992) observaron que los genotipos sensibles acumulan aproximadamente ocho veces más aluminio en el ápice de la raíz que los tolerantes, mientras que estas diferencias no se producen en tejidos maduros. Resultados parecidos se obtuvieron en líneas casi isogénicas (NILs) que diferían únicamente en el locus de tolerancia *Alt1* (Delhaize y col. 1993a) y en otros cultivares con diferente comportamiento ante el aluminio (Tice y col., 1992).

2.1.1 Exclusión por eflujo de ácidos orgánicos

La capacidad de los ácidos orgánicos para quelar el aluminio, produciendo compuestos no tóxicos es bien conocida. Se ha especulado durante bastante tiempo con la posibilidad de que las plantas tolerantes emplearan estos ácidos para detoxificar el aluminio, bien internamente o en la rizosfera. El primer trabajo que evidenció este mecanismo fue realizado en judías (*Phaseolus vulgaris* L.) por Miyasaka y col. (1991),

observando que en la tolerancia al aluminio de esta especie tiene participación la excreción de ácido cítrico. Posteriormente, Delhaize y col. (1993b) demostraron que la tolerancia al aluminio conferida por el locus *Alt1* cosegregaba con la tasa de malato excretado al medio desde el ápice de la raíz. Además, la adición de malato protege a las plantas sensibles al aluminio de su toxicidad (Delhaize y col., 1993b; Basu y col., 1994b). Finalmente, Ryan y col. (1995a) estudiaron la excreción de malato en una gran variedad de cultivares de trigo, proponiendo que este debía ser un sistema generalizado de tolerancia al aluminio en trigo.

Dado que se ha demostrado que no existen diferencias en la tasa de síntesis de malato entre genotipos tolerantes y sensibles de trigo, las diferencias en eflujo deben residir en la capacidad de transportar el malato a través de la membrana en respuesta al aluminio. Por ello, el locus *Alt1* parece candidato para codificar una proteína de un canal de membrana permeable a malato, o bien un componente de la ruta que regularía la actividad de ese canal (Ryan y col. 1995b).

En maíz, se han encontrado genotipos tolerantes que excretan varias veces más cítrico en respuesta al aluminio que los sensibles. El ácido cítrico forma un fuerte complejo con Al^{3+} , siendo más efectivo que el malato en la detoxificación del aluminio (Pellet y col., 1995).

2.1.2 Exclusión por eflujo de fosfatos

Recientemente, Pellet y col. (1996) han investigado la respuesta al aluminio en un cultivar tolerante de trigo (Atlas 66), con control multigénico de la tolerancia, y una NIL tolerante (ET3), portadora únicamente del gen *Alt1*. En Atlas se observó tres veces más resistencia que en ET3, comprobando que en este cultivar, se produce, además de excreción de malato, otra de fosfato inorgánico.

2.1.3 Otros mecanismos de exclusión

En la literatura se citan otra serie de posibles mecanismos de exclusión del aluminio de las raíces. Ejemplos de estos son: el incremento del pH de la rizosfera, el

bajo intercambio catiónico de la pared celular o la existencia de canales de excreción de aluminio en la membrana celular. Aunque las hipótesis de partida son bastante atractivas, no existe, por ahora, ninguna evidencia clara que ratifique alguna de ellas (Taylor, 1991).

2.2 Detoxificación interna

Como se dijo anteriormente, se ha postulado que el mecanismo genérico de tolerancia al aluminio en trigo es la excreción de malato, el cual, no parece necesitar de la inducción de síntesis de proteínas. En cualquier caso, estos datos no excluyen la posibilidad de la existencia de otros mecanismos de tolerancia que requieran esta síntesis inducida por aluminio.

Hasta el momento se han realizado varios trabajos donde se observa la inducción por aluminio de proteínas en los ápices de la raíz de trigo, pero aún no existen claras evidencias de que alguno de esos genes este ligado a la tolerancia al aluminio, siendo la mayoría de ellos inducidos tanto en plantas tolerantes como sensibles. Cruz-Ortega y Ownby (1993) encontraron una proteína de 18 kD inducible por aluminio que mostraba homología con proteínas relacionadas con patogénesis. Esta proteína es inducible por varios tipos de estres distintos del aluminio y en el mismo grado en genotipos tolerantes y sensibles. Basu y col. (1994a) identificaron dos proteínas de 51kD, inducidas a partir de las 24 horas de exposición al aluminio, en la fracción microsomal de ápices de raíz de trigo. Estas proteínas se observaban solo en el cultivar tolerante pero no en el sensible. Debido a que la respuesta a la presencia de aluminio se manifiesta en pocas horas sería necesario demostrar la rápida inducción de estas proteínas para probar su participación directa en la tolerancia.

Finalmente, comparando patrones de expresión de proteínas de la fracción microsomal en líneas tolerantes y sensibles de trigo se observa que todos los cambios diferenciales en la expresión están asociados a las líneas sensibles al aluminio, sugiriendo que la tolerancia al aluminio en trigo debe consistir en la expresión constitutiva de ciertos genes (Somers y Gustafson, 1995).

En el campo de la biología molecular se han realizado aún muy pocos trabajos. Se han clonado siete c-DNAs (*wali1-7*) que proceden de los correspondientes mRNAs inducibles por aluminio en raíces de plantas sensibles (Snowden y Gardner, 1993; Richards y col., 1994). La deducción de las secuencias de las proteínas codificadas por estos genes indican la existencia de homologías con diversas proteínas y familias de proteínas relacionadas con estrés, como son: “metalotionin-like”, fenilalanina amonio liasa, inhibidores de proteínas y aspartato sintetasa. Todos estos genes presentan un grado de inducción proporcional al grado de estrés al que han sido sometidas las plantas, pero salvo el caso de *wali2*, no existen diferencias entre los genotipos tolerantes y sensibles.

3 Genética de la tolerancia al aluminio

La tolerancia al aluminio ha sido investigada en la mayoría de las especies cultivadas, habiéndose encontrado una gran variabilidad (revisión en Duke, 1982). Dentro de los cereales, el centeno y la avena son las especies más tolerantes al aluminio, mientras que el trigo y la cebada se han descrito como poco tolerantes. Los triticales presentan, por lo general una tolerancia intermedia entre las de sus progenitores e incluso más próxima al trigo. Además de la variación descrita entre especies, existe una gran variabilidad intraespecífica para el grado de tolerancia entre cultivares (revisión en Aniol y Gustafson, 1990).

A pesar de la abundancia de información sobre variabilidad en la respuesta al estrés por aluminio en especies vegetales, la información sobre sistemas genéticos que controlen estas respuestas es muy limitada y fragmentaria. La mayoría de los datos disponibles versan sobre trigo. Por ello, en primer lugar presentaremos estos datos, para posteriormente resumir los avances obtenidos en otras especies vegetales.

3.1 Genética de la tolerancia al aluminio en trigo

3.1.1 Control genético en trigo

En referencia al control genético de la tolerancia al aluminio en trigo la información es bastante fragmentaria. Lafever y Campbell (1978) analizaron la herencia de la tolerancia al aluminio empleando diferentes cruzamientos F1, F2 y retrocruzamientos entre dos variedades tolerantes y dos sensibles, teniendo todas diferentes procedencias. En este trabajo eran capaces de seleccionar plantas sensibles en la F2, mientras que la selección de plantas tolerantes medias era menos eficiente. Estos resultados demostraban que si bien en la herencia de la tolerancia al aluminio debía existir un gen de efecto fuerte no podía descartarse la existencia de otros con efecto menor. Posteriormente, Campbell y Lafever (1981) estudiaron 48 poblaciones F1 procedentes de 16 parentales diferentes de trigo, concluyendo que la variabilidad genética observada entre los cruzamientos tiene una gran proporción de componentes aditivos y altamente heredables. Otro trabajo realizado por Aniol (1984) apoya el control multigénico de la tolerancia al aluminio, pues en cruzamientos entre variedades tolerantes brasileñas y variedades sensibles polacas de trigo observa diferentes grados de tolerancia.

Existen otra serie de trabajos donde se describe el control del carácter por un gen dominante en diferentes cultivares (Kerridge y Kronstad, 1986; Fisher y Scott, 1987; Larkin, 1987). Apoyando estos resultados están las segregaciones 3:1 (tolerante:sensible) observadas en diversos descendencias F2 en trigo (Delhaize y col., 1993a; Sommers y Gustafson, 1995).

Recientemente, ha sido posible identificar en el cultivar de trigo brasileño BH 1146 un gen responsable de la tolerancia al aluminio, denominado *Alt_{BH}* (Riede y Anderson, 1996). Este gen ha sido ligado a un marcador RFLP situado en el brazo *4DL* a una distancia de 1,1 cM.

3.1.2 Localización cromosómica de genes de tolerancia al aluminio en trigo

Slootmaker (1974) analizó el grado de tolerancia al aluminio de los diferentes genomios del trigo hexaploide estudiando distintas variedades, con diferente nivel de

ploidía. En los trigos diploides y hexaploides encontró variabilidad, mientras que los trigos tetraploides eran uniformemente sensibles. Con estos resultados se concluía la existencia de factores de tolerancia en los genomas A y D y no en el B, donde podrían existir genes supresores de los de expresión de la tolerancia al aluminio.

Gracias a la existencia de las series aneuploides de trigo hexaploide se han realizado varios intentos de asignar los genes de tolerancia en trigo a cromosomas concretos. Polle y col. (1978) localizaron un gen de tolerancia al aluminio en el cromosoma *4D* del cultivar "Chinese Spring". Posteriormente, empleando las líneas ditelosómicas y nulitetrasómicas se han localizado genes mayores de tolerancia al aluminio en los cromosomas *2DL*, *4DL* y *5AS* (Takagi y col., 1983) y una serie de genes menores en los cromosomas *6AL*, *7AS*, *3DL*, *4AL* y *7D* (Aniol y Gustafson, 1984). También se han localizado factores genéticos en *5AS* que controlan la expresión de los genes situados en *2DL* y *4DL* y otros factores en *6BS* con efecto supresor de la tolerancia al aluminio (Aniol, 1990).

A la luz de todos estos datos se deduce que la tolerancia al aluminio en trigo es un fenómeno de extrema complejidad. Por el momento, solo parece posible afirmar que existe un control multigénico con varios genes mayores y una serie de genes menores, que probablemente son capaces de modular el efecto de los anteriores.

3.2 Genética de la tolerancia al aluminio en otras especies vegetales

Mediante la realización de cruzamientos entre variedades tolerantes y sensibles se han tratado de identificar genes de tolerancia en diversas especies. En cebada se determinó la existencia de un único gen dominante localizado en el cromosoma *4H* (Reid, 1970; Stolen y Anderson, 1978). En maíz, se identificó la existencia de un gen multialélico (Rhue y col., 1978), mientras que en sorgo se observó la presencia de una serie de genes, al menos tres, con efecto aditivo (Bastos, 1982; Boye-Gone y Marcarian, 1985). En *Phalaris aquatica* se postuló una hipótesis con la acción de dos loci, requiriendo al menos un alelo dominante por locus para expresar la tolerancia (Culvenor y col., 1986).

En otras especies, como cebolla (Horst, 1985), alfalfa (Bauton y col., 1986) y algodón (Kennedy y Smith, 1986) se ha descrito la existencia de un control genético para la tolerancia al aluminio, pero sin poder identificar el número de genes implicados.

Mediante experimentos de mutagénesis en *Arabidopsis thaliana*, han sido identificados ocho mutantes sensibles al aluminio (*als1-als8*) constituyendo ocho diferentes grupos de complementación. Todas las mutaciones se han comportado como recesivas, a excepción de *als5* que presenta semidominancia. Dos de los mutantes, *als1* y *als4*, han podido ser localizados en el cromosoma 5 y ligados a dos microsatélites a 8-9cM y 2-3cM, respectivamente (Larsen y col., 1996).

3.3 Genética de la tolerancia al aluminio en centeno

El centeno (*Secale cereale* L. $2n=14$) pertenece a la tribu *Triticeae*, dentro de la cual se encuentra la subtribu *Triticinae*, donde se incluyen, además de *Secale*, los géneros *Triticum* y *Aegilops*. El género *Secale* cuenta con un gran número de especies y subespecies, siendo *Secale cereale* la única cultivada.

Este cereal presenta una serie de características muy favorables para su cultivo en suelos marginales (tolerancia a suelos ácidos, a la salinidad, al frío, etc. y diversas resistencias). Esta es la razón por la cual, pese a tener un valor nutricional más bajo que otros cereales, es cultivado en amplias zonas del centro y norte de Europa. Además, al tratarse de una especie afín al trigo, se emplea para introducir en trigo alguna de estas características de interés agronómico, utilizando como puente los triticales.

El centeno es, como dijimos previamente, una especie altamente tolerante a elevadas concentraciones de aluminio (Aniol y col., 1980; Aniol y Madej, 1996; Pinto-Carnide y Guedes-Pinto, 1996). No obstante, solamente existen datos de localización cromosómica, sin haber identificado en cruzamientos la presencia de genes de tolerancia al aluminio. En el trabajo anteriormente citado de Aniol y Gustafson (1984) se emplean las líneas de adición trigo "Chinese Spring" - centeno "Imperial" localizando los principales genes de tolerancia al aluminio en *3R*, *6RS* y *4R*. Además, mediante el estudio de estas líneas y de diferentes triticales observan que la expresión de los genes de

tolerancia al aluminio de centeno es reducida por la acción de genes de trigo. Posteriormente, empleando las líneas de sustitución trigo "Holdfast" - centeno "KingII" observan que dependiendo del cromosoma de trigo sustituido esta inhibición es mayor o menor (Aniol 1986). Así, la sustitución del cromosoma *6R* es más efectiva cuando es por *6D*, algo menos por *6A* y cuando es por *6B* no existe tolerancia. De estos resultados se desprende que la posible introducción de genes de tolerancia al aluminio, procedentes de centeno, en trigo no será siempre un proceso simple.

La mejora de los trigos y triticales requiere el conocimiento previo del control genético de la tolerancia al aluminio en el trigo y en el centeno y la localización de los genes responsables de los mecanismos de la tolerancia en estas especies, así como su expresión en los híbridos. Por el momento, son muy escasos los datos sobre el control genético de la tolerancia al aluminio en centeno (Aniol y Madej, 1996), y no ha sido posible identificar ningún marcador genético ligado a un gen de tolerancia al aluminio en esta especie.

4 Marcadores genéticos

La obtención de marcadores genéticos estrechamente ligados a los genes de interés constituye una herramienta que apoya y agiliza considerablemente los procesos de mejora. Además, estos marcadores pueden permitir, a más largo plazo, el aislamiento del gen o genes implicados en estas respuestas, facilitando el conocimiento del mecanismo de acción y su posible introducción en otros cultivares y especies relacionadas, mediante transformación.

Los marcadores genéticos pueden clasificarse en tres grupos: morfológicos, cromosómicos y moleculares. En el grupo de los marcadores moleculares se podría establecer una subdivisión en marcadores proteínicos y de ADN. En este trabajo se han empleado marcadores moleculares.

4.1 Marcadores morfológicos

Los primeros marcadores genéticos empleados en plantas fueron diversos caracteres morfológicos tales como coloración, talla, morfología foliar, etc. Este tipo de marcadores presentan una serie de desventajas que reducen su utilidad. Por lo general son caracteres determinados por varios loci, es necesario el desarrollo de la planta hasta la madurez, su expresión puede estar influenciada por el ambiente y presentan frecuentemente modificaciones epistáticas. Pese a esto, un importante número de marcadores de este grupo, que presentan control monogénico y son de fácil clasificación, son empleados habitualmente.

4.2 Marcadores cromosómicos

Dentro de este grupo se encuentran, además de diferentes tipos de bandeos cromosómicos, mutaciones tales como las translocaciones o las inversiones, que originan alteraciones en los grupos de ligamiento. Si bien su empleo no está muy extendido son fundamentales en la construcción de mapas físicos. En la actualidad se está produciendo un auge en la utilización de marcadores cromosómicos debido al desarrollo de técnicas de hibridación "in situ" (FISH) (Cuadrado y Jouve, 1994; Nennó y col., 1994; Jiang y col., 1995).

4.3 Marcadores moleculares

4.3.1 Isoenzimas y proteínas de reserva

El desarrollo de las técnicas electroforéticas ha permitido el análisis de la variabilidad genética existente a nivel de proteínas. Diferentes variantes alélicas de un mismo gen pueden presentar distinta carga neta debido a modificaciones en la estructura primaria de las proteínas. Las más empleadas son las isoenzimas, que son distintas formas moleculares de la misma enzima que muestran idéntica o similar especificidad de sustrato (Market y Moller, 1959).

El uso de este tipo de marcadores presenta una serie de ventajas, como son:

- Se estudia de manera directa el producto génico.

- Estan poco o nada influenciados por el ambiente.
- Muestran en la mayor parte de los casos codominancia. A cada fenotipo le corresponde un genotipo determinado.
- No suelen presentar modificaciones de tipo epistático.
- Se posibilita el análisis de un elevado número de individuos en un tiempo relativamente corto y de manera no destructiva.

Sin embargo estos marcadores conllevan también varios inconvenientes:

- Solo un tercio de todos los cambios aminoacídicos son detectables mediante electroforesis (Lewontin, 1974).
- Pueden existir modificaciones postraduccionales que provoquen cambios en la movilidad electroforética.
- El número de marcadores proteínicos es bastante limitado, ya que solo se analizan genes con información para proteínas solubles.

4.3.2 Marcadores de ADN

El desarrollo de técnicas para la manipulación de fragmentos específicos de ADN ha permitido el descubrimiento de un gran número de marcadores basados en los polimorfismos para secuencias o fragmentos de ADN. Este tipo de estudios tiene la ventaja de analizar directamente el material hereditario y no su manifestación fenotípica. Entre estos marcadores se encuentran los RFLPs, los basados en PCR y los AFLPs.

a) RFLPs

Este fue el primer tipo de marcadores de ADN desarrollado. Los RFLPs se basan en el empleo de endonucleasas de restricción para digerir el ADN. La variación se detecta en función del cambio de tamaño de los fragmentos de ADN digeridos que hibridan con una sonda. Estos cambios se deben a alteraciones en las dianas que reconocen las endonucleasas o a inserciones y deleciones que afectan a la zona de reconocimiento de la sonda (Botstein y col. 1980). El ADN digerido puede ser genómico o mitocondrial.

Presentan las mismas ventajas que los marcadores proteínicos. Además, el hecho de que el número de sondas utilizables sea prácticamente ilimitado y que estos marcadores sean, por lo general, de carácter codominante, han sido características responsables del extendido uso de los RFLPs en estudios genéticos.

Por otra parte, esta tecnología supone un proceso largo y costoso, siendo además necesario, en la mayor parte de los casos, el empleo de radiactividad. Además, la mayoría de las sondas se obtienen a partir de cDNAs, abarcando una porción limitada del genoma, sobre todo en especies con un elevado porcentaje de ADN repetido.

b) Marcadores basados en la PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y col., 1986) supone la amplificación enzimática del número de copias de un segmento de ADN situado entre dos oligonucleótidos que actúan como cebadores. Es un proceso simple en el que el ADN se desnaturaliza y se une a un par de oligonucleótidos específicos que suministran extremos 3'-OH a una polimerasa de ADN termoestable capaz de replicar el segmento de ADN comprendido entre las secuencias diana de los cebadores. El principal inconveniente de esta técnica es que requiere el conocimiento previo de la secuencia a amplificar. Para solventar este problema se desarrollaron una serie de variantes de la técnica, como son: RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams y col., 1990), AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR) (Welsh y McClelland, 1990) y DAF (DNA Amplification Fingerprinting) (Caetano-Anollés, 1993). Todas ellas se basan en el empleo de cebadores de secuencia al azar y la principal diferencia reside en la forma de visualización de los productos amplificados. Una revisión comparativa de los tres métodos la realiza Caetano-Anollés (1994).

Con posterioridad se han desarrollado otro tipo de marcadores basados en la detección de microsatélites (Tautz, 1989, Weber y May, 1989). Los microsatélites, o secuencias cortas repetidas en tandem un número variable de veces (VNTRs), son muy abundantes y se encuentran dispersos por el genoma. En este caso, se detecta la variación en el número de repeticiones del tandem mediante amplificación, empleando cebadores complementarios a las regiones flanqueantes al microsatélite.

- **RAPDs**

El uso de RAPDs supone la utilización para la reacción de amplificación de oligonucleótidos decámeros de secuencia arbitraria que permiten amplificar distintas regiones del genoma. El polimorfismo encontrado puede producirse por la existencia de inserciones o deleciones dentro del segmento amplificado, aunque en general es consecuencia de mutaciones puntuales que afectan a nucleótidos de las secuencias diana del cebador (Vierling y Nguyen, 1992).

Estos marcadores presentan una serie de ventajas que los han convertido en uno de los más empleados en la actualidad:

- El método es sencillo, rápido y con costes inferiores a los de los RFLPs.
- No requiere el empleo de radiactividad.
- Se emplean cantidades mínimas de ADN molde.
- El número de marcadores puede ser prácticamente ilimitado.

Sin embargo, los RAPDs presentan también una serie de inconvenientes, que en algunos casos son comunes a todos los marcadores basados en la PCR:

- En la mayor parte de los casos muestran una herencia de tipo dominante.
- Pueden aparecer fragmentos de ADN, de igual tamaño, amplificados de diferentes individuos, que tengan diferentes secuencias.
- Pueden presentarse problemas de contaminación.
- Se ha comprobado que pueden producirse diferencias en los perfiles de amplificación debidas a diversos factores, como son: las concentraciones de los diversos componentes de la mezcla de reacción, la DNA polimerasa empleada o el tipo de termociclador (Devos y Gale, 1992, Yu y Pauls, 1992). Esta es la razón por la cual el protocolo empleado debe seguirse de manera muy estricta.

Pese a estos problemas, el gran número de trabajos en los que se han utilizado estos marcadores, demuestran la utilidad de esta metodología (Revisión en Smith y Williams, 1994).

Con posterioridad, se ha desarrollado la técnica de los SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) (Paran y Michelmore, 1992), también llamados STS (Sequence Tagged Sites) (Olson y col., 1989). Consiste en la secuenciación de los segmentos de ADN de interés amplificados mediante RAPDs y el diseño de oligonucleótidos de mayor tamaño (20-25 pb) para realizar amplificaciones específicas de estos fragmentos. De este modo los RAPDs pueden ser transformados en codominantes mediante digestión con enzimas de restricción. Además, la amplificación específica de estos fragmentos aumenta su repetibilidad, y por consiguiente su fiabilidad.

c) AFLPs

Los AFLPs (Amplification Fragment Length Polymorphism) es una metodología de reciente aparición (Zabeau y Vos, 1994; Vos y col., 1995), que combina características de los RFLPs y de los marcadores basados en la PCR. Para la identificación de polimorfismo de fragmentos de restricción emplea la amplificación de fragmentos previamente digeridos. El procedimiento empleado se puede dividir en tres pasos:

1. Restricción y ligamiento: el ADN genómico es digerido con dos enzimas de restricción. Los fragmentos digeridos son ligados a unos adaptadores de doble hebra, específicos de las secuencias que han quedado en los extremos por la restricción.
2. Amplificación preselectiva: las secuencias de los adaptadores sirven de sitios de unión para esta amplificación. Cada uno de los dos cebadores empleados tiene un nucleótido selectivo en 3'-OH que reconocerá solamente la parte de los fragmentos digeridos que tengan este nucleótido. De esta forma se reduce la complejidad de la mezcla de fragmentos para obtener así un número razonable que pueda ser posteriormente resuelto mediante electroforesis.
3. Amplificación selectiva: La complejidad de la mezcla de PCR es nuevamente reducida y los fragmentos son marcados mediante la realización de una segunda amplificación con cebadores selectivos marcados con radiactividad o fluorescencia. Estos cebadores tienen tres nucleótidos selectivos en 3'-OH. El primero es el mismo que se empleó en la primera amplificación, y los dos

restantes pueden ser alguna de las 16 combinaciones posibles de los cuatro nucleótidos.

Finalmente, los productos son resueltos mediante electroforesis en geles de secuenciación.

Su mayor ventaja reside en la posibilidad de analizar cientos de fragmentos de ADN al mismo tiempo. Por contra, esta técnica es más laboriosa que los RAPDs, requiriendo además un importante desembolso económico.

4.4 Empleo de marcadores moleculares en mejora vegetal

Como dijimos previamente, los marcadores moleculares son piezas clave en el desarrollo de los mapas genéticos, de gran utilidad en programas de mejora vegetal. En la actualidad, existen mapas bien desarrollados en diferentes especies vegetales, como son: Alfalfa (Echt y col., 1993; Kiss y col., 1993), *Arabidopsis thaliana* (Reiter y col., 1992; Hauge y col., 1993), arroz (Causse y col., 1994), avena (O'Donoughue y col., 1992), *Brassica oleraceae* (Slocum y col., 1990), cebada (Heun y col., 1991; Graner y col., 1991; Kleinhofs y col., 1993), centeno (Devos y col., 1993a; Phillipp y col., 1994), lechuga (Kesseli y col., 1994), maíz (Beavis y Grant, 1991), sorgo (Pereira y col., 1994; Ragab y col., 1994), tomate (Tanksley y col., 1992) y trigo (Chao y col., 1989; Liu y Tsunewaki, 1991; Devos y col., 1992, 1993a, 1993b; Chen y col., 1994).

La aparición de los marcadores de ADN ha posibilitado la construcción de mapas saturados. Así, se han conseguido mapas de estas características en especies de importancia económica como tomate y patata (Bernatzky y Tanksley, 1986; Tanksley y col., 1992) o arroz (Causse y col., 1994). Su utilidad principal reside en la obtención de marcadores genéticos, estrechamente ligados a genes de interés agronómico, que permitan la realización de programas de mejora asistidos por estos marcadores.

Se han desarrollado diferentes procedimientos para saturar de marcadores específicamente las regiones del genoma de interés. De este modo se reduce notoriamente el tiempo y el dinero invertidos en estos trabajos al no tener que construir

mapas genéticos completos. La obtención de líneas casi isogénicas (NILs), que solamente difieren en la zona de interés es un procedimiento con el que se han localizado genes como Tm-2a, de resistencia a virus en tomate (Young y Tanksley, 1989), un gen de aroma en arroz (Ahn y col., 1992) o el gen de la resistencia a la roya de la hoja (LT9) en trigo (Schachermayr y col., 1994). Esta estrategia requiere la realización de cruzamientos entre individuos con diferente genotipo para el carácter en estudio y de una serie de retrocruzamientos por uno de los parentales.

Una segunda aproximación consiste en la simulación de bloques de genotipos de forma análoga a las NILs. Arnheim y col. (1985) describieron el empleo de bloques de muestras de genotipos para identificar polimorfismos que estaban en desequilibrio de ligamiento. En este caso, el análisis se realiza empleando dos mezclas de muestras derivadas de una población segregante para el locus de interés, que se origina a partir de un único cruzamiento. Cada mezcla contiene individuos con idéntico genotipo para el locus estudiado pero genotipo al azar para el resto de regiones del genoma. Así, las dos mezclas diferirán genéticamente solo en la región seleccionada. En la figura 1 se muestra un ejemplo, en el análisis de una descendencia F2 procedente del cruzamiento de dos individuos que difieren en un carácter dominante o uno codominante. Los bloques se obtienen a partir de la mezcla de varios individuos de la F2 con idéntico fenotipo. En ambos casos se muestran cuatro fragmentos de RAPDs amplificados en dos parentales y en sus descendencias F1 y F2. El locus a, que no está ligado al gen de tolerancia, y el locus d, que no segrega, aparecen en los dos bloques. Los fragmentos amplificados en los loci b y c están ligados al locus de interés. En el caso de los bloques realizados a partir del carácter dominante, el locus b no aparece como diferencial entre los bloques por encontrarse ligado en repulsión respecto del carácter.

Empleando este análisis de bloques segregantes (BSA) se han podido identificar rápidamente marcadores ligados a genes como el de la resistencia al downy mildew (Dm5/8) en lechuga (Michelmore y col., 1991) o a un gen que determina la maduración del fruto en tomate (Giovannoni y col., 1991).

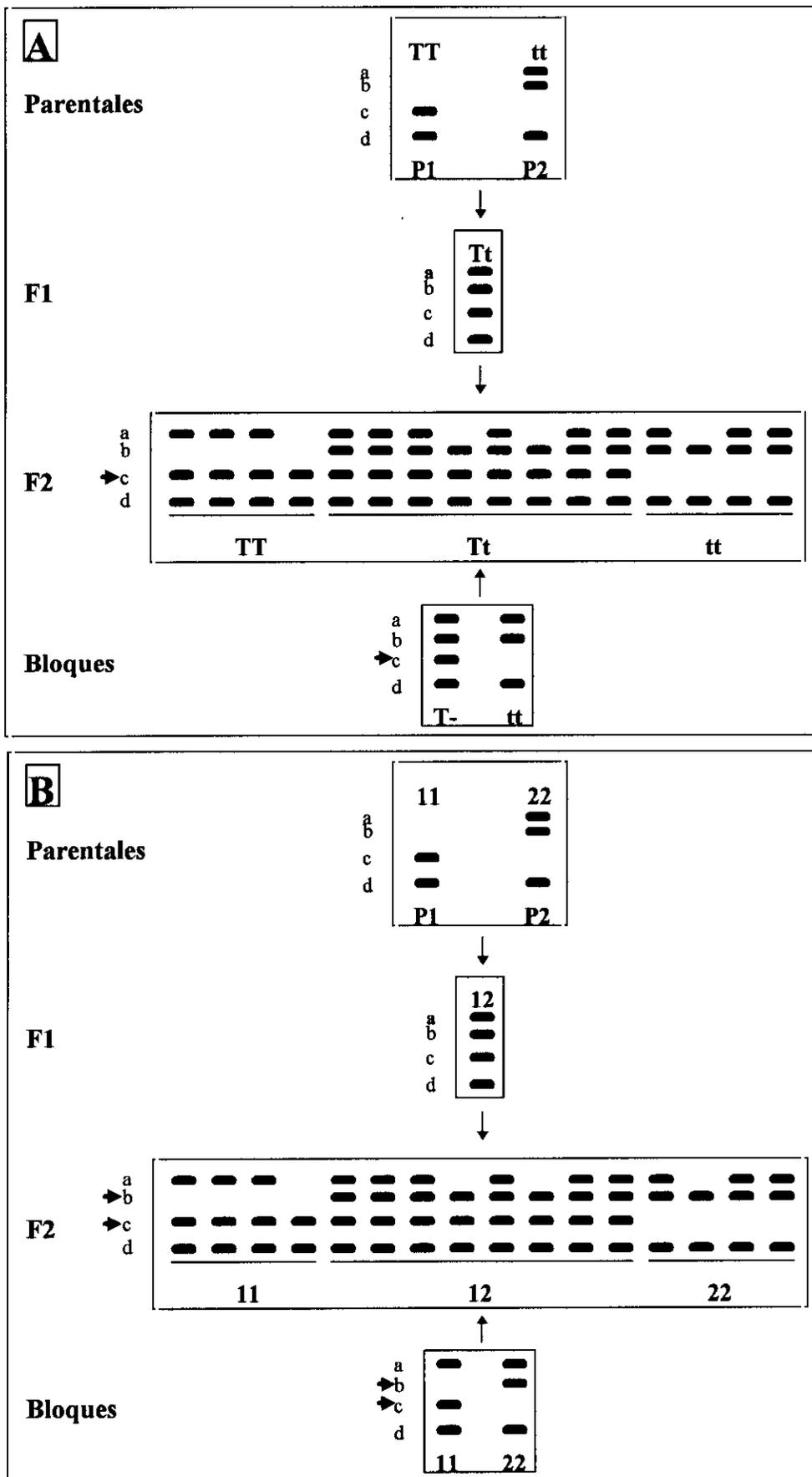


Figura 1.- Esquema de la base genética del análisis de bloques segregantes (BSA) en F2 de un carácter A) dominante y B) codominante.

Uno de los campos que están mostrando un mayor desarrollo gracias a la obtención de estos mapas o regiones saturadas de marcadores es el estudio de loci de caracteres cuantitativos (QTLs). Así, se han podido conseguir marcadores estrechamente ligados a diversos QTLs como por ejemplo los que determinan características forrajeras del maíz (Melchinguer y col., 1993), del arroz (Ahn y col., 1993) o relacionados con la resistencia a hongos, la altura de la planta o la fecha de espigado (Backes y col., 1995).

La finalidad última de la obtención de estos marcadores moleculares sería el aislamiento del gen o genes de interés. En el caso de especies como el centeno con un elevado porcentaje de secuencias repetidas (Flavell y col., 1974; Flavell, 1982) esta meta no es sencilla, ya que pequeñas distancias genéticas suelen suponer grandes distancias físicas. Hasta el momento, basándose en marcadores estrechamente ligados, se han conseguido clonar genes en especies con genomas más pequeños, como es un gen implicado en el metabolismo de ácidos grasos en *Arabidopsis thaliana* (Aronel y col., 1992) y un gen de resistencia a *Pseudomonas syringae* en tomate (Martin y col., 1993).

4.5 Localización cromosómica y mapas en centeno

Los trabajos de localización cromosómica en centeno han sido realizados empleando líneas disómicas de adición trigo-centeno, líneas ditelocéntricas de adición trigo-centeno, líneas de sustitución trigo-centeno, translocaciones o análisis de ligamiento con loci previamente localizados. Este tipo de análisis también puede ser llevado a cabo en líneas de adición centeno-trigo, líneas trisómicas y telotrisómicas o a través de análisis de ligamiento con bandas C o hibridación "in situ".

En centeno han sido localizados marcadores genéticos en todos los cromosomas del complemento haploide. A pesar de ser bastante amplio el número de marcadores localizados, el número de mapas genéticos realizados es aún escaso (Revisión de Melz y col, 1992; Liu y col. 1992; Alonso-Blanco y col. 1993a, 1993b, 1994; Devos y col. 1993a,b; Philip y col., 1994; Van Deynze y col., 1995; Wanous y Gustafson, 1995).

Hasta el momento, son escasos los trabajos en centeno en los que haya sido empleada la PCR (Rogowsky y col., 1992; Koebner, 1995; Lee y col., 1996) y en concreto la

amplificación mediante RAPDs, para la construcción de mapas (Iqbal y Rayburn, 1995; Loarce y col., 1996). Esta técnica, debido a su capacidad de producir un número ilimitado de marcadores de modo rápido, debe convertirse en una herramienta eficaz para la generación de mapas genéticos saturados en centeno y otras especies vegetales con elevado contenido en ADN.

Objetivos

Considerado el interés del centeno como especie donadora de tolerancia al aluminio a trigos y triticales, el presente trabajo pretende profundizar en el conocimiento de la genética de este proceso en dicha especie.

Son objetivos de esta tesis:

1. El estudio de la tolerancia al aluminio en diferentes poblaciones de centeno.
2. La investigación del control genético de la tolerancia al aluminio en centeno.
3. La obtención de marcadores moleculares ligados a genes de tolerancia al aluminio en centeno.

Material y Métodos

1 Material Vegetal

El material vegetal empleado en la realización de este trabajo ha sido el siguiente:

- Los análisis de tolerancia al aluminio se realizaron en plantas de dos cultivares de centeno: Ailés (A) y JNK (J) y de dos líneas consanguíneas: Pool (P) y Riodeva (R), con más de 30 generaciones de autofecundación.
- En la investigación del control genético de la tolerancia al aluminio se emplearon cinco generaciones F1 (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR6) obtenidas a partir de cruzamientos entre las cinco plantas de Ailés (7^{II} en meiosis) más tolerantes al aluminio con plantas de Riodeva. Además, se analizaron cinco retrocruzamientos de plantas de estas F1 por la línea Riodeva (AR1.5xR, AR1.7xR, AR1.11xR, AR2.6xR y AR4.6xR) y seis descendencias F2 procedentes de la autofecundación de otras tantas plantas de las F1 (AR1.13⊗, AR1.15⊗, AR2.14⊗, AR3.14⊗, AR4.18⊗ y AR6.17⊗). En la figura 2 se muestra un esquema de estos cruzamientos.

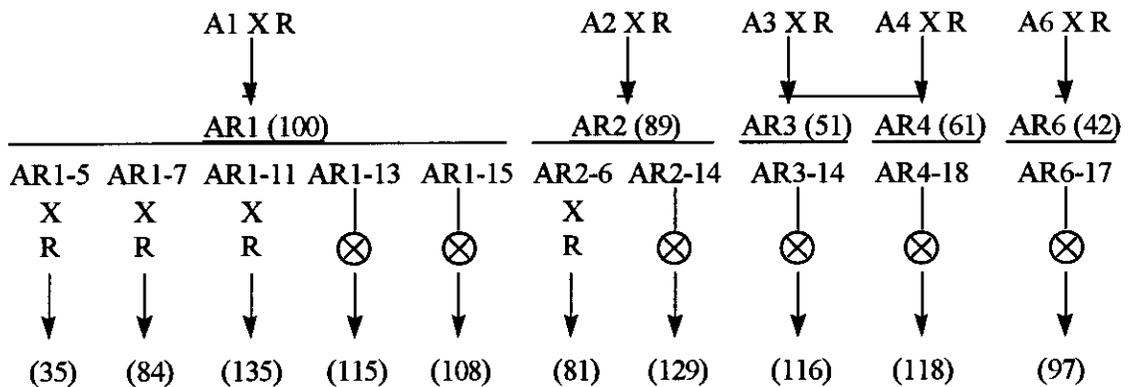


Figura 2.- Esquema de los cruzamientos realizados en este trabajo.

- Para la construcción de mapas de ligamiento se emplearon dos de las descendencias F2 anteriormente citadas (AR1.13⊗ y AR6.17⊗).
- En los trabajos de asignación cromosómica de los marcadores moleculares se utilizó el siguiente material:
 - *Triticum aestivum* L., cv. "Chinese spring" (CS) 2n=42.
 - *Secale cereale* L., cv. "Imperial" (I) 2n=14.

- Las siete líneas disómicas de adición de *Triticum aestivum* L., cv. "Chinese spring" y *Secale cereale* L., cv. "Imperial": 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R.
- Las líneas ditelocéntricas de adición de *Triticum aestivum* L., cv. "Chinese spring" y *Secale cereale* L., cv. "Imperial": 1RS, 1RL, 2RL, 3RS, 4RL, 5RL, 6RL, 7RS y 7RL.
- El anfiploide de *Triticum aestivum* L., cv. "Chinese spring" y *Secale cereale* L., cv. "Imperial" (CS-I) $2n=56$.

Este material fue cedido por el Doctor Lukaszewski (Universidad de California).

2 Test de tolerancia al aluminio

En los ensayos de tolerancia al aluminio se empleó un método de pulso de aluminio (Aniol, 1981). El procedimiento fue el siguiente:

Las semillas eran esterilizadas con HgCl_2 al 0,1% durante diez minutos. Una vez lavadas abundantemente con agua, las semillas eran puestas a germinar toda la noche sobre papel de filtro. Los granos que habían germinado se sembraban al día siguiente en una malla de polietileno con flotadores. Estos bloques se situaban en la superficie de una solución de nutrientes vigorosamente aireada, a 25°C y con luz incandescente continua a $12\text{W}/\text{m}^2$. La composición de la solución de nutrientes era: CaCl_2 0,4 mM, KNO_3 0,65 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,01 mM y NH_4NO_3 0,04mM. Esta solución, debía mantenerse a pH $4,0 \pm 0,1$, sustituyéndola dos veces al día. A los cuatro días, las plántulas se cambiaban a la misma solución con aluminio $[\text{AlK}(\text{SO}_4)_2]$, a distintas concentraciones. Después de 24h en este medio las raíces de las plántulas eran abundantemente lavadas con agua durante 3 minutos y posteriormente teñidas con Eriocromo de cianina R al 0,1% (p/v) durante 10 minutos. De esta forma, se teñían los ápices de las raíces. Las plántulas se transferían a la solución sin aluminio para su recuperación durante 48h. Finalmente, se procedía a medir el crecimiento adicional de la raíz desde el punto en que se teñió con anterioridad.

3 Electroforesis de isoenzimas

Para la resolución de los sistemas isoenzimáticos empleados en este trabajo se utilizó la técnica de electroforesis horizontal en geles de almidón al 12% (p/v). El sistema de tampones era discontinuo y se aplicaba un voltaje constante. Las electroforesis se llevaron a cabo en dos sistemas de tampones diferentes: Poulik e histidina.

En el sistema Poulik, el tampón de los electrodos fue Bórico-NaOH (0,3M, pH 8,6) y el del gel fue Tris-cítrico (0,015M pH 7,75). Las condiciones de electroforesis fueron 250V durante 3 horas a 4°C. En dicho sistema se tiñeron los isoenzimas de Esterasas (EST), Fosfoglucomutasa (PGM) y Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT).

En el sistema Histidina el tampón de los electrodos fue Tris-cítrico (0,043 M, pH 7,0) y el tampón del gel fue Histidina-ClH (0,006M, pH 7,0). Las condiciones de electroforesis fueron 150V durante cinco horas a 4°C. Las isoenzimas resueltas en este sistema fueron: Leucin aminopeptidasa (LAP), Malato deshidrogenasa (MDH), Aconitasa (ACO) y NADH-deshidrogenasa (NDH).

Los geles de almidón eran de 1cm de espesor, cortandose en lonchas de 2mm. De esta manera se podía realizar la tinción en cada loncha para un isoenzima diferente.

Estos siete sistemas isoenzimáticos fueron seleccionados por presentar loci previamente localizados en los cromosomas *3R*, *4R* y *6R*, en los cuales esta descrita la presencia de genes relacionados con la tolerancia al aluminio en centeno. En la Tabla 1 se muestran algunas características de estos sistemas, como son, su código y estructura molecular.

Los isoenzimas de NDH fueron también resueltos mediante electroforesis verticales en geles de acrilamida-bisacrilamida (29:1) al 12% (p/v), urea 8M, TEMED 0,5 µl/ml, persulfato de amonio 60 µg/ml, siendo el tampón del gel y el de la cubeta los mismos que los empleados en almidón. Las condiciones de electroforesis fueron de 20 mA durante 4h.

Isoenzima	Símbolo	Código	Estructura molecular
Esterasas	EST	(3.1.1.-)	monomérica
Fosfoglucomutasa	PGM	(2.7.5.1)	monomérica
Glutamato oxalacetato transaminasa	GOT	(2.6.1.1)	dimérica
Leucin aminopeptidasa	LAP	(3.4.1.1)	monomérica
Malato deshidrogenasa	MDH	(1.1.1.37)	monomérica dimérica
Aconitasa	ACO	(4.2.1.3)	monomérica
NADH-deshidrogenasa	NDH	(1.6.2.2)	monomérica tetramérica

Tabla 1.- Código y estructura molecular de los sistemas isoenzimáticos empleados.

Los métodos de tinción empleados fueron, básicamente, los descritos por : Shaw y Koen (1968) para EST; Brewer y Singh (1970) para MDH, PGM y LAP; Chenicek y Hart (1987) para ACO; Nielsen y Johansen (1986) para NDH y Selander y col. (1971) para GOT.

4 Técnicas moleculares

4.1 Técnicas generales

Los procedimientos más comunes en la manipulación del ADN, como extracciones con fenol/cloroforno, precipitaciones con etanol y electroforesis en geles de agarosa se realizaron según Sambrook y col. (1989).

El sistema tampón empleado para todas la electroforesis en geles de agarosa de este trabajo fue TAE (Tris-Acetato 0'04M, EDTA 0'001M). Las condiciones de electroforesis fueron de 3-4 V/cm (medido como la distancia entre los electrodos) durante 2-3 horas. La detección de los productos de amplificación se hizo por tinción con Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml).

4.2 Aislamiento de ADN total

El aislamiento y purificación del ADN genómico se realizó según el método descrito por Dellaporta y col. (1983), con modificaciones. Se realizaron extracciones de plantas individuales, y para la obtención de alguno de los marcadores de RAPDs se emplearon

mezclas de plantas. Para hacer estas extracciones conjuntas se pesaban hojas de 15 plantas (0,1 g/planta) previamente clasificadas con igual genotipo para el locus analizado en cada caso. La metodología seguida a partir de este punto era igual a la de plantas individuales.

El material se congelaba con N₂ líquido, se pulverizaba en mortero con un tampón de extracción (Tris-ClH 100 mM, pH 8; EDTA 50 mM, pH 8 y NaCl 500 mM) y se sometía a un tratamiento con SDS al 20% (p/v) a 65°C. El siguiente paso era añadir acetato potásico 5M, incubando a 0°C. Tras centrifugar a 25.000 xg el sobrenadante se purificaba con alcohol isopropílico durante al menos media hora a -20°C. Posteriormente, se centrifugaba a 20.000 xg para precipitar el ADN tras lo cual se resuspendía con TE 50:10 (Tris 50 mM, EDTA 10 mM pH 8). El ADN resuspendido se trataba con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y con RNasa A (10mg/ml). A continuación, el ADN se precipitaba con acetato sódico 3 M y CTAB al 1% (p/v). Finalmente, se llevaba a cabo un lavado del ADN con etanol al 70% (v/v), resuspendiéndolo en TE 10:1 (Tris 10 mM, EDTA 1mM pH 8).

4.3 Valoración del ADN genómico

Para la determinación de la concentración de ADN se medía la densidad óptica a 260nm de longitud de onda según el método espectrofotométrico descrito por Sambrook y col. (1989). Además, se obtenía una estima de la pureza del ADN mediante la relación de la densidad óptica medida a 260 y 280nm de longitud de onda. De este modo, un valor de 1'8 a 2 de esta relación era indicativo de pureza, mientras que si la relación era menor de estos valores debía existir contaminación con proteínas o fenol. Paralelamente, se llevaba a cabo una electroforesis de ADN en un gel de agarosa al 1% (p/v) para comprobar que no existía degradación del ADN ni restos de ARN.

Una vez valorado el ADN se tomaba una alícuota que se conservaba a +4°C y el resto se precipitaba con acetato sódico 3M y etanol absoluto, manteniéndose a -20°C.

4.4 Amplificación del ADN mediante RAPDs

Para la obtención de fragmentos de ADN por la técnica de RAPDs se siguió el protocolo descrito por Williams y col (1990), con modificaciones.

La mezcla de reacción tenía un volumen final de 25 μ l y contenía los siguientes componentes: 60 ng de ADN molde, 2,5 μ l de tampón de reacción 10X (Tabla 2), 100 μ M de cada uno de los dNTPs, 5 pmoles de cebador y 0,4u de ADN polimerasa. En este trabajo se emplearon dos ADN polimerasas diferentes. En los estudios de localización cromosómica se utilizó el enzima Biotaq (Bioprobe Systems) y para la realización de mapas se empleó la ADN polimerasa termoestable DyNAzyme (Finnzymes Inc.). Los cebadores empleados fueron 120, correspondiéndose con cada uno de los 20 oligodecámeros de los kits A, B, C, F, R y S de la casa Operon Technologies (Tabla 3).

ADN polimerasa	Composición del tampón de reacción (1X)
Biotaq™	Tris-ClH 20mM, pH 8,55 (NH ₄) ₂ SO ₄ 16mM MgCl ₂ 2,5mM BSA 150mg/ml.
DyNAzyme™	Tris-ClH 10mM, pH 8,8 KCl 50 mM MgCl ₂ 1,5mM Triton X-100 0,1%

Tabla 2.- ADN polimerasas empleadas para RAPDs con la composición de sus tampones de reacción.

Las reacciones de amplificación se realizaron en dos termocicladores: DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer Cetus) y PTC-100 (MJ Research).

Los programas de amplificación llevados a cabo en el caso de RAPDs fueron los siguientes:

- Un ciclo de 4' a 94°C.
 - 45 ciclos que constaban de 3 segmentos cada uno:
 - a) Desnaturalización a 94°C durante 1'.
 - b) Renaturalización a 36°C, 1'.
 - c) Polimerización a 72°C, 2'.
 - Un ciclo de terminación a 72°C, 4'.
- La separación de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis

horizontal en geles de agarosa al 1'5% (p/v) (Sambrook y col., 1989).

Kit A	Sec.(5'→3')	Kit B	Sec.(5'→3')	Kit C	Sec.(5'→3')
OpA01	CAGGCCCTTC	OpB01	GTTTCGCTCC	OpC01	TTCGAGCCAG
OpA02	TGCCGAGCTG	OpB02	TGATCCCTGG	OpC02	GTGAGGCGTC
OpA03	AGTCAGCCAC	OpB03	CATCCCCCTG	OpC03	GGGGTCTTT
OpA04	AATCGGGCTG	OpB04	GGACTGGAGT	OpC04	CCGCATCTAC
OpA05	AGGGGTCTTG	OpB05	TGCGCCCTTC	OpC05	GATGACCGCC
OpA06	GGTCCCTGAC	OpB06	TGCTCTGCCC	OpC06	GAACGGACTC
OpA07	GAAACGGGTG	OpB07	GGTGACGCAG	OpC07	GTCCCCACGA
OpA08	GTGACGTAGG	OpB08	GTCCACACGG	OpC08	TGGACCGGTG
OpA09	GGGTAACGCC	OpB09	TGGGGGACTC	OpC09	CTCACCGTCC
OpA10	GTGATCGCAG	OpB10	CTGCTGGGAC	OpC10	TGTCTGGGTG
OpA11	CAATCGCCGT	OpB11	GTAGACCCGT	OpC11	AAAGCTGCGG
OpA12	TCGGCGATAG	OpB12	CCTTGACGCA	OpC12	TGTCATCCCC
OpA13	CAGCACCCAC	OpB13	TTCCCCCGCT	OpC13	AAGCCTCGTC
OpA14	TCTGTGCTGG	OpB14	TCCGCTCTGG	OpC14	TGCGTGCTTG
OpA15	TCCGAACCC	OpB15	GGAGGGTGTT	OpC15	GACGGATCAG
OpA16	AGCCAGCGAA	OpB16	TTTGCCCGGA	OpC16	CACACTCCAG
OpA17	GACCGCTTGT	OpB17	AGGGAACGAG	OpC17	TTCCCCCAG
OpA18	AGGTGACCGT	OpB18	CCACAGCAGT	OpC18	TGAGTGGGTG
OpA19	CAAACGTCCG	OpB19	ACCCCGAAG	OpC19	GTTGCCAGCC
OpA20	GTTGCGATCC	OpB20	GGACCCTTAC	OpC20	ACTTCGCCAC

Kit F	Sec.(5'→3')	Kit R	Sec.(5'→3')	Kit S	Sec.(5'→3')
OpF01	ACGATCCTG	OpR01	TGCGGGTCCT	OpS01	CTACTGCGCT
OpF02	GAGGATCCCT	OpR02	CACAGCTCCT	OpS02	CCTCTGACTG
OpF03	CCTGATCACC	OpR03	CCCGTAGCAC	OpS03	CAGAGGTCCC
OpF04	GGTGATCAGG	OpR04	CCCGTAGCAC	OpS04	CACCCCTTG
OpF05	CCGAATTCCC	OpR05	GACCTAGTGG	OpS05	TTGGGGCCCT
OpF06	GGGAATTCCG	OpR06	GTCTACGGCA	OpS06	GATACCTCGG
OpF07	CCGATATCCC	OpR07	ACTGGCCTGA	OpS07	TCCGATGCTG
OpF08	GGGATATCCG	OpR08	CCCGTTGCCT	OpS08	FTCAGGGTGG
OpF09	CCAAGCTTCC	OpR09	TGAGCACGAG	OpS09	TCCTGGTCCC
OpF10	TTGGTACCCG	OpR10	CCATTCCCCA	OpS10	ACCGTTCCAG
OpF11	GGAATACCCC	OpR11	GTCTACGGCA	OpS11	AGTCGGGTGG
OpF12	ACCGTACCAG	OpR12	ACAGGTGCGT	OpS12	CTGGGTGAGT
OpF13	GGCTGCAGAA	OpR13	GGACGACAAG	OpS13	GTCGTTCCCTG
OpF14	TGCTGCAGGT	OpR14	CAGGATTCCC	OpS14	AAAGGGGTCC
OpF15	CCAGTACTCC	OpR15	GGACAACGAG	OpS15	CAGTTCACGG
OpF16	GGAGTACTGG	OpR16	CTCTGCGCGT	OpS16	AGGGGGTTCC
OpF17	AACCCGGGAA	OpR17	CCGTACGTAG	OpS17	TGGGGACCAC
OpF18	TTCCCGGGTT	OpR18	GGCTTTGCCA	OpS18	CTGGCGAACT
OpF19	CCTCTAGACC	OpR19	CCTCCTCATC	OpS19	GAGTCAGCAG
OpF20	GGTCTAGAGG	OpR20	ACGGCAAGGA	OpS20	TCGGACGGA

Tabla 3.- Secuencia de los oligonucleótidos decámeros empleados en este trabajo.

Los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados eran calculados, en función de la comigración respecto de marcadores de peso molecular, mediante el programa GEL. Los marcadores de peso molecular empleados fueron los siguientes: Fago Lambda digerido con *Bst* II o con *Hind* III y Fago ϕ X174 digerido con *Hae*III (Tabla 4).

Marcador de peso molecular	Tamaños de los fragmentos (pb)
Fago Lambda/ <i>BstEII</i>	8454, 7242, 6369, 5686, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224, 117
Fago Lambda/ <i>HindIII</i>	23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564.
Fago ϕ X174/ <i>HaeIII</i>	1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72.

Tabla 4.- Lista de los marcadores de peso molecular empleados en este trabajo con los tamaños de sus fragmentos.

4.5 Experimentos tipo Southern

4.5.1 Transferencia a membranas de Nylon

Se transferían los productos de amplificación resueltos por electroforesis a membranas de Nylon cargadas positivamente procedentes de la compañía Boehringer. El método seguido es el descrito por Sambrook y col. (1989).

4.5.2 Obtención de sondas no radiactivas

Para la obtención de sondas se seleccionaba uno de los productos de amplificación. La extracción del ADN de la agarosa se realizaba empleando el kit USBiobclean (USB). Basicamente, la técnica consistía en la disolución de la agarosa con NaI 6M y la posterior fijación del ADN a una matriz de sílice.

El marcaje de estos fragmentos se realizaba mediante reamplificación en presencia de digoxigenina (Dig-dUTP) o empleando la técnica de "random primer" (protocolo de Boehringer Mannheim).

4.5.3 Hibridación y detección

Las hibridaciones fueron realizadas a 68°C en horno (Techne Hybridiser HB-1D). Los lavados de los filtros fueron: 2x5 min en 2x SSC; SDS 0,1%, y 2x15 min. en 0,1x SSC; SDS 0,1% a 68° C.

La detección de los productos hibridados se llevó a cabo mediante inmunoensayo con reacción de color (Fosfatasa) o con luminiscencia (AMPPD) siguiendo los protocolos de la casa Boehringer Mannheim.

4.6 Obtención de cebadores específicos de centeno

Los fragmentos amplificados que tenían mayor interés fueron parcialmente secuenciados para el diseño de cebadores que produjeran una amplificación específica de dichos fragmentos. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

4.6.1 Ligación de fragmentos de ADN

Las piezas de ADN eran ligadas al plasmido pGEM-T empleando el kit para ligación de fragmentos de PCR pGEM-T vector Systems (Promega) siguiendo el protocolo especificado por la casa comercial.

4.6.2 Transformación de *Escherichia coli*

La transformación de las células competentes se realizaba mediante electroporación empleando un electroporador de la casa Invitrogen (The Electroporator II).

a) Obtención de células competentes

Las células (*E. coli*, cepa DH5 α) eran crecidas en 1l de medio LB hasta que alcanzaban una densidad óptica de 0,5-0,6 OD₅₅₀. Posteriormente, se realizaban, mediante centrifugación, una serie de lavados con agua, reduciendo el volumen hasta 40 ml. Finalmente, se resuspendían en glicerol al 10% (v/v), obteniendo una concentración aproximada de 1 a 3x10¹⁰ cel/ml.

b) Electroporación

Para la electroporación se mezclaban 20-100 ng de ADN con 80 μ l de células competentes y se sometían a un pulso eléctrico con las siguientes condiciones: 50 μ F, 150 Ω y 1500V. A continuación, las bacterias se incubaban con 10 ml de LB a 37°C durante 1h.

Finalmente, se sembraban alícuotas de este cultivo en placas Petri con agar/LB/X-GAL/ampicilina. En estas placas se seleccionaban las colonias blancas. Esta selección se basa en la resistencia a ampicilina que confiere el plásmido a las células bacterianas que lo incorporan y a la inactivación del gen de la β -galactosidasa por interposición del ADN a clonar. En presencia de ampicilina solo crecían las células que habían incorporado el plásmido, presentando adicionalmente coloración blanca aquellas que tenían inactivo el gen de la β -galactosidasa, frente al color azul que desarrollaban aquellas que eran capaces de metabolizar el x-gal.

Para la confirmación de la clonación de los fragmentos de ADN se llevaron a cabo extracciones de plásmido a pequeña escala y posterior digestión con enzimas de restricción. El método de extracción empleado fue el de lisis por álcali (Sambrook y col., 1989). Todos los tratamientos con enzimas de restricción se llevaron a cabo en las condiciones de incubación recomendadas por los distribuidores. Las digestiones se realizaron empleando 5u de dos enzimas con diana en el polilinker, *ApaI* y *SacI* (Amersham), y 5u de RNasa A (Boehringer Mannheim), durante al menos 4 horas de incubación a 37°C.

Finalmente, se comprobaba el éxito del proceso de clonación mediante experimentos tipo Southern, como se ha descrito previamente, empleando digoxigenina.

4.6.3 Extracción de ADN plasmídico para secuenciación

En los clones en los que se confirmó la presencia de los insertos se realizó una extracción de ADN plasmídico para su secuenciación empleando el Qiagen Plasmid Kit (Qiagen). El método seguido fue el recomendado por los suministradores.

4.6.4 Reacciones de secuenciación

Los fragmentos de ADN fueron secuenciados, mediante PCR, empleando el kit no radiactivo DIG Taq DNA Sequencing (Boehringer Mannheim), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se utilizaron los cebadores "M13/pUC forward y reverse sequencing primers", marcados con digoxigenina en el extremo 5', y la Taq ADN polimerasa proporcionada en el kit.

El programa de secuenciación utilizado fue el siguiente:

- Un ciclo de 2' a 95°C.
- 30 ciclos que constaban de 3 segmentos cada uno:
 - a) Desnaturalización a 95°C durante 30s.
 - b) Renaturalización a 65°C, 30s.
 - c) Polimerización a 70°C, 1'.
- Un ciclo de terminación a 72°C, 4'.

La separación electroforética de los productos de secuenciación se realizó en geles de acrilamida-bisacrilamida (39:1) al 12%, urea 8M, TEMED 0,5 µl/ml y persulfato de amonio 60 µg/ml, siendo el tampón del gel y el de la cubeta TBE 1X (Tris 9 mM; Acido Bórico 9 mM; EDTA 2,5 mM, pH 8,2). La cubeta empleada fue una Hoeffer SE400 (16cm x 18cm x 0,2mm) que permitía la secuenciación de al menos 100 nucleótidos por cada extremo del fragmento de ADN.

Antes de aplicar las muestras, se llevaba a cabo una preelectroforesis durante 30 min a 650V, 20W y 10mA. Las muestras se calentaban 3 min a 95°C para su desnaturalización, separándose en una diferencia de potencial de 550V, 15W y 7,5mA durante 4h 30min. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se separaba de uno de los cristales, situándole encima un filtro de nylon cargado positivamente (Boehringer Mannheim) durante 30 min. De esta forma se producía la transferencia de los productos de secuenciación al filtro, que eran posteriormente fijados por exposición a luz ultravioleta (300nm) durante 3 min. El protocolo de tinción del filtro fue el de inmunoensayo con reacción de color (Fosfatasa), siguiendo las recomendaciones de Boehringer.

4.6.5 Diseño de los cebadores específicos

Una vez obtenidas las secuencias de los extremos de los fragmentos de ADN amplificados, se diseñaban los cebadores de 21 bases, consistiendo en la secuencia de diez bases del oligonucleótido empleado para la amplificación por RAPDs y las once bases siguientes.

Además de estos oligonucleótidos, se diseñaron cebadores específicos a partir de las secuencias conocidas de tres clones inducibles por aluminio en trigo (*wali1*, *wali2* y *wali5*) (Snowden y Gardner, 1993; Richards y col., 1994). En la tabla 5 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos obtenidos.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Cebador	Secuencia (5'→3')
OpA08F	GTGACGTAGGGTGCATGCA	OpB16F	TTTGCCCGGACAACAGATGAG
OpA08R	GTGACGTAGGCAGGCTGTAAG	OpB16R	TTTGCCCGGAGCTGTATAAAC
OpB03F	CATCCCCCTGGAGAATAGGAC	OpR01F	TGCGGGTCCTGTCACCCGGTA
OpB03R	CATCCCCCTGGCAGTTCCTCG	OpR01R	TGCGGGTCCTCCATAGTGAGT
OpB15F	GGAGGGTGTGTCGTGAAGCT	OpS14F	AAAGGGGTCCAACATCACCTT
OpB15R	GGAGGGTGTTCAGGACTAAAA	OpS14R	AAAGGGGTCTGACAATGTGG
Wali1F	CAGGTCGCCGCCGTGGTCGT	Wali2F	TCCGACAAGAAGCGTAGCAG
Wali1R	ATTCATCACTCCATCCATAG	Wali2R	CTCACTACGAACGACTACTT
Wali5F	GAGCATTCTACCACCGCACC		
Wali5R	CTGAACAACAAGCAACACCA		

Tabla 5.- Secuencias de los oligonucleótidos específicos obtenidos en este trabajo y de los diseñados a partir de las secuencias conocidas de tres clones inducibles por aluminio en trigo (*wali1*, *wali2* y *wali5*).

4.7 Amplificación por PCR empleando cebadores específicos (SCAR)

La mezcla de reacción tenía un volumen final de 25 µl y contenía los siguientes componentes: 60 ng de ADN, 2,5 µl de tampón 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, KCl 100 mM), MgCl₂ 2,5 mM, 100 µM de cada uno de los dNTPs, 15pmoles de cada uno de los dos cebadores y 1u de Amplitaq ADN polimerasa, Stoffel fragment (Perkin Elmer).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research).

Los programas de amplificación llevados a cabo fueron los siguientes:

- Un ciclo de 5' a 94°C.
- 35 ciclos que constan de 3 segmentos cada uno:
 - a) Desnaturalización a 94°C durante 1'.
 - b) Renaturalización entre 55 y 65°C (según los cebadores) , 1'.

- c) Rampa de transición de la renaturalización a la polimerización de 0,1°C/seg.
- d) Polimerización a 72°C, 6'.
- Ciclo de terminación a 72°C, 5'.

La temperatura de renaturalización era determinada empíricamente para cada pareja de primers. En cada caso, se buscaba la máxima temperatura que produjera la amplificación del único fragmento esperado.

4.8 Digestiones con enzimas de restricción

Alguno de los fragmentos amplificados era digerido, en reacciones separadas, con un total de 17 enzimas de restricción (Amersham); cuatro de las cuales reconocen 4 pares de bases: *HaeIII*, *HhaI*, *RsaI* y *TaqI*; y el resto 6 pares de bases: *BamHI*, *BglI*, *EcoRI*, *HindIII*, *HinfI*, *PstI*, *SacI*, *SmaI*, *XhoI*, *Sall*, *MspI*, *ApaI* y *KpnI*. Todos los tratamientos con enzimas de restricción se llevaron a cabo en las condiciones de incubación recomendadas por los distribuidores. Las digestiones se realizaron empleando 5u de enzima para los 25 µl de la mezcla de PCR, durante al menos 4 horas de incubación a 37°C.

5 Análisis de la segregación y elaboración de mapas mediante el programa Mapmaker/Exp 3.0

En los análisis de ligamiento se utilizó el programa Mapmaker/Exp 3.0 (Lander y col., 1987). En primer lugar, se asignó a cada individuo el genotipo para los diferentes loci. En el caso de loci codominantes se asignaron las letras A (homocigoto para el parental Ailés), R (homocigoto para el parental Riodeva) y H (heterocigoto). Para loci dominantes se emplearon cuatro letras. Cuando la banda provenía de Ailés se asignaron las letras R (ausencia) y D (presencia). Si la banda procedía de Riodeva las letras eran A (ausencia) y C (presencia). En la tabla 6 se resumen las letras asignadas en función de los genotipos observados.

Letra	Genotipo
A	Homocigoto de Ailés
R	Homocigoto de Riodeva
H	Heterocigoto
C	No homocigoto de Ailés
D	No homocigoto de Riodeva

Tabla 6.- Letras asignadas en función de los genotipos de los individuos para los diferentes loci.

Una vez asignados los genotipos, se empleaba el comando “group”, que dividía los loci en grupos de ligamiento. Este comando determinaba si existía ligamiento entre cualesquiera de los loci, tomados de dos en dos, calculando su distancia genética mediante el método de máxima verosimilitud y su LOD (logarithm of the odds) correspondiente. Si dos loci tenían un LOD mínimo de 4.0 y una distancia máxima de 50 cM se consideraban como ligados. El valor de LOD es el \log_{10} de la verosimilitud de que dos loci estén ligados. Este valor es la razón de la probabilidad de que su segregación sea debida a dos loci ligados entre la probabilidad de que la segregación observada sea la propia de dos loci no ligados. Un valor de LOD de 4.0 significaría, por tanto, que es 10.000 veces más probable que la segregación observada sea debida a la existencia de ligamiento.

El orden lineal de los loci, dentro de los grupos de ligamiento, se estimaba mediante el comando “compare”, que determinaba el orden más probable de los loci de entre todos los posibles. Este resultado era verificado mediante el comando “ripple”, que comprueba el orden de los loci tomados de 5 en 5.

Finalmente, para obtener las distancias genéticas entre los loci ligados se empleaba el comando “map”, que realizaba un análisis múltiple. Las distancias genéticas entre los loci, expresadas en cM, eran calculadas a partir de las frecuencias de recombinación, utilizando la función de mapa de Kosambi. Esta función calcula las distancias en el mapa teniendo en cuenta la ocurrencia de múltiples sobrecruzamientos y la interferencia entre segmentos contiguos.

Resultados

1 Control genético de la tolerancia al aluminio en centeno

1.1 Efecto del aluminio sobre el crecimiento de la raíz en distintas poblaciones de centeno

Para realizar un estudio sobre la genética de la tolerancia al aluminio en centeno era necesario, en primer lugar, analizar la variabilidad existente para este carácter en diferentes poblaciones de esta especie. Por ello, se empleó un test de tolerancia (ver material y métodos) para investigar el efecto que producía el aluminio, a diferentes concentraciones (50, 100 y 150 μM), sobre el crecimiento de las raíces en dos cultivares (Ailés y JNK) y dos líneas consanguíneas (Pool y Riodeva) de centeno. En todos los casos, se observó una disminución progresiva en el crecimiento de la raíz al aumentar la concentración de aluminio en el medio. De todos modos, en base a la respuesta a los tratamientos, las variedades estudiadas pudieron dividirse en tres grupos. En el primer grupo se encontraba el cultivar Ailés, en el segundo JNK y Pool, y en el tercero Riodeva.

En el cultivar Ailés se observó el menor efecto del aluminio. Así, la diferencia en crecimiento medio de la raíz entre plantas tratadas y no tratadas con aluminio, a todas las concentraciones, fue siempre inferior a 1 cm. Solo a una concentración de 150 μM se observaron dos individuos en los que ya no había crecimiento de la raíz tras el tratamiento, pero incluso a esta concentración, aparecían individuos con crecimientos de hasta 3,5 cm (Figura 3).

El cultivar JNK y la línea consanguínea Pool, mostraron un patrón de comportamiento muy similar. En ambos casos, la disminución en la media de crecimiento de la raíz era proporcional al aumento de la concentración de aluminio. A partir de una concentración de 100 μM se observaron individuos en Pool que no tenían crecimiento adicional de la raíz. Esta situación se presentaba a una concentración de 150 μM en JNK. A esta concentración, aún se observaba un elevado número de plántulas con crecimientos de la raíz de hasta 2,3 cm (Figuras 4 y 5).

La línea consanguínea Riodeva mostró un comportamiento diferencial. En este caso, la disminución de la media de crecimiento era muy drástica. A una concentración 100 μM de

aluminio, la reducción era ya de 1,3 cm, y a 150 μM no se encontraron individuos con crecimientos superiores a 0,3 cm (Figura 6).

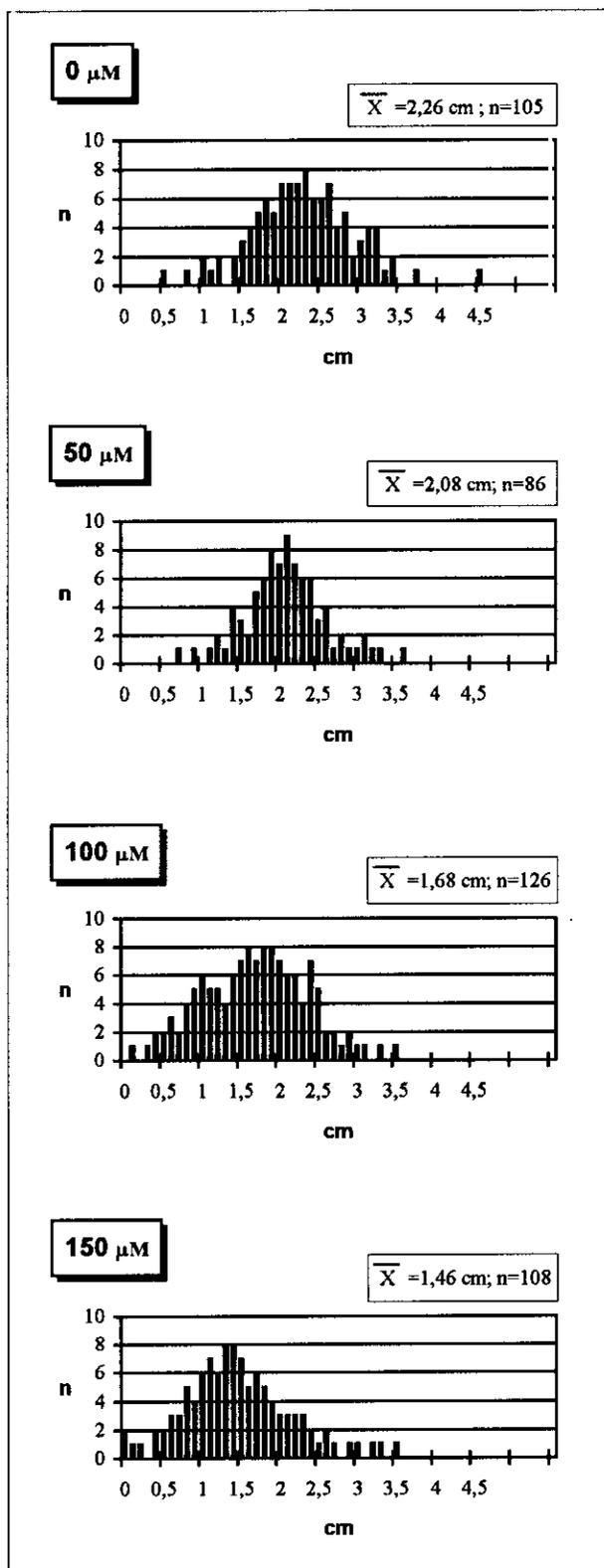


Figura 3.- Distribuciones del crecimiento adicional de la raíz en plantas del cultivar Ailés después del tratamiento con aluminio: control, 50 μM , 100 μM y 150 μM . n: n° de plantas.

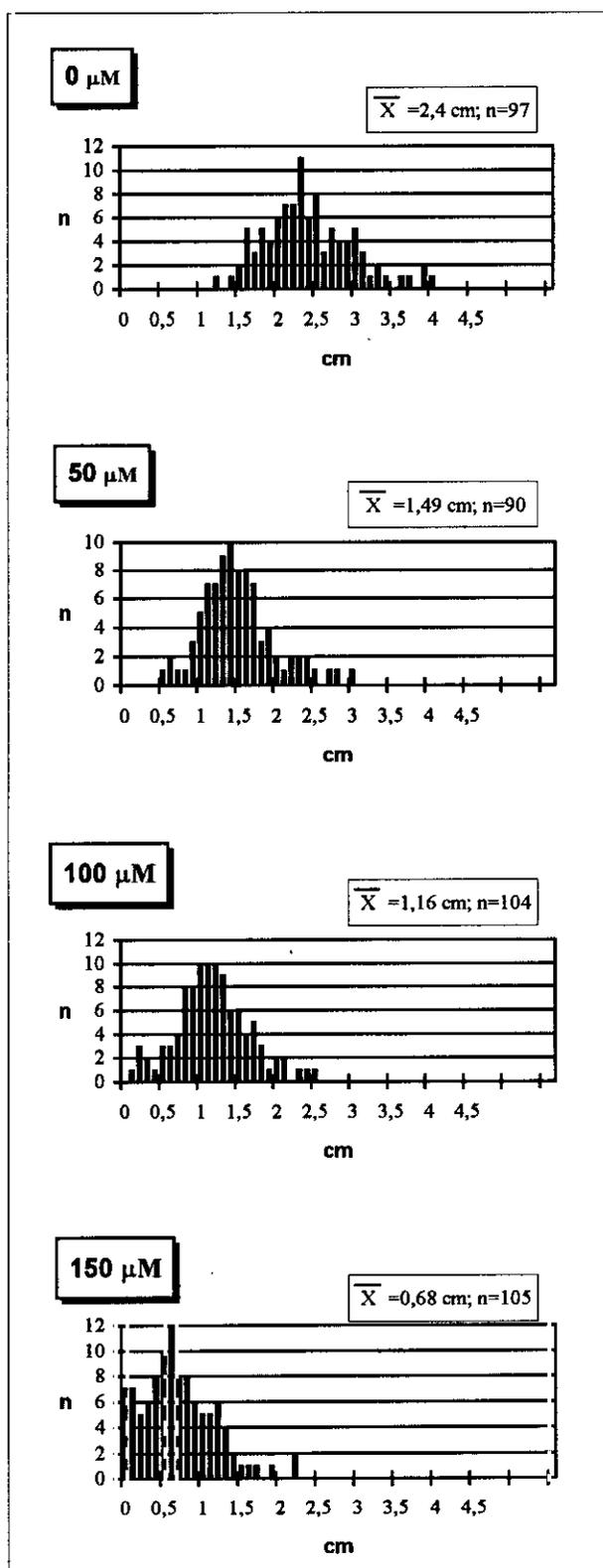


Figura 4.- Distribuciones del crecimiento adicional de la raíz en plantas del cultivar JNK después del tratamiento con aluminio: control, 50 μM , 100 μM y 150 μM . n: n° de plantas.

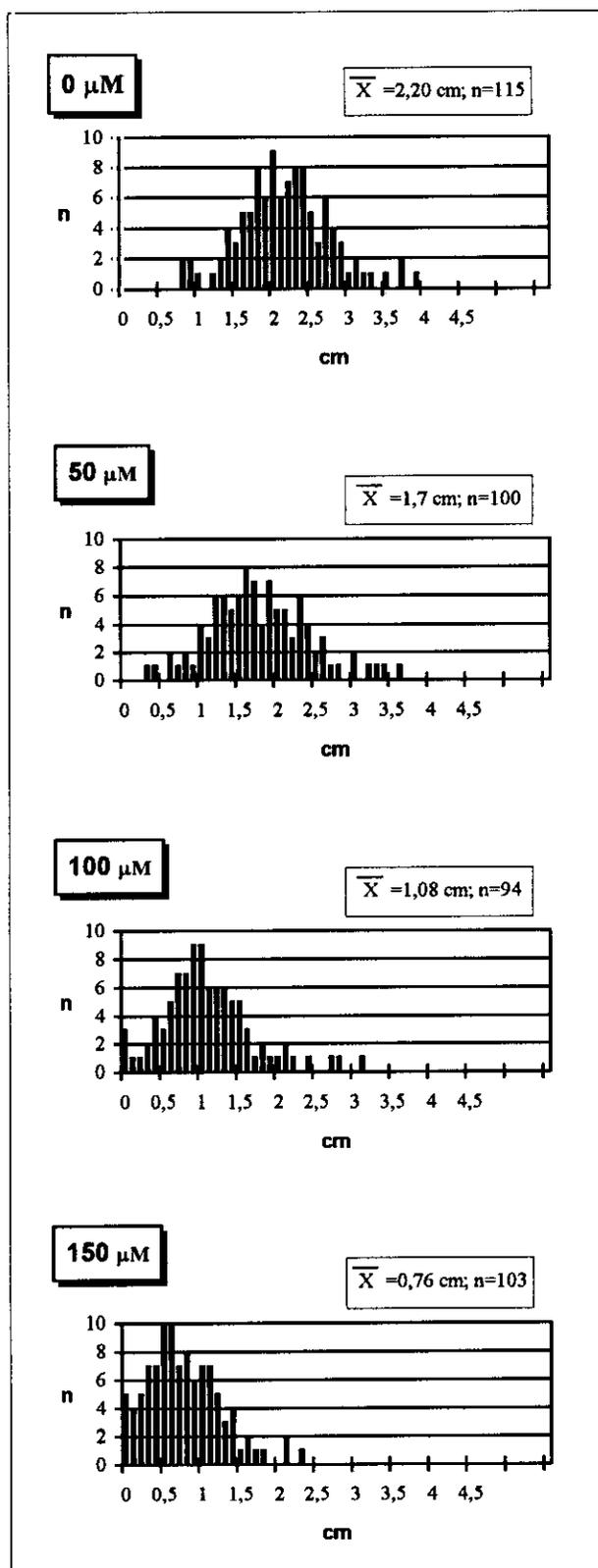


Figura 5.- Distribuciones del crecimiento adicional de la raíz en plantas de la línea consanguínea Pool después del tratamiento con aluminio: control, 50 μM , 100 μM y 150 μM . n: n° de plantas.

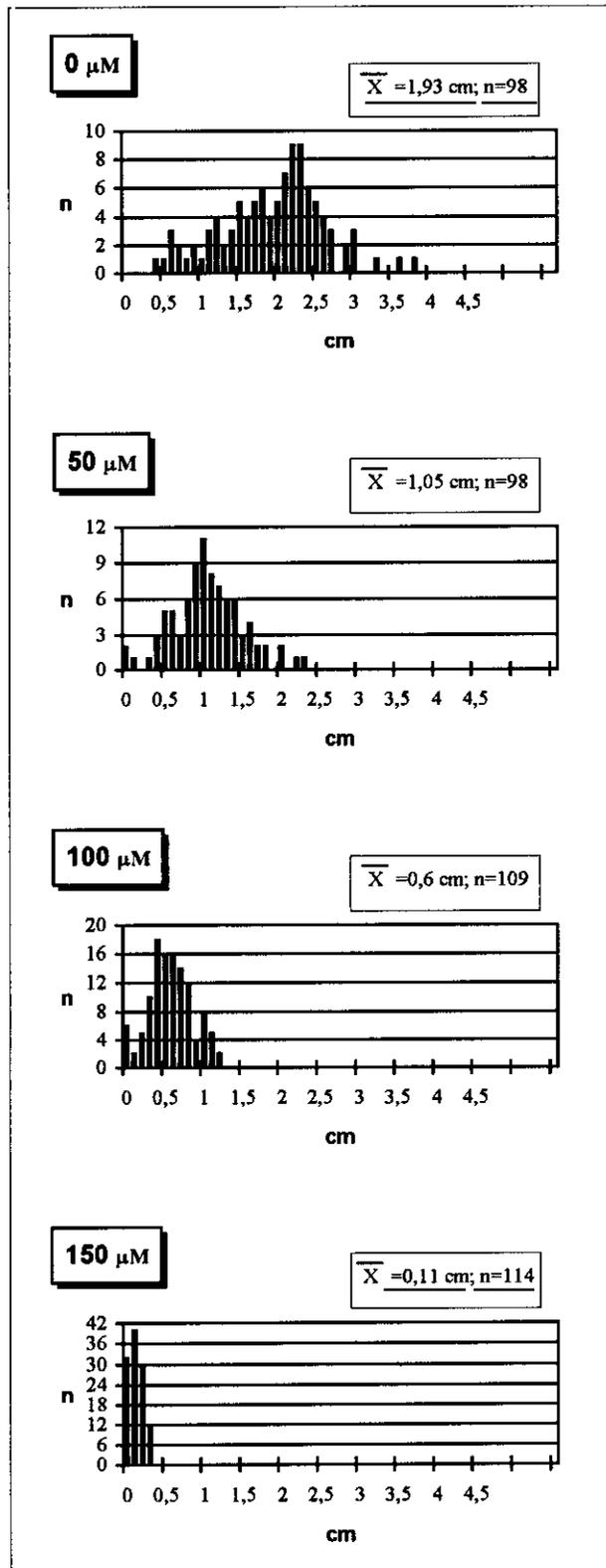


Figura 6.- Distribuciones del crecimiento adicional de la raíz en plantas de la línea consanguínea Riodeva después del tratamiento con aluminio: control, 50 μM, 100 μM y 150 μM. n: n° de plantas.

Por consiguiente, el cultivar Ailés era el más tolerante al aumento de la concentración de aluminio, la línea consanguínea Riodeva era la más sensible, mientras que el cultivar JNK y la línea consanguínea Pool mostraron una tolerancia intermedia.

En la figura 7 se pueden apreciar las diferencias en crecimiento adicional de la raíz observadas entre plantas de Ailés y Riodeva, tratadas con aluminio ($150 \mu\text{M}$).

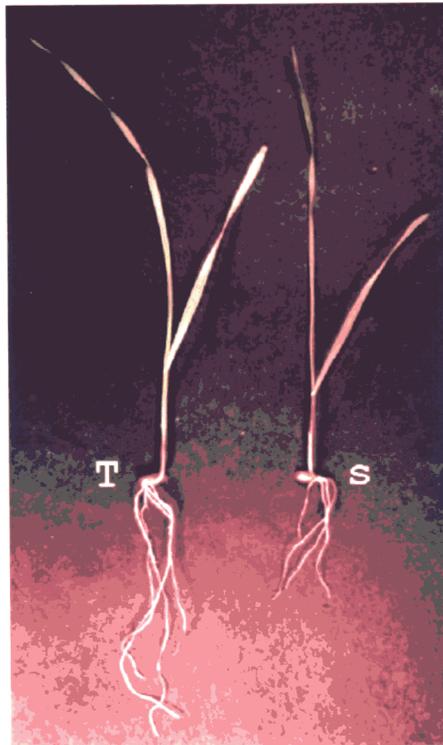


Figura 7.- Efecto del aluminio ($150 \mu\text{M}$) sobre el crecimiento de la raíz en plantas de Ailés (T:tolerante) y Riodeva (s:sensible).

En la tabla 7 y en la figura 8 se muestra la disminución de las medias de crecimiento adicional de la raíz en las cuatro poblaciones, a las distintas concentraciones de aluminio empleadas.

Estos resultados muestran que las mayores diferencias aparecían a la mayor concentración de aluminio ($150 \mu\text{M}$). A esta concentración, el crecimiento de la raíz disminuía, respecto de los controles, un 35,4% en Ailés, 65,5% en Pool, 71,7% en JNK y un 94,4% en Riodeva (Tabla 8 y Figura 9).

	0 μM		50 μM		100 μM		150 μM	
	Media	% psc	Media	% psc	Media	% psc	Media	% psc
Ailés	2,26 \pm 0,8	0	2,08 \pm 0,72	0	1,68 \pm 0,82	0	1,46 \pm 0,83	1,8
JNK	2,4 \pm 0,75	0	1,49 \pm 0,69	0	1,16 \pm 0,69	0	0,68 \pm 0,67	6,6
Pool	2,2 \pm 0,79	0	1,7 \pm 0,8	0	1,08 \pm 0,76	3,1	0,76 \pm 0,69	4,8
Riodeva	1,93 \pm 0,82	0	1,05 \pm 0,67	2,2	0,6 \pm 0,54	5	0,11 \pm 0,31	28

Tabla 7.- Medias de crecimiento adicional de la raíz en las cuatro poblaciones estudiadas, a las diferentes concentraciones de aluminio analizadas. % psc: porcentaje de plantulas que no presentaron crecimiento adicional de la raíz tras el tratamiento con aluminio.

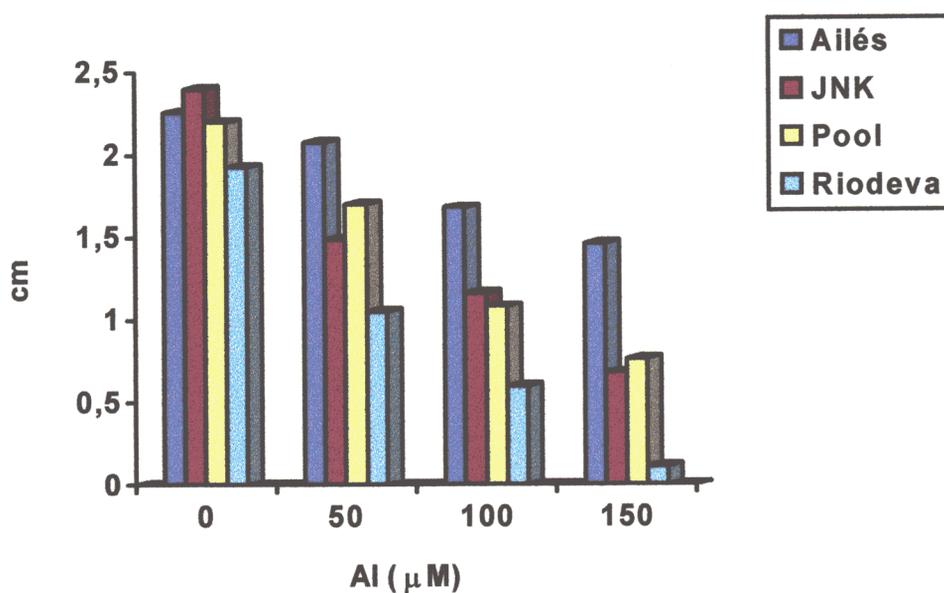


Figura 8.- Representación de las medias de crecimiento adicional de la raíz en las cuatro poblaciones estudiadas, a las diferentes concentraciones de aluminio analizadas (0, 50, 100 y 150 μM).

	Concentración de aluminio			
	0 μ M	50 μ M	100 μ M	150 μ M
Ailés	100	92	74,3	64,6
JNK	100	62	48,3	28,3
Pool	100	80	49	34,5
Riodeva	100	54,4	31	5,6

Tabla 8.- Disminución en el crecimiento de la raíz en los cultivares Ailés y JNK y las líneas consanguíneas Pool y Riodeva, en el rango de tratamientos con aluminio utilizado. El crecimiento de la raíz está expresado como porcentaje del crecimiento de los controles (0 μ M).

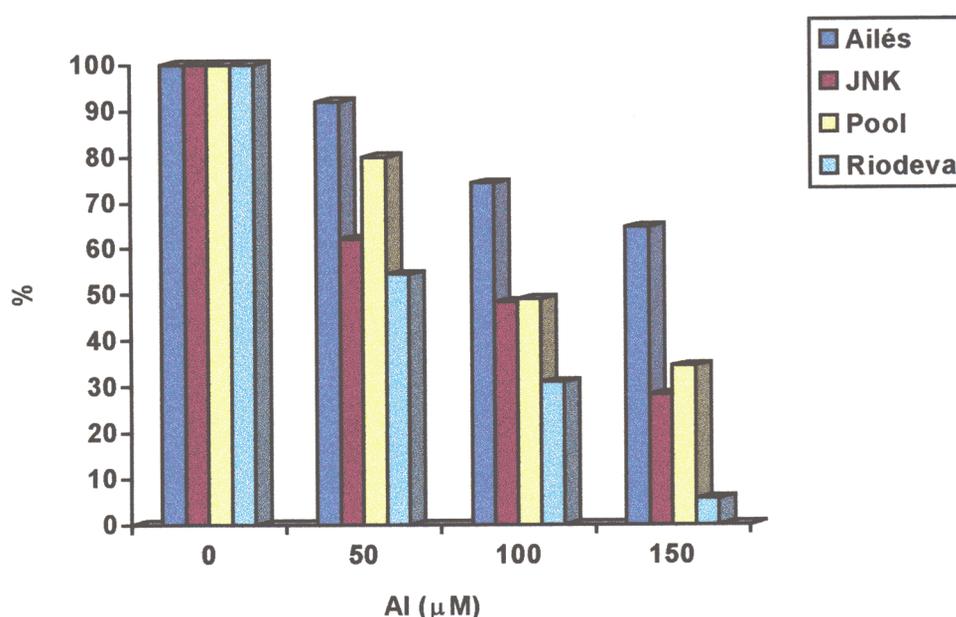


Figura 9.- Crecimiento de la raíz, expresado como porcentaje del crecimiento de los controles (0 μ M), en el rango de tratamientos con aluminio utilizado (50, 100 y 150 μ M).

Se seleccionaron raíces de plantas tratadas con aluminio (150 μ M) de las cuatro poblaciones, para su observación a la lupa. Esta observación puso en evidencia en las plantas sensibles al aluminio una serie de diferencias morfológicas, claramente apreciables. Las raíces de Ailés, Pool y JNK tenían aspectos similares a los de las plantas sin tratar, mientras que en las raíces de Riodeva mostraban un aspecto coraloide y una intensidad de tinción mayor que en los otros casos. En la figura 10 se muestran estas diferencias.

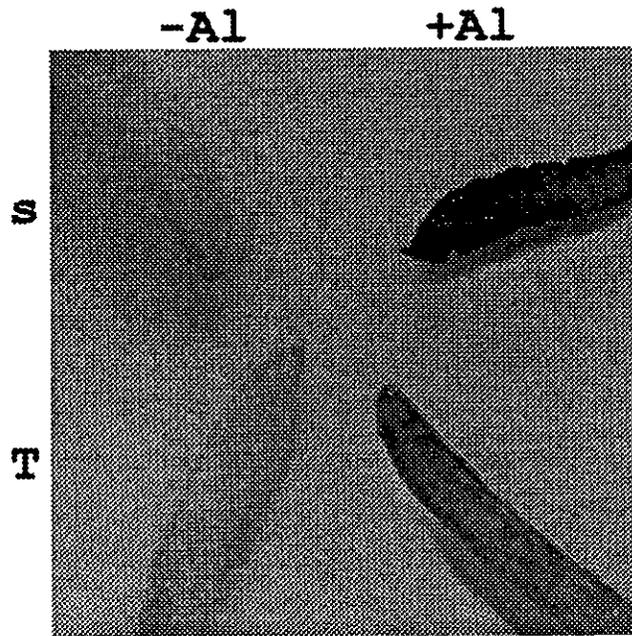


Figura 10.- Aspecto de los ápices de raíces de plantas de Ailés (T:tolerante) y Riodeva (s:sensible) tratados y no tratados con aluminio ($150 \mu\text{M}$).

Nuevamente, las mayores diferencias entre las poblaciones, para la tolerancia al aluminio, aparecían a una concentración de $150 \mu\text{M}$ de aluminio. Por lo tanto, se decidió que esta sería la concentración a emplear, a partir de este momento, en los test de tolerancia.

1.2 Estudio del control genético de la tolerancia al aluminio

A la luz de los resultados obtenidos en las cuatro poblaciones, realizamos test de tolerancia al aluminio ($150 \mu\text{M}$) en las descendencias de diversos cruzamientos de las plantas de Ailés con mayor crecimiento ($>2,5 \text{ cm}$) por plantas de Riodeva en las que no se registró ningún crecimiento adicional de la raíz tras el tratamiento.

Se analizaron un total de cinco descendencias F1 (AR1, AR2, AR3, AR4 y AR6). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11. Las medias de crecimiento en estas cinco descendencias oscilaron entre $2,1 \text{ cm}$ y $1,76 \text{ cm}$ (\bar{x} conjunta= $1,94 \text{ cm}$) y en ningún caso hubo individuos con crecimientos adicionales menores de $0,7 \text{ cm}$. Estas medias eran estadísticamente semejantes a la media del cultivar Ailés ($1,46 \text{ cm}$), aunque ligeramente superiores.

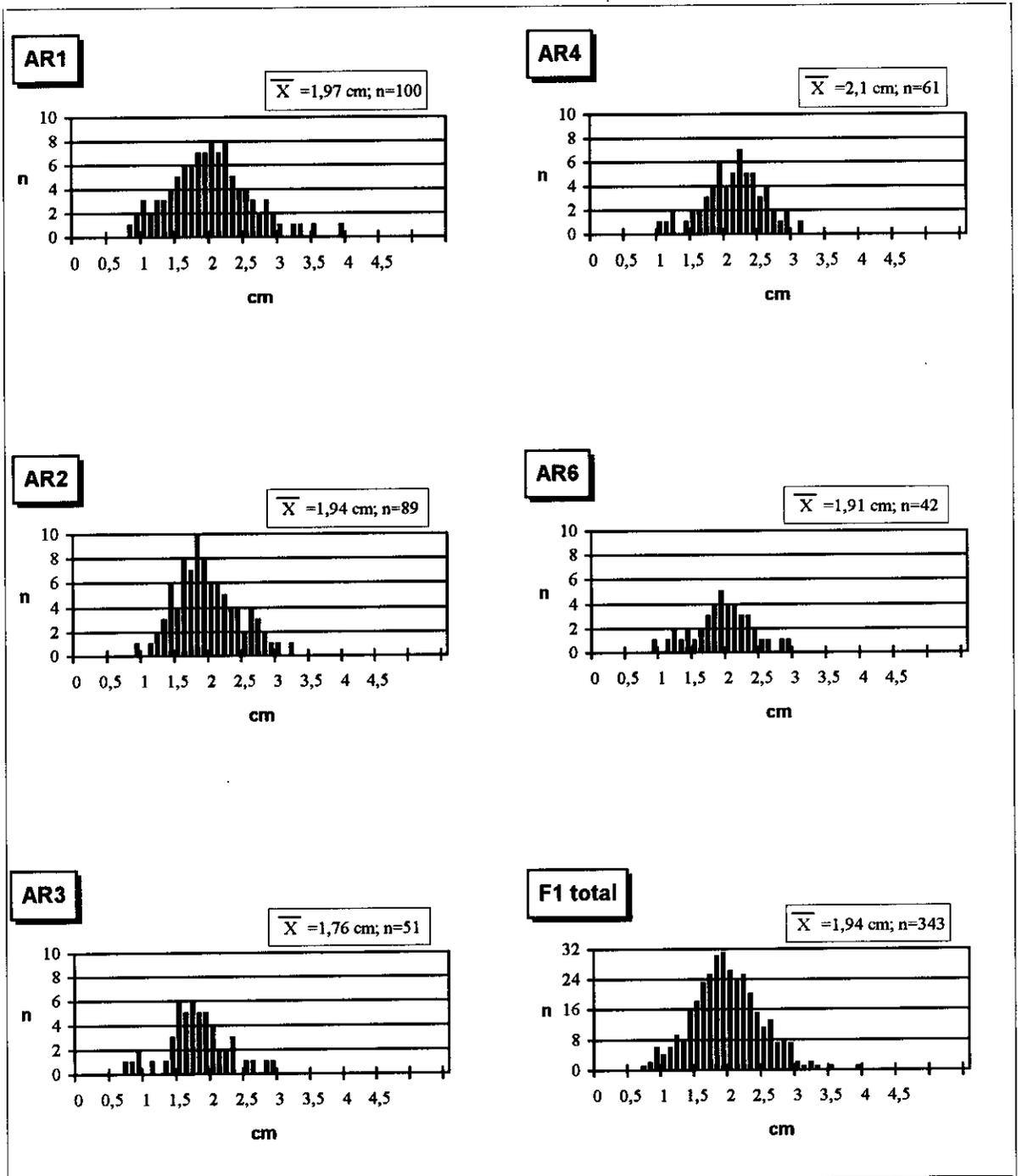


Figura 11.- Distribuciones del crecimiento adicional de la raíz en las cinco descendencias F1 tratadas con aluminio ($150 \mu\text{M}$), por separado y conjuntamente. n: n° de plantas.

Se analizó la tolerancia al aluminio en autofecundaciones y retrocruzamientos por Riodeva de plantas de estas cinco poblaciones F1. Las distribuciones del crecimiento de la raíz de estas descendencias mostraban un comportamiento claramente bimodal. Así, en todos los cruzamientos, menos en AR4.6xR, esta distribución se podía dividir en otras dos. La media de la distribución de menor crecimiento era igual que la de Riodeva, mientras que la de mayor crecimiento era del mismo orden que las que presentaba la población de Ailés y las de la F1 parental. En la figura 12 se muestran las distribuciones del crecimiento de la raíz en varias de las descendencias analizadas.

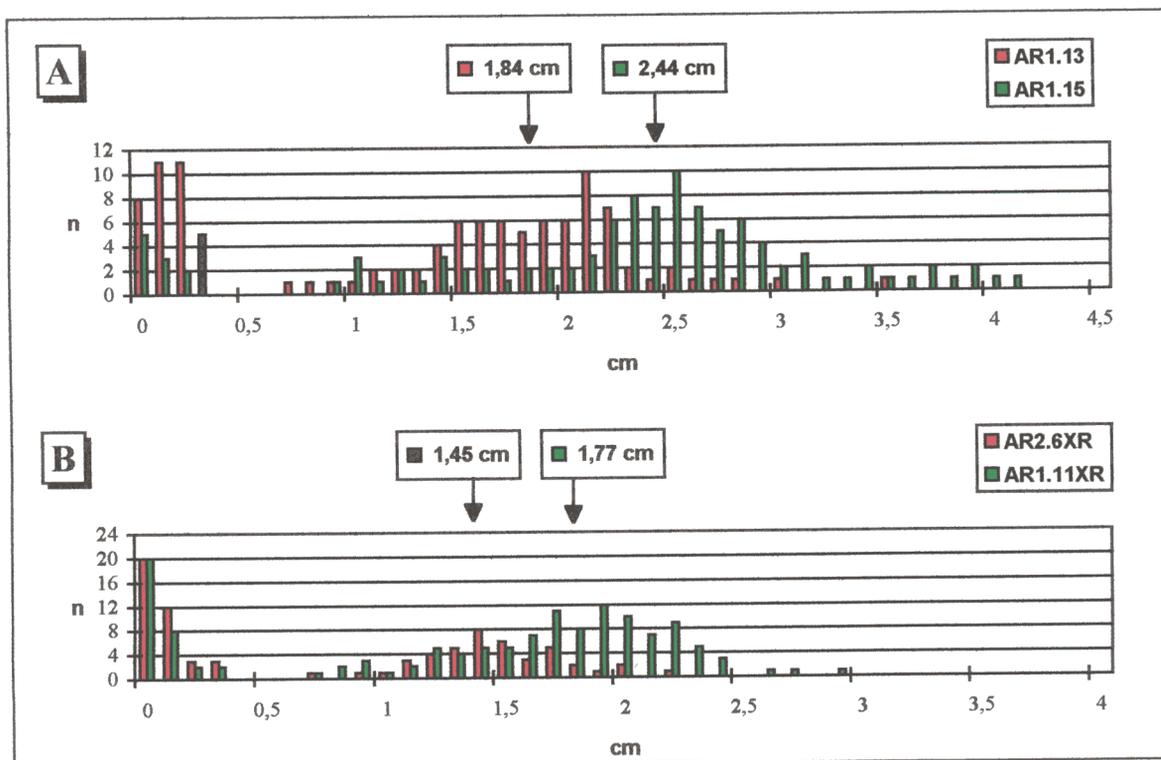


Figura 12.- Distribuciones del crecimiento de la raíz en 4 cruzamientos. A) dos descendencias F2: AR1.13 \otimes (3 Tolerantes: 1 sensible) y AR1.15 \otimes (15T:1s); B) dos retrocruzamientos: AR2.6xR (1T:1s) y AR1.11xR (3T:1s), tras el tratamiento con aluminio (150 μ M). n: n $^\circ$ de plantas. Las flechas indican el valor de las medias para cada una de las distribuciones de plantas tolerantes en cada descendencia.

Las dos clases en que se podían diferenciar los individuos de los cruzamientos coincidían claramente con los patrones de crecimiento de los parentales empleados en los cruzamientos. Por lo tanto, decidimos comprobar si la segregación de este carácter “tolerancia al aluminio” en estos cruzamientos se correspondía con algún tipo de segregación

mendeliana. Tomamos como individuos susceptibles aquellos en los que el crecimiento de la raíz no excedía los 0,3cm, pues este era el máximo crecimiento observado en Riodeva (Figura 6), y como tolerantes los que presentaban un crecimiento mayor de 0,3cm. En cinco de las descendencias F2 (AR1.13⊗, AR2.14⊗, AR3.14⊗, AR4.18⊗ y AR6.17⊗) las segregaciones observadas fueron del tipo 3:1, mientras que en dos cruzamientos prueba (AR1.5xR y AR2.6xR) estas se ajustaban a una segregación 1:1. También aparecieron un retrocruzamiento (AR1.11xR) y una F2 (AR1.15⊗) con segregaciones 3:1 y 15:1, respectivamente, y que además mostraron un crecimiento medio de la raíz superior al resto de descendencias (Figura 12). En el caso de la descendencia del retrocruzamiento AR1.7xR la segregación a la que más se asemejaba era a una 9:7.

En la tabla 9 y en la figura 13 se muestra la segregación del carácter tolerancia al aluminio y un resumen de los resultados obtenidos en las descendencias analizadas.

Cruzamiento	Tipo	Fenotipo		Hipótesis	X ²
		Tolerantes (\bar{X}_T)	Sensibles (\bar{X}_s)		
AR1.11xR	BC	103 (1,77)	32 (0,05)	3:1	0,12
AR1.13⊗	F2	75 (1,84)	35 (0,13)	3:1	2,72
AR1.15⊗	F2	98 (2,44)	10 (0,07)	15:1	1,66
AR1.5xR	BC	15 (1,60)	20 (0,12)	1:1	0,71
AR1.7xR	BC	51 (1,75)	32 (0,11)	1:1	4,34*
				9:7	0,91
AR2.14⊗	F2	101 (1,87)	28 (0,12)	3:1	0,66
AR2.6xR	BC	43 (1,45)	38 (0,07)	1:1	0,3
AR3.14⊗	F2	88 (1,93)	28 (0,07)	3:1	0,04
AR4.6xR	BC	63 (1,76)	2 (0)	-	-
AR4.18⊗	F2	93 (1,81)	25 (0,08)	3:1	0,91
AR6.17⊗	F2	73 (1,56)	24 (0,13)	3:1	0,006

Tabla 9.- Segregaciones observadas en las descendencias de los cruzamientos analizados para el carácter "tolerancia al aluminio". BC: retrocruzamiento. \bar{X}_T : media (en cm) de la distribución de las plantas tolerantes. \bar{X}_s : media (en cm) de la distribución de las plantas sensibles. * X² con diferencias significativas a nivel de P<0,05.

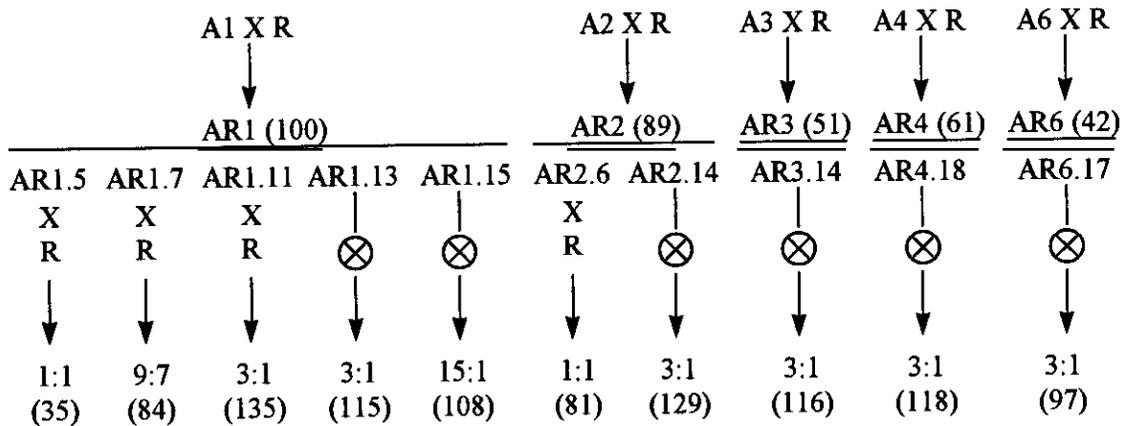


Figura 13.- Esquema de las segregaciones observadas para la tolerancia al aluminio en todas las descendencias F2 y retrocruzamientos analizados. Entre paréntesis se muestra el número de individuos analizados. A: Ailés. R: Riodeva

2 Localización de genes de tolerancia al aluminio

2.1 Análisis de ligamiento entre genes de tolerancia al aluminio y varios loci isoenzimáticos

En centeno se ha descrito la existencia de genes de tolerancia al aluminio en los cromosomas *3R*, *4R* y *6R*, mediante el estudio de líneas de adición (Aniol y Gustafson, 1984). Por esta razón, se analizaron las descendencias de los cruzamientos en los que se encontraban segregando una serie de isoenzimas localizadas en estas cromosomas.

Se llevaron a cabo electroforesis en geles de almidón de dos descendencias F2 (AR1.13⊗ y AR6.17⊗) y de dos cruzamientos prueba (AR1.5xR y AR1.7xR). En la tabla 10 se indica la localización cromosómica de los loci isoenzimáticos analizados que se encontraban segregando.

El locus *Got3* presentaba dos alelos activos (1 y 2), mostrando un comportamiento dimérico. Los heterocigotos tenían una banda nueva de migración intermedia. Las isoenzimas *Aco1*, *Aco2*, *Lap1*, *Mdh2* y *Pgm1* mostraron dos alelos activos (1 y 2), presentando un comportamiento monomérico. Cada uno de los loci de esterasas (*Est6* y *Est8*) presentaban un alelo activo (+) y uno nulo (-). Estos loci llevan información para isoenzimas con un

comportamiento monomérico. Por tanto, para este grupo de loci no era posible distinguir a los homocigotos para el alelo activo (++) de los heterocigotos activo-nulo (+-). Finalmente, en el caso del locus *Ndh2*, con comportamiento tetramérico, solamente fue posible la diferenciación entre dos fenotipos de diferente migración en el gel (+ y -).

Locus	Braza cromosómico	Referencia	Cruzamiento
<i>Got3</i>	3RL	Tang y Hart, 1975.	AR6.17⊗, AR1.5xR y AR1.7xR
<i>Mdh2</i>	3RL	Salinas y Benito, 1985a.	AR1.13⊗
<i>Pgm1</i>	4RS	Salinas y Benito, 1985c.	AR6.17⊗
<i>Aco2</i>	5RL	Chenicek y Hart, 1987.	AR1.13⊗, AR1.5xR y AR1.7xR
<i>Aco1</i>	6RL	Chenicek y Hart, 1987.	AR1.13⊗, AR6.17⊗ y AR1.5xR
<i>Ndh2</i>	6RL	Wehling, 1991.	AR6.17⊗
<i>Est6</i>	6RL	Salinas y Benito, 1985b.	AR6.17⊗
<i>Est8</i>	6RL	Salinas y Benito, 1985b.	AR6.17⊗
<i>Lap1</i>	6RS	Tang y Hart, 1975.	AR1.13⊗, AR1.5xR y AR1.7xR

Tabla 10.- Localización cromosómica de los genes estructurales de isoenzimas que segregaron en los diferentes cruzamientos.

Unicamente en la descendencia AR6.17⊗ se comprobó la existencia de ligamiento entre varios loci isoenzimáticos y un gen de tolerancia al aluminio. Estos loci eran *Aco1*, *Ndh2*, *Est6* y *Est8* (Figura 14), habiendo sido todos ellos previamente localizados en el brazo cromosómico 6RL. En la tabla 11 se muestran las segregaciones conjuntas de estas isoenzimas y del gen de tolerancia al aluminio, mientras que en la figura 15 se puede observar el mapa genético construido, empleando el programa MAPMAKER/EXP 3.0.

En los otros tres cruzamientos (AR1.13⊗, AR1.5xR y AR1.7xR) la segregación conjunta del gen de tolerancia con los loci isoenzimáticos no difería significativamente del supuesto de independencia.

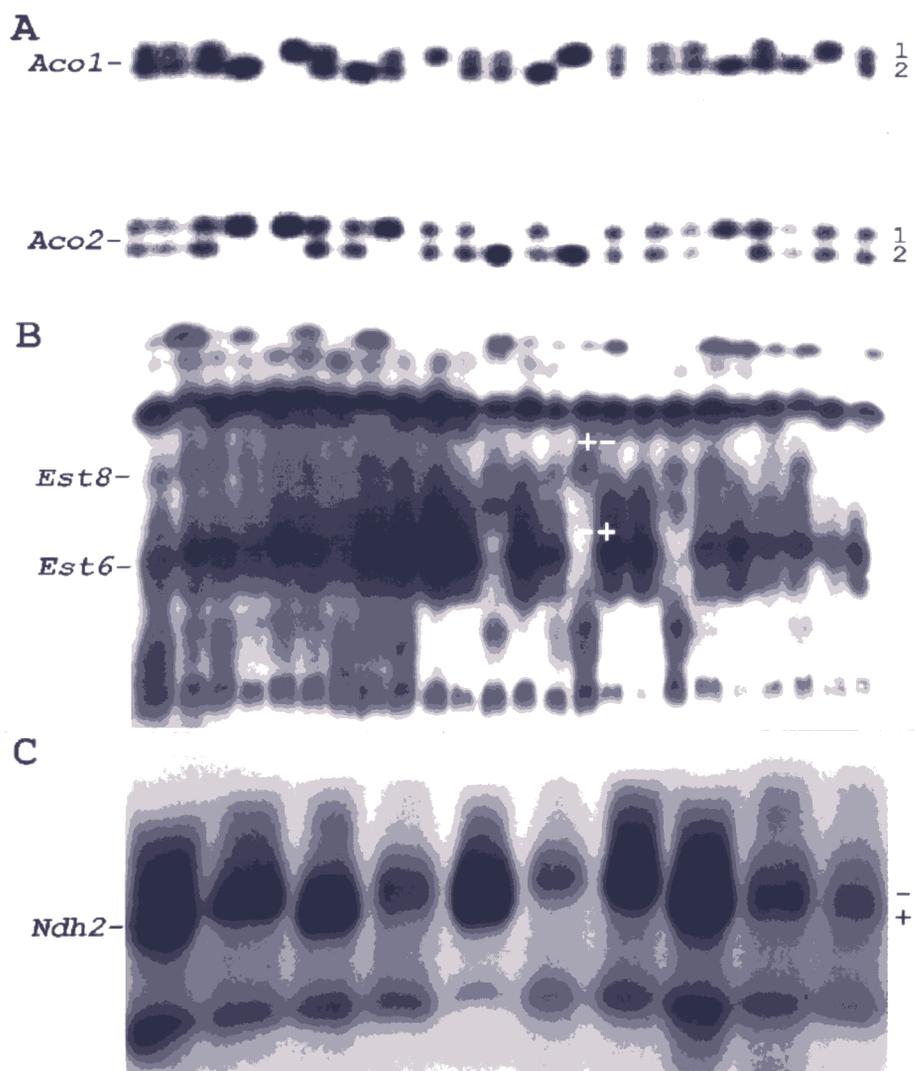


Figura 14.- Patrones electroforéticos observados para las isoenzimas A) Aconitasa (ACO), B) Esterasas (EST) y C) NADH-deshidrogenasa (NDH), en 10 individuos de la descendencia AR6.17⊗.

Loci	Distribución de la descendencia						X ²	cM
	T,11	s,11	T,12	s,12	T,22	s,22		
<i>Alt1, Aco1</i>	8	16	43	6	22	2	31,17***	24,6
	T,+	T,-	s,+	s,-				
<i>Alt1, Ndh2</i>	58	15	11	13			9,94**	46,4
<i>Alt1, Est6</i>	58	15	21	3			0,75	-
<i>Alt1, Est8</i>	53	20	12	12			3,18	-
	11,+	11,-	12,+	12,-	22,+	22,-		
<i>Aco1, Ndh2</i>	5	19	40	9	24	0	43,29***	16,8
<i>Aco1, Est6</i>	24	0	39	10	16	8	9,33**	42,4
<i>Aco1, Est8</i>	8	16	35	14	22	2	19,92***	42,5
	+,+	+,-	-,+	-,-				
<i>Ndh2, Est6</i>	52	17	27	1			5,83*	26,1
<i>Ndh2, Est8</i>	57	12	8	20			26,29***	26,7
<i>Est6, Est8</i>	47	32	18	0			10,86***	0

Tabla 11.- Relaciones de ligamiento observadas entre los loci isoenzimáticos analizados y el locus de tolerancia al aluminio (*Alt1*) localizado en 6R. * X² con diferencias significativas a nivel de P<0,05; ** X² con diferencias significativas a nivel de P<0,01; *** X² con diferencias significativas a nivel de P<0,001. T: tolerante; s: sensible.

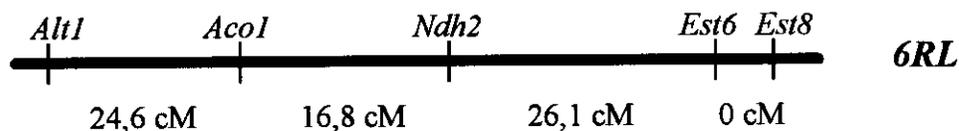


Figura 15.- Mapa genético construido en el cromosoma 6R empleando los loci isoenzimáticos analizados y el locus de tolerancia al aluminio (*Alt1*).

A la vista de los resultados de ligamiento con marcadores isoenzimáticos iniciamos la búsqueda de marcadores RAPDs ligados a los genes de tolerancia al aluminio en dos cruzamientos diferentes. En la descendencia AR6.17⊗ debieran hallarse marcadores ligados al gen de tolerancia localizado en el cromosoma 6R (*Alt1*). Por otro lado, en la descendencia F2 AR1.13⊗ estaban segregando los loci isoenzimáticos *Aco1* y *Lap1*, localizados en los brazos 6RL y 6RS, respectivamente. Debido a que ninguno de estos dos loci se comportaron como ligados al gen de tolerancia al aluminio que segregaba en este cruzamiento decidimos emplearlo para localizar este gen, que debería estar en otro cromosoma distinto del 6R.

2.2 Obtención de marcadores moleculares ligados a genes de tolerancia al aluminio

Para conseguir marcadores ligados a los genes de tolerancia se emplearon dos tipos de estrategias, como son, el análisis de bloques segregantes y la localización cromosómica de fragmentos amplificados por PCR en líneas de adición. Además, estas metodologías fueron complementadas con la transformación de los marcadores obtenidos en marcadores SCAR.

2.2.1 Análisis de bloques segregantes

Para realizar este tipo de análisis era interesante conocer la ventana que se abría alrededor del locus en estudio, en función de la sensibilidad de la PCR. Es decir, había que saber la capacidad de la técnica para detectar genotipos “recombinantes” dentro de un bloque. Se realizó un experimento empleando los cebadores OpR07 y OpS04 en dos individuos con diferentes patrones de amplificación. El ADN de estos individuos se mezclaba en distintas proporciones en cada tubo de reacción. El resultado obtenido se muestra en la figura 16.

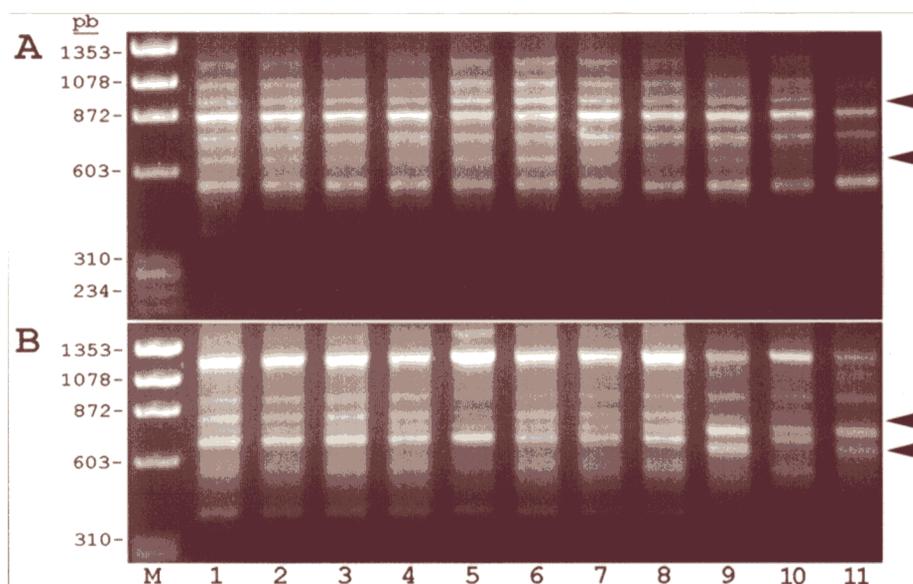


Figura 16.- Estudio de la sensibilidad de los RAPDs. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con los oligonucleótidos A) OpR07 y B) OpS04. Los carriles 1 al 11 muestran la amplificación con el ADN mezclado de dos individuos del cultivar Ailés, en proporciones 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 y 0:10, respectivamente. M: Fago ϕ X174 digerido con *Hae* III. Las flechas indican los fragmentos diferenciales entre los individuos.

Como se puede apreciar en esta figura, para cada fragmento amplificado hay una sensibilidad diferente. En el caso del cebador OpR07 se observan dos fragmentos que son

detectados en una proporción de 1:9, mientras que en el cebador OpS04 aparece un fragmento que ofrece problemas para su detección cuando está en proporción 9:1. En función de este resultado, parecía que existía la posibilidad de detectar marcadores en una amplia ventana a ambos lados del locus analizado.

a) Análisis de bloques segregantes en el cromosoma 6R

Para localizar marcadores en la zona del gen de tolerancia al aluminio situado en el cromosoma 6R se realizaron análisis de bloques segregantes para dos loci de esta región. Uno de ellos era, lógicamente, el propio gen de tolerancia al aluminio y el otro se trataba del locus isoenzimático *LapI*.

• Análisis de bloques segregantes para la tolerancia al aluminio en el cromosoma 6R

Como dijimos previamente, en función de los resultados de ligamiento con marcadores isoenzimáticos iniciamos la búsqueda de marcadores RAPDs ligados al gen de tolerancia localizado en el cromosoma 6R (*AltI*) en la descendencia AR6.17⊗.

Se realizaron amplificaciones en bloques de plantas tolerantes y sensibles del cruzamiento AR6.17⊗, empleando 120 cebadores, correspondientes a los kits A, B, C, F, R y S de la casa Operon. La mayor parte de los cebadores empleados producían el mismo patrón de amplificación en ambos bloques. En la figura 17 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos. Únicamente en ocho del total de cebadores empleados no se obtuvo ninguna amplificación (OpA19, OpC01, OpC04, OpC09, OpC16, OpR14, OpR17 y OpR18). Con el resto de cebadores se amplificaron un total de 452 fragmentos, con un rango de 1 a 10 fragmentos por primer. Del total de bandas analizadas se encontraron dos que estaban presentes en el bloque de plantas tolerantes y no en el de sensibles. Estos fragmentos se correspondían con la amplificación de los cebadores OpB03 (655 pb) y OpR01 (600 pb), siendo denominados *OpB03₆₅₅* y *OpR01₆₀₀* (Figura 18).

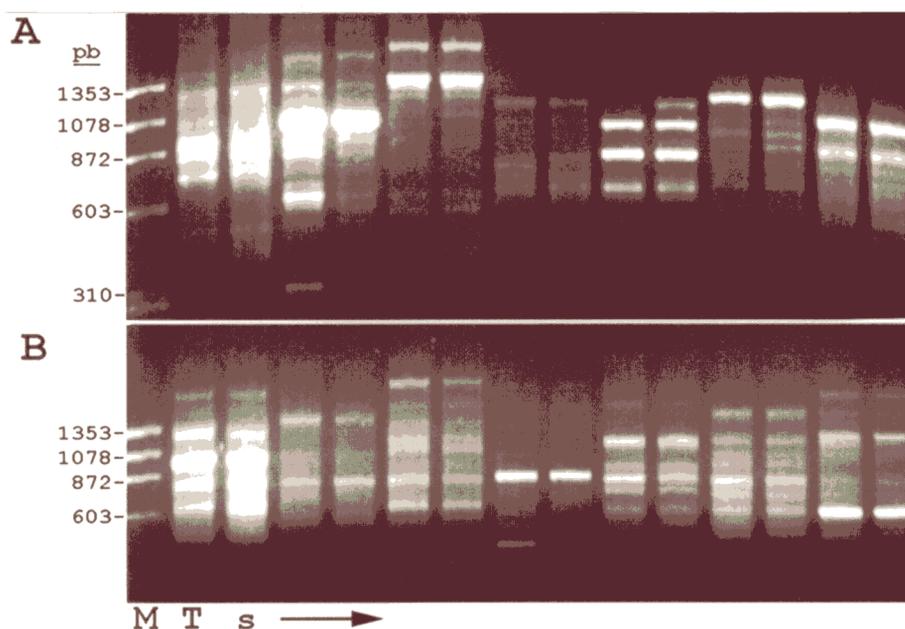


Figura 17.- Ejemplo de los resultados obtenidos en un análisis de bloques segregantes. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con 14 oligonucleótidos decámeros. T: bloque de plantas tolerantes al aluminio. s: bloque de plantas sensibles al aluminio. M: Fago ϕ X174 digerido con *Hae*III.

Se procedió realizando amplificaciones en cada uno de los individuos de la descendencia AR6.17 \otimes , por separado, con los mismos cebadores que habían mostrado diferencias en los bloques (Figura 18). La determinación de la segregación mendeliana de los dos fragmentos diferenciales de bloques se realizó mediante pruebas X^2 , ajustándose la segregación de cada locus a la esperada en caso de dominancia (3:1). En ambos casos la segregación no se desvió significativamente de la esperada.

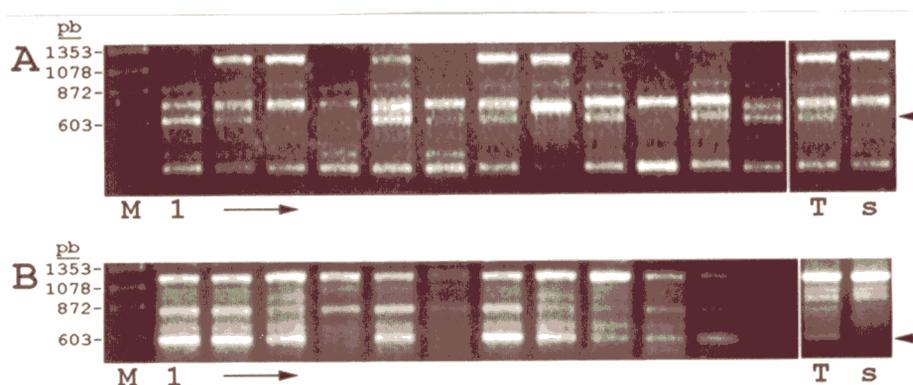


Figura 18.- Segregaciones de los fragmentos de RAPDs *OpB03*₆₅₅ y *OpR01*₆₀₀. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con los oligonucleótidos A) *OpB03* y B) *OpR01* en 12 plantas de la descendencia AR6.17 \otimes . T: bloque de plantas tolerantes al aluminio. s: bloque de plantas sensibles al aluminio. M: Fago ϕ X174 digerido con *Hae* III. Las flechas indican los fragmentos diferenciales.

En la tabla 12 se muestran las segregaciones conjuntas de estos fragmentos de RAPDs con el gen de tolerancia al aluminio y las distancias genéticas estimadas.

Loci	Distribución de la descendencia				X ²	cM
	T,+	T,-	s,+	s,-		
<i>Alt1, OpB03₆₅₅</i>	64	9	7	17	31,51***	21,9
<i>Alt1, OpR01₆₀₀</i>	72	1	1	23	86,64***	2,2
	+,+	+,-	-,+	-, -		
<i>OpB03₆₅₅, OpR01₆₀₀</i>	64	7	9	17	31,53***	21,9

Tabla 12.- Relaciones de ligamiento observadas entre los loci *OpB03₆₅₅*, *OpR01₆₀₀* y *Alt1*. ***X² con diferencias significativas a nivel de P<0,001.

- **Análisis de bloques segregantes para el locus isoenzimático *Lap1***

El locus *Lap1* está localizado en el brazo corto del cromosoma *6R*. Nuestros resultados de ligamiento entre *Alt1* y loci isoenzimáticos localizados en *6R* apuntaban la posible localización en *6RS* de *Alt1*. Estos datos nos indujeron a pensar que *Lap1* se encontraría probablemente en las proximidades del gen de tolerancia al aluminio. Como se observa en la tabla 10, en la descendencia AR6.17⊗ no se encontraba segregando *Lap1*, y dado que en otros cruzamientos sí segregaba, como era el caso de la F2 AR1.13⊗, lo que intentamos fue buscar fragmentos amplificados mediante RAPDs ligados a *Lap1* en ese cruzamiento, para posteriormente, traspasar esos fragmentos a la F2 AR6.17⊗.

Por lo tanto, en este caso se prepararon los bloques de plantas en función de su genotipo para el locus *Lap1*. Se realizaron amplificaciones con 120 cebadores en bloques de 15 plantas con genotipos 11 y 22 para *Lap1*, en la F2 AR1.13⊗. De este modo, se obtuvieron los fragmentos de amplificación *OpB15₇₉₀* y *OpB16₁₁₄₅*, asociados a los bloques 11 y 22 para *Lap1*, respectivamente.

La amplificación con estos primers en los individuos del cruzamiento AR6.17⊗ rindió resultados diferentes para los dos fragmentos. El fragmento *OpB16₁₁₄₅* no se detectaba en la

descendencia AR6.17 \otimes . Sin embargo, el fragmento *OpB15*₇₉₀ si se amplificaba, mostrando una segregación de tipo 3:1 (Figura 19). En el análisis de ligamiento se comprobó que no existían recombinantes entre este locus y el locus de tolerancia al aluminio (Tabla 13).

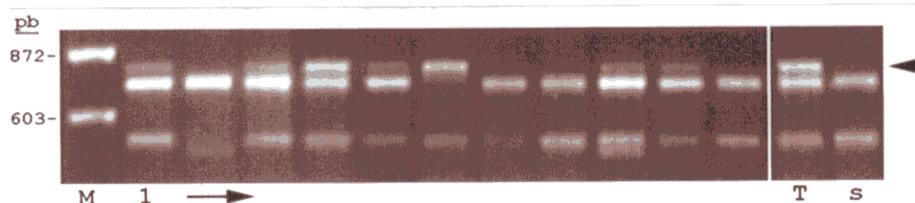


Figura 19.- Segregación del fragmento *OpB15*₇₉₀. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con el oligonucleótido OpB15 en 11 plantas de la descendencia AR6.17 \otimes . T: bloque de plantas tolerantes al aluminio. s: bloque de plantas sensibles al aluminio. M: Fago ϕ X174 digerido con *Hae*III. La flecha indica el fragmento *OpB15*₇₉₀.

Loci	Distribución de la descendencia				X ²	cM
	T,+	T,-	s,+	s,-		
<i>Alt1,OpB15</i> ₇₉₀	46	27	24	0	12,28**	0

Tabla 13.- Relaciones de ligamiento observadas entre el locus *OpB15*₇₉₀ y el locus de tolerancia al aluminio (*Alt1*). ** X² con diferencias significativas a nivel de P<0,01.

b) Análisis de bloques segregantes para la tolerancia al aluminio en otro cromosoma diferente al 6R

En el cruzamiento AR1.13 \otimes se encontraba segregando un gen de tolerancia al aluminio que no aparecía como ligado a isoenzimas localizadas en el cromosoma 6R. Se realizaron amplificaciones en bloques de 15 plantas tolerantes y 15 sensibles de este cruzamiento para intentar localizar dicho gen. El procedimiento empleado fue similar al relatado con anterioridad. Se utilizaron 120 cebadores, correspondientes a los kits A, B, C, F, R y S de la casa Operon. Únicamente en 7 del total de primers empleados no se obtuvo ninguna amplificación (OpA19, OpC03, OpC04, OpC17, OpF11, OpF14 y OpF15). Con el resto de cebadores se amplificaron un total de 422 fragmentos, con un rango de 1 a 11 fragmentos por primer. Del total de bandas analizadas se encontró una, correspondiente a la amplificación con el cebador OpS14 (705 pb), que estaba presente en el bloque de plantas tolerantes y no en el de sensibles.

Se amplificó con OpS14 el ADN de los individuos de la descendencia AR1.13⊗. Si bien en el caso de los bloques las diferencias eran siempre claras, en el caso de plantas individuales las amplificaciones no eran siempre eficientes, con lo cual a muchos individuos no se les podía asignar un genotipo con fiabilidad. Por ello, se decidió pasar directamente a la obtención de cebadores específicos (SCAR) que permitieran el análisis de ligamiento.

2.2.2 Localización cromosómica de fragmentos amplificados por PCR en líneas de adición

a) Localización cromosómica de fragmentos amplificados por RAPDs

Paralelamente a los experimentos relatados hasta el momento, desarrollamos experimentos de localización cromosómica de fragmentos amplificados mediante RAPDs. De esta forma, intentábamos producir un banco de marcadores moleculares de utilidad, tanto en los estudios sobre tolerancia al aluminio como en futuros trabajos.

Se realizaron amplificaciones en trigo (CS), en centeno (I), en el anfiploide (CS-I) y en las siete líneas disómicas de adición trigo-centeno empleando 60 oligonucleótidos decámeros (Kits A, B y F). El número de fragmentos amplificados por cada oligonucleótido osciló entre 1 y 6 en trigo y entre 1 y 7 en centeno. Del conjunto de los 137 fragmentos obtenidos en centeno, 45 solaparon con bandas de trigo y tan sólo 21 pudieron ser localizados, encontrándose estos repartidos a lo largo de los 7 cromosomas del complemento haploide del centeno. Los 70 fragmentos restantes, pese a no solapar con bandas de trigo, no se observaron en ninguna de las líneas de adición.

Los 21 fragmentos localizados fueron a su vez asignados a un brazo cromosómico determinado mediante amplificación, empleando las líneas ditelosómicas correspondientes. Por ejemplo, la amplificación con el oligonucleótido OpA10 generó un fragmento de 370 pb que fue localizado en el cromosoma 7R. Mediante amplificación de las líneas ditelosómicas 7RS y 7RL este fragmento fue asignado al brazo largo del cromosoma 7 del centeno (figura 20).

El tamaño del fragmento localizado con cada uno de los oligonucleótidos, el cromosoma y el brazo cromosómico en el que se localiza figuran en la tabla 14.

Oligonucleótidos decámeros	Tamaño de los fragmentos localizados (pb)	Brazo cromosómico
OpA01	570	5RS
OpA02	304	6RL
OpA05	385	4RS
OpA08	415	6RL
OpA10	370	7RL
OpA13	230	6RL
OpA17	466	1RL
OpA20	564	5RS
OpB04	325	3RL
OpB07	276	3RL
OpB15	365	6RL
OpB16	175	3RL
OpB17	315	3RS
OpB18	330	3RS
OpF01	263	2RS
OpF01	570	3RS
OpF01	476	7RL
OpF05	257	3RS y 6RL
OpF08	311	2RL
OpF14	370	4RL
OpF19	221	2RL

Tabla 14.- Localización cromosómica de los productos de amplificación obtenidos mediante RAPDs.

En la tabla 14 puede observarse que 13 de los 21 fragmentos fueron localizados en los cromosomas 3R (*OpB04*₃₂₅, *OpB07*₂₇₆, *OpB16*₁₇₅, *OpB17*₃₁₅, *OpB18*₃₃₀, *OpF01*₅₇₀ y *OpF05*₂₅₇), 4R (*OpA05*₃₈₅ y *OpF14*₃₇₀) y 6R (*OpA02*₃₀₄, *OpA13*₂₃₀, *OpB15*₃₆₅ y *OpF05*₂₅₇), donde se ha descrito la existencia de genes de tolerancia al aluminio, mediante el estudio de líneas de adición (Aniol y Gustafson, 1984).

Como resultado de la amplificación a partir del oligonucleótido OpA08 se localizó un fragmento de 415 pb en el cromosoma 6R del complemento haploide del centeno. Con el fin de comprobar que las bandas de igual movilidad electroforética obtenidas en centeno, línea 6R y anfiploide correspondían al mismo fragmento de ADN amplificado, se procedió a la transferencia de los productos de amplificación a un filtro de nylon. Tras realizar la hibridación con una sonda específica de centeno marcada con digoxigenina se confirmó la hipótesis de partida, observándose los correspondientes productos de hibridación en centeno, la línea 6R y el anfiploide (figura 21).

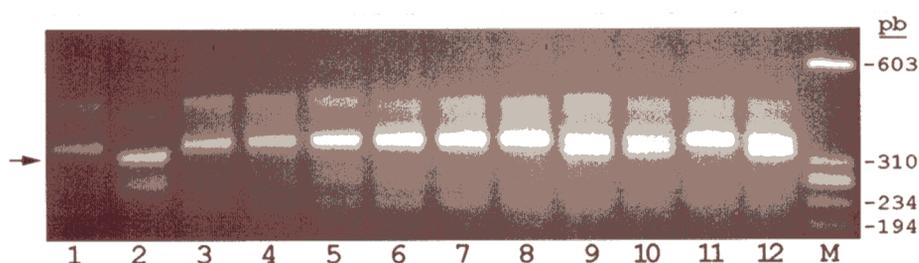


Figura 20.- Localización del fragmento *OpA10*₃₇₀. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con el oligonucleótido OpA10. 1: *Triticum aestivum* "Chinese spring". 2: *Secale cereale* "Imperial". 3-9: Líneas de adición CS-I 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R, respectivamente. 10: Anfiploide. 11 y 12: Líneas ditelocéntricas de adición 7RS, 7RL, respectivamente. M: Fago ϕ X174 digerido con *Hae* III. La flecha indica el fragmento localizado.

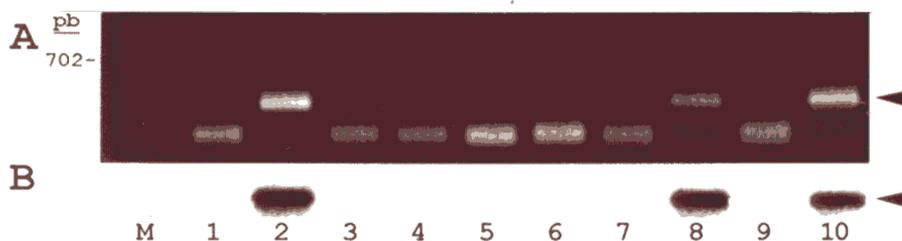


Figura 21.- Localización del fragmento *OpA08*₄₁₅. A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con el oligonucleótido OpA08. B) Hibridación con el fragmento de 415 pb (localizado en el cromosoma 6R) marcado con digoxigenina. 1: *Triticum aestivum* "Chinese spring". 2: *Secale cereale* "Imperial". 3-9: Líneas de adición CS-I 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R, respectivamente. 10: Anfiploide. M: Fago lambda digerido con *BstE* II. Las flechas indican el fragmento localizado

Las localizaciones obtenidas a partir de la amplificación con los oligonucleótidos OpA01, OpA02, OpA05, OpA10, OpA13 y OpB04 fueron confirmadas mediante la realización de "dot-blots". Se llevó a cabo la hibridación del ADN de trigo (CS), de centeno (I), del anfiploide (CS-I) y de las siete líneas disómicas de adición trigo-centeno, con sondas marcadas con digoxigenina obtenidas a partir de los fragmentos de centeno (I), previamente

localizados por RAPDs. Como resultado, se observó que las distintas sondas hibridaban con el ADN de centeno, el del anfiploide y el de la correspondiente línea de adición en la que se había realizado la localización.

Estos resultados nos impulsaron a intentar la localización, mediante la técnica de dot-blot, de diez de los fragmentos amplificados que no habían podido asignarse a ningún cromosoma directamente. Estas localizaciones no fueron posibles porque, o bien, la señal de hibridación aparecía en todos los puntos, o bien, aparecía en todos menos en el del trigo (CS).

b) Localización cromosómica de fragmentos con posible homología con los genes *wali* de trigo

Se diseñaron cebadores específicos a partir de las secuencias conocidas de tres clones inducibles por aluminio en trigo (*wali1*, *wali2* y *wali5*) (Snowden y Gardner, 1993; Richards y col., 1994), con la finalidad de intentar localizar, mediante amplificación en las líneas de adición trigo-centeno, los correspondientes genes homeólogos en centeno. De esta forma se trataba de comprobar si existía alguna relación entre los genes de tolerancia al aluminio presentes en nuestras descendencias y estos clones de trigo.

Se realizaron amplificaciones en las líneas de adición trigo-centeno a una temperatura de renaturalización de 60°C. Para comprobar que los fragmentos amplificados tenían homología con los genes de trigo, se transferían los geles de agarosa a filtros de nylon para realizar hibridaciones tipo Southern, empleando como sonda los clones originales de trigo. Los fragmentos de centeno que mostraban señal de hibridación eran secuenciados para comprobar el grado de homología con el trigo. En el apéndice I se muestran las secuencias completas de estos fragmentos.

La pareja de cebadores diseñada a partir de la secuencia de *wali1* amplificaba varios fragmentos en el centeno Imperial. La hibridación posterior mostró que únicamente dos de estos fragmentos (*wali1.1* y *wali1.2*) presentaban cierto grado de homología con la sonda de trigo (Figura 23a). En ninguno de los dos casos estas bandas aparecieron en alguna de las líneas de adición y los resultados de la secuenciación de los mismos indicaron que el grado de

semejanza era mucho menor del esperado. Incluso se pudo observar que en los dos extremos de estos fragmentos se hallaba el mismo cebador con la secuencia invertida.

En el caso de la amplificación con la pareja de cebadores correspondiente a *wali2* se observó la presencia de un fragmento de 985 pb en centeno (*rali2*). Mediante hibridación con la sonda de trigo, se pudo localizar dicho fragmento en los cromosomas *4R* y *7R* (Figura 23b). La secuencia de este fragmento mostró una homología con el clon de trigo del xx % (Figura 22).

En la descendencia AR1.13⊗ estaba segregando un gen de tolerancia al aluminio localizado en un cromosoma diferente del *6R*. Por ello, se realizaron amplificaciones en 10 individuos de esta descendencia con la pareja de cebadores de *wali2*, en la esperanza de que pudiera existir ligamiento entre este fragmento de 985 pb y el gen de tolerancia al aluminio. A una temperatura de 58°C se conseguía amplificar la banda, pero no hubo posibilidad de observar variabilidad, ni directamente por presencia o ausencia, ni mediante digestión de los productos de amplificación con las 17 enzimas de restricción descritas en material y métodos.

La pareja de cebadores correspondiente a *wali5* no amplificó ninguna banda en centeno y tampoco se observó fragmento alguno por hibridación con la sonda de trigo (Figura 23c).

Figura 22.- Homologia de wali2

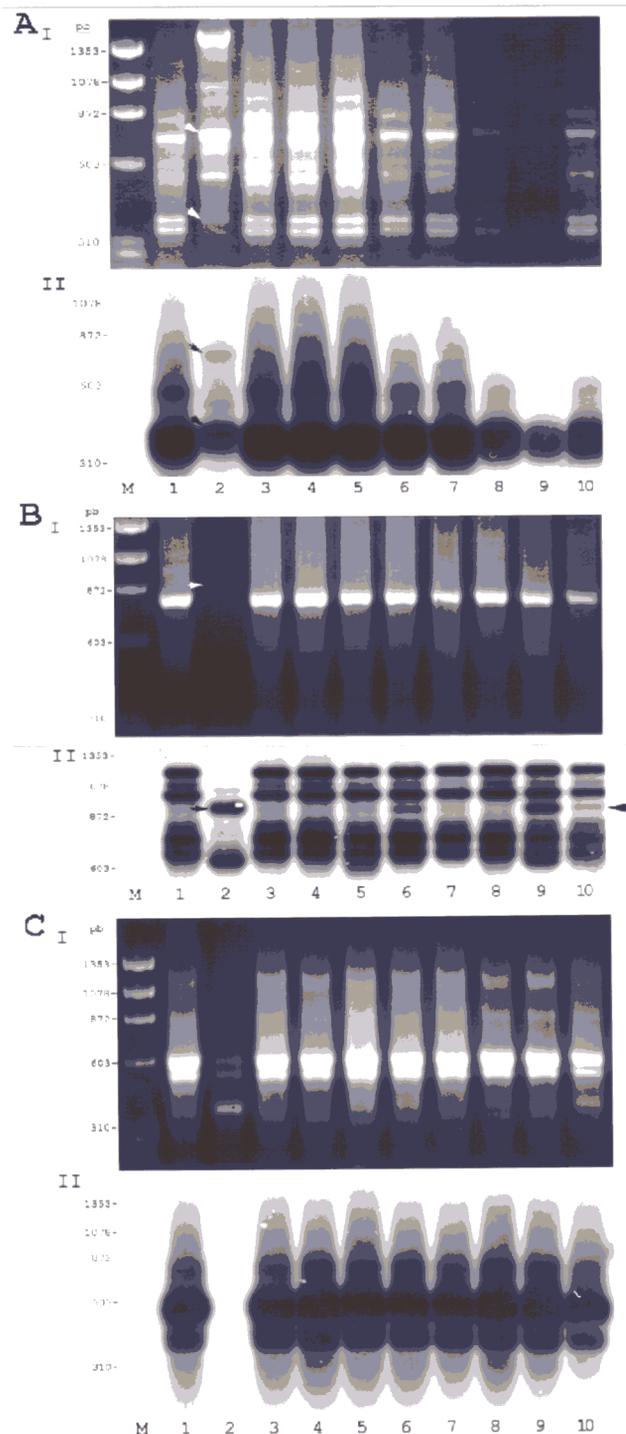


Figura 23.- Amplificaciones por PCR (60 °C) con los cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias conocidas de los clones inducibles por aluminio en trigo A) *wali1*, B) *wali2* y C) *wali5*. I) Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados. II) Hibridación a 65°C con los clones originales de trigo, marcados con digoxigenina. 1: *Triticum aestivum* "Chinese spring". 2: *Secale cereale* "Imperial". 3-9: Líneas de adición CS-I 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R, respectivamente. 10: Anfiploide. M: Fago ϕ X174 digerido con *Hae* III. Las flechas en el interior de las figuras indican los fragmentos secuenciados, mientras que en el exterior muestran los fragmentos localizados.

2.3 Obtención de SCAR

En este trabajo se planteó la obtención de SCARs a partir de diferentes fragmentos amplificados por RAPDs. El objetivo era, por un lado, aumentar la robustez de los marcadores moleculares ligados a los genes de tolerancia al aluminio y, por otro, incorporar nuevos marcadores ligados a dichos genes. Para ello, era necesario secuenciar cada uno de los fragmentos de interés y, de este modo, poder diseñar cebadores “largos” que permitieran la realización de amplificaciones específicas, siguiendo el protocolo descrito en material y métodos.

Para cada pareja de cebadores se determinó empíricamente su temperatura idónea de renaturalización. La decisión de esta temperatura dependía de dos factores: 1) debía conseguirse amplificar únicamente el fragmento deseado y 2) debía producirse, si esto era posible, la diferenciación de los genotipos directamente por presencia o ausencia de la banda amplificada. Lógicamente, no fue posible en todos los casos alcanzar este segundo objetivo. En la tabla 15 se muestran los fragmentos de ADN para los que se obtuvieron cebadores específicos, el interés que podían tener en este estudio, las temperaturas establecidas para la amplificación y si se consiguió o no diferenciar directamente por PCR los genotipos. En el apéndice I se presentan las secuencias obtenidas de los RAPDs, para el diseño de los cebadores.

Locus	Situación	Tª de renaturalización	Variabilidad por PCR
<i>OpA08₄₁₅</i>	Localizado en <i>6RL</i>	69°C	No
<i>OpB03₆₅₅</i>	Ligado a <i>Alt1</i> en <i>6R</i>	61°C	Si
<i>OpB15₇₉₀</i>	Ligado a <i>Alt1</i> en <i>6R</i>	63°C	Si
<i>OpB16₁₁₄₅</i>	Ligado a <i>Lap1</i> en <i>6R</i>	65°C	No
<i>OpR01₆₀₀</i>	Ligado a <i>Alt1</i> en <i>6R</i>	63°C	Si
<i>OpS14₇₀₅</i>	Ligado a <i>Alt3</i>	58°C	No

Tabla 15.- Fragmentos de ADN para los que se diseñaron cebadores específicos.

En el caso de los fragmentos *OpB03₆₅₅*, *OpB15₇₉₀* y *OpR01₆₀₀* se pudo mantener la variabilidad previamente observada en RAPDs. Los datos de presencia-ausencia de estos fragmentos fueron totalmente coincidentes con los previamente obtenidos para RAPDs (Figura 24). Además, se intentó confirmar la localización cromosómica de estos fragmentos, mediante amplificación en las líneas de adición trigo-centeno. El locus *OpB03₆₅₅* fue el único

caso en el que no se consiguió su localización, dado que no se encontró ninguna temperatura a la que se amplificara el fragmento en las líneas de adición. Los fragmentos *OpB15*₇₉₀ y *OpR01*₆₀₀ fueron localizados en el brazo corto del cromosoma 6R (Figura 25), mediante amplificación con una temperatura de renaturalización de 63°C y 59°C, respectivamente.

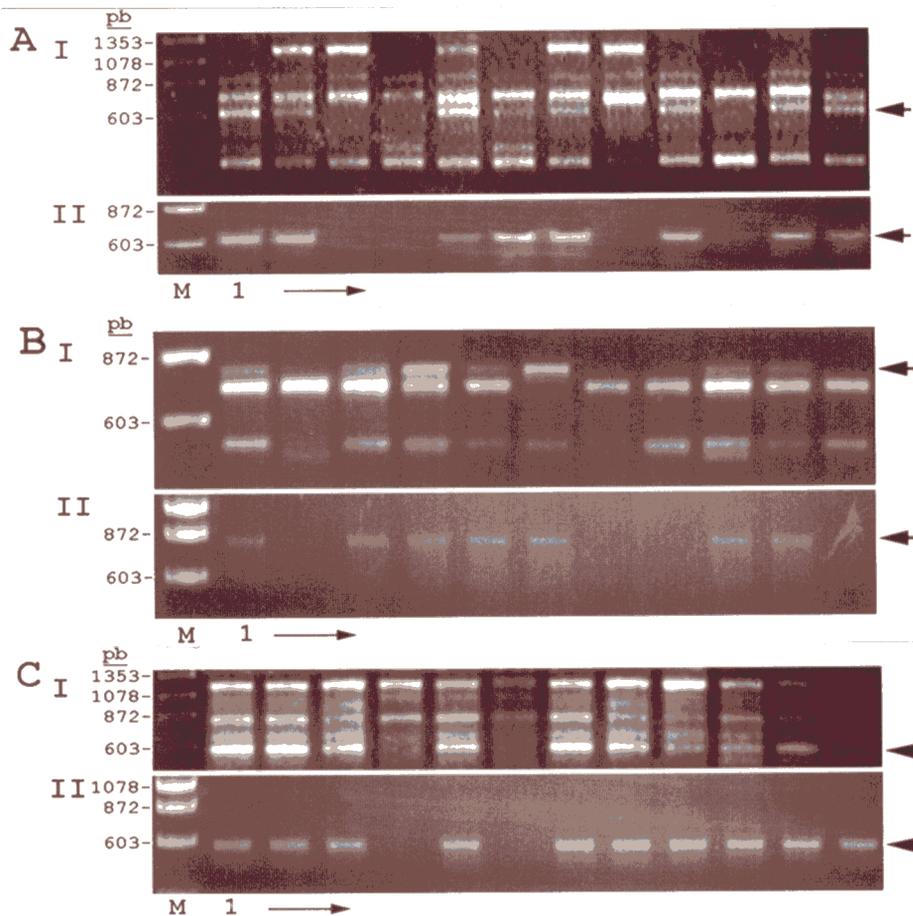


Figura 24.- Segregaciones de los marcadores SCAR A) *OpB03*₆₅₅, B) *OpB15*₇₉₀ y C) *OpR01*₆₀₀. Comparación de los resultados de presencia o ausencia de los fragmentos de interés amplificados I) por RAPDs (con los oligonucleótidos decámeros) y II) por SCAR (con los cebadores específicos) en varias plantas de la descendencia AR6.17⊗. M: Fago φX174 digerido con *Hae* III. Las flechas indican los fragmentos de interés.

En cuanto a los fragmentos *OpA08*₄₁₅, y *OpB16*₁₁₄₅, no se pudo detectar variabilidad directamente por PCR. Por ello, se realizaron digestiones de los fragmentos amplificados con las parejas de “primers” *OpA08F-R* y *OpB16F-R*, empleando 17 enzimas de restricción. De esta forma, sí fue posible detectar segregación del fragmento amplificado con *OpA08F-R* mediante digestión con *Rsa*I, ya que en algunos individuos aparecían tres nuevos fragmentos de menor tamaño (Figura 26). La segregación de este locus se ajustaba a una segregación

mendeliana (1:2:1) y en el análisis de ligamiento se comprobó que se comportaba como ligado al gen de tolerancia al aluminio (Tabla 16). Sin embargo, no se encontró polimorfismo con ninguna de las 17 enzimas de restricción para el fragmento amplificado con OpB16F-R. La localización de estos dos fragmentos en el cromosoma 6R fue confirmada, al igual que en el caso anterior, mediante amplificación en las líneas de adición trigo-centeno. En el caso del locus *OpA08₄₁₅* fue confirmada su localización previa en 6RL, amplificando a 69°C, mientras que *OpB16₁₁₄₅* fue localizado en 6RS, amplificando a 61°C (Figura 27).

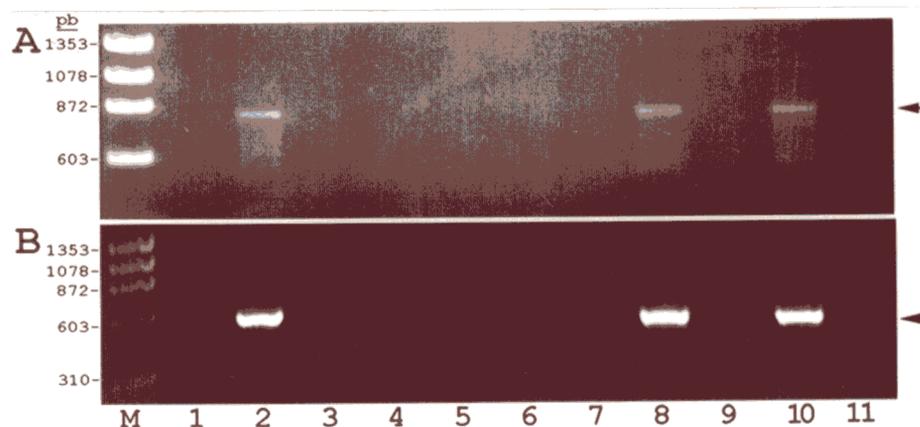


Figura 25.- Localizaciones de los fragmentos SCAR A) *OpB15₇₉₀* y B) *OpR01₆₀₀*. 1: *Triticum aestivum* "Chinese spring". 2: *Secale cereale* "Imperial". 3-9: Líneas de adición CS-I 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R, respectivamente. 10: Anfiplóide. 11: Línea ditelocéntrica de adición 6RL. M: Fago ϕ X174 digerido con *Hae* III. Las flechas indican los fragmentos localizados.

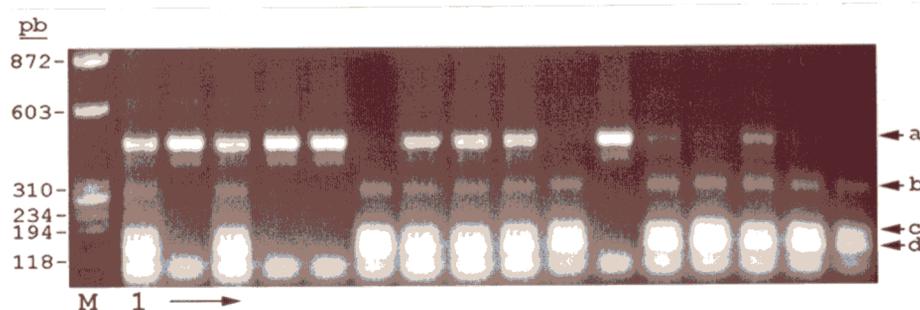


Figura 26: Segregación del fragmento SCAR *OpA08₄₁₅*. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos OpA08F y R y posteriormente digeridos con la enzima *Rsa* I en 16 plantas de la descendencia AR6.17 \otimes . M: Fago ϕ X174 digerido con *Hae* III. El fragmento a se corresponde en tamaño con el producto de PCR sin digerir, mientras que los fragmentos b, c y d aparecen solamente tras la digestión con *Rsa*I.

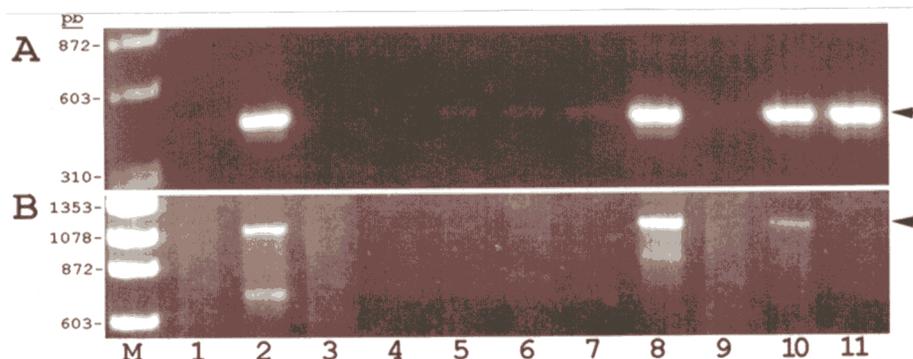


Figura 27.- Localizaciones de los fragmentos SCAR A) *OpA08₄₁₅* y B) *OpB16₁₁₄₅*. 1: *Triticum aestivum* "Chinese spring". 2: *Secale cereale* "Imperial". 3-9: Líneas de adición CS-I 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R, respectivamente. 10: Anflploide. 11: Línea ditelocéntrica de adición 6RL. M: Fago ϕ X174 digerido con *Hae* III. Las flechas indican los fragmentos localizados.

Loci	Distribución de la descendencia						X ²	cM
	T,11	s,11	T,12	s,12	T,22	s,22		
<i>Alt1, OpA08₄₁₅</i>	22	2	42	9	9	13	18,75***	33,5

Tabla 16.- Relaciones de ligamiento observadas entre *OpA08₄₁₅* y *Alt1*. *** X² con diferencias significativas a nivel de P<0,001.

Para el único marcador de PCR ligado al otro gen de tolerancia al aluminio (*OpS14₇₀₅*) el procedimiento seguido fue muy similar. Una vez diseñada la pareja de cebadores OpS14F-R, se determinó, como en los casos anteriores, la máxima temperatura a la cual se amplificaba únicamente el fragmento esperado. Dicha temperatura era de 58°C, pero no fue posible conservar la segregación (presencia-ausencia).

Se llevaron a cabo amplificaciones en individuos de la descendencia AR1.13 \otimes y posteriormente se realizaron digestiones con 17 enzimas de restricción. Con la enzima *Hha*I pudo detectarse la aparición, en algunos individuos, de un nuevo fragmento de 490 pb, observándose una segregación que se ajustaba a la de un carácter dominante (3:1) (Figura 28). En el análisis de ligamiento se comprobó que este fragmento se comportaba como ligado al gen de tolerancia al aluminio. (Tabla 17).

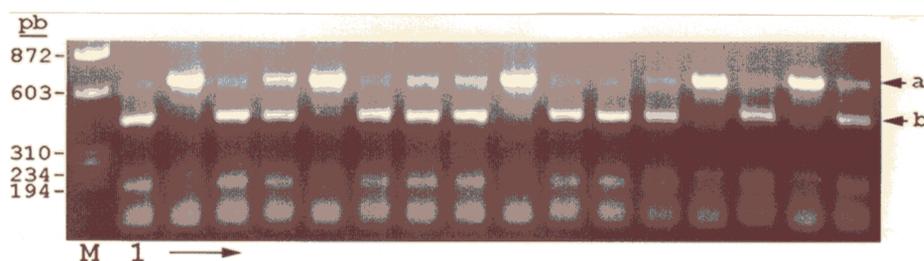


Figura 28.- Segregación del fragmento SCAR *OpS14705*. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con los oligonucleótidos OpS14F y R y posteriormente digeridos con la enzima *HhaI* en 16 plantas de la descendencia AR1.13 \otimes . M: Fago ϕ X174 digerido con *Hae* III. El fragmento a se corresponde en tamaño con el producto de PCR sin digerir, mientras que el fragmento b aparece solamente tras la digestión con *HhaI*.

Loci	Distribución de la descendencia				X ²
	T,+	T,-	s,+	s,-	
<i>Alt3,OpS14705</i>	48	27	32	2	14,94**

Tabla 17.- Relaciones de ligamiento observadas entre el locus *OpS14705* y el locus de tolerancia al aluminio (*Alt3*). ** X² con diferencias significativas a nivel de P<0,01.

Para intentar localizar este fragmento se realizaron amplificaciones en las líneas de adición trigo-centeno. A una temperatura de 58°C aparecía un fragmento, del tamaño esperado, en trigo, centeno y las siete líneas de adición, mientras que al subir un grado más la temperatura este fragmento desaparecía de todas las líneas. Por ello, se realizaron experimentos de tipo Southern, hibridando la PCR, a 68°C, con la sonda obtenida a partir del fragmento amplificado en Imperial. De esta forma, se pudo localizar este fragmento en el brazo cromosómico *4RL* (Figura 29).

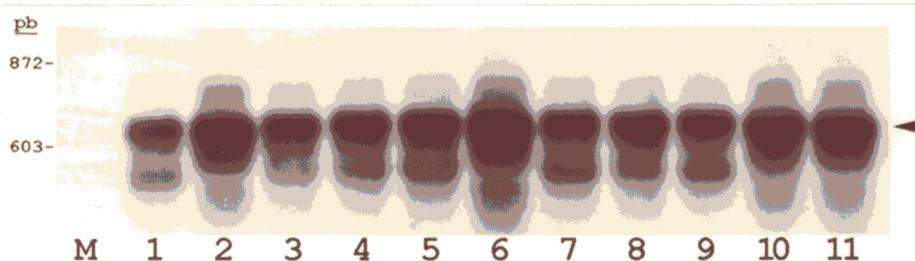


Figura 29.- Localización del fragmento *OpS14705*. Hibridación de los productos amplificados con los oligonucleótidos OpS14F y R con el fragmento amplificado en el centeno "Imperial", marcado con digoxigenina. 1: *Triticum aestivum* "Chinese spring". 2: *Secale cereale* "Imperial". 3-9: Líneas de adición CS-I 1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R y 7R, respectivamente. 10: Anfiploide. 11: Línea ditelocéntrica de adición *4RL*. M: Fago lambda digerido con *BstE* II. La flecha indica el fragmento localizado.

En la tabla 18 se resumen las localizaciones cromosómicas obtenidas para todos los marcadores SCAR empleados, mediante el análisis de líneas de adición trigo-centeno.

Locus	Braza cromosómico
<i>OpA08₄₁₅</i>	<i>6RL</i>
<i>OpB03₆₅₅</i>	-
<i>OpB15₇₉₀</i>	<i>6RS</i>
<i>OpB16₁₁₄₅</i>	<i>6RS</i>
<i>OpR01₆₀₀</i>	<i>6RS</i>
<i>OpS14₇₀₅</i>	<i>4RL</i>

Tabla 18.- Localización cromosómica de los marcadores SCAR obtenidos

3 Construcción de mapas genéticos en los cromosomas 6R y 4R

3.1 Construcción de un mapa genético en el cromosoma 6R

En la tabla 19 se muestran la totalidad de las segregaciones conjuntas obtenidas con todos los loci que se encontraban segregando en la descendencia AR6.17 \otimes .

Los dos marcadores más próximos al locus de tolerancia (*Alt1*) eran *OpB15₇₉₀* y *OpR01₆₀₀*, hallándose a una distancia de 0 y 2,2 cM, respectivamente.

Una vez que habíamos obtenido una serie de marcadores isoenzimáticos (*Aco1*, *Ndh2*, *Est6* y *Est8*) y basados en PCR (*OpB03₆₅₅*, *OpR01₆₀₀*, *OpB15₇₉₀* y *OpA08₄₁₅*) ligados al gen de tolerancia al aluminio en 6R (*Alt1*), pasamos a construir un mapa genético, empleando el programa MAPMAKER/EXP 3.0, con un LOD=4. El mapa obtenido se muestra en la figura 30.

Loci	Distribución de la descendencia						X ²	cM			
	T,11	s,11	T,12	s,12	T,22	s,22					
<i>Alt1, OpA08₄₁₅</i>	22	2	42	9	9	13	18,75***	33,5			
<i>Alt1, Aco1</i>	8	16	43	6	22	2	31,17***	24,6			
	T,+	T,-	s,+	s,-							
<i>Alt1, Est6</i>	58	15	21	3			0,75	-			
<i>Alt1, Est8</i>	53	20	12	12			3,18	-			
<i>Alt1, Ndh2</i>	58	15	11	13			9,94**	46,4			
<i>Alt1, OpB03₆₅₅</i>	64	9	7	17			31,51***	21,9			
<i>Alt1, OpB15₇₉₀</i>	46	27	24	0			12,28***	0			
<i>Alt1, OpR01₆₀₀</i>	72	1	1	23			86,64***	2,2			
	11,11	11,12	11,22	12,11	12,12	12,22	22,11	22,12	22,22		
<i>OpA08₄₁₅, Aco1</i>	0	7	17	5	39	7	19	3	0	53,71***	13,8
	11,+	11,-	12,+	12,-	22,+	22,-					
<i>OpA08₄₁₅, Est6</i>	14	10	44	7	21	1				12,11**	29,9
<i>OpA08₄₁₅, Est8</i>	22	2	38	13	5	17				27,13***	29,1
<i>OpA08₄₁₅, Ndh2</i>	24	0	45	6	0	22				71,13***	6,4
<i>OpA08₄₁₅, OpB03₆₅₅</i>	24	0	45	6	2	20				29,71***	9
<i>OpA08₄₁₅, OpB15₇₉₀</i>	9	15	40	11	21	1				36,57***	30,8
<i>OpA08₄₁₅, OpR01₆₀₀</i>	22	2	42	9	9	13				18,75**	33,5
<i>Aco1, Est6</i>	24	0	39	10	16	8				9,33**	42,4
<i>Aco1, Est8</i>	8	16	35	14	22	2				19,92***	42,5
<i>Aco1, Ndh2</i>	5	19	40	9	24	0				43,29***	16,8
<i>Aco1, OpB03₆₅₅</i>	1	23	46	3	24	0				80,19***	4,3
<i>Aco1, OpB15₇₉₀</i>	24	0	40	9	6	18				38,41***	18,5
<i>Aco1, OpR01₆₀₀</i>	8	16	43	6	22	2				31,16***	24,6
	+,+	+,-	-,+	-,-							
<i>Est6, Est8</i>	47	32	18	0						10,86***	0
<i>Est6, Ndh2</i>	52	27	17	1						5,83*	26,1
<i>Est6, OpB03₆₅₅</i>	54	25	17	1						5,08*	28,7
<i>Est6, OpB15₇₉₀</i>	61	18	9	9						5,33*	-
<i>Est6, OpR01₆₀₀</i>	58	21	15	3						0,77	-
<i>Est8, Ndh2</i>	57	8	12	20						26,29***	26,7
<i>Est8, OpB03₆₅₅</i>	56	9	15	17						16,89***	36,4
<i>Est8, OpB15₇₉₀</i>	43	22	27	5						3,41	-
<i>Est8, OpR01₆₀₀</i>	53	12	20	12						3,19	-
<i>Ndh2, OpB03₆₅₅</i>	63	6	8	20						39,97***	17,5
<i>Ndh2, OpB15₇₉₀</i>	44	25	26	2						8,37**	32,2
<i>Ndh2, OpR01₆₀₀</i>	58	11	15	13						9,96**	46,4
<i>OpB03₆₅₅, OpB15₇₉₀</i>	45	26	25	1						10,17**	20,6
<i>OpB03₆₅₅, OpR01₆₀₀</i>	64	7	9	17						31,53***	21,9
<i>OpB15₇₉₀, OpR01₆₀₀</i>	46	24	27	0						12,29***	0

Tabla 19.- Relaciones de ligamiento observadas entre todos los loci localizados en 6R. * X² con diferencias significativas a nivel de P<0,05; ** X² con diferencias significativas a nivel de P<0,01; *** X² con diferencias significativas a nivel de P<0,001.

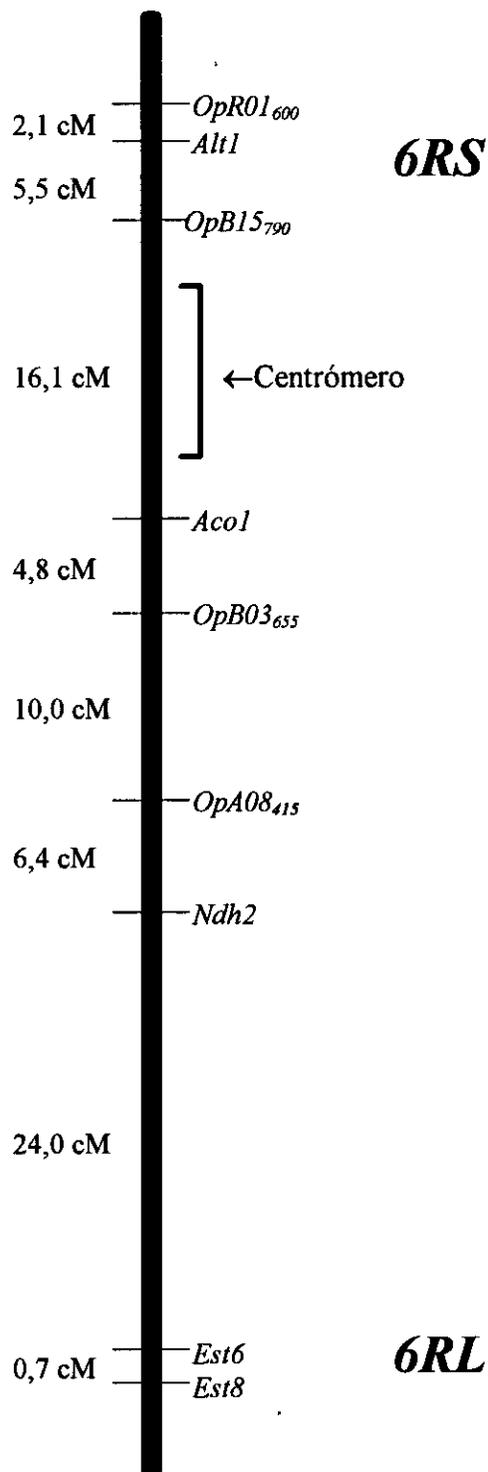


Figura 30.- Mapa genético obtenido en el cromosóma 6R.

3.2 Construcción de un mapa genético en el cromosoma 4R

En el cromosoma 4R únicamente se pudo localizar el locus *OpS14705* ligado al gen de tolerancia al aluminio (*Alt3*) (tabla 18). En la figura 31 se muestra el mapa genético obtenido.

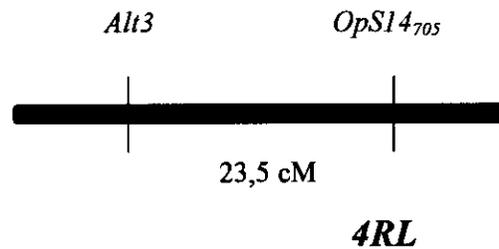


Figura 31.- Mapa genético obtenido en el cromosoma 4R.

Como se puede observar en la figura 31, el marcador *OpS14705* se halla a una distancia de 23,5 cM del locus de tolerancia *Alt3*.

Discusión

1 Tolerancia al aluminio en centeno

Se han desarrollado diferentes métodos para analizar la tolerancia al aluminio en plantas, como son: cultivos de células y tejidos, cultivo con soluciones de nutrientes, ensayos de suelos y evaluación en campo (revisión en Carver y Ownby, 1995). La utilización de un test de tolerancia que permita el análisis de un importante número de plantas simultáneamente, que posibilite la selección de individuos sin su destrucción y que, sobre todo, sea fiable es la clave en investigaciones sobre la genética de la tolerancia a un estrés por metales. Los test de tolerancia en cultivos cumplen estas tres condiciones, presentando una elevada correlación con los realizados en campo (Reid y col., 1971; Campbell y Lafever, 1976; Howler y Cadavid, 1976; McCain y Davies, 1983). Además, se han observado mayores grados de heredabilidad para la tolerancia al aluminio empleando soluciones de nutrientes (0,73-0,89) (Campbell y Lafever, 1978; Camargo, 1984) que en el caso de ensayos en campo (0,49-0,72) (Nodari y col., 1982). Debe tenerse en cuenta que en este tipo de test se pueden controlar en mayor medida las condiciones de los experimentos, homogeneizando de este modo los resultados obtenidos.

Está ampliamente demostrado que el efecto principal del aluminio se ejerce en la raíz, desde los estadios más tempranos de desarrollo de la planta (Delhaize y Ryan, 1995). Nuestras observaciones indican que es específicamente a este nivel donde aparecen los daños en las plantas, diferenciando los genotipos tolerantes de los sensibles.

El centeno, junto con la avena, han sido descritos como las gramíneas con mayor grado de tolerancia, en contraposición a otras especies como el trigo y la cebada, mucho más sensibles (Aniol, 1990). Los trigos más tolerantes, como es el caso de la variedad "Atlas 66", no resisten concentraciones de aluminio superiores a 25 μM , mientras que los centenos toleran, por lo general, concentraciones de hasta 150 μM . Nuestros datos en las diferentes poblaciones de centeno han coincidido con los previamente obtenidos en otros trabajos, donde se observaron niveles de tolerancia a concentraciones muy similares a las empleadas por nosotros. En un estudio sobre tolerancia al aluminio en centeno, Aniol y col. (1980) clasifican una serie de líneas consanguíneas analizadas en cuatro grupos: I) sensibles a 30 ppm de aluminio, II) sensibles a 50 ppm, III) sensibles a

70 ppm y IV) tolerantes a 70 ppm, presentando todas las líneas del grupo I y buena parte de las del grupo II una inhibición irreversible del crecimiento de la raíz tras los tratamientos. Dentro de esta clasificación podrían incluirse las poblaciones que hemos analizado. Así, línea consanguínea Pool y los cultivares JNK y Ailés se hallarían en el grupo IV (altamente tolerantes), mientras que la línea consanguínea Riodeva estaría encuadrada en el grupo III (medianamente tolerante). El hecho de que Ailés y Riodeva tuvieran un comportamiento claramente diferenciable y que además no sufrieran daños irreversibles tras los tratamientos los convierten en un material idóneo para la realización de cruzamientos donde analizar la genética de este proceso.

Todas las descendencias F1 analizadas, procedentes de cruzamientos entre plantas de Riodeva y Ailés, presentaban tolerancia al aluminio, indicando que esta tolerancia es dominante respecto de la sensibilidad. El hecho de que las medias de crecimiento de la raíz en las F1 fueran ligeramente superiores a las observadas en el cultivar Ailés (1,94 cm en las F1 frente a 1,46 cm en Ailés) podría deberse a que la realización de los cruzamientos se llevó a cabo seleccionando las plantas de Ailés con mayor crecimiento de la raíz tras los tratamientos.

En el caso de los retrocruzamientos, realizados a partir de las F1, se pudieron observar segregaciones para la tolerancia del tipo 1:1 y 3:1, mientras que en las F2 las segregaciones observadas eran del tipo 3:1 y 15:1. Estos datos indican que en estos cruzamientos se encontraban segregando al menos dos genes independientes de tolerancia al aluminio, con dominancia completa. Cabe destacar que el retrocruzamiento y la F2 en los que segregaban simultáneamente dos genes de tolerancia al aluminio (segregaciones 3:1 y 15:1, respectivamente) procedían de la misma F1 (Figura 13, pág 56), siendo sus medias de crecimiento superiores a las observadas en el resto de descendencias, donde hay un único gen segregando (Figura 12, pág 54). Estos resultados indican la existencia de un efecto aditivo para la tolerancia al aluminio en centeno. A mayor número de genes que confieren tolerancia al aluminio mayor crecimiento adicional de la raíz.

La segregación 9:7, observada en el retrocruzamiento AR1.7xR, podría deberse a la existencia de algún gen supresor de la expresión de la tolerancia al aluminio en

centeno, similar al caso del gen localizado en el brazo *6BS* de trigo (Aniol, 1990). Sin embargo, esta segregación podría explicarse simplemente por una ligera desviación estadística de una 1:1.

El análisis de las segregaciones para la tolerancia al aluminio en las descendencias de los diferentes cruzamientos entre Ailés y Riodeva confirma la existencia de varios genes de tolerancia, al menos dos, en centeno. En la literatura se citan tres genes de tolerancia (*Alt1*, *Alt2* y *Alt3*), localizados, por análisis en las líneas de adición trigo “Chinese Spring” y centeno “Imperial”, en los cromosomas *6RS*, *3R* y *4R*, respectivamente (Aniol y Gustafson, 1984). En un trabajo reciente de Aniol y Madej (1996) se analiza la tolerancia al aluminio en una serie de líneas consanguíneas de centeno, generadas a partir de dos grupos de líneas hermanas, uno tolerante y otro sensible al aluminio. Sus resultados muestran que, entre las sublíneas procedentes de la línea tolerante, un 75% son tolerantes, mientras que todas las procedentes de la línea sensible son sensibles. La existencia de variabilidad en las sublíneas podría significar que los grupos de líneas hermanas no son tan homogéneos como se podría pensar, existiendo genotipos heterocigotos para la tolerancia. Además, en el análisis de una serie de cruzamientos F1 entre sublíneas tolerantes y sensibles encuentran algunas descendencias con dominancia incompleta, apareciendo un 25% o un 50% de plantas sensibles, lo que significaría realmente que se están observando segregaciones en estas descendencias de los tipos 1:1 y 3:1. Todos estos datos podrían apoyar los resultados obtenidos por nosotros, en el sentido de la existencia de al menos dos genes de tolerancia al aluminio en centeno.

Se ha postulado en numerosas ocasiones que si en trigo se han hallado varios genes de tolerancia, en centeno, por ser más tolerante, deben existir aún más genes, controlando otros mecanismos adicionales de tolerancia (Aniol y col., 1980; Aniol, 1990). Nuestros resultados indican que el cultivar Ailés difiere en, al menos, dos genes de tolerancia con Riodeva. Por otro lado, la línea consanguínea Riodeva debe poseer uno o más genes adicionales de tolerancia al aluminio, pues presenta también un grado considerable de tolerancia (a una concentración importante de Al, como es 100 μ M, su media de crecimiento es aún de 0,6 cm). Parece por lo tanto muy probable que en centeno existan más genes relacionados con la tolerancia al aluminio. Esta suposición no

es muy descabellada si se piensa en el elevado número de rutas metabólicas que puede afectar un estrés de tipo abiótico, como es el caso del aluminio.

En este trabajo se han podido localizar dos genes asociados con la tolerancia, mediante el empleo de marcadores isoenzimáticos y moleculares, en los cromosomas *4R* y *6RS*. Si bien, como hemos dicho previamente, deben haber varios genes involucrados en los procesos de tolerancia, las diferencias en comportamiento entre Ailés y Riodeva indican que estos dos loci deben tener una participación destacada en los mismos.

Se ha hecho referencia a la posibilidad de transferir los genes de tolerancia del centeno al trigo, o al menos de sustituir las zonas de suelos ácidos cultivadas con centenos por triticales, obtenidos a partir de variedades tolerantes (Aniol y Gustafson, 1984). También, se ha demostrado que este proceso no sería tan fácil ya que la expresión de la tolerancia del centeno está altamente influenciada por el fondo genético del trigo, siendo ésta prácticamente nula en variedades con trigos sensibles y elevada en presencia de trigos más tolerantes (Aniol, 1986). En los análisis poblacionales que hemos realizado se puede comprobar que, pese al comportamiento muy tolerante predominante, aparecen individuos dentro de las poblaciones con sensibilidad al aluminio. Este hecho podría producir que en el proceso de selección para el desarrollo de triticales, sin presión selectiva para el aluminio, se acaben por obtener triticales con centenos sensibles. A estos factores que podrían influir en la mejora de los triticales habría que añadir el efecto aditivo, relatado anteriormente, sobre la tolerancia al aluminio en centeno, no siendo igual el empleo de un centeno con una sola dosis de un gen de tolerancia que el de otro con varias dosis de varios genes. Por ello, la obtención de marcadores ligados a estos genes de tolerancia al aluminio en centeno, como los presentados en este trabajo, jugaría un importante papel en los procesos de mejora de los triticales, colaborando en la selección de plantas con un elevado número de alelos “favorables” (por ejemplo, en segregaciones 15:1 en F₂) y su mantenimiento a lo largo del tiempo.

2 Metodologías para la obtención de marcadores en regiones cromosómicas específicas

En este trabajo se han buscado marcadores RAPD ligados a los genes de tolerancia al aluminio mediante el análisis de bloques segregantes y la localización cromosómica en líneas de adición, para posteriormente transformarlos en SCAR. A continuación, discutiremos la eficacia de estos procedimientos.

2.1 Utilidad de los RAPDs como marcadores genéticos

La utilidad de los RAPDs como marcadores moleculares ha sido puesta en duda, debido principalmente a su sensibilidad a diversos factores que influyen en las reacciones de PCR. Los productos de amplificación son muy dependientes de la calidad y concentración del ADN molde, de la polimerasa y del resto de productos incluidos en la mezcla de reacción (especialmente el Mg^{2+}). Además, las temperaturas y tiempos de cada uno de los segmentos del programa empleado para amplificar, así como el número de ciclos y el tipo de termociclador utilizado son también elementos que influyen notablemente en los perfiles de amplificación obtenidos (Penner y col., 1993; Schierwater y Ender, 1993; Wolff y col, 1993). En repetidas ocasiones, se ha demostrado que se puede conseguir un alto grado de repetibilidad, si se establece un riguroso protocolo de actuación (revisión en Smith y Williams, 1994). En este trabajo se muestra que los RAPDs, en unión con otras metodologías, como el análisis de bloques segregantes y los SCAR, son unas herramientas de indudable utilidad para la obtención de marcadores fiables y de interés para la mejora en plantas.

2.2 Análisis de bloques segregantes

El análisis de bloques segregantes (BSA) es un procedimiento rápido y eficaz para la localización de loci en regiones determinadas del genoma. En este trabajo ha sido posible hallar marcadores ligados a dos genes de tolerancia al aluminio, situados en dos regiones diferentes, empleando 120 cebadores. Así, se han estudiado aproximadamente 450 fragmentos de PCR, con notable ahorro de tiempo y dinero, en comparación con los análisis de ligamiento tradicionales.

Michelmore y col. (1991) determinaron que la ventana en la que se pueden localizar marcadores de RAPDs en 15 cM, mientras que nosotros hemos encontrado marcadores a distancias de hasta 26,4 cM (*Alt1-OpB03₆₅₅*). Parece bastante razonable pensar que la sensibilidad de detección está directamente relacionada con la “capacidad” de amplificación de cada uno de los fragmentos y con el número de individuos que contengan cada bloque, como se observa en el experimento realizado con los cebadores OpR07 y OpS04 (Figura 16, pág 60).

En nuestro caso, realizamos los bloques de plantas a partir de descendencias F2, en función de su tolerancia o sensibilidad al aluminio. La tolerancia era dominante sobre la sensibilidad, y por lo tanto en el bloque de plantas tolerantes había tanto homocigotos (TT) como heterocigotos (Tt). Esta es la causa por la cual solamente podíamos encontrar marcadores ligados en acoplamiento con la tolerancia. Un ejemplo de esta situación se muestra en la figura 1a (pág. 23). De este modo, estábamos perdiendo aproximadamente la mitad de marcadores. Esta situación no se producía cuando los bloques se realizaban en función del marcador codominante *Lap1*. Otra opción hubiera sido la realización de los bloques en función de los datos de las F3, para de esta forma diferenciar los genotipos homocigotos tolerantes de los heterocigotos tolerante-sensible. Pensamos que era más eficaz emplear un número de cebadores mayor y no tener que esperar una nueva generación, donde sería necesario realizar los test de tolerancia al aluminio en unas 1000 plantas por cruzamiento. El número de marcadores que se han podido conseguir no es menor que los obtenidos en otros trabajos de similares características, como en los trabajos de Michelmore y col. (1991) (100 cebadores analizados y 3 fragmentos ligados al gen Dm5/8), de Schachermayr y col. (1994) (495 cebadores analizados y 3 loci ligados al gen Lr9) o de Woeste y col. (1996) (400 cebadores analizados y 2 fragmentos ligados al gen de hipersensibilidad a CLRV).

Para localizar los marcadores ligados en repulsión con el locus de tolerancia al aluminio realizamos bloques en función de otro locus situado en la zona de interés, como era el caso de *Lap1* (Figura 1b, pág 23). De esta forma, se pudo obtener, en otra descendencia, el fragmento *OpB15₇₉₀*, ligado al bloque de plantas con genotipo 11 para *Lap1*, y con posterioridad transferirlo directamente a la descendencia donde segregaba la tolerancia al aluminio, comprobando que se encontraba ligado en repulsión con el locus

Alt1. Estos resultados demuestran que esta puede ser una estrategia alternativa al análisis de bloques en F3.

2.3 Localización cromosómica de fragmentos amplificados por RAPDs en líneas de adición

Los trabajos de localización cromosómica de fragmentos de RAPDs en líneas de adición tenían como objetivo inicial la obtención de marcadores en el cromosoma 6R de centeno, para poder incrementar el número de loci ligados al gen de tolerancia al aluminio localizado en este cromosoma por el análisis de isoenzimas. Logicamente, se localizaron fragmentos en todos los cromosomas del complemento haploide de centeno. De esta forma, estábamos produciendo un banco de marcadores moleculares de utilidad, tanto en los estudios sobre tolerancia al aluminio como para otra serie de trabajos.

En el análisis llevado a cabo para localizar RAPDs han sido empleados 60 oligonucleótidos decámeros, de los cuales aproximadamente un 35% han generado segmentos de ADN que han podido ser localizados en cromosomas específicos de centeno. De este modo se han encontrado marcadores en los 7 cromosomas de centeno.

La confirmación de seis de las localizaciones pudo realizarse mediante ensayos de dot-blot. Sin embargo, con esta metodología no fue posible obtener nuevas localizaciones. La amplificación de un elevado porcentaje de fragmentos que contienen secuencias altamente repetidas (Williams, 1990), repartidas por todos los cromosomas, parece ser la causa más probable que impide su localización, pues estas secuencias deben ser las que producen hibridación cruzada con el ADN de trigo o con el resto de líneas de adición.

En centeno han sido amplificados 137 fragmentos de los cuales 46 (33%) solaparon con bandas de trigo. De los 91 restantes, 21 (15%) pudieron localizarse en alguna de las líneas de adición trigo-centeno y 70 (51%) no se observaron en ninguna.

El hecho de que exista un alto porcentaje de fragmentos específicos de centeno que no aparecen en ninguna de las líneas de adición puede deberse a que estos

fragmentos sean productos de amplificación de secuencias repetidas en centeno pero no en un número suficientemente alto en cada cromosoma como para ser visualizados en el gel de amplificación, en este caso, estos fragmentos son visualizados como producto de amplificación del anfiploide trigo-centeno. Otra explicación posible podría ser la existencia de competencia de las secuencias diana de trigo y centeno por los cebadores, en cuyo caso estos fragmentos tampoco se observan como producto de amplificación del anfiploide.

En este trabajo no ha sido posible localizar ningún fragmento en el brazo cromosómico *6RS*, con lo cual no se consiguieron, mediante este sistema, fragmentos estrechamente ligados al locus *Alt1*. Sin embargo, no deja de ser una técnica eficaz en la obtención de marcadores moleculares, dado que el número de oligonucleótidos que pueden ser empleados en la amplificación es prácticamente ilimitado.

Sin embargo, el fragmento *OpA08₄₁₅*, situado en *6RL*, ha podido incorporarse en el mapa del cromosoma *6R*. Este hecho demuestra la utilidad de la localización de marcadores de PCR, mediante amplificación por RAPDs en líneas de adición y posterior transformación en SCAR.

En la actualidad, se están obteniendo marcadores SCAR a partir del resto de fragmentos localizados en los cromosomas *4R* (*OpA05₃₈₅* y *OpF14₃₇₀*) y *6R* (*OpA02₃₀₄*, *OpA13₂₃₀*, *OpB15₃₆₅* y *OpF05₂₅₇*), para intentar de este modo incrementar el número de marcadores ligados a los genes de tolerancia al aluminio localizados en estos cromosomas.

2.4 Obtención de SCAR

El desarrollo de marcadores SCAR es una herramienta adicional que aporta una serie de ventajas sobre los RAPDs. El empleo de RAPDs nos ha posibilitado la obtención de una serie de marcadores ligados a los loci de tolerancia al aluminio, pero su gran sensibilidad a las condiciones de la PCR, la amplificación de varios fragmentos con cada oligonucleótido y su naturaleza dominante restringen en gran medida su uso posterior. En muchos casos, el principal problema de los marcadores RAPDs reside en la gran

dificultad para su transferencia entre variedades, e incluso para su empleo en laboratorios distintos de donde originariamente se consiguieron. Debido a la mayor longitud de los cebadores de SCAR, y por consiguiente, la mayor temperatura empleada en la PCR, hemos conseguido, en todos los casos, la amplificación específica de los fragmentos de interés. Así, se facilita enormemente la transferencia de estos marcadores a otras descendencias y poblaciones, permitiendo su empleo en aplicaciones como la mejora asistida por marcadores o la captura de genes.

El polimorfismo observado en los RAPDs (presencia-ausencia) puede ser causado por diferencias en la secuencia en las zonas de unión de los cebadores o por reordenaciones estructurales en la zona amplificada. Paran y Michelmore (1993) encontraron, además de diferencias en las zonas de unión, reordenaciones que afectaban al segmento amplificado, ya que al analizar un total de nueve SCAR diferentes, observaron que en tres de los casos no era posible la amplificación en uno de los parentales. En nuestro caso, todas las amplificaciones empleando las parejas de cebadores largos han permitido, al disminuir la temperatura, la amplificación de los fragmentos en los dos parentales. Por lo tanto, parece claro que en la mayor parte de las ocasiones el polimorfismo observado en los RAPDs se produce por diferencias en las zonas de unión de los oligonucleótidos.

En todos los fragmentos en los que se detectó variabilidad mediante RAPDs se pudo mantener esta variabilidad en las amplificaciones específicas, excepto para el locus *OpS14₇₀₅*. Esta efectividad en el mantenimiento de la variabilidad observada en las amplificaciones por RAPDs puede deberse, en gran medida, a que para el diseño de los cebadores específicos decidimos mantener las diez bases del cebador de RAPD, pues esta era la “diana” fuente de polimorfismo. Otro dato a tener en cuenta es que, pese a mantener estas secuencias, al aumentar el tamaño del oligonucleótido hasta 21 pb, estas se ven desplazadas hacia el extremo 3', zona en la que las ADN polimerasas tienen una mayor permisividad para la existencia de bases no apareadas (“mismatches”) entre las secuencias del cebador y la hebra molde, pudiendo por tanto amplificarse los fragmentos en los dos parentales. En este punto jugó también un destacado papel la ADN polimerasa empleada en estos experimentos (Fragmento Stoffel, Perkin Elmer), pues una de sus

características es la gran especificidad en su amplificación, no aceptando prácticamente “mismatches” en ningún punto de las dianas de los cebadores.

La realización de digestiones de las amplificaciones permite, por un lado, incluir nuevos marcadores, y por otro, convertir los marcadores dominantes en codominantes. En este trabajo se han incluido dos loci por este procedimiento (*OpA08₄₁₅* y *OpS14₇₀₅*). Únicamente para el fragmento *OpB16₁₁₄₅* no se pudo encontrar variabilidad. En situaciones como esta, en las que el fragmento se amplifica en los dos parentales, se pueden probar varios métodos para identificar polimorfismo: 1) Buscar diferencias en una base mediante electroforesis en gradiente de desnaturalización 2) Secuenciar ambos parentales para hallar estas diferencias que pueden posteriormente ser identificadas con un enzima de restricción o mediante el diseño de cebadores específicos de alelos y 3) El polimorfismo se puede buscar en otras líneas con mayor divergencia genética. Como puede observarse, una vez que se han obtenido marcadores RAPDs son muchos los caminos que se pueden seguir para que estos tengan una aplicación útil en el campo de la mejora en plantas.

3 Localización del gen de tolerancia *Alt1* y construcción de un mapa en el cromosoma 6R

Con los marcadores que se comportaron como ligados al gen de tolerancia al aluminio localizado en el cromosoma 6R se construyó un mapa en dicho cromosoma (Figura 30, pág. 79). Los resultados de los análisis de ligamiento (Tabla 19, pág. 78) coinciden con los datos de localización cromosómica. Los loci isoenzimáticos *Got3* y *Pgm1*, que se comportaron como independientes, se encuentran localizados en los brazos cromosómicos 3RL y 4RS, respectivamente, mientras que aquellos que se comportaron como ligados (*Aco1*, *Ndh2*, *Est6* y *Est8*) se localizan en el brazo cromosómico 6RL (Tabla 10, pág. 57). En el caso de los marcadores SCAR también coincidieron los datos de localización con los de ligamiento, ya que todos los loci que aparecieron como ligados fueron localizados, bien en el brazo 6RS (*OpB15₇₉₀* y *OpR01₆₀₀*), o bien en el brazo 6RL (*OpA08₄₁₅*). Únicamente en el caso del locus *OpB03₆₅₅* no se consiguió su localización con líneas de adición (Tabla 18, pág. 77), aunque los análisis de ligamiento indican que se encuentra en el brazo 6RL, entre *Aco1* y *OpA08₄₁₅*.

En el cromosoma 6R de centeno se han localizado una apreciable cantidad de marcadores genéticos. Hasta el momento, existen varios trabajos con datos de ligamiento en este cromosoma (Benito y col., 1991; Wehling, 1991; Wricke, 1991; Philipp y col., 1994; Loarce y col., 1996).

Las distancias genéticas obtenidas en este trabajo son muy semejantes a las descritas en trabajos previos (tabla 20).

Loci	Distancia (cM)	Referencias
<i>Aco1-Ndh2</i>	16,8	
	16±3,8	Wehling, 1991.
	16	Philipp y col., 1994.
<i>Aco1-Est6</i>	42,4	
	30,4±4,1	Benito y col., 1991.
<i>Aco1-Est8</i>	42,5	
	29,6±4,1	Benito y col., 1991.
	33±3,7	Wehling, 1991.
<i>Ndh2-Est6</i>	26,1	
<i>Ndh2-Est8</i>	26,7	
	22±1,6	Wehling, 1991.
	22±1,6	Wricke, 1991.
	22	Philipp y col., 1994.
<i>Est6-Est8</i>	0,7	
	0,5±0,5	Benito y col., 1991.
<i>Lap1-Aco1</i>	33,66±3,7	Benito y col., 1991.
	41,46±5,6	Benito y col., 1996.

Tabla 20.- Relaciones de ligamiento obtenidas entre los loci isoenzimáticos localizados en el cromosoma 6R. En primer lugar aparecen los resultados de este trabajo.

En este trabajo no ha sido posible estimar la distancia genética existente entre el locus de tolerancia *Alt1* y el locus isoenzimático *Lap1*, debido a que no se encontraban segregando conjuntamente en ninguno de los cruzamientos analizados. Existen una serie de datos, como son: la localización de *Lap1* en el brazo 6RS (Tang y Hart, 1975), las distancias genéticas obtenidas previamente entre *Lap1* y *Aco1* (tabla 20) y el hecho de que hemos obtenido un marcador SCAR estrechamente ligado a *Lap1* y a *Alt1* (*OpB15₇₉₀*), que indican que *Lap1* debe estar estrechamente ligado a *Alt1*.

Como dijimos previamente, Aniol y Gustafson (1984) localizaron un gen mayor de tolerancia al aluminio (*Alt1*) en el brazo cromosómico *6RS* del cultivar de centeno Imperial. Parece bastante probable que el locus de tolerancia que nosotros hemos localizado en el mismo brazo cromosómico del cultivar Ailés se trate del mismo gen. Los marcadores moleculares que hemos detectado más próximos a este locus, mediante el análisis con el programa MAPMAKER/EXP 3.0, son *OpR01₆₀₀* y *OpB15₇₉₀*, hallándose a una distancia de 2,1 y 5,5 cM, respectivamente. Si bien estas distancias suponen una proximidad importante al gen, es necesario conseguir una aproximación aún mayor, si lo que se desea es su captura. Para ello, es necesario, por un lado, aumentar el número de marcadores a analizar, y sobre todo, incrementar el número de individuos incluidos en los análisis.

Para incluir nuevos marcadores en esta región se utilizarán los fragmentos de RAPDs localizados en *6R* en este trabajo (*OpA02₃₀₄*, *OpA13₂₃₀*, *OpB15₃₆₅* y *OpF05₂₅₇*), junto con nuevos fragmentos localizados y sondas de RFLPs localizadas en este cromosoma en centeno y especies afines. Para incrementar el número de individuos en los análisis, los loci *OpR01₆₀₀* y *OpB15₇₉₀* jugarían un papel vital, pues podrían ser empleados para identificar las diferentes descendencias en las que se encuentra segregando dicho gen, y no otro, para así poder agruparlas.

4 Localización del gen de tolerancia *Alt3* en el cromosoma *4R*

En el caso del gen de tolerancia localizado en el cromosoma *4R* el número de marcadores obtenidos ha sido muy inferior. No se ha encontrado ninguna isoenzima ligada al locus de tolerancia, debido a que en la descendencia del cruzamiento en el que segregaba este gen no segregaba, en cambio, ningún locus isoenzimático localizado en el cromosoma *4R*. El único fragmento de PCR ligado (*OpS14₇₀₅*) se halla a una distancia de 23,5 cM. Si bien este SCAR está más alejado que los del cromosoma *6R*, podría emplearse también como punto de partida en el análisis y agrupamiento de descendencias en las que segregue este gen de tolerancia. Este fragmento está localizado en el brazo *4RL*, pero pese a esto no es posible asegurar que el locus de tolerancia se halle también en este brazo cromosómico.

Los análisis de los fragmentos amplificados con las parejas de cebadores diseñadas a partir de las secuencias *wali* de trigo (*wali1*, *wali2* y *wali5*) han posibilitado la localización de un fragmento con elevada homología con el clon *wali 2* de trigo en los cromosomas *4R* y *7R*. Cabe destacar que el clon *wali2* es el único que presenta un patrón de expresión diferencial entre genotipos tolerantes y sensibles. Si bien no ha sido posible ligar este fragmento con el gen de tolerancia localizado en el cromosoma *4R*, no se puede descartar que tenga alguna relación con él. Realmente, los fragmentos amplificados son dos, de igual tamaño, ya que se localizan en dos cromosomas diferentes de centeno. Por ello, habría que conseguir la secuenciación de cada uno de estos dos fragmentos y poder diferenciarlos mediante el diseño de cebadores adecuados.

Además del trabajo de Aniol y Gustafson (1984), en el que localizan un gen de tolerancia (*Alt3*) en el cromosoma *4R* de centeno, existen otros trabajos que han descrito la existencia de genes de tolerancia al aluminio en el grupo de homeología 4 de otras especies de cereales. Hay genes localizados en el cromosoma *4H* de cebada (Stolen y Anderson, 1978; Reid, 1970) y recientemente, se ha localizado un gen de tolerancia al aluminio, mediante ligamiento con RFLPs, en el brazo *4DL* de trigo (Riede y Anderson, 1996), que coincidiría con la localización en el brazo *4RL* del locus que hemos hallado en el cultivar Ailés, aunque es necesario tener en consideración las diferentes translocaciones que afectan al cromosoma *4R* de centeno. Estos datos parecen indicar la existencia de un mecanismo de tolerancia común a todos los cereales, localizado en el grupo de homeología 4.

Como dijimos con anterioridad, en el cromosoma *4R* hemos localizado, por amplificación en líneas de adición, los fragmentos *OpA05₃₈₅* (en *4RS*) y *OpF14₃₇₀* (en *4RL*). Estos marcadores, transformados en SCAR, junto con una serie de marcadores RFLPs localizados en este cromosoma, procedentes de centeno y especies afines, serán empleados, como en el caso del locus *Alt1*, para la obtención de marcadores más próximos al locus *Alt3*.

5 Futuras aplicaciones

Para un mejorador que trata de desarrollar nuevos cultivares, el tipo de herencia es de indudable interés. La selección de caracteres determinados por unos pocos genes dominantes es mucho más fácil que seleccionar para caracteres determinados por muchos genes con poco efecto. La genética de la tolerancia al aluminio en trigos, triticales y centeno es un caso típico con unos pocos genes mayores y bastantes genes menores. En este caso es ventajoso seleccionar para homocigosis los genes mayores y posteriormente los menores. Este procedimiento únicamente puede llevarse a cabo si estos genes mayores son claramente identificados y se obtienen marcadores genéticos para su selección.

Disponemos de descendencias F₂ en las que segregan dos genes que confieren tolerancia al aluminio en centeno y en las que se pueden seleccionar, mediante el empleo de los marcadores obtenidos, plantas homocigotas para ambos loci. Estas plantas podrán emplearse en la obtención de triticales más tolerantes.

Además, la obtención de nuevos marcadores, más próximos a estos genes, deberán posibilitar su captura y el conocimiento de la relación entre los mecanismos fisiológicos de la tolerancia al aluminio y dichos genes.

Conclusiones

1. En base al crecimiento adicional de la raíz tras los tratamientos con aluminio, las variedades estudiadas pudieron clasificarse en tres grupos. El cultivar Ailés era el más tolerante, la línea consanguínea Riodeva era la más sensible, mientras que el cultivar JNK y la línea consanguínea Pool mostraron una tolerancia intermedia. Las raíces de las plantas sensibles al aluminio presentaron una serie de diferencias morfológicas, claramente apreciables.
2. Los análisis realizados en descendencias F1, F2 y retrocruzamientos indican que en estos cruzamientos se encuentran segregando al menos dos genes de tolerancia al aluminio, con dominancia completa y efecto aditivo.
3. Se han localizado marcadores en los 7 cromosomas del complemento haploide de centeno, mediante amplificación por RAPDs en las líneas de adición trigo “Chinese Spring-centeno “Imperial”. Los 21 fragmentos localizados fueron a su vez asignados a un brazo cromosómico determinado empleando las líneas ditelosómicas correspondientes. El fragmento *OpA08₄₁₈*, situado en *6RL*, ha podido incorporarse en un mapa del cromosoma *6R*, comportandose como ligado a la tolerancia al aluminio. Este hecho demuestra la utilidad de la localización de marcadores de PCR, mediante amplificación por RAPDs y posterior transformación en SCAR. Además, se han localizado otra serie de fragmentos en los cromosomas *4R* (*OpA05₃₈₅* y *OpF14₃₇₀*) y *6R* (*OpA02₃₀₄*, *OpA13₂₃₀*, *OpB15₃₆₅* y *OpF05₂₅₇*), que llevan información para la tolerancia.
4. En el caso de las amplificaciones con las parejas de cebadores procedentes de los genes *wali* de trigo, inducibles por aluminio, se pudo localizar un fragmento de 985 pb en los cromosomas *4R* y *7R* de centeno, que presenta una elevada homología con el clon de trigo *wali2*.
5. Mediante análisis de bloques segregantes, ha sido posible hallar RAPDs ligados a dos genes de tolerancia al aluminio, situados en dos cromosomas diferentes. Los marcadores *OpB03₆₅₅*, *OpB15₇₉₀* y *OpR01₆₀₀* están ligados al gen de tolerancia *Alt1*, localizado en el cromosoma *6R*, y el marcador *OpS14₇₀₅* al gen *Alt3*, localizado en el cromosoma *4R*.

6. La secuenciación de los extremos de varios de los fragmentos amplificados por RAPDs (*OpA08₄₁₈*, *OpB03₆₅₅*, *OpB15₇₉₀*, *OpB16₁₁₄₅*, *OpR01₆₀₀* y *OpS14₇₀₅*) y el diseño de cebadores largos, a partir de estas secuencias, ha permitido la amplificación específica de estos fragmentos de ADN (SCAR). Los marcadores SCAR obtenidos se comportan como ligados a los caracteres de interés y su localización cromosómica se ha confirmado mediante la amplificación en líneas de adición trigo-centeno.

7. Con los marcadores isoenzimáticos y de PCR, localizados en el cromosoma *6R* se construyó un mapa genético en dicho cromosoma. El orden más probable de los loci analizados es el siguiente:
OpR01₆₀₀-Alt1-OpB15₇₉₀-centrómero-Aco1-OpB03₆₅₅-OpA08₄₁₈-Ndh2-Est6-Est8.
El locus *Lap1* no ha podido incluirse en este mapa, pero debe estar estrechamente ligado al locus *Alt1*, en el brazo corto (*6RS*).

8. Los marcadores más próximos al gen de tolerancia al aluminio *Alt1* fueron *OpR01₆₀₀* y *OpB15₇₉₀*, hallándose a una distancia de 2,1 y 5,5 cM, respectivamente. Estos fragmentos fueron localizados en el brazo cromosómico *6RS*, confirmando la localización de *Alt1* en este brazo. Parece bastante probable que este gen de tolerancia sea el mismo que el previamente localizado mediante el análisis de líneas de adición por Aniol y Gustafson (1984).

9. En el brazo cromosómico *4RL* se ha podido localizar el fragmento de PCR *OpS14₇₀₅* que se comporta como ligado al gen de tolerancia al aluminio *Alt3*, a una distancia de 23,5 cM. Como en el caso anterior, parece probable que este gen de tolerancia sea el mismo que otro previamente localizado en este cromosoma, mediante el análisis de líneas de adición, por Aniol y Gustafson (1984).

10. Existen una serie de trabajos que han descrito la existencia de genes de tolerancia al aluminio en el grupo de homeología 4 de diferentes especies de cereales. Nuestros datos podrían apoyar la hipótesis de la existencia de un mecanismo de tolerancia común a todos los cereales, localizado en el grupo de homeología 4.

Bibliografía

Ahn SN, Bollich CN, McClung AM y Tanksley SD, (1993). RFLP analysis of genomic region associated with cooked-kernel elongation in rice. *Theor Appl Genet*, 87:27-32.

Ahn SN, Bollich CN y Tanksley SD, (1992). RFLP tagging of a gene for aroma in rice. *Theor Appl Genet*, 84:825-828.

Akeson MA y Munns DN, (1990). Uptake of aluminum into root cytoplasm: predicted rates for important solution complexes. *J Plant Nutr*, 13:467-484.

Alonso-Blanco C, Goicoechea PG, Roca A y Giráldez R, (1993a). Genetic linkage between cytological markers and the seed storage protein loci Sec2(Gli-R2) and Sec3(Glu-R1) in rye. *Theor Appl Genet*, 87:321-327.

Alonso-Blanco C, Goicoechea PG, Roca A y Giráldez R, (1993b). A cytogenetic map on the entire length of rye chromosome *1R*, including one translocation breakpoint, three isozyme loci and four C-bands. *Theor Appl Genet*, 85:735-744.

Alonso-Blanco C, Goicoechea PG, Roca A, Alvarez E y Giráldez R, (1994). Genetic mapping of cytological and isozyme markers on chromosomes *1R*, *3R*, *4R* and *6R* of rye. *Theor Appl Genet*, 88:208-214

Alva AK, Edwards DG, Asher CJ y Blamey FP, (1986). Relationships between root length of soybean and calculated activities of aluminum monomers in nutrient solution. *Soil Sci Soc Am J*, 50:959-962.

Aniol A, (1981). Screening method for aluminum tolerance for cereals. *Bull IHAR*, 43:3.

Aniol A, (1984). Introduction of aluminum tolerance into aluminum sensitive wheat cultivars. *Z Pflanzenzucht*, 93:331.

Aniol A, (1986). Inheritance of aluminum tolerance in triticale and parental species. En: *Proc Int Triticale Symp. Sidney*, pp:283-288.

Aniol A, (1990). Genetics of aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). Plant and Soil, 123:223-227.

Aniol A y Gustafson JP, (1984). Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye and triticale. Can J Genet Cytol, 26:701-705.

Aniol A y Gustafson JP, (1990). Genetics of tolerance in agronomic plants. En "Heavy metals tolerance in plants: Evolutionary aspects". Ed: Shaw AJ. CRC Press. pp:255-267.

Aniol A y Hill RD, (1980). The aluminium uptake by roots of triticale. Hod Ros Aklim I Nasien, 24(5):669-676.

Aniol A y Madej L, (1996). Genetic variation for aluminium tolerance in rye. Vortr Pflanzenzuchtg, 35:201-211.

Aniol A, Hill RD y Larter EN, (1980). Aluminum tolerance of spring rye inbred lines. Crop Sci, 20:205-208.

Arnheim N, Strange E y Erlich H, (1985). Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: studies of the HLA class II loci. Proc Natl Acad Sci USA, 82:6970-6974.

Aronel V, Lemieux B, Hwang I, Gibson S, Goodman HM y Somerville CR, (1992). Map-based cloning of a gene controlling omega 3 fatty acid desaturation in Arabidopsis. Science, 258:1353-1355.

Backes G, Graner A, Foroughi-Wehr B, Fischbeck G, Wenzel G y Jahoor A, (1995). Localization of quantitative trait loci (QTL) for agronomic important characters by the use of a RFLP map in barley. Theor Appl Genet, 90:294-302.

Bastos CR, (1982). Inheritance study of aluminum tolerance in sorghum in nutrient culture. Tesis doctoral. Mississippi State University, Mississippi.

- Basu A, Basu U y Taylor GJ, (1994a).** Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of *Triticum aestivum* L. under conditions of aluminum stress. *Plant Physiol*, 104:1007-1013.
- Basu U, Godbold D y Taylor GJ, (1994b).** Aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. *J Plant Physiol*, 144:747-753.
- Bauton JH, Summer ME, Hammel JE y Shahandeh H, (1986).** Yield of alfalfa germoplasm selected for acid soil tolerance when grown in soils with modified subsoils. *Crop Sci*, 26:334.
- Beavis WD y Grant B, (1991).** A linkage map based on information from four F2 populations of maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*, 82:636-644.
- Benito C, Gallego FJ, Zaragoza C, Frade JM y Figueiras AM, (1991).** Biochemical evidence of a translocation between *6RL/7RS* chromosome arms in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet*, 82:27-32.
- Benito C, Romero MP, Henriques-Gil N, Llorente F y Figueiras AM, (1996).** Sex influence on recombination frequency in *Secale cereale* L. *Theor Appl Genet*, 93:926,931.
- Bennet RJ y Breen CM, (1991).** The aluminium signal: new dimensions to mechanisms of aluminium tolerance. *Plant Soil*, 134:153-166.
- Bennet RJ, Breen CM y Fey MV, (1987).** The effects of aluminium on root cap function and root development in *Zea mays* L. *Environ Exp Bot*, 27:91-104.
- Bernatzky R y Tanksley SD, (1986).** Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics*, 112:887-898.

Blamey FPC, Edwards DG y Asher CJ, (1983). Effects of aluminum, OH:Al and P:Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. *Soil Sci*, 136:197-206.

Botstein D, White RL, Skolnick M y Davis RW, (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32:314-331.

Boye-Gone SR y Marcarian V, (1985). Diallel analysis of aluminum tolerance in selected lines of grain sorghum. *Crop Sci*, 25:749.

Brewer JG y Singh CF, (1970). An introduction to isozyme techniques. Academic Press, New York.

Caetano-Anollés G, (1993). Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Meth Appl*, 3:85-94.

Caetano-Anollés G, (1994). MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis. *Plant Mol Biol*, 25:1011-1026.

Camargo CE de O, (1984). Wheat improvement. VI. Heritability studies on aluminum tolerance using three concentrations of aluminum in nutrient solutions. *Bragantia*, 43:279-291.

Campbell LG y Lafever HN, (1976). Correlation of field and nutrient solution culture techniques of screening wheat for aluminum tolerance. En "Plant adaptation to mineral stress in problem soils". Eds: Wright MJ y Ferrari AS. Cornell University Press. Ithaca, NY. pp:277.

Campbell LG y Lafever HN, (1978). Heritability and gene effects for aluminum tolerance in wheat. En: Proc in 6th Int Wheat Genet Symp. New Dehli, India.

- Campbell LG y Lafever HN, (1981).** Heritability of aluminum tolerance in wheat. *Cereal Res Commun*, 9:281.
- Carver BF y Ownby JD, (1995).** Acid soil tolerance in wheat. *Adv in Agron*, 54:117-173.
- Causse MA, Fulton TM, Chao YG, Ahn SN, Chungwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE, Second G, McCouch SR y Tanksley SD, (1994).** Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics*, 138:1251-1274.
- Chao S, Sharp PJ, Worland AJ, Warham EI, Koebner RMD y Gale MD, (1989).** RFLP -based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor Appl Genet*, 78:495-504.
- Chen Z, Devey M, Tuleen NA y Hart GE, (1994).** Use of recombinant substitution lines in the construction of RFLP-based genetic maps of chromosomes 6A and 6B of tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *Theor Appl Genet*, 89:703-712.
- Chenicek KJ y Hart GE, (1987).** Identification of chromosomal locations of aconitase gene loci in Triticeae species. *Theor Appl Genet*, 74:281-288.
- Cruz-Ortega R y Ownby JD, (1993).** A protein similar to PR (pathogenesis-related) proteins is elicited by metal toxicity in wheat roots. *Physiol Plant*, 89:211-219.
- Cuadrado A y Jouve N, (1994).** Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-triticale. *Chromosome Res*, 2:331-338.
- Culvenor RA, Oram RN y Wood TJ, (1986).** Inheritance of aluminum tolerance in *Phalaris aquatica* L. *Aust J Agris Res*, 37:387.
- Delhaize E y Ryan PR, (1995).** Aluminium toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol*, 107:315-321.

- Delhaize E, Craig S, Beaton CD, Bennet RJ, Jagadish VC y Randall PJ, (1993a).** Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol*, 103:685-693.
- Delhaize E, Ryan PR y Randall PJ, (1993b).** Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol*, 103:695-702.
- Dellaporta SL, Wood J y Hicks JB, (1983).** A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biol Report*, 1:19-21.
- Devos KM y Gale MD, (1992).** The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor Appl Genet*, 84:567-572.
- Devos KM, Atkinson MY, Chinoy CN, Francis HA, Harcourt RL, Koebner RMD, Liu CJ, Masoje P, Xie DX y Gale MD, (1993a).** Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor Appl Genet*, 85:673-680.
- Devos KM, Atkinson MD, Chinoy CN, Liu CJ y Gale MD, (1992).** RFLP-based genetic map of the homoeologous group 3 chromosomes of wheat and rye. *Theor Appl Genet*, 83:931-939.
- Devos KM, Millán T y Gale MD, (1993b).** Comparative RFLP maps of the homoeologous group-2 chromosomes of wheat, rye and barley. *Theor Appl Genet*, 85:784-792.
- Duke JA, (1982).** Plant germplasm resources for breeding crops adapted to marginal environments. En "Breeding plants for less favorable environments". Eds: Christiansen NMN y Lewis CF. John Wiley & Sons, New York, cap. 12.
- Echt CS, Kidwell KK, Knapp SJ, Osborn TC y McCoy TJ, (1993).** Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Genome*, 37:61-71.

Fisher JA y Scott BJ, (1987). Response to selection for aluminium tolerance. En "Priorities in soil/plant relations research for plant production". Eds: Searle PGE y Davey BG, pp:135-137.

Flavell RB, (1982). Sequence amplification, deletion and rearrangement: major sources of variation during species divergence. En "Genome Evolution". Eds: Dover GA y Flavell RB. Academic Press, London. pp:301-323.

Flavell RB, Bennet MD, Smith JB y Smith DB, (1974). Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem Genet*, 12:257-269.

Foy CD, (1984). Physiological effects of hydrogen, aluminium, and manganese toxicities in acid soil. En "Soil Acidity and Liming". Ed: Adams F. Madison. pp: 57-97.

Foy CD, (1988). Plant adaptation to acid aluminium-toxic soils. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 19:959-87.

Foy CD, Chaney RL y White MC, (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annu Rev Plant Physiol*, 29:511.

Giovannoni JJ, Wing RA, Ganai MW y Tanksley SD, (1991). Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. *Nucleic Acids Res* 19:6553-6558.

Graner A, Jahoor A, Schondelmaier J, Siedler H, Pillen K, Fischbeck G, Wenzel G y Herrmann RG, (1991). Construction of an RFLP map of barley. *Theor Appl Genet*, 83:250-256.

Guedes-Pinto H, (1985). Novas técnicas para o melhoramento de cereais tolerantes ao alumínio. Workshop "Inovação tecnológica e desenvolvimento Regional" Universidade do Minho / Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica. Braga. pp:11.

Haug A, (1984). Molecular aspects of aluminum toxicity. *CRC Crit Rev Plant Sci*, 1:345-373.

- Haug A, Shi B y Vitorello V, (1994).** Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch Toxicol*, 68:1-7.
- Hauge B, Hanley S, Cartinhour S, Cherry JM, Goodman H, Koormeef M, Stam P, Chang C, Kempin S, Medrano L y Meyerowitz EM, (1993).** An integrated genetic/RFLP map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant J*, 3:745-754.
- Heun M, Kennedy AE, Anderson JA, Lapitan NLV, Sorrels ME y Tanksley SD, (1991).** Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 34:437-447.
- Horst WJ, (1985).** Quick screening of cow pea (*Vigna unguiculata*) genotypes for aluminum tolerance in an aluminum-treated acid sand. *Z Pflanzenernehr Bodenkd*, 148:335.
- Howler RH y Cadavid LF, (1976).** Screening rice cultivars as compared with a field screening method. *Agron J*, 68:551.
- Huang JW, Grunes DL y Kochian LV, (1992a).** Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. *Planta*, 188:414-421.
- Huang JW, Grunes DL y Kochian LV, (1994).** Voltage-dependent Ca^{2+} influx into rightside-out plasma membrane vesicles isolated from wheat roots: characterization of a putative Ca^{2+} channel. *Proc Nat Acad Sci USA*, 91:3473-77.
- Huang JW, Pellet DM, Papernik IA y Kochian LV, (1996).** Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and tolerant wheat cultivars. *Plant Physiol*, 110:561-569.
- Huang JW, Shaft JE, Grunes DL y Kochian LV, (1992b).** Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol*, 98:230-237.

Iqbal MJ y Rayburn AL, (1995). Identification of the *IRS* rye chromosomal segment in wheat by RAPD analysis. *Theor Appl Genet*, 91:1048-1053.

Jiang J, Gill BS, Wang GL, Ronald PC y Ward DC, (1995). Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc Nat Acad Sci*, 92:4487-4491.

Jones DL y Kochian LV, (1995). Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity. *The Plant Cell*, 7:1913-1922.

Kennedy IR, (1986). Acid Soil and Acid Rain: The Impact on the Environment of Nitrogen and Sulphur Cycling. Research Studies Press, Letchworth, UK.

Kennedy CW y Smith WC, (1986). Use of a pulse-insult technique to screen cotton genotypes for relative tolerance to aluminum. *En Proc Louisiana Acad. Sci.*, 49:1.

Kerridge PC y Kronstad WE, (1986). Evidence of genetic resistance to aluminum toxicity in wheat (*Triticum aestivum* Vill. Host). *Agron J*, 60:710.

Kesseli RV, Paran I y Michelmore RW, (1994). Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (Lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics*, 136:1434-1446.

Kinraide TB, (1988). Proton extrusion by wheat roots exhibiting severe aluminum toxicity symptoms. *Plant Physiol*, 88:418-23.

Kinraide TB, (1991). Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil*, 134:167-178.

Kiss GB, Csanádi G, Kálmán K, Káló P y Ökrész L, (1993). Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Mol Gen Genet*, 238:129-137.

Kleinhofs A, Kilian A, Shagai Maroof MA, Biyashev RM, Hayes P, Chen FQ, Lapitan N, Fenwick A, Blake TK, Kanazin V, Ananiev E, Dahleen L, Kudrna D, Bollinger J, Knapp SJ, Liu D, Sorrells SM, Franckowiak JD, Hoffman D, Skadsen R y Steffenson B J, (1993). A molecular, isozyme, and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*, 86:705-712.

Koebner RMD, (1995). Generation of PCR-based markers for the detection of rye chromatin in a wheat background. *Theor Appl Genet*, 90:740-745.

Lafever HN y Campbell LG, (1978). Inheritance of aluminum tolerance in wheat. *Can J Genet Cytol*, 20:355-64.

Lander ES, Green P, Abrahamsom J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE y Newburg L, (1987). MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1:174-181.

Larkin PJ, (1987). Calmodulin levels are not responsible for aluminium tolerance in wheat. *Aust J Plant Physiol*, 14:377-85.

Larsen PB, Tai CY, Kochian LV y Howell SH, (1996). Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. *Plant Physiol*, 110:743-751.

Lazof DB, Goldsmith JG, Rufty TW y Linton RW, (1994). Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. A microanalytical study using secondary ion mass spectroscopy. *Plant Physiol*, 106:1107-1114.

Lee JH, Graybosch RA, Kaeppler SM y Sears RG, (1996). A PCR assay for detection of a *2RL/2BS* wheat-rye chromosome translocation. *Genome*, 39:605-608.

Lewontin RC, (1974). The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press, New York.

- Liu CJ, Atkinson MD, Chinoy CN, Devos KM y Gale MD, (1992).** Nonhomeologous translocations between group 4, 5 and 7 chromosomes within wheat and rye. *Theor Appl Genet*, 83:305-312.
- Liu YG y Tsunewaki K, (1991).** Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. II. Linkage maps of the RFLP sites in common wheat. *Jpn J Genet*, 66:617-633.
- Loarce Y, Hueros G y Ferrer E, (1996).** A molecular linkage map of rye. *Theor Appl Genet*, en prensa.
- MacDonald TL, Humphreys WG y Martin RB, (1987).** Promotion of tubulin assembly by aluminium ion in vitro. *Science*, 23:183-86.
- MacDonald TL y Martin RB, (1988).** Aluminum ion in biological systems. *Trends Biol Sci*, 13:15-19.
- Market CL y Möller F, (1959).** Multiple forms of enzyme: tissues, ontogenetic and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci*, 45:753-763.
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle DE y Tanksley SD, (1993).** Map-based cloning of a protein kinase gene conferring resistance in tomato. *Science*, 262:1345-1484.
- Martin RB, (1988).** Bioinorganic chemistry of aluminum. En "Metal ions in biological systems". Eds: Sigel H y Sigel A. Marcel Dekker, New York, 24:1-57.
- Martin RB, (1992).** Aluminium speciation in biology. En "Aluminium in biology and medicine". Ed: Chadwick DJ, Whelan J. Wiley, New York. pp:5-25.
- Matsumoto H, Hirasawa E, Torikai H y Takahashi E, (1976).** Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acids. *Plant Cell Physiol*, 17:127-137.

McCain S y Davies MS, (1983). The influence of background solution on root responses to aluminum in *Holcus lanatus* L. Plant and Soil, 73:425.

Melchinger AE, Boppenmaier J, Dhillon BS, Pollruer WG y Herrman RG, (1993). Genetic diversity for RFLP in European maize inbreds. II. Relationships to performance of hybrids within versus between heterotic groups for forage traits. Theor Appl Genet, 84:672-681.

Melz G, Schlegel R y Thiele V, (1992). Genetic linkage map of rye (*Secale cereale* L.). Theor Appl Genet, 85:33-45.

Michelmore RW, Paran I y Kessell RV, (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA, 88:9828-9832.

Miyasaka SC, Buta JG, Howell RK y Foy CD, (1991). Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. Plant Physiol, 96:737-743.

Miyasaka SC, Kochian LV, Shall JE y Foy CD, (1989) Mechanisms of aluminum tolerance in wheat: an investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K⁺, and H⁺ transport, and root cell membrane potentials. Plant Physiol, 91:1188-1196.

Morimura S y Matsumoto H, (1978). Effect of aluminum on some properties and template activity of purified pea DNA . Plant Cell Physiol, 19:429-436.

Mullis KB, Faloona S, Scharf R, Saiki R, Horn G y Erlich H, (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 51:263-273.

Neeno M, Schumann K y Nagl W, (1994). Detection of rRNA and phaseolin genes on polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by fluorescence in situ hybridization after pepsin pretreatment. Genome, 37(6):1018-1021.

Nielsen G y Johansen HB, (1986). Proporsal for the identification of barley varieties based on the genotypes for 2 hordein and 39 isoenzyme loci of 47 reference varieties. *Euphytica*, 35:717-728.

Nodari RO, Carvalho FIF y Federizzi LC, (1982). Genetic bases of the inheritance of Al-toxicity tolerance in wheat genotypes. *Pesq Agropec Bras*, 17(2):269-280.

O'Donoghue LS, Wang Z, Roder M, Kneen B, Leggett M, Sorrells ME y Tanksley SD, (1992). An RFLP-based linkage map of oats based on a cross between two diploid taxa. *Genome*, 35:765-771.

Olson M, Hood L, Cantor C y Botstein D, (1989). A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, 245:1434-1435.

Ownby JD y Popham HR, (1990). Citrate reverses the inhibition of wheat root growth caused by aluminum. *Plant Physiol*, 135:588-591.

Paran I y Michelmore RW, (1992). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet*, 85:985-993.

Pellet DM, Grunes DL y Kochian LV, (1995). Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 196:788-795.

Pellet DM, Papernik LA y Kochian LV, (1996). Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat. *Plant Physiol*, 112:591-597.

Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ y Fedak G, (1993). Reproducibility of random polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods and Applications*, 2:341-345.

Pereira MG, Lee M, Bramel-Cox P, Woodman W, Doebley J y Whitkus R, (1994). Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. *Genome*, 37:236-243.

- Philipp U, Wehling P y Wricke G, (1994).** A linkage map of rye. *Theor Appl Genet*, 88:243-248.
- Pinto-Carnide O y Guedes-Pinto H, (1996).** Differential behaviour of rye Portuguese populations and European varieties to aluminium toxicity. *Vortr Pflanzenzuchtg*, 35:218.
- Polle E, Konzac CF y Kittrick JA, (1978).** Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Sci*, 18:823-827.
- Ragab RA, Dronavalli S, Saghai Maroof MA y Yu YG, (1994).** Construction of a sorghum RFLP linkage map using sorghum and maize DNA probes. *Genome*, 37:590-594.
- Reid DA, (1970).** Genetic control of reaction to aluminum in winter barley. En: "Barley genetics II", Proc 2nd Int Barley Genet Symp. Ed: Nilan RA. Washington State University Press, Pullman, pp:409 - 413.
- Reid DA, Fleming AL y Foy CD, (1971).** A method for determining aluminum response of barley in nutrient solution in comparison to response in Al-toxic soil. *Agron J*, 63:600.
- Reiter RS, Williams JGK, Feldmann KA, Rafalsky JA, Tingey SV y Scolnik PA, (1992).** Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:1417-1481.
- Rengel Z, (1992).** Disturbance of cell Ca^{2+} homeostasis as a primary trigger of Al toxicity syndrome. *Plant Cell Environ*, 15:931-938.
- Rhue RD, Grogan CO, Stockmeyer EW y Everett HL, (1978).** Genetic control of aluminum tolerance in corn. *Crop Sci*, 18:1063.

Richards KD, Snowden KC y Gardner RC, (1994). wali6 and wali7: genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol*, 105:1455-1456.

Riede CR y Anderson JA, (1996). Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci*, 36:905-909.

Rincón M y Gonzales RA, (1992). Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Physiol*, 99:1021-1028

Rogowsky PM, Shepherd KW y Landridge P, (1991). Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences. *Genome*, 35:621-626.

Ryan PR, Delhaize E y Randall PJ, (1995a). Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant genotypes of wheat roots. *Planta*, 196:103-110.

Ryan PR, Delhaize E y Randall PJ, (1995b). Malate efflux from root apices: evidence for a general mechanism of Al-tolerance in wheat. *Aust J Plant Physiol*, 22:531-536.

Ryan PR, DiTomaso JM y Kochian LV, (1993). Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J Exp Bot*, 44:437-446.

Ryan PR, Kinraide TB y Kochian LV, (1994). Al³⁺-Ca²⁺ interactions in aluminum rhizotoxicity. I. Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. *Planta*, 192:98-103.

Ryan PR, Shaff JE y Kochian LV, (1992). Aluminum toxicity in roots. Correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum-tolerant wheat cultivars. *Plant Physiol*, 99:1193-1200.

Salinas J y Benito C, (1985a). Chromosomal location of malate dehydrogenase structural genes in rye (*Secale cereale* L.). *Z Pflanzenzücht*, 94:208-218.

- Salinas J y Benito C, (1985b).** Esterase isozymes in rye. Characterization, genetic control and chromosomal location. *Theor Appl Genet*, 71:136-140.
- Salinas J y Benito C, (1985c).** Chromosomal locations of phosphoglucomutase, phosphoglucose isomerase and glutamate oxaloacetate transaminase structural genes in rye cultivars. *Can J Genet Cytol*, 27:105-113.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T, (1989).** Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Ed: Nolan C, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York.
- Santos JQ, (1983).** Fertilizantes. Fundamentos e aspectos práticos da sua aplicação. En "Euroagro". Publicações Europa-América. Lda, Mere Martins, pp:246.
- Schachermayr G, Siedler H, Gale MD, Winzeller H, Winzeller M y Keller B, (1994).** Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 leaf rust resistance gene of wheat. *Theor Appl Genet*, 88:110-115.
- Schierwater B y Ender A, (1993).** Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Res*, 21:4647-8.
- Selander RK, Smith MH, Yang SY, Johnson WE y Gentry JB, (1971).** Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus* I. Variation in old field mouse (*Peromyscus polionatus*). *Stus Genet*, 8:49-90.
- Shaw GR y Koen AL, (1968).** Starch gel zone electrophoresis of enzymes. En "Chromatographic and electrophoretic techniques". Ed: Smith I. Interscience Publ, Chichester, pp:325-364.
- Shi B y Haug A, (1992).** Aluminium interferes with signal transduction in neuroblastoma cells. *Pharmacol Toxicol*, 71:308-13.
- Shi B, Chou K y Haug A, (1993).** Aluminum impacts elements of the phosphoinositide signalling pathway in neuroblastoma cells. *Mol Cell Biochem*, 121:109-118.

Slocum MK, Figdore SS, Kenard WC, Suzuki JY y Osborn TC, (1990). Linkage arrangement of restriction fragment length polymorphism loci in *Brassica oleraceae*. Theor Appl Genet, 80:57-64.

Slootmaker LA, (1974). Tolerance to high soil acidity in wheat related species, and triticale. Euphitica, 23:505-513.

Smith JSC y Williams JGK, (1994). Arbitrary primer mediated fingerprinting in plants: Case studies in plant breeding, taxonomy and phylogeny. En "Molecular ecology and evolution: approaches and applications". Eds: Schierwater B, Street B, Wagner GP y DeSalle R. Birkhauser Verlag Basel, pp:5-15.

Snowden KC y Gardner RC, (1993). Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. Plant Physiol, 103:855-861.

Sommers DJ y Gustafson JP, (1995). The expression of aluminum stress induced polypeptides in a population segregating for aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Genome, 38:1213-1220.

Stolen O y Anderson S, (1978). Inheritance of tolerance to low soil pH in barley. Hereditas, 88:101.

Takagi H, Namai H y Murakami K, (1983). Exploration of aluminum tolerant genes in wheat. En: Proc 6th Int Wheat Genet Symp. Maruzen, Kyoto, Japón, 143.

Tang KS y Hart GE, (1975). Use of isozymes as chromosome markers in wheat-rye addition lines and triticale. Genet Res, 26:187-202.

Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoul JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Riider MS, Wing RA, Wu W y Young ND, (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics, 132:1141-1160.

- Tautz D, (1989).** Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res*, 17:6463-6471.
- Taylor GJ, (1988).** The physiology of aluminum phytotoxicity. En "Metal ions in biological systems". Eds: Sigel H y Sigel A. Marcel Dekker, New York, 24:123-63.
- Taylor GJ, (1991).** Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. *Curr Top Plant Biochem Physiol*, 10:57-93.
- Tice KR, Parker DR y DeMason DA, (1992).** Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol*, 100:309-318.
- Van Deynze AE, Dubcovsky J, Gill KS, Nelson JC, Sorrells ME, Dvorak J, Gill BS, Lagudah ES, McCouch SR y Appels R, (1995).** Molecular-genetic maps for group 1 chromosomes of Triticeae species and their relation to chromosomes in rice and oat, *Genome*, 38:45-59.
- Vierling RA y Nguyen T, (1992).** Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes. *Theor Appl Genet*, 84:835-838.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M y Van de Lee T, (1995).** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acid Res*, 23(21):4407-4414.
- Wallace SU y Anderson IC (1984).** Aluminium toxicity and DNA synthesis in wheat roots. *Agron J*, 76:5-8.
- Wanous MK y Gustarson JP, (1995).** A genetic-map of rye chromosome 1R integrating RFLP and cytogenetic loci. *Theor Appl Genet*, 91:720-726.
- Weber JK y May PE, (1989).** Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genetj*, 44:388-397.

Wehling P, (1991). Inheritance, linkage relationship and chromosomal localization of the glutamate oxalacetate transaminase, acid phosphatase and diaphorase isozyme genes in *Secale cereale* L. *Theor Appl Genet*, 82:569-576.

Welsh J y McClelland D, (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res*, 18:7213-7218.

Williams JGK, Connor W, Wosnick MA, Aiken JM, Gedamu L y Dixon GH, (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acid Res*, 18(22):6531-6535.

Winkler S, Ockels W, Budzikiewicz H, Korth H y Pulverer G, (1986). 2-hydroxy-4-methoxy-5-methylpyridine-N-oxide: an aluminum complexing metabolite from *Pseudomonas cepacia*. *Z Naturforsch Teil C*, 41:807-808.

Woeste K, McGranahan G y Bernatzky R, (1996). The identification and characterization of a genetic marker linked to hypersensitivity to the cherry leafroll virus in walnut. *Molecular Breeding*, 2:261-266.

Wolff K, Schoen ED y Peters-VanRijn J, (1993). Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNA in chrysanthemum. *Theor Appl Genet*, 86:205-212.

Wricke G, (1991). A molecular marker linkage map of rye for plant breeding. *Vortr Pflanzenzücht*, 20:72-7.

Young ND y Tanksley SD, (1989). RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. *Theor Appl Genet*, 77:353-359.

Yu K y Pauls KP, (1992). Optimization of the PCR program for RAPDs analysis. *Nucl Acids Res*, 20:2606.

Zabeau M, Kuiper M, Peleman J, Lee T, Reijans M, Hogers R, Hornes M, Fritjers A, Vos P y Keygene NV, (1994). Marker assisted breeding using AFLP. Abstract 4th Int Cong Plant Mol Biol, Amsterdam, Holanda.

Secuencias obtenidas de los fragmentos de ADN de centeno que mostraron alguna señal de hibridación con las sondas wali de trigo (rali) y de los RAPDs, a partir de los cuales se diseñaron cebadores largos para la obtención de marcadores SCAR (en negrita se muestran los cebadores empleados en las amplificaciones):

rali1.1 (768pb)

CAGGTGCGCCGCCGTGGTCGTCCTCGTGAAAACGAGATGGTGGCAGCATTGATTTGCATGCATGCACAAACCAG
 TTATTAGTCGTGCTTACCTTACATCCTCGTCCTTTTTTCTCCAAAGAGGTATTTCTTTGGCCAATGCATGCAT
 GAGTGAAGGAGTTATTGTTGGGTTGCATGCAGAAAAGAGGGAGAGGAAGTTGCATGCGAGGGAGTCTTGGAG
 AGGGATGAGAGCGGGCTACACAGCCAAGTACTATTCCCAATATTTGCTCCACTTTTTTATGCAACAGCCTTGGT
 ACTACGAAAAGATTTTAAACTTAGGCGCTGTTTATATGGAAGGAAGGAGTAGTTTCCAATGATATTATTTCTT
 GGTGACATGCATTCAACATTTTAAGGTCAAACCTTGGAGCAAATGCAAAGGGGACCAATAGACCAGTAA
 ACATCAAAGTTCTCTCGTTTTGCCCGAACTTGGTCTCGGTGAGATGACTATACTGCACCGGCACAGAGGG
 AGGGCTGGGAGGCCCGAGGAGTACATGGCCAACACACACGTGAATGCAACGCATTCTGCACCTTCTCATAT
 AAAGGCTCCCCGACAGTCCAATCTACGAAATACAATGCACCTACGCACCCTAACCAAGGGCAAGAGTGAA
 CACTCCAATCGCATGATCAGTTGACTAGTAGAAGCTATACCCATGGAGGCGATGAGCGCGACCATCAGCC
 GGCTGTGTGAGATGGTCC**ACGACCACGGCGGCGACCTG**

rali1.2 (375 pb)

CAGGTGCGCCGCCGTGGTCGTTGGCCGGTCCGCTCGGTCCGGCCCGAGCTTGGACGCCGCCGGTCCGGTCCCTG
 AAATCACACAGTATGTTCTGTTTGGTTCTGAAACGTTTCATCAACGAGTTTCGCTCTCCGCCTCCGCAGCGTT
 CTTCAGGCACCGGCCCAAGCTGCAGCTCCGACCATCTGCAGCCGTCTCGCACAGCGGGGGCAGCGAGGCAAC
 AATGGGGGGCATCCACCAGCCGCTGCCAGAGCCGGAGGCAGAGCCGAAGCACAAGATATCGCTCGAGCTGACA
 CTCTCCTTACCTACATGTTAGCCACCTTCAGATCGACCATCACTCTCTGCCCCACTGTTGTTAACTTAGAAC
ACGACCACGGCGGCGACCTG

OpA08₄₁₅ (415 pb)

GTGACGTAGGGTGGTATGCATTCAATGACTTGAAGACTACTTAGAGCAGGGTTAAACAATATAGCCGACC
 CAATGGCTATAATATATTGACAGGCCGTCTATAGCAAAGGTGTAGTACATAACAATGGTAATTTATTGCA
 TTCAGTGCTATTAATTAGCACATAGTATTCATTTTCATGTATAATAGTAAACATCACGTTCTCTCGTTTCC
 ACTCCGCTGTGCGTGCCAAATGATTATTCACCTAGACGGAGGGAGTAGTACTTGTTTACAACATGGCCCA
 TCATTCACTCTCACATATCTTCTTGGAGCTCGTGCTACAGCTGGCTGTAAATCTACATCACGCTTACTTC
 TCTCTTATCTGACTGAGGCAAAGATATAGTACAATATTTAAGCCTT**ACAGCCTGCCTACGTAC**

OpB03₆₅₅ F

CATCCCCCTGGAGAATAGGACAGAGGCTTTCGGAAAGGTGCTAGGGAACTGGATTGGTAAAGCAGTATGG
 GTGGATCTGAAAAACATGGATCATTTAAAGGAGTTCATTTAGGGTTTGCACAAAGCTGTCAATTTTTGG
 CCTCTTGCTGAGGGGGTTCAATTTGAAGGAGACAGAAGATCGATCCCGAAGAATATGTA

OpB03₆₅₅ R

CATCCCCCTGGCAGTTCCTCGTTTTCTTGCCCTTTGCCACAGCCGACCAGTGCCGCTGCTTATTCGGGCT
ATTTACCTCCTCTTCAAACCCTCCTTAAAG

OpB15₇₉₀ F

GGAGGGTGTTCGTGAAGCTTAGGTGTGCTAGGGCGTAGCGTGGGGTTGATCTAAACATCCCCGTGTTA
TCCTTCGGTAGCCTAGTTTCCAACGTGAT

OpB15₇₉₀ R

GGAGGGTGTTCAGGACTAAAAAGAAACAGTGGGCAAAGGCGACTCTTGAAGTCTGCAGGGGACGGAACAGG
AGACCATCTGTGCATATTCGGATTAT

OpB16₁₁₄₅ F

TTTGCCCGGACAACAGATGAGTCGCCCCGCGGCATTGTAAGCCGGCACGTACGGGCGAGTTAATCGCAGGC
GCGGACAGCTGAGTCGGCCACATATTGATGTAAGCGCACGAATGGGGGCGAGTACTGCACGCGTATCCG
TCGGGCGGTTTATGAGAACGGGTGCGGCACCGGCGTGTAAATGTAGACCAGACCGCGGAAACGGTGGCGT
GCGCACGTCCATTGGCGAGGGAGTCGGCCGCGGTGTTGGAGACCACCCAT

OpB16₁₁₄₅ R

TTTGCCCGGAGCTGTATAAACCCCTTCTCTTGCGTGTTGATCTGCCTCGTGTCTCTCGATCCCGACCAACC
CCTTCAAGCTACCATA

OpR01₆₀₀ F

TGCGGGTCCCTGTCACCCGGTAAATATCTGGCGCCGTAGCAGTTGACACCTTCTTGTTGAACCTTGGAGT
CTCAGGGGAATTCGATCCGTGGTATCTTTGCCAAGGGAAAACCTACCGCTACACTGCATCTCAAACCCTCC
ACTTGGGTAA

OpR01₆₀₀ R

TGCGGGTCCCTCCATAGTGAGTAGGAGGAGCGGAGTGGAAGGATCCCCTCCCATCTTTAGTAACCGGGG
CTTGTTCACTACTTCTTCCTTGTCGGGATTAGCCTCGCACACGTTGGTAGCGGGACGAACCACTTCCAAC
GTGTGGTGGATAAT

OpS14₇₀₅ F

AAAGGGTCCAACATCACCTTGGATGCTGGTCCAGGAACCATAATGGAAACCATCAACCACATAGCACAA
CTGAAAGGATCGATATGGTTGACTAGAGGGGGGGTGTGAGGATATGACTACGAGGTATAAACCGGCTAG
TGTAACCGGCTTGTAAATTTAGTAAAGGCTACGGCCATGAGATCTTAGGGCCCATGTATAGAATTATG
GTTGTAA

***OpS14*₇₀₅ R**

**AAAGGGTCCTGACAATGTGGCGCCACTGTACGTGTATTAGCACGGCAGATGTCCGGTTTACGACTAGAT
CTGGACCACTGACGG**