



Universitat de Lleida

Análisis de la población doble haploide de cebada, procedente del cruzamiento de Albacete × Plaisant, para el estudio de la translocación recíproca presente en Albacete

Isabel Lacasa Benito

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat de Lleida

Tesis doctoral

**Análisis de la población doble haploide de cebada,
procedente del cruzamiento de Albacete × Plaisant,
para el estudio de la translocación recíproca
presente en Albacete**

Isabel Lacasa Benito

Directores:

Dr. D. Ignacio Romagosa Clariana

Dra. Dña. M^a Pilar Muñoz Odina

Lleida, 2012

Esta Tesis Doctoral se realizó gracias a la financiación concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2002-04139-C02-01); así como a la beca FPI concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BES-2003-1095).

Agradecimientos

Terminar esta tesis, después de tanto tiempo y tras varios años de abandono, ha supuesto un gran esfuerzo personal, sin embargo, por mucho empeño que yo haya puesto jamás lo hubiera conseguido sin el apoyo de numerosas personas.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores, Ignacio y Pilar, por su ayuda, por su paciencia, por tenderme la mano cuando por fin me decidí a escribir.

Al personal del Departament de Producció Vegetal y Ciència Forestal de la UdL donde siempre encontré apoyo y buenos consejos. A Marian por la oportunidad de iniciar esta tesis. A Eva por su buen hacer en el laboratorio y por su amistad. A Tere, por su inestimable ayuda con todo el papeleo.

A todo el personal del IRTA. A José Luis Molina por suministrar parte de los datos utilizados en este trabajo. A María, Andrea, Teresa, Rosa, Ezequiel, Betbe, Millera (mayor y pequeño), Mónica, y tantos y tantos otros que pasaron por el almacén; gracias por hacer que cosechar o procesar muestras fuera mucho más entretenido de lo que a priori puede parecer. A Toñi y al resto del personal de secretaría por hacer que el papeleo de becas, estancias y demás fuera mucho más llevadero.

A Luis, Ana y Mapi, de la Estación Experimental de Aula Dei. Gracias por hacer posible gran parte de los resultados de esta tesis pero, sobre todo, por acogerme siempre con los brazos abiertos, por ayudarme, por escucharme, por hacer que me sienta como en casa. A Begoña, Merche, María, Natalia, Patricia, Rosa, Chus, Miguel; gracias por hacerme sentir como una más del grupo.

A Ángeles Cuadrado, por sus enseñanzas, sus preparaciones de FISH y su apoyo.

A Alba, gracias por tu gran ayuda con los mapas, con los QTLs, con todo.

Al personal del Departamento de Genética y Producción Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei en especial a Ana Casas y Ernesto Igartua, infinitas gracias por vuestra ayuda con los QTLs y por los ánimos que me habéis dado siempre.

A Patrick M. Hayes, Andrzej Kilian y sus respectivos grupos en Corvallis y Canberra. Los meses que pasé en cada uno de estos laboratorios fueron un auténtico privilegio a nivel profesional y una experiencia inolvidable a nivel personal.

A Fanny, Mónica, Asun, Gisela, Alex, Jenny, Andrea, Jordi, Martín, Ariel, Miguel, Ángeles, Miguelito, Giuseppe, Ana, Iris, Belén, a todos los compañeros y amigos de Lleida, mi otra familia durante cuatro años, gracias por hacer el trabajo mucho más entretenido, por los cafés y comidas compartidas, por descubrirme las calçotadas, por hacer que los momentos duros fueran un poco más llevaderos.

A Julia, Natalia, Javi, Víctor, Laura, por tantas y tantas cosas.

A mis amigos de Zaragoza, por alegrarme la vida, por mantener mi ánimo siempre arriba. No os puedo pedir más.

A los Velázquez-González, por su interés, por sus ánimos, por su buen humor.

A Vicente, por las mil cosas que me regalas cada día pero sobre todo por tu paciencia infinita.

A mi madre. A mis hermanos. A los apegados que “no son de la familia”. Gracias. Por todo.

“Todo tiene su tiempo y hay un momento para todo cuanto ocurre” Ec 3.1

A mi padre

Resum

Es va analitzar una població doble haploide (DH) de 181 individus procedents de l'encreuament entre Albacete i la varietat Plaisant per dur a terme la caracterització citogenètica de la translocació cromosòmica recíproca present en la varietat d'ordi Albacete i valorar la seva possible relació amb la resistència d'Albacete a ambients extrems de fred i sequera.

La distorsió de la segregació present en poblacions doble haploides pot suposar un inconvenient per a la construcció de mapes de lligament i anàlisi de QTLs per la qual cosa, primerament, es va realitzar una anàlisi en una població de línies DHs i una altra de RILs procedents de l'encreuament entre un dels parentals, Plaisant, i un altre genotip, Orria, d'estructura genòmica estàndard. Els resultats obtinguts van mostrar valors similars de distorsió de la segregació en ambdues poblacions de manera que la utilització d'una població doble haploide per dur a terme aquest estudi es va considerar adequat.

Un cop determinada la idoneïtat de la població objecte d'estudi per a la caracterització de la translocació recíproca, es va realitzar un genotipatge amb marcadors SSR i DART. Després de l'anàlisi de lligament es van obtenir sis grups principals. Cinc d'ells es corresponien amb els cromosomes 2H, 4H, 5H, 6H i 7H. El grup restant agrupava els marcadors pertanyents als cromosomes 1H i 3H. Aquest lligament entre marcadors de diferents cromosomes es va atribuir a la presència de la translocació recíproca. Una anàlisi més detallada d'aquest grup de lligament va situar el punt de tall de la translocació en els bin 7-8 del cromosoma 1H i a l'altura dels bin 5-6 en el cromosoma 3H.

Paral·lelament a la caracterització genètica de la població es van observar meiosi de cèl·lules mare de pol·len procedents de línies DH retrocreuades per Plaisant. Totes les línies en què es va confirmar la presència d'un quadrivalent en metafase mostraven el genotip d'Albacete en la zona proposada com a punt de tall de la translocació. Posteriorment es va dur a terme una hibridació in situ fluorescent (FISH) en preparacions cromosòmiques d'Albacete, amb les sondes pTa71 i pTa749, juntament amb el trinucleòtid (ACT)₅. L'observació en una mateixa estructura cromosòmica de senyals corresponents als braços 1HS i 3HL, va confirmar la presència de la translocació recíproca entre els cromosomes 1H i 3H. La combinació dels resultats genètics i citològics va permetre establir al mapa físic la zona on es localitzaria el punt de tall de la translocació recíproca: aproximadament entre un 37% del braç 1HS i un 30% del 1HL, i entre un 57% del 3HS i un 32% del braç 3HL.

Per valorar la relació de la translocació recíproca amb caràcters d'interès agronòmic es van realitzar assaigs en dues localitats durant un període de dos anys. El caràcter pes de mil grans va ser superior, de forma significativa, en les línies doble haploides portadores de la translocació recíproca. Es van detectar també QTLs significatius per als caràcters vigor inicial, data de canoneig, data d'espigat, fase d'elongació de la tija i fase d'ompliment de gra. La majoria d'aquests caràcters es trobaven associats al gen de fotoperíode *PPD-H2* en el cromosoma 1H, al gen de vernalització *VRN-H1*, en el cromosoma 5H, i al gen de precocitat intrínseca *Eam6* en el cromosoma 2H.

Resumen

Se analizó una población doble haploide (DH) de 181 individuos procedentes del cruzamiento de Albacete y la variedad Plaisant para llevar a cabo la caracterización citogenética de la translocación cromosómica recíproca presente en la variedad de cebada Albacete y valorar su posible relación con la resistencia de Albacete a ambientes extremos de frío y sequía.

La distorsión de la segregación presente en poblaciones doble haploides puede suponer un inconveniente para la construcción de mapas de ligamiento y análisis de QTLs, por lo que, en primer lugar, se realizó un análisis en una población de líneas DHs y otra de RILs procedentes del cruzamiento entre uno de los parentales, Plaisant, y otro genotipo, Orria, de estructura genómica estándar. Los resultados obtenidos mostraron valores similares de distorsión de la segregación en ambas poblaciones por lo que la utilización de una población doble haploide para llevar a cabo este estudio se consideró adecuado.

Una vez determinada la idoneidad de la población objeto de estudio para la caracterización de la translocación recíproca, se realizó un genotipado con marcadores SSR y DArT. Tras el análisis de ligamiento se obtuvieron seis grupos principales. Cinco de ellos se correspondían con los cromosomas 2H, 4H, 5H, 6H y 7H. El grupo restante agrupaba los marcadores pertenecientes a los cromosomas 1H y 3H. Este ligamiento entre marcadores de diferentes cromosomas se atribuyó a la presencia de la translocación recíproca. Un análisis más detallado de este grupo de ligamiento situó el punto de corte de la translocación en los bin 7-8 del cromosoma 1H y a la altura de los bin 5-6 en el cromosoma 3H.

De forma paralela a la caracterización genética de la población se observaron meiosis de células madre de polen procedentes de líneas DH retrocruzadas por Plaisant. Todas las líneas en las que se confirmó la presencia de un cuadrivalente en metafase mostraban el genotipo de Albacete en la zona propuesta como punto de corte de la translocación. Posteriormente se llevó a cabo una hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en preparaciones cromosómicas de Albacete, con las sondas pTa71 y pTa749, junto con el trinucleótido (ACT)₅. La observación en una misma estructura cromosómica de señales correspondientes a los brazos 1HS y 3HL, confirmó la presencia de la translocación recíproca entre los cromosomas 1H y 3H. La combinación de los resultados genéticos y citológicos permitió establecer en el mapa físico la zona en la que se localizaría el punto de corte de la translocación recíproca: aproximadamente entre un 37% del brazo 1HS y un 30% del 1HL, y entre un 57% del 3HS y un 32% del brazo 3HL.

Para valorar la relación de la translocación recíproca con caracteres de interés agronómico se realizaron ensayos en dos localidades durante un periodo de dos años. El carácter peso de mil granos fue superior, de forma significativa, en las líneas doble haploides portadoras de la translocación recíproca. Se detectaron también QTLs significativos para los caracteres vigor inicial, fecha de encañado, fecha de espigado, fase de elongación del tallo y fase de llenado de grano. La mayor parte de estos caracteres se encontraban asociados al gen de fotoperiodo *PPD-H2* en el cromosoma 1H; al gen de vernalización *VRN-H1*, en el cromosoma 5H, y al gen de precocidad intrínseca *Eam6* en el cromosoma 2H.

Abstract

A double haploid (DH) population of 181 lines, derived from a cross between Albacete and Plaisant cultivars, was used to characterize the reciprocal chromosomal translocation present in Albacete. The possible relation between this translocation and the drought tolerance present in Albacete was analyzed.

Segregation distortion present in DH populations may suppose an inconvenience to the construction of linkage maps and QTLs analysis. In order to check the suitability of use a DH population, an analysis of the segregation distortion was carried out in DHs and RILs population derived from cross between a parental, Plaisant, with Orria, another genotype with a standard genomic structure. As the results obtained showed similar values of segregation distortion for both populations, the utilization of double haploid populations was considered adequate to carry out this study.

After determining the suitability of the population selected for the reciprocal translocation characterization, a genotyping process with SSR and Dart markers was carried out. Six main linkage groups were detected involving markers from chromosomes 2H, 4H, 5H, 6H and 7H. The remaining markers, from 1H and 3H, formed a single linkage group. This was attributed to the presence of a reciprocal translocation. A more detailed analysis of this last linkage group, showed that the translocation breakpoints occurred in bin 7 -8 on chromosome 1H and in bin 5 - 6 on chromosome 3H.

At the same time, meiosis of pollen stem cells coming from Plaisant backcrossed DH lines were observed. All lines in which a quadrivalent was confirmed showed Albacete's genotype. Lately a fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was done in chromosome preparations of Albacete cultivars, with pTa71 and pTa749 probes, together with the trinucleotide (ACT)5. The fact that signals corresponding to 1HS and 3HL arms were found in the same chromosome, confirmed the presence of a reciprocal translocation between the chromosomes 1H and 3H. The combination of the genetic and cytological results made possible to establish, into the physical map, the region where the break point of the reciprocal translocation will be found: approximately between a 37% of 1HS and a 30% of 1HL arm and between 57% of 3HS and 32% of 3HL arm.

In order to assess the relation of the reciprocal translocation with important agronomical traits, different trials were carried out in two locations in two growing seasons. The 1000-kernel weight was significantly higher in DH lines carrying the reciprocal translocation. Moreover, significant QTLs were detected for early vigour, jointing, heading date, stem elongation and grain filling. Most of these traits were associated to the photoperiod gene *PPD-H2* on 1H chromosome, the vernalization gene *VRN-H1* on 5H chromosome and the early maturity gene, *Eam6* on 2H chromosome.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	19
ÍNDICE DE FIGURAS	19
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	23
1.1. LA CEBADA	25
1.1.1. ORIGEN, TAXONOMÍA Y TIPOS DE CEBADA	26
1.1.2. ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA CEBADA	27
1.2. LA VARIEDAD DE CEBADA ALBACETE	27
1.3. LAS TRANSLOCACIONES RECÍPROCAS	30
1.3.1. CONSECUENCIAS CITOLÓGICAS	31
1.3.2. EFECTO DE POSICIÓN Y ALTERACIONES FENOTÍPICAS	33
1.3.3. ALTERACIÓN DE LAS RELACIONES DE LIGAMIENTO	35
1.4. MARCADORES MOLECULARES Y MAPAS DE LIGAMIENTO EN CEBADA	35
2. OBJETIVOS	39
3. DISTORSIÓN DE LA SEGREGACIÓN EN DOS POBLACIONES DE CEBADA PROCEDENTES DEL MISMO CRUZAMIENTO	43
3.1. INTRODUCCIÓN	45
3.1.1. POBLACIONES UTILIZADAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE MAPAS GENÉTICOS	45
3.1.2. LAS POBLACIONES DOBLE HAPLOIDES	45
3.1.3. DISTORSIÓN DE LA SEGREGACIÓN	46
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.2.1. MATERIAL VEGETAL	48
3.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	49
3.2.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA CON MARCADORES DART	49
3.2.4. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO	49
3.2.5. ANÁLISIS DE LA DISTORSIÓN DE LA SEGREGACIÓN	50
3.3. RESULTADOS	50
3.3.1. COMPARACIÓN DE LOS MAPAS DE LIGAMIENTO DEL CRUZAMIENTO P×O OBTENIDOS A PARTIR DE LAS POBLACIONES DE DHs Y RILs	50
3.3.2. COMPARACIÓN DE LA DISTORSIÓN DE LA SEGREGACIÓN ENTRE DHs Y RILs	57
3.4. DISCUSIÓN	62

4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DOBLE HAPLOIDE PROCEDENTE DEL CRUZAMIENTO DE ALBACETE × PLAISANT	67
4.1. INTRODUCCIÓN	69
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	70
4.2.1. MATERIAL VEGETAL	70
4.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	70
4.2.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA CON MARCADORES SSR	71
4.2.3.1. Electroforesis en gel de acrilamida.....	72
4.2.3.2. Análisis en secuenciador automático.....	74
4.2.4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA CON MARCADORES DART.....	74
4.2.5. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO Y CONSTRUCCIÓN DE MAPAS GENÉTICOS	75
4.3. RESULTADOS.....	76
4.3.1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA CON MARCADORES SSR Y OBTENCIÓN DE UN MAPA DE LIGAMIENTO PRELIMINAR.....	76
4.3.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN CON MARCADORES DART.....	78
4.3.2.1. Análisis de ligamiento y construcción del mapa de los grupos implicados en la translocación	80
4.3.2.2. Construcción del mapa de ligamiento de los cromosomas no implicados en la translocación recíproca.	88
4.3.3. DISTORSIÓN DE LA SEGREGACIÓN.....	91
4.3.4. OBTENCIÓN DE UN MAPA SATURADO DEL CRUZAMIENTO ALBACETE × PLAISANT INCLUYENDO MARCADORES DART Y SSR.....	92
4.4. DISCUSIÓN.....	98
5. CARACTERIZACIÓN CITOLÓGICA DE LA TRANSLOCACIÓN RECÍPROCA	101
5.1. INTRODUCCIÓN	103
5.1.1. MAPAS GENÉTICOS Y MAPAS FÍSICOS	103
5.1.2. ANÁLISIS DEL CARIOTIPO	103
5.1.3. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH).....	104
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	106
5.2.1. COMPROBACIÓN CITOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE LA TRANSLOCACIÓN EN LA POBLACIÓN DOBLE HAPLOIDE.....	106
5.2.2. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH).....	107

5.2.2.1. Obtención y preparación de anteras procedentes de híbridos de Albacete × Plaisant para la obtención de células madre de polen en metafase.....	107
5.2.2.2. Obtención y preparación de raíces de Albacete para la obtención de células mitóticas en metafase	107
5.2.2.3. Obtención de preparaciones cromosómicas.....	107
5.2.2.4. Sondas utilizadas	108
5.2.2.5. Hibridación	110
5.2.2.6. Visualización y captación de imágenes	112
5.3. RESULTADOS	112
5.3.1. PRESENCIA DE LA TRANSLOCACIÓN EN LAS LÍNEAS DOBLE HAPLOIDES.....	112
5.3.2. FISH.....	114
5.4. DISCUSIÓN.....	117
6. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA TRANSLOCACIÓN RECÍPROCA E IDENTIFICACIÓN DE QTLs	121
6.1. INTRODUCCIÓN.....	123
6.2. MATERIALES Y METODOS.....	124
6.2.1. MATERIAL VEGETAL.....	124
6.2.2. CONDICIONES DE ENSAYO	125
6.2.3. CARACTERES ESTUDIADOS.....	128
6.2.4. RELACIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN CON CARACTERES DE INTERÉS AGRONÓMICO. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	129
6.2.5. ANÁLISIS DE QTL.....	129
6.3. RESULTADOS	130
6.3.1. RELACIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN RECÍPROCA CON CARACTERES DE INTERÉS AGRONÓMICO.....	130
6.3.1. ANÁLISIS DE QTL.....	133
6.4. DISCUSIÓN.....	152
7. CONCLUSIONES.....	159
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1	Segregación esperada en las RILs	50
Tabla 3.2	Distribución de marcadores, longitud de los grupos de ligamiento obtenidos con las poblaciones DHs y RILs para el cruzamiento de Plaisant x Orria y comparación con el mapa de referencia (Wenzl et al. 2006)	51
Tabla 3.3	Porcentaje que representan los marcadores distorsionados ($p=0,01$) de cada cromosoma respecto al total de marcadores que integran cada cromosoma y al total de marcadores distorsionados en cada población.	57
Tabla 4.1	Composición de las reacciones de PCR para el análisis de marcadores SSR	72
Tabla 4.2	Distribución de marcadores, grupos de ligamiento y longitudes obtenidas con los marcadores SSR.....	78
Tabla 4.3	Distribución de marcadores en los cromosomas 1H y 3H, longitud de los brazos cromosómicos y localización del punto de translocación según las posiciones de referencia del mapa consenso.....	88
Tabla 4.4	Distribución de marcadores y longitud de los cromosomas no implicados en la translocación...	89
Tabla 4.5	Número de marcadores distorsionados y su posición en el mapa de Albacete × Plaisant. Se incluye también el bin donde se localizarían los marcadores distorsionados	91
Tabla 4.6	Marcadores cercanos al punto de corte de la translocación recíproca. Las posiciones que se especifican son las del mapa de referencia (Wenzl et al., 2006).....	93
Tabla 4.7	Distribución de marcadores y longitudes del mapa final del cruzamiento Albacete × Plaisant ...	94
Tabla 5.1	Relación de líneas DHs retrocruzadas por Plaisant en las que se observaron células madre de polen en metafase. Se incluye la fecha de siembra y el resultado de las observaciones citológicas.	113
Tabla 6.1	Número de líneas doble haploides evaluadas y testigos utilizados en cada ensayo	125
Tabla 6.2	Contraste de significación entre los DH portadores de la translocación y los no portadores, para el conjunto de ambientes y para cada uno forma individual. Se incluyen también los resultados obtenidos entre Albacete y Plaisant	131
Tabla 6.3	Resumen de los QTLs identificados en la población DH procedente del cruzamiento Albacete × Plaisant. Para cada locus se indica el cromosoma, posición (cM) en el mapa de referencia (Wenzl et al. 2006), bin y significación ($-\log_{10}(P)$). Se indica también el efecto aditivo y la variabilidad explicada en cada ambiente. Los efectos en azul son positivos para Albacete y en naranja positivos para Plaisant.	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Superficie dedicada al cultivo de cereales en España. Años 2007-2011. (Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. http://www.marm.es)	25
Figura 1.2	Producción de cereales en España. Años 2007-2011 (Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. http://www.marm.es)	26

Figura 1.3	Apareamiento durante la meiosis en un individuo heterocigoto para la translocación recíproca (Fuente: Griffiths et al. 2000).....	32
Figura 1.4	Espiga de un individuo heterocigoto para la translocación recíproca en la que puede observarse una esterilidad parcial.	33
Figura 3.1	Mapas de ligamiento del cruzamiento Plaisant × Orria obtenidos con la población de DHs y la población de RILs. Las distancias genéticas están expresadas en cM según la función de mapa Kosambi. Los cromosomas están orientados con el brazo corto en la parte superior y las distancias entre los grupos de ligamiento son proporcionales a las distancias del mapa consenso tomado como referencia. En cada marcador se indica, entre paréntesis, su posición en el mapa de referencia (Wenzl et al. 2006)	53
Figura 3.2	Distorsión de la segregación observada en las poblaciones DH y RIL genotipadas con 248DArT. Para cada cromosoma aparecen a la izquierda los marcadores DArT localizados en el cromosoma correspondiente según las distancias (cM) del mapa consenso (Wenzl et al. 2006). En cada cromosoma están señalados los <i>Bins</i> con diferentes tonos de gris. En el centro se representa el porcentaje de Plaisant en cada población. La línea vertical marca el 50%. A la derecha se representa la distorsión de la segregación calculada como $-\log(\text{prob}\chi^2)$. La línea de puntos se corresponde con $p=0,01$	58
Figura 4.1	Distribución en el genoma de cebada de los 60 marcadores SSR seleccionados para la caracterización genética inicial de la población Albacete × Plaisant. Para determinar la posición de cada marcador se ha tomado como referencia Varshney <i>et al.</i> 2007.	71
Figura 4.2	Mapa de ligamiento del cruzamiento Albacete × Plaisant con 60 marcadores SSR. Las distancias genéticas están expresadas en centiMorgans (cM) según la función de mapa Kosambi. Los cromosomas están orientados con el brazo corto en la parte superior y las distancias entre los grupos de ligamiento y los marcadores independientes son proporcionales a las distancias del mapa consenso tomado como referencia (Varshney <i>et al.</i> 2007). Los marcadores que aparecen en rojo pertenecen al cromosoma 1H y los que aparecen en azul al cromosoma 3H.....	77
Figura 4.3	Representación gráfica de las frecuencias de recombinación obtenidas entre 108 DArT pertenecientes a los cromosomas 1H y 3H. Las tonalidades mas oscuras se corresponden con frecuencias de recombinación cercanas a 0. Dentro de cada cromosoma los marcadores están ordenados según las distancias de referencia del mapa consenso (Wenzl <i>et al.</i> 2006)	80
Figura 4.4	Frecuencias de recombinación obtenidas entre 37 DArT seleccionados y representación gráfica de los cromosomas 1H y 3H con éstos marcadores ordenados según las distancias de referencia del mapa consenso (Wenzl <i>et al.</i> 2006). Dentro de la tabla de frecuencias aparecen en tonalidades mas oscuras y en negrita las frecuencias de recombinación $\leq 0,1$	81
Figura 4.5.	Mapas obtenidos tras 100 repeticiones con 108 DArT de los cromosomas 1H (en rojo) y 3H (en azul). En cada marcador aparece entre paréntesis su posición en el mapa consenso (Wenzl et al. 2006); a) 1HS-3HL + 3HS-1HL con todos los marcadores cercanos a TB reunidos en 3HS-1HL (55%); b) 1HS-3HL + 3HS-1HL con los marcadores cercanos a TB repartidos entre los dos grupos de ligamiento (4%); c) 1HS-1HL + 3HS-3HL con marcadores de 3H	

	insertados entre 1HS y 1HL (11%); d) 1HS-1HL + 3HS-3HL con marcadores de 1H insertados entre 3HS y 3HL (23%); e) 1HS-1HL + 3HS-3HL (6%); f) 1HS-3HS + 1HL-3HL (1%).	84
Figura 4.6	Mapa de ligamiento de los cromosomas 1H y 3H. Cada uno de los grupos se corresponde con un brazo cromosómico. En el cuadro central aparecen los marcadores de ambos cromosomas que no pueden asignarse a ningún brazo concreto. Las líneas discontinuas representan la posibilidad de ligamiento dos a dos entre los diferentes brazos incluyendo en el grupo resultante alguno de los marcadores del cuadro central, todos o ninguno. Las distancias genéticas de los brazos cromosómicos están expresadas en cM según la función de mapa Kosambi. En cada marcador aparece entre paréntesis su posición en el mapa consenso (Wenzl et al. 2006).	87
Figura 4.7	Mapa de ligamiento de los grupos no implicados en la translocación recíproca. Los cromosomas están orientados con el brazo corto en la parte superior y las distancias genéticas están expresadas en cM según la función de mapa Kosambi. En cada marcador aparece entre paréntesis su posición en el mapa consenso y las distancias entre los grupos de ligamiento son proporcionales a las distancias del mapa consenso tomado como referencia (Wenzl et al. 2006).	90
Figura 4.8	Mapa de ligamiento del cruzamiento Albacete × Plaisant con 49 SSR (subrayados) y 498 DArT. Las distancias genéticas están expresadas en cM según la función de mapa Kosambi. Los marcadores que aparecen en negrita son marcadores localizados en el mapa consenso de referencia (Wenzl et al. 2006).	95
Figura 5.1	Patrón de distribución aproximada de 45S rDNA (pTa71) y 5S rDNA (pTa794) en cebada; pTa71 estaría marcado con biotina (rojo) y pTa794 con digoxigenina (verde).	109
Figura 5.2	Patrón de distribución aproximada del oligonucleótido (ACT) ₅ en los siete cromosomas de cebada; el marcaje de la sonda se habría realizado con biotina (rojo).	110
Figura 5.3	Microfotografías de células madre de polen en metafase; a-b) células mostrando un cuadrivalente y cinco bivalentes en metafase correspondientes a las líneas 806xP y 1726xP; c-d) células mostrando los siete bivalentes, correspondientes a los siete cromosomas normales de cebada, observados en las líneas 31077xP y 30382xP.	114
Figura 5.4	Microfotografías de FISH. (a-c) Metafase de células madre de polen de un híbrido de Albacete × Plaisant. La hibridación <i>in situ</i> fluorescente se ha realizado con las sondas ribosomales pTa71 (45S rDNA) y pTa794 (5S rDNA). (d-e) Metafase mitótica de células de la raíz de Albacete; (d) resultado de la hibridación con las sondas ribosomales pTa71 y pTa794; las señales de pTa71 localizadas en los brazos cortos del cromosoma 1H aparecen señaladas mediante flechas; (e) resultado de la hibridación con el trinucleótido (ACT) ₅ ; la señal característica obtenida con este oligonucleótido en el brazo largo del cromosoma 3H está indicada mediante flechas. (f-g) Cariotipo de Albacete obtenido a partir de las microfotografías (d) y (e); (f) las señales resultantes de la hibridación con las sondas pTa71 (45S rDNA) y pTa794 (5SrDNA) están indicadas con asteriscos y flechas respectivamente; (g) resultado de la hibridación con el trinucleótido (ACT) ₅ .	116

Figura 5.5	Genotipos de las 24 líneas DH retrocruzadas por Plaisant en las que se han observado metafases con claridad. Se muestran únicamente los marcadores localizados en la zona del punto de corte de la translocación recíproca de los cromosomas 1H y 3H según los resultados genotípicos. El gris más oscuro se corresponde con el alelo de Albacete y el más claro con el alelo de Plaisant. En la parte superior de la tabla se indican los resultados obtenidos por microscopía; con una x se señalan aquellas líneas en las que se ha observado un cuadrivalente o “anillo” en metafase.	117
Figura 5.6	Localización de marcadores SSR en el mapa físico de los cromosomas 1H y 3H. Para cada cromosoma se representa a la izquierda el mapa genético y a la derecha el mapa físico. En el mapa genético se señalan, en rojo, los SSRs utilizados en el mapa de Albacete x Plaisant y, subrayados, los SSRs que aparecen en los trabajos de referencia para cada cromosoma (Taketa et al 2002; Künzel et al. 2002). Las distancias están en cM según el mapa publicado por Ramsay et al. (2000). Los SSRs situados en la zona de la translocación, según el análisis de ligamiento, aparecen sombreados en azul. En el mapa físico se indican, además de los porcentajes de longitud a los que se sitúan los SSRs, las señales obtenidas tras el análisis de FISH con las sondas pTa71 (1H) y (ACT) ₅ (3H). Sombreada en azul se indica la zona de cada cromosoma en la que, de acuerdo con los datos de este trabajo, podría localizarse el punto de corte de la translocación recíproca.	119
Figura 6.1	Precipitación acumulada y temperaturas medias registradas en las estaciones de Gimennells y Oliola durante los años de ensayo; a) 2005/2006 y b) 2006/2007.....	126
Figura 6.2	Esquema de los ensayos de campo mostrando la organización de las parcelas en cada bloque y la disposición de los testigos (T1=Albacete, T2=Plaisant, T3=Cierzo, T4=Azara); a) Ensayo 2005/2006; b) Ensayo 2006/2007.....	127
Figura 6.3	Análisis de QTLs. Para cada carácter se indica: i) Significación de los QTLs identificados, efectos principales y efectos aditivos en cada ambiente (en azul, efecto positivo para Albacete y en anaranjado, efecto positivo para Plaisant); ii) Posición en el mapa de referencia (Wenzl et al. 2006) de los marcadores más significativos para cada QTL. Los marcadores en rojo indican un efecto constante del QTL en todos los ambientes. Los marcadores en azul indican efectos variables en función del ambiente (GxE).....	138
Figura 6.4	Localización en el mapa de ligamiento de Albacete x Plaisant de los QTLs identificados en la población DH. En cada pareja aparece a la izquierda el grupo de ligamiento con los DArT y a la derecha la localización de los bins. Las distancias en cM se indica mediante la regla de la izquierda y corresponden a las distancias del mapa consenso (Wenzl et al. 2006). Entre cada pareja aparecen los genes más cercanos a los QTLs localizados. En azul, los QTLs con efecto aditivo positivo para Albacete, en naranja los QTL con efecto aditivo positivo para Plaisant. alt=altura de la planta, ext=extrusión, DtJ=fecha de encañado, DtH=fecha de espigado, DtM=fecha de madurez, DfJtH=elongación del tallo, DfHtM=llenado de grano, nudo=longitud del último nudo, ped=longitud del pedúnculo, tkw=peso de 100 granos, vi=vigor inicial, yld=rendimiento.....	155

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. LA CEBADA

Los cereales constituyen la base de la agricultura mundial, proporcionando más de la mitad del alimento consumido por el hombre. Entre los cereales, la cebada por ser el cultivo que ocupa una mayor extensión, y el trigo por su incidencia en los sectores de producción de semillas y en el sector agroalimentario, tienen gran importancia en España, existiendo una demanda creciente hacia la obtención rápida de nuevos cultivares con mayor rendimiento, mejor calidad y resistencia a condiciones ambientales adversas.

Según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente el cultivo de cereales en España representa, aproximadamente, un 44% de la superficie total cultivada, es decir, algo más de 6 millones de hectáreas, de las que casi 3 millones se dedican al cultivo de cebada (Figura 1.1). Su producción supera los 9 millones de toneladas lo que supone, aproximadamente, un 44% de la producción total de cereales (Figura 1.2)

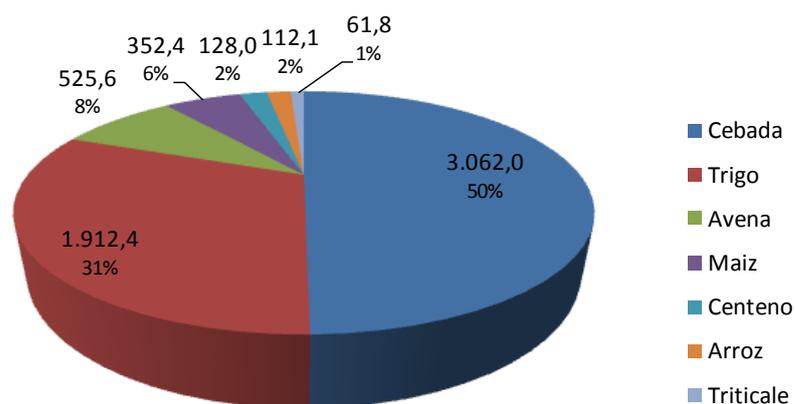


Figura 1.1 Superficie media dedicada al cultivo de cereales en España durante los años 2007-2011. (x1.000ha) (Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. <http://www.marm.es>)

Los usos a los que se destina son muy diversos e incluyen tanto la alimentación humana, de forma directa o a través de la producción de malta, como la alimentación animal en forma de pienso o forraje. Tiene también otros usos no alimentarios como la producción de etanol. Por otra parte, se adapta a una gran diversidad de ambientes, incluso secanos semiáridos que no admiten otro aprovechamiento económico, por lo que el cultivo

representa, además, un papel ecológico en cuanto a conservación del medio natural y lucha contra la erosión.

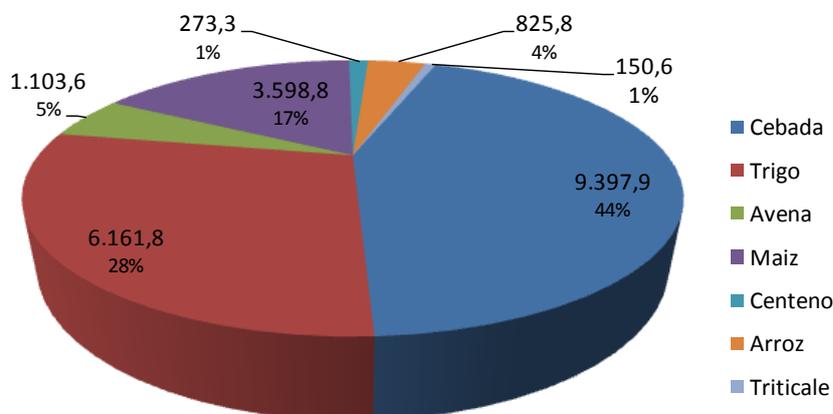


Figura 1.2 Producción media de cereales en España durante los años 2007-2011 (x1.000t) (Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. <http://www.marm.es>)

1.1.1. ORIGEN, TAXONOMÍA Y TIPOS DE CEBADA

El género *Hordeum*, al que pertenece la cebada cultivada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) junto con diversas cebadas silvestres como *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* Koch u *Hordeum bulbosum*, se incluye en la tribu *Triticeae* (familia *Poaceae* o *Gramineae*). La hipótesis más aceptada sitúa la domesticación de la cebada a partir de *H. spontaneum* hace unos 10.000 años en el Creciente Fertil (Zohary y Hopf 1993), zona donde actualmente se encuentran Israel, Líbano, Siria, Irak y Turquía. Actualmente su cultivo se extiende desde el ecuador, en Etiopía, hasta la latitud 70° N en Noruega, y desde el nivel del mar, en los Países Bajos, hasta altitudes de 5.000 m en el Tibet.

La cebada puede clasificarse según diferentes criterios. Los más utilizados son los relacionados con la morfología de la espiga y con su hábito de crecimiento. Según la morfología de la espiga diferenciamos cebadas de dos y seis carreras. En las primeras únicamente son fértiles las espiguillas centrales mientras que las laterales abortan. En las de seis carreras son fértiles las tres espiguillas aunque las laterales son, en general, de menor tamaño. En cuanto al hábito de crecimiento nos encontramos con cebadas de

invierno, con ciclos largos y que requieren un periodo de vernalización para florecer, y cebadas de primavera, con ciclos cortos y sin necesidad de vernalización.

1.1.2. ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA CEBADA

La cebada es un organismo experimental modelo para estudios genéticos debido a su naturaleza diploide ($2n=2x=14$), autógena, a su gran facilidad para ser cruzada y a la sencillez de su cultivo. A pesar de su gran tamaño (5×10^9 pb) el genoma de cebada está muy bien caracterizado, tanto desde el punto de vista de la genética clásica como de la citogenética y la genética molecular.

El análisis comparativo de los distintos mapas génicos, dentro de las especies de la tribu *Triticeae*, pone de manifiesto que los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de cebada muestran correspondencia con los cromosomas de los grupos de homeología de trigo 7, 2, 3, 4, 1, 6 y 5, denominados por tanto 7H, 2H, 3H, 4H, 1H, 6H y 5H, respectivamente (Linde-Laursen et al. 1997). Actualmente ésta parece ser la nomenclatura más aceptada por lo que ha sido la adoptada en la realización del presente trabajo.

1.2. LA VARIEDAD DE CEBADA ALBACETE

Tradicionalmente, la mejora genética vegetal ha hecho hincapié en el aumento de la producción o en la selección de variedades resistentes a estreses bióticos y abióticos. Las condiciones climáticas actuales y la necesidad de adoptar unas prácticas agronómicas más respetuosas con el medioambiente obligan a incidir en la obtención de cultivares que, sin disminuir su rendimiento, permitan una mayor economía de recursos. En este contexto, variedades como Albacete, por su gran capacidad de adaptación a zonas áridas, pueden representar una buena opción.

Albacete es una variedad de invierno de seis carreras, con una capacidad muy alta de ahijamiento y un espigado medianamente precoz. Su porte es elevado (110-120cm) y presenta una gran resistencia al descabezado y desgrane. Destaca por su rusticidad y por su resistencia a situaciones límite por lo que su cultivo se recomienda en secanos áridos y/o fríos y en tierras pobres y marginales. Su destino es la producción de pienso, siendo especialmente importante su aporte de fibra en la alimentación animal.

Esta variedad se obtuvo a partir de la selección de una línea pura en una población local genéticamente heterogénea (mezcla de genotipos homocigotos) procedente de la provincia de Albacete. Se calcula que desde su obtención en 1955 por Enrique Sánchez Monge en la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza) se han cultivado unos 50 millones de hectáreas.

Su rendimiento, en condiciones ambientales óptimas, se sitúa en un nivel medio si lo comparamos con otros cultivares, sin embargo, su resistencia a condiciones extremas de frío y sequía lo convierten en la mejor elección en años de escasas precipitaciones. Los ensayos anuales realizados por el Instituto Técnico Agronómico Provincial (ITAP; <http://www.itap.es/Itap.asp>), de la Diputación de Albacete, muestran como en los años con inviernos especialmente fríos y secos el rendimiento de Albacete supera al del resto de variedades. En años con mejor climatología su rendimiento es comparativamente menor, sin embargo, su porcentaje en proteína suele ser superior a la media.

Según Isla et al. (1999) un mayor desarrollo radicular podría explicar la resistencia de Albacete al estrés hídrico, en especial en perfiles salinos invertidos, donde sería capaz de extraer agua de horizontes más profundos y mantener un adecuado rendimiento.

La resistencia que presenta Albacete parece haber despertado cierto interés en agricultura ecológica, donde se prioriza la estabilidad en el rendimiento frente a rendimientos altos obtenidos a base de aportes externos. Para la agricultura ecológica un cultivo debe ser capaz de completar su ciclo en condiciones naturales, por lo que es necesario que tolere condiciones ambientales adversas y la presión de enfermedades sin variar excesivamente su rendimiento o la calidad del grano. Esto es especialmente importante en zonas mediterráneas donde el estrés hídrico y las altas temperaturas suelen estar presentes en la fase final del ciclo de cebada. Con el objetivo de determinar el potencial de determinadas variedades para su utilización en agricultura ecológica, González (2008) comprobó la resistencia de diversos materiales de cebada a condiciones ambientales extremas. Para ello realizó un estudio de la estabilidad de la membrana celular sometida a estrés hídrico y a temperaturas elevadas. Cinco líneas de mejora y nueve variedades comerciales, entre ellas Albacete, fueron sometidas a temperaturas de entre 35 y 55°C y a concentraciones de polietilenglicol (PEG-6000) de 30% a 50% (p/v). En ambos tratamientos, Albacete mostró un porcentaje de daño de membrana mucho menor que

cualquiera de las otras variedades o líneas de mejora, observándose además bastante estabilidad en la membrana celular (menos de un 10% de daño) a 51°C y a concentraciones de PEG-6000 del 50%.

Albacete ha sido poco utilizada en cruzamientos debido a su pobre reputación como parental. De hecho, los esfuerzos de cruzamiento intenso con otras variedades, llevados a cabo en los años 70 y 80, no tuvieron demasiado éxito. Este hecho puede deberse sin duda a una cierta esterilidad de sus descendencias, acentuadas bajo el manejo masal de las mismas llevado a cabo en esos momentos. A principios de los años 80, L. Cistué (datos sin publicar), al analizar la meiosis de la F₁ entre Albacete y diferentes variedades, observó un cuadrivalente y cinco bivalentes. Este apareamiento anormal de los cromosomas durante la meiosis fue también observado por Vázquez y Sánchez-Monje (1987) en la F₁ procedente del cruzamiento de Albacete y los cultivares Berta y Rika. La presencia habitual en Metafase-Anafase I de un cuadrivalente, junto con el problema de semi-esterilidad en la descendencia, típico de determinadas alteraciones cromosómicas, eran una prueba clara de la existencia de una translocación recíproca. El alto porcentaje (75%) de apareamientos anormales observado por Vázquez y Sánchez-Monge (1987) sugería, además, que los segmentos translocados en Albacete tenían una longitud considerable.

En cebada se conocen más de 500 translocaciones (von Wettstein-Knowles 1992), sin embargo, prácticamente todas ellas han sido obtenidas mediante mutagénesis artificial. Konishi y Linde-Laursen (1988) realizaron un exhaustivo trabajo en el que se ponía de manifiesto que las mutaciones cromosómicas, tales como inversiones o translocaciones, rara vez se daban de forma espontánea en cebada. Para ello analizaron 1.240 variedades cultivadas de cebada y 120 de *Hordeum spontaneum*. Entre las primeras se encontraron tan sólo cuatro ecotipos locales procedentes de Etiopía que mostraron la misma translocación recíproca entre los cromosomas 2H y 4H, con un punto de ruptura en la región centromérica, de forma que los cromosomas resultantes tenían los dos brazos cortos (2HS+4HS) y los dos brazos largos (2HL+4HL). Tres, de las 120 cebadas silvestres, también eran portadoras de translocaciones, en este caso entre los cromosomas: 2H/4H, 3H/5H y 3H/6H.

Entre las variedades cultivadas en una cierta extensión, el grado de conservación del orden lineal cromosómico parece ser extraordinariamente alto (Kleinhofs y Han 2002)

por lo que Albacete podría representar la única variedad de cebada, cultivada extensamente, portadora de una translocación recíproca.

Para abordar la mejora de una variedad como Albacete, es esencial tener un profundo conocimiento de su genoma a nivel citológico y molecular ya que, además del efecto observado en su capacidad reproductiva, la localización y extensión de la translocación recíproca podrían tener consecuencias importantes a nivel de expresión.

1.3. LAS TRANSLOCACIONES RECÍPROCAS

Los cambios estructurales del genoma, entre los que se encuentran las translocaciones recíprocas, son, por definición, “aquellos en los que se produce una alteración del orden lineal de los cromosomas como consecuencia de roturas producidas en los mismos” (Sanchez Monge y Jouve 1989). Estos extremos de rotura pueden cicatrizar y formar un nuevo extremo cromosómico pero, generalmente, se fusionan con otros extremos de rotura, nunca con extremos naturales o telómeros. La fusión de los extremos de rotura puede dar lugar a una restitución del orden lineal original o a una reunión de los fragmentos en un orden nuevo, produciéndose así el cambio o mutación estructural.

Las principales variaciones estructurales son: las deleciones, en las que se pierde material genético; duplicaciones, en las que se produce la repetición de un segmento cromosómico; inversiones de fragmentos cromosómicos respecto al centrómero y translocaciones, en las que los segmentos cromosómicos se trasladan a otra posición del mismo o de diferente cromosoma.

Según Lacadena (1989) “una translocación es un cambio estructural en el que algún segmento cromosómico cambia de posición relativa dentro del complejo cromosómico, modificando por tanto los grupos de ligamiento”.

Si nos atenemos a clasificaciones clásicas como la de Rieger et al. (1968) podemos diferenciar entre “translocaciones intracromosómicas”, en las que un segmento cambia de posición dentro del mismo cromosoma y “translocaciones intercromosómicas”, en las que el cambio de posición se produce entre diferentes cromosomas. Muchos autores no consideran las primeras como verdaderas translocaciones ya que el mismo resultado podría

obtenerse con otro tipo de mutaciones cromosómicas, como las inversiones sucesivas. Por otra parte tampoco se modificarían los grupos de ligamiento, aunque la ordenación de los genes dentro de un grupo y las distancias relativas de los mismos si se verían alteradas.

Dentro de las translocaciones intercromosómicas, y siguiendo con la clasificación de Rieger, nos encontramos con cambios de posición de un solo fragmento, que reciben el nombre de “transposiciones”, y con las verdaderas “translocaciones recíprocas” en las que dos segmentos cromosómicos se intercambian entre dos cromosomas. En general, los cromosomas implicados en las translocaciones recíprocas no son homólogos ya que el intercambio entre dos cromosomas homólogos suele originar gametos con duplicaciones y deleciones y por lo tanto inviables.

Según sean los productos resultantes del intercambio podemos hablar de translocaciones simétricas si obtenemos dos cromosomas normales, es decir, cromosomas con un centrómero, o translocaciones asimétricas si se originan fragmentos acéntricos o dicéntricos. Las translocaciones recíprocas simétricas pueden afectar a fragmentos terminales, a brazos cromosómicos casi completos, si la rotura se produce en un lugar próximo a los respectivos centrómeros (Muller 1940), e incluso a brazos completos si esta ocurriera exactamente a nivel de centrómero (Comings y Okada 1971). Así, aunque se conserva el centrómero, su posición y la longitud de los brazos cromosómicos puede verse completamente alterada.

1.3.1. CONSECUENCIAS CITOLÓGICAS

El resultado de una translocación recíproca simétrica son dos nuevas estructuras cromosómicas. Si consideramos estas nuevas estructuras y los cromosomas originales podremos encontrar tres tipos de individuos: homocigotos para los originales, homocigotos para los cromosomas translocados y heterocigotos. A nivel citológico, la presencia de una translocación recíproca provoca, en heterocigosis, un apareamiento anormal de los cromosomas implicados durante la meiosis. Si el individuo es homocigoto, ya sea para cromosomas con la ordenación típica o translocados, formará bivalentes y tanto la meiosis como los gametos resultantes de la misma serán normales. Sin embargo, en el caso del heterocigoto habrá cuatro cromosomas que tendrán fragmentos homólogos dos a dos por lo

que, al aparearse, no formarán un bivalente sino una estructura en forma de cruz (Figura 1.3).

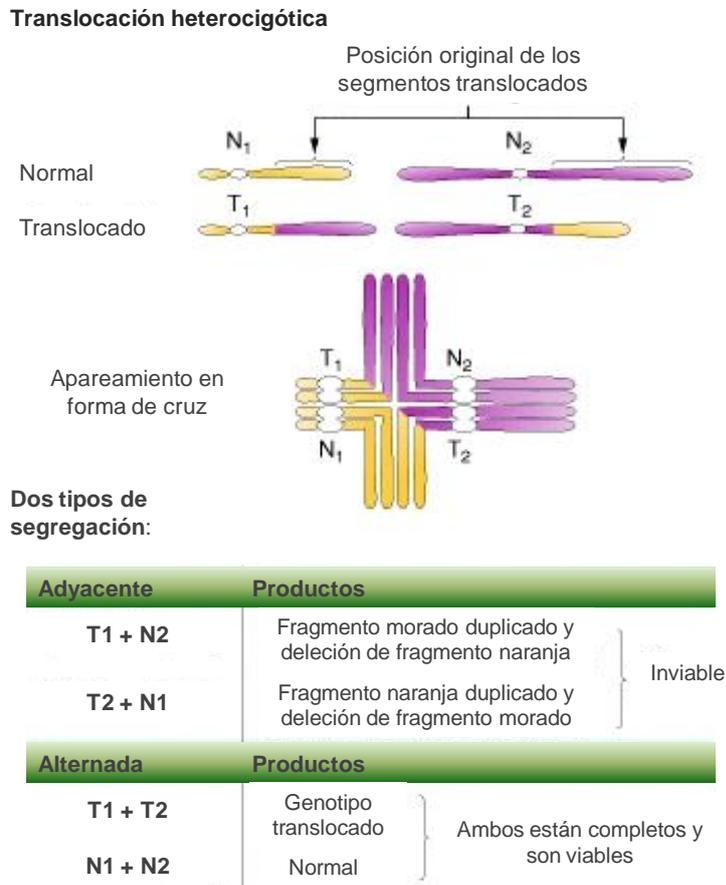


Figura 1.3 Apareamiento durante la meiosis en un individuo heterocigoto para la translocación recíproca (Fuente: Griffiths et al. 2000)

En el supuesto de que no se produzca recombinación en las zonas intersticiales, es decir, entre el centrómero y el punto de translocación, la viabilidad de los gametos dependerá de la coorientación de los cromosomas durante la metafase:

- Coorientación adyacente: en este caso migrarán a cada polo un cromosoma normal junto con un cromosoma translocado. Los gametos formados a partir de esta segregación presentarán duplicaciones y deleciones y por lo tanto no serán viables. En metafase esta coorientación de los cromosomas se corresponde con una estructura en forma de anillo.
- Coorientación alternada: en este caso cada cromosoma segregará con su homólogo, es decir, los cromosomas normales migrarán juntos a uno de los

polos y los cromosomas translocados al otro. La información genética en ambos casos será completa por lo que los gametos serán viables. Esta orientación presenta durante la metafase una estructura en forma de ocho o *zig-zag*.

En el caso de que se produjera recombinación en la zona intersticial las configuraciones adyacente y alternada podrían dar lugar, respectivamente, a gametos viables e inviables (Lacadena, 1989). Esta disposición de los cromosomas durante la meiosis y la consiguiente viabilidad o no de los gametos originados da lugar a una esterilidad parcial en los individuos heterocigotos para la translocación recíproca (Figura 1.4)



Figura 1.4 Espiga de un individuo heterocigoto para la translocación recíproca en la que puede observarse una esterilidad parcial.

1.3.2. EFECTO DE POSICIÓN Y ALTERACIONES FENOTÍPICAS

A diferencia de otras mutaciones cromosómicas, las translocaciones recíprocas no originan pérdida o ganancia de genes, sin embargo, la alteración del orden lineal de los mismos si puede afectar a su expresión. Es lo que se conoce como el efecto de posición. La

alteración del fenotipo en un organismo homocigoto para la translocación no se produce por cambios en determinados genes como consecuencia de la alteración estructural, sino únicamente porque éstos han cambiado de posición. Se ha comprobado experimentalmente que la recolocación en su posición original de los fragmentos cromosómicos translocados va acompañada de una restauración del fenotipo normal (Catcheside 1939)

Si la translocación sitúa genes de zonas eucromáticas en zonas de heterocromatina la expresión puede verse reprimida. Este efecto, denominado efecto de posición “variegado”, se ha observado en diferentes organismos como: en *Oenothera lundana* (Catcheside 1939) o en *Drosophila* (Spofford 1976), al quedar los genes en zonas de heterocromatina centromérica, o en *Saccharomyces cerevisiae* (Gottschling et al 1990) al situarse los loci de interés cercanos a los telómeros.

En otros casos se ha observado una variación del fenotipo, pero no asociada a una reducción en la expresión de un gen determinado. El ejemplo clásico de este tipo de efecto de posición, denominado “estable”, sería el gen *Bar* en *Drosophila*. En este caso la alteración lineal no estaría producida por una translocación sino por una duplicación. Se observa, en cualquier caso, que la presencia de cuatro segmentos *Bar*, situados dos y dos en los cromosomas homólogos, no produce el mismo fenotipo que si se sitúan tres en un cromosoma y uno en otro (Dobzhansky 1932).

Trabajos más recientes, llevados a cabo en *S. cerevisiae*, relacionan la presencia de translocaciones recíprocas con una mayor resistencia a determinadas sustancias tóxicas (Pérez-Ortín et al 2002) o con mayor adaptabilidad a condiciones limitantes de nutrientes (Colson et al 2004). En *Brassica napus* (Osborn et al 2003) se ha observado también una variación del fenotipo asociada a una mutación estructural. En este caso las líneas doble haploides portadoras de una transposición recíproca presentan rendimientos significativamente superiores que las líneas sin mutación. En estos trabajos, el cambio de fenotipo no se asocia a un efecto de posición, sin embargo, sí parece ser consecuencia directa de la presencia de las alteraciones estructurales.

1.3.3. ALTERACIÓN DE LAS RELACIONES DE LIGAMIENTO

Tal y como se apunta en la definición de Lacadena (1989), para las translocaciones recíprocas, la alteración del orden lineal de los cromosomas tiene también consecuencias en las relaciones de ligamiento existentes: genes independientes en los individuos normales aparecen ligados en las líneas translocadas. Junto con la semiesterilidad y la presencia de estructuras en anillo o *zig-zag* durante la metafase, este “pseudoligamiento” entre marcadores de diferentes cromosomas es una prueba evidente de la presencia de una translocación recíproca (Catarino et al. 2006; Kosterin et al. 1999; Mahama et al. 2003; Tadmor et al. 1987)

La problemática que plantea este “pseudoligamiento” en la construcción de mapas genéticos se analizará con mayor detalle en el Capítulo 4 de este trabajo.

1.4. MARCADORES MOLECULARES Y MAPAS DE LIGAMIENTO EN CEBADA

Un mapa genético es una disposición lineal, con un orden y distancias determinadas, de un grupo de genes o marcadores. El orden y las distancias obtenidas se basan en la recombinación que se produce entre los cromosomas homólogos durante la meiosis, y por lo tanto, están relacionadas con la localización física de estos genes o marcadores. Idealmente el número de grupos obtenidos, en un mapa de ligamiento, será el mismo que la dotación haploide del organismo analizado.

La construcción de mapas genéticos supone un paso imprescindible para la identificación de *loci* asociados a caracteres cuantitativos (QTLs) o para la selección asistida por marcadores (MAS). En el proceso de construcción de un mapa genético las dos primeras decisiones que hay que tomar son: qué tipo de población se va a utilizar y cuáles son los marcadores más adecuados para lograr los objetivos buscados.

Un marcador genético es cualquier carácter heredable que muestra variabilidad o polimorfismo entre los individuos objeto de estudio. El marcador ideal debería tener: una herencia codominante, interacción nula con el medio o con otros genes, elevado polimorfismo, expresión en cualquier tejido o estado de desarrollo, rapidez y simplicidad en la detección y bajo coste (Arús et al. 2001)

Los primeros marcadores genéticos fueron los morfológicos. Su evaluación es muy sencilla, sin embargo, son escasos y habitualmente su expresión se ve modificada, ya sea por la interacción con otros marcadores o por la influencia ambiental. Por otra parte, la principal ventaja de un marcador es poder realizar una selección indirecta de las características de interés, selección que será más útil cuanto más temprano sea el estadio en el que se encuentra la planta. Esperar a observar el color de la flor para seleccionar o descartar un grupo de individuos supone, habitualmente, un derroche de espacio, tiempo y recursos (Martín 2002).

Los marcadores proteicos, como las isoenzimas o las proteínas de almacenamiento, también han sido muy utilizadas en mejora genética. Su evaluación requiere más trabajo pero la influencia ambiental es menor. Sin embargo, su expresión no siempre es constante en todos los ambientes, ni tiene porqué producirse en estadios tempranos del desarrollo de la planta (Martín 2002).

La aparición de los marcadores basados en polimorfismos del ADN o marcadores moleculares supuso un cambio sustancial en el análisis genético. Su número es ilimitado y se pueden encontrar tanto en regiones codificantes como no codificantes. Además, al estar basados en cambios en la secuencia de ADN se pueden detectar en todos los tejidos y en cualquier estadio de desarrollo.

Los primeros marcadores de ADN desarrollados fueron los RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) basados en mutaciones puntuales que determinan la presencia o no de puntos de corte para enzimas de restricción. Tras someter el ADN a digestión se obtienen fragmentos de diferentes tamaños que son separados en agarosa, transferidos a un soporte y detectados por sondas de ADNc, marcadas radioactivamente o con fluorescencia. El número de polimorfismos posibles es, en principio ilimitado, y presentan la ventaja de ser codominantes. En cebada existen mapas genéticos basados en este tipo de marcadores (Graner et al. 1991; Heun et al. 1991; Kleinhofs et al. 1993) que siguen siendo una importante referencia, sin embargo, su proceso de obtención es muy laborioso y tiene un coste económico alto

El desarrollo de la técnica de PCR trajo consigo una mayor simplicidad y un aumento considerable del número de marcadores disponibles. Los primeros marcadores basados en esta técnica fueron los RAPDs y los AFLPs. Los RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) están basados en la amplificación aleatoria de secuencias de ADN mediante la utilización de un cebador muy corto (10nt). Su metodología es rápida y económica, sin embargo, son marcadores dominantes y poco reproducibles entre diferentes laboratorios (Arús et al. 2001).

Los AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) tienen un proceso de obtención más complicado. Tras la digestión con dos enzimas de restricción se generan una serie de fragmentos sobre los que se realiza una amplificación selectiva (Vos et al. 1995). Al igual que con los RAPDs los fragmentos que se generan son aleatorios y generalmente dominantes. Mapas genéticos realizados con AFLPs muestran una distribución poco uniforme de estos marcadores, con tendencia a acumularse en zonas centroméricas, mientras que los RFLPs, basados en el mismo tipo de polimorfismo, presentan una distribución mucho más homogénea (Qi et al. 1998).

Los marcadores moleculares más utilizados son, sin duda alguna, los SSRs (*Simple Sequence Repeats*), también conocidos como microsatélites. Están basados en la presencia de repeticiones en tándem de di-, tri- o tetra-nucleótidos en el genoma de eucariotas. El número de repeticiones varía entre individuos por lo que su amplificación con cebadores específicos, para las secuencias únicas que flanquean la región redundante, da lugar a fragmentos de diferente longitud. Si la separación de estos fragmentos se realiza en geles de acrilamida se pueden detectar diferencias de una sola base. Los SSR son marcadores muy polimórficos, codominantes y con una alta reproducibilidad. El único inconveniente que presentan es que es necesario conocer la secuencia que flanquea el microsatélite para el diseño de los cebadores. Aunque tienen también cierta tendencia a agruparse en zonas centroméricas, la utilidad de este tipo de marcadores en cebada se ha visto confirmada por numerosos trabajos (Becker y Heun 1995; Liu et al. 1996; Struss y Plieske 1998; Ramsay et al. 2000; Li et al. 2003)

Jacoud et al. (2001) describieron una nueva tecnología con un alto grado de automatización y capaz de detectar centenas de polimorfismos en un solo análisis. Se denomina tecnología DArT® (*Diversity Array Technology*). Para realizar este análisis es

necesario disponer previamente de una colección de fragmentos de ADN representativa de la especie. Para la obtención de estos fragmentos se parte de un *pool* de ADN formado por diferentes individuos de la especie, se digiere con enzimas de restricción y se amplifica de forma selectiva (Wenzl et al. 2004). Cada uno de los fragmentos obtenidos es clonado en un vector e introducido en *E. coli*. Se forma así una colección representativa de la especie y que estará formada por:

- Fragmentos constantes, es decir, fragmentos presentes en cualquier individuo de la misma especie.
- Fragmentos polimórficos, presentes únicamente en algunos individuos de la especie y que constituyen los marcadores moleculares denominados DArT.

En cada análisis, estos fragmentos se marcan con un fluoróforo y se disponen en un *array* sobre el que se hibrida la muestra de interés, consistente en fragmentos obtenidos por el mismo proceso de reducción. El polimorfismo se detecta en forma de presencia/ausencia y responde en realidad a cambios de una base, deleciones o inserciones en la secuencia de ADN.

En los últimos años han surgido numerosos mapas consenso que integran la información obtenida con diferentes poblaciones (Varshney et al. 2007) y/o marcadores de distintos tipos. Especialmente interesantes para este trabajo son los mapas que integran información de marcadores SSR y DArT (Wenzl et al. 2006; Hearnden et al. 2007)

2. OBJETIVOS

En este trabajo se aborda el estudio de la translocación recíproca presente en la variedad de cebada Albacete desde una perspectiva molecular y citológica y se valora su posible relación con determinados caracteres de interés agronómico. Para ello se ha utilizado una población doble haploide derivada del cruzamiento entre Albacete y la variedad de cebada Plaisant. Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

1. Justificación de la idoneidad de la utilización de una población doble haploide, como material de estudio para el presente trabajo, mediante el análisis de la distorsión de la segregación en una población de líneas doble haploides (DHs) y en una población de líneas puras recombinantes (RILs), obtenidas a partir del mismo cruzamiento.
2. Identificación de los cromosomas implicados en la translocación recíproca presente en la variedad de cebada Albacete y localización aproximada del punto de corte. La consecución de este objetivo conlleva la realización de los tres siguientes:
 - 2.1. Obtención de un mapa genético saturado del cruzamiento Albacete × Plaisant mediante la caracterización molecular de la población doble haploide.
 - 2.2. Comprobación de la presencia de la translocación recíproca en la población doble haploide, mediante la observación de metafases en células madre de polen, procedentes de líneas doble haploides retrocruzadas con Plaisant.
 - 2.3. Identificación de los cromosomas de cebada en preparaciones de células somáticas y meióticas mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH).
3. Caracterización fenotípica de la translocación recíproca mediante el ensayo en campo de la población doble haploide derivada del cruzamiento de Albacete y Plaisant.
4. Identificación de QTLs de interés agronómico en la población doble haploide Albacete x Plaisant.

**3. DISTORSIÓN DE LA SEGREGACIÓN EN
DOS POBLACIONES DE CEBADA
PROCEDENTES DEL MISMO
CRUZAMIENTO**

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. POBLACIONES UTILIZADAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE MAPAS GENÉTICOS

Para la construcción de mapas genéticos pueden utilizarse diferentes tipos de poblaciones y cada una de ellas lleva asociada una serie de ventajas y desventajas (McCouch and Doerge, 1995; Paterson, 1996). Las poblaciones F₂, derivadas de la F₁, y las poblaciones “*backcross*” (BC), derivadas del cruzamiento de la F₁ con uno de los parentales, son las más simples y rápidas de obtener. Las F₂, caracterizadas con marcadores codominantes ofrecen la máxima información genética, sin embargo, la obtención de datos cuantitativos se complica por la dificultad de disponer de repeticiones. Sucesivas autofecundaciones, utilizando como material inicial individuos de la F₂, permiten obtener líneas puras recombinantes o RILs (*Recombinant Inbred Lines*). La mayor ventaja de estas poblaciones es que tras seis u ocho generaciones se consigue la homocigosis, es decir, se convierten en poblaciones permanentes que pueden multiplicarse sin que se produzcan cambios genéticos. Su desventaja es evidente: las 5 o 6 generaciones necesarias para llegar al menos a un 99% de homocigosis alargan considerablemente los programas de mejora. Las poblaciones doble haploides (DH), obtenidas mediante la duplicación espontánea o inducida de la dotación cromosómica de un haploide, son también poblaciones homocigotas y por lo tanto permanentes. Las técnicas de obtención de DH permiten obtener estas líneas de forma rápida y eficaz, por lo que se han convertido en una herramienta muy útil tanto para la mejora genética molecular como para la tradicional (Thomas et al. 2003).

3.1.2. LAS POBLACIONES DOBLE HAPLOIDES

Como se ha comentado en el párrafo anterior, la duplicación del genoma, dando lugar a una planta doble haploide, puede producirse de forma espontánea, sin embargo, las frecuencias de obtención son demasiado bajas para que puedan usarse en los programas de mejora (Palmer y Keller 2005). Existen varios métodos que aumentan la frecuencia de obtención de doble haploides. Dos de los más efectivos son:

- La hibridación interespecífica, seguida por la eliminación cromosómica de uno de los parentales del cruce, generalmente el que poliniza. En cebada, a este método también se le conoce por “método bulbosum”, ya que se realiza

cruzando una F1 de cebada (*H. vulgare*) con polen de *Hordeum bulbosum* (Kasha y Kao 1970).

- La embriogénesis de la microspora o androgénesis, donde la microspora es capaz de desdiferenciarse y cambiar su patrón de desarrollo para regenerar una planta completa. Esto se logra mediante el cultivo de anteras o de microsporas aisladas (Maluszynski et al. 2003)

En el caso de la cebada, la utilización de líneas DHs, obtenidas por diferentes métodos, se ha generalizado para la construcción de mapas de ligamiento y posteriores análisis de QTLs (Graner et al. 1991; Heun et al. 1991; Kleinhofs et al. 1993; Laurie et al. 1995; Costa et al. 2001; Wenzl et al. 2006; Hearnden et al. 2007; Varshney et al. 2007; Cistué et al. 2011). La obtención en una sola generación de plantas homocigotas permite disponer rápidamente de una población de mapeo muy numerosa, lo que se traduce en una mayor resolución de los mapas obtenidos y una mejor estimación del número de QTLs, así como de su posición, efecto e interacción (Vales et al. 2005).

3.1.3. DISTORSIÓN DE LA SEGREGACIÓN

Uno de los fenómenos más comunes observados en la producción de doble haploides, y también uno de sus principales inconvenientes, es la distorsión de la segregación (Graner et al. 1991; Heun et al. 1991; Zivy et al. 1992; Dufour et al. 2001; Lu et al. 2002). La distorsión de la segregación, es decir, la desviación de las frecuencias genotípicas observadas respecto de las Mendelianas, puede complicar o distorsionar los análisis genéticos posteriores (Lu et al. 2002) y en programas de mejora reduce la probabilidad de recuperar determinados recombinantes de interés.

La distorsión de la segregación puede estar ocasionada por factores genéticos (Taylor y Ingvarsson 2003; Törjék et al. 2006), o por factores ambientales, como la temperatura (Xu et al. 1997) o las condiciones de cultivo *in vitro* (Graner et al. 1991; Foisset and Delourne 1996). El método de obtención de DHs parece ser también un factor importante, observándose menor distorsión con la técnica de *Hordeum bulbosum* que con cultivo de anteras (Li et al. 2010; Cistué et al. 2011). Con esta última técnica se ha observado distorsión a favor del parental que presenta una mejor respuesta, por lo que se ha sugerido que las áreas distorsionadas podrían contener genes que favorezcan el

desarrollo de la microspora o la regeneración de plantas (Manninen 2000; Haitham et al. 2002). El efecto de esta distorsión sobre otros caracteres, no relacionados directamente con el cultivo de anteras, supondría un inconveniente para la utilización de estas poblaciones en programas de selección. Sin embargo, diferentes resultados obtenidos en cebada y en arroz indican que esta selección de genes podría no tener efectos negativos sobre caracteres de interés agronómico (Cistué et al. 2005; Lapitan et al. 2009).

La distorsión de la segregación no es un fenómeno exclusivo de las poblaciones doble haploides aunque sí parece ser mas importante en poblaciones DH o RIL que en F₂. Xu et al. 1997 compararon la distorsión de la segregación en seis poblaciones diferentes de arroz, entre ellas dos de DHs y una de RILs. Sus resultados mostraron un mayor porcentaje de marcadores distorsionados en una de las poblaciones DH (31,8%), seguida de cerca por la población de RILs (24,7%) y de la otra población doble haploide (22,1%). Las poblaciones F₂ y BC mostraban porcentajes de distorsión más bajos (6,8% – 13,2%). En este mismo trabajo realizaron una revisión de la distorsión de la segregación en 53 poblaciones diferentes. Las poblaciones de RIL parecían tener de media un mayor porcentaje de distorsión (40%) frente a las DH (30%) o las F₂ (20%). Hay que matizar , sin embargo, que la media de las RIL se realizó a partir de dos poblaciones con valores muy extremos mientras que el número de poblaciones DH o F₂ que integraban el estudio eran 8 y 30 respectivamente.

La comparación entre dos poblaciones de arroz, DH y RIL, procedentes del mismo cruzamiento, mostró menor distorsión en la población DH, un 18,2% frente al 27,3% de marcadores distorsionados en las RILs ($p < 0,01$) (He et al. 2001). Sayed et al. 2002 también compararon en cebada dos poblaciones obtenidas a partir del mismo cruzamiento, en este caso DH y F₂. Aquí, la población DH mostró una distorsión muy superior a la obtenida en la F₂ (44,2% y 16% respectivamente a $p = 0,05$).

La distorsión de la segregación puede detectarse con diferentes tipos de marcadores aunque no se observa uniformidad en los porcentajes de distorsión obtenidos. Marcadores como los AFLPs muestran porcentajes muy diferentes (25% frente a 6-8%) dependiendo del cruzamiento analizado (Costa et al. 2001; Becker et al. 1995; Qi et al. 1998), sin embargo en los RAPDs se observan en general altos porcentajes de distorsión (Manninen 2000; Costa et al. 2001). Frente a los SSRs, los marcadores DArT muestran porcentajes

superiores de distorsión en unos casos (Francki et al. 2009), mientras en otros se observa lo contrario (Li et al. 2010).

El objetivo de este capítulo es comparar los mapas de ligamiento y la distorsión de la segregación entre una población doble haploide obtenida por cultivo de anteras y una población de líneas puras recombinantes. Ambas poblaciones procedían del mismo cruzamiento Plaisant x Orria y se genotiparon con el mismo set de marcadores DArT.

Por otro lado, Plaisant es un parental común con la población doble haploide utilizada para el estudio de la translocación recíproca presente en Albacete. El análisis de la distorsión en una población doble haploide obtenida a partir del cruzamiento entre Plaisant y una variedad normal, sin ningún tipo de mutación estructural y recalcitrante al cultivo de anteras, igual que Albacete, podía ayudar a determinar posteriormente la distorsión asociada con la translocación.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. MATERIAL VEGETAL

Se analizaron dos tipos de poblaciones, una de líneas doble haploides (DHs) y otra de líneas puras recombinantes (RILs), procedentes ambas del cruzamiento entre las variedades de cebada Plaisant (P) y Orria (O). Plaisant es una variedad francesa de seis carreras obtenida del cruzamiento entre Ager y Nymphe. Tiene un ciclo medio-largo, porte medio-alto y precocidad media. En condiciones óptimas está considerada como una variedad altamente productiva y presenta una buena respuesta al cultivo de anteras. Orria es una variedad española de seis carreras seleccionada a partir de material CIMMYT. Presenta mayor potencial agronómico que Plaisant pero se muestra recalcitrante al cultivo de anteras.

La población doble haploide estaba integrada por 186 líneas procedentes de la F1 del cruzamiento de Plaisant y Orria. Los doble haploides se obtuvieron mediante cultivo de anteras, según el protocolo descrito en Cistue *et al.* 2003, en la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza). La población de RILs consistía en 187 líneas de una generación F₆, obtenidas por genealogía espiga-surco, a partir del cruzamiento entre Plaisant y Orria.

3.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de hojas frescas procedentes de plantas jóvenes obtenidas en invernadero. Se utilizó el kit de extracción “DNeasy 96 Plant Kit” de la casa comercial Qiagen. Con este kit se obtiene un ADN genómico de gran calidad y libre de impurezas, requisito indispensable para el análisis de marcadores DArT.

3.2.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA CON MARCADORES DArT

El análisis de marcadores DArT fue realizado por la empresa australiana *Triticarte Pty. Ltd.* en el año 2006. El envío se realizó en cuatro placas de 96 pocillos en las que, además de las líneas DH o RIL, se incluyeron muestras de los parentales Plaisant y Orria. En todos los casos el volumen de muestra enviada fue de 50 μ l de una dilución de ADN de 100 ng/ μ l.

Los marcadores DArT se nombraron siguiendo las indicaciones de la empresa: con el prefijo “bPb-” seguido de un número de cuatro dígitos. Las letras del prefijo bPb se corresponden, en este orden, con “barley” y con los enzimas de restricción “PstI” y “BstNI”.

En la información facilitada por la empresa, junto con el resultado del análisis genotípico, se incluía un “Índice Q”. Para cada marcador, Q es un estimador de la calidad de lectura del mismo. Valores de Q superiores a 80 nos indican que las dos fases (presencia vs ausencia) están claramente diferenciadas. Con valores de Q inferiores aumenta la probabilidad de realizar una lectura errónea.

3.2.4. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

El análisis de ligamiento se realizó con JoinMap[®]4.0 (Van Ooigen, 2006), utilizando el parámetro “*Independence LOD*” y tomando como valor mínimo de selección de grupos LOD=4. El cálculo de distancias y el orden relativo de los marcadores en cada grupo se realizó por regresión, seleccionando Kosambi como función de mapa. La representación gráfica de los mapas se realizó con el programa MapChart[®]2.2 (Voorrips, 2002).

3.2.5. ANÁLISIS DE LA DISTORSIÓN DE LA SEGREGACIÓN

Dentro de cada población, DHL y RIL, se llevó a cabo, para cada marcador, una prueba de hipótesis de igualdad de frecuencias parentales mediante una prueba χ^2 . Al tratarse de un análisis con marcadores dominantes se consideró la segregación 1:1 como la esperada en ambas poblaciones. En la Tabla 3.1 se muestra la segregación esperada en diferentes generaciones de RILs. Como puede observarse, a partir de la F₆, la presencia de heterocigotos apenas varía la relación A_/aa.

Tabla 3.1 Segregación esperada en las RILs

	<i>AA</i>	<i>Aa</i>	<i>aa</i>	<i>A_/aa</i>
F ₂	0,250	0,500	0,250	3,000
F ₃	0,375	0,250	0,375	1,667
F ₄	0,438	0,125	0,438	1,286
F ₅	0,469	0,063	0,469	1,133
F ₆	0,484	0,031	0,484	1,065
F ₇	0,492	0,016	0,492	1,032
...
F _n = DHL	0,500	0,000	0,500	1,000

El valor de la distorsión se expresó como $-\log$ (probabilidad χ^2). Como nivel mínimo de significación se consideró $p=0,01$.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. COMPARACIÓN DE LOS MAPAS DE LIGAMIENTO DEL CRUZAMIENTO P×O OBTENIDOS A PARTIR DE LAS POBLACIONES DE DHS Y RILs

En el análisis realizado por *Triticarte Pty. Ltd.* se obtuvieron un total de 505 DArT polimórficos entre los parentales Plaisant y Orria. De este grupo inicial se descartaron los marcadores con un valor de $Q < 80$ y aquellos que no estaban presentes en ambas poblaciones. Se obtuvo un conjunto de 344 DArT del cual se seleccionaron únicamente aquellos marcadores localizados en el mapa de referencia (Wenzl et al. 2006). Finalmente el grupo de marcadores utilizados para el análisis de ligamiento fue de 252 DArT. Con un criterio de selección de $LOD = 5$ se obtuvieron en ambas poblaciones 14 grupos de

ligamiento que incluían 248 marcadores. Tres de los grupos se correspondían con los cromosomas 1H, 6H y 7H. El resto de cromosomas estaban formados por más de un grupo de ligamiento: el 3H por dos grupos y los cromosomas 2H, 4H y 5H por tres grupos cada uno de ellos. El mapa de ligamiento obtenido con cada población se muestra en la Tabla 3.2 y en la Figura 3.1.

Tabla 3.2 Distribución de marcadores, longitud de los grupos de ligamiento obtenidos con las poblaciones DHs y RILs para el cruzamiento de Plaisant x Orria y comparación con el mapa de referencia (Wenzl et al. 2006)

Crom	Nº de grupos	Nº de marcadores	Longitud (cM)		Distancia promedio entre marcadores (cM)		Long DH / Long RIL	Cobertura del mapa consenso (%)	Long DH / Long consenso	Long RIL / Long consenso
			DH	RIL	DH	RIL				
1H	1	60	191,0	145,8	3,2	2,4	1,31	92,5	1,36	1,04
2H	3	25	99,9	75,0	4,0	3,0	1,33	38,3	1,57	1,18
3H	2	26	183,9	140,5	7,1	5,4	1,31	66,4	1,50	1,15
4H	3	12	41,0	38,3	3,4	3,2	1,07	20,4	1,35	1,26
5H	3	27	109,5	67,0	4,1	2,5	1,63	38,3	1,47	0,90
6H	1	30	95,2	58,1	3,2	1,9	1,64	51,2	1,26	0,77
7H	1	68	228,2	166,8	3,4	2,5	1,37	96,5	1,43	1,04
Total	14	248	948,7	691,4	3,8	2,8	1,37	57,5	1,42	1,04

El agrupamiento de los marcadores y el orden de los mismos dentro de cada grupo fue similar en ambas poblaciones. Los cromosomas 1H y 7H mostraron el mayor número de marcadores, 60 y 68 respectivamente, mientras que el cromosoma 4H resultó ser el menos polimórfico con 12 marcadores únicamente. Este grupo era también el que presentaba menor longitud en los dos mapas mientras que el 7H era el más largo en ambos casos. La longitud de los grupos obtenidos con la población DH superaba en todos los casos a la de los grupos obtenidos con la población de RILs: desde un 7% más en el cromosoma 4H hasta un 63% en el caso del cromosoma 6H. El cromosoma 3H resultó ser el de menor densidad con una distancia media entre marcadores de 7,1cM y 5,4cM en DHs y RILs respectivamente. Este cromosoma era también el que mostraba, en su brazo corto, el mayor intervalo en la población DH (35 cM). En la población de RILs el intervalo más grande se localizaba en el brazo largo del cromosoma 1H con 24,8 cM. Ambas poblaciones mostraban al menos un intervalo superior a 20 cM en todos los cromosomas.

Comparando los mapas obtenidos con el mapa consenso utilizado como referencia (Wenzl et al. 2006) se observó poco polimorfismo entre las variedades Plaisant y Orria con este set de marcadores. Los grupos obtenidos con los 248 DArT representaban únicamente un 57% del mapa consenso. Este porcentaje variaba considerablemente de unos grupos a otros: desde un escaso 20% de cobertura en el cromosoma 4H hasta un 92% y 96% en los cromosomas 1H y 7H respectivamente. La ordenación de los DArT era similar a la del mapa de referencia, sin embargo, las distancias relativas obtenidas dentro de cada grupo de ligamiento eran superiores en ambos casos a las distancias del mapa consenso. La longitud obtenida en la población DH era superior a la del consenso en todos los grupos: entre un 26% más, correspondiente al cromosoma 6H, y un 57%, en el caso del 2H. Con la población de RIL se obtenían longitudes inferiores a las del consenso en el caso de los cromosomas 5H y 6H (un 10% y 23% más cortos respectivamente). En el resto de grupos las longitudes eran superiores pero en una proporción menor que en la población DH: entre un 4% más en los cromosomas 1H y 7H, a un 26% en el cromosoma 4H.

3. Distorsión de la segregación en dos poblaciones de cebada procedentes del mismo cruzamiento

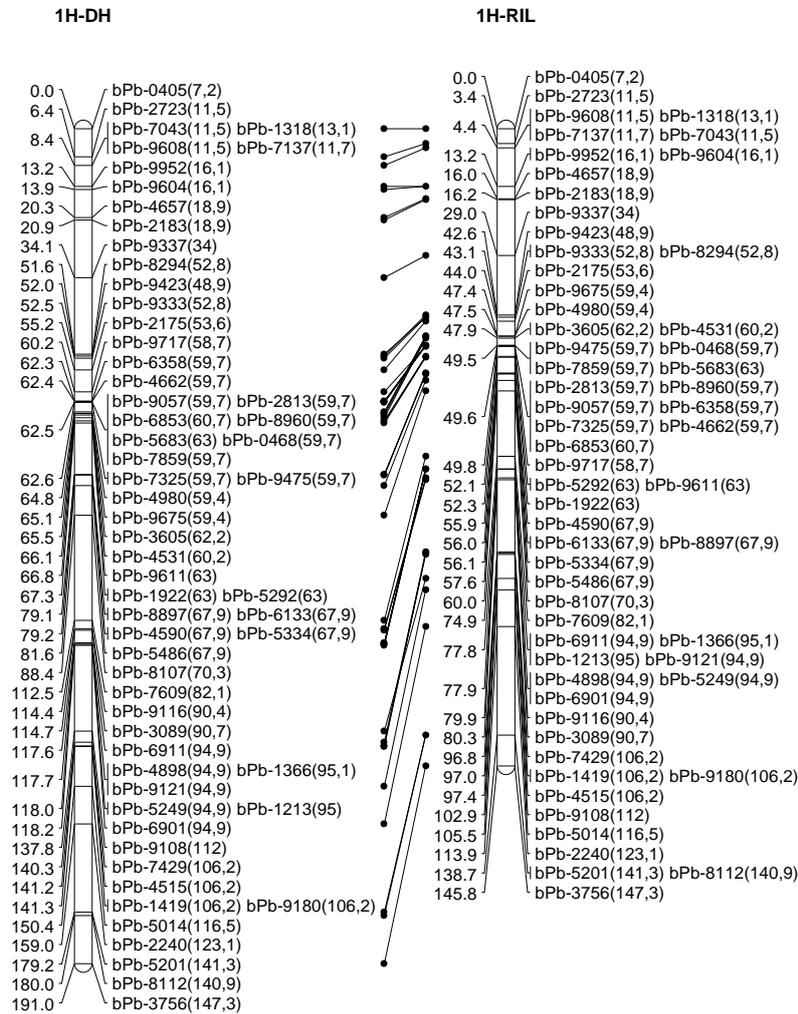
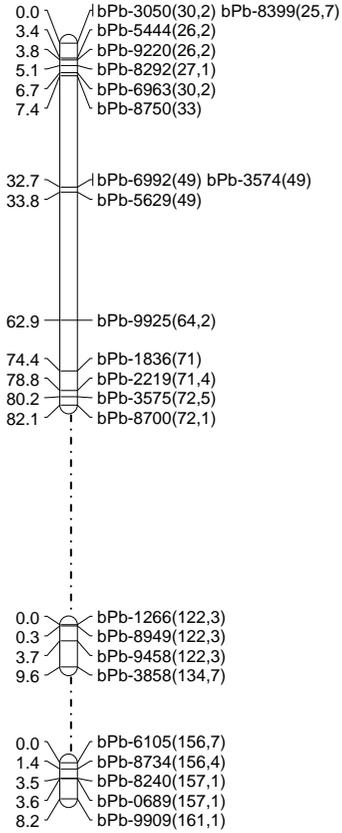
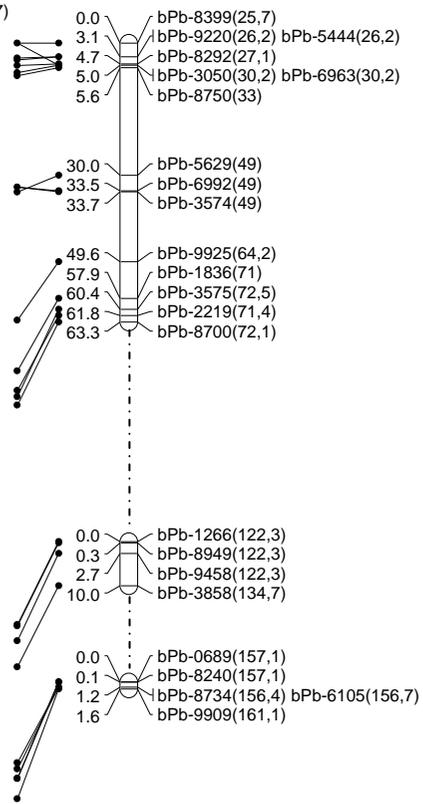


Figura 3.1 Mapas de ligamiento del cruzamiento Plaisant × Orria obtenidos con la población de DHs y la población de RILs. Las distancias genéticas están expresadas en cM según la función de mapa Kosambi. Los cromosomas están orientados con el brazo corto en la parte superior y las distancias entre los grupos de ligamiento son proporcionales a las distancias del mapa consenso tomado como referencia. En cada marcador se indica, entre paréntesis, su posición en el mapa de referencia (Wenzl et al. 2006)

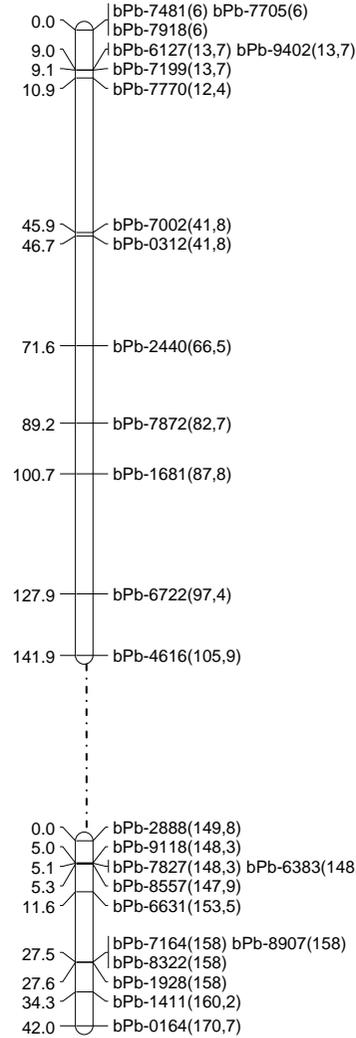
2H-DH



2H-RIL



3H-DH



3H-RIL

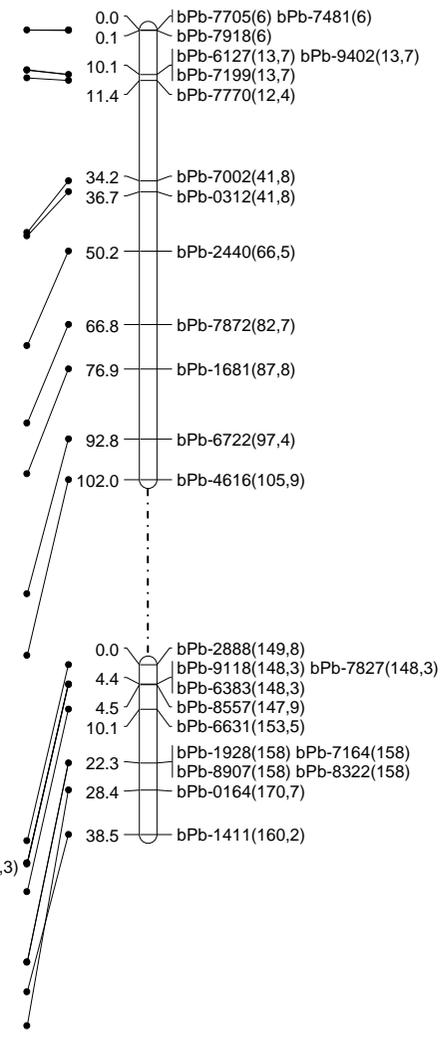


Figura 3.1 (Continuación)

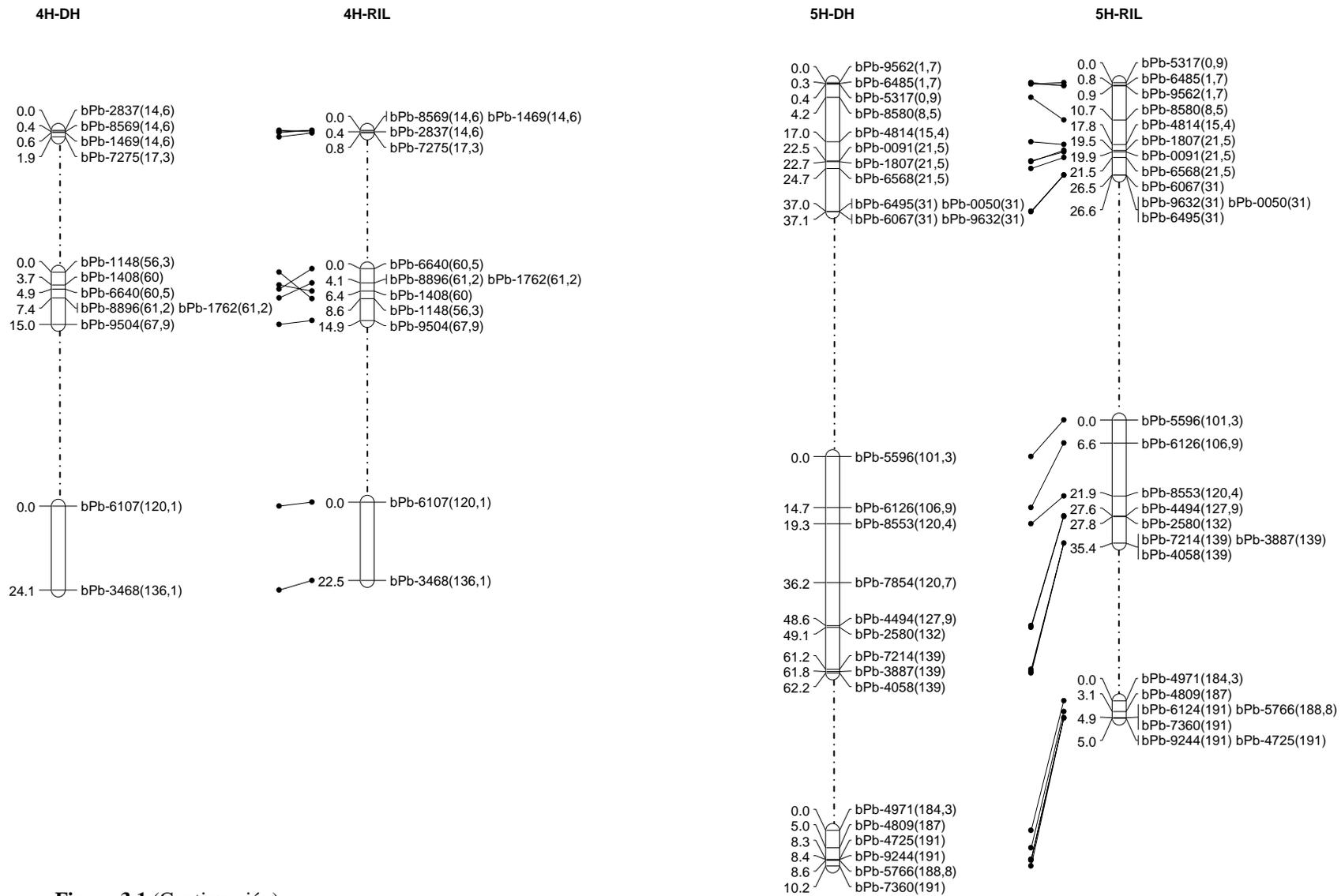


Figura 3.1 (Continuación)

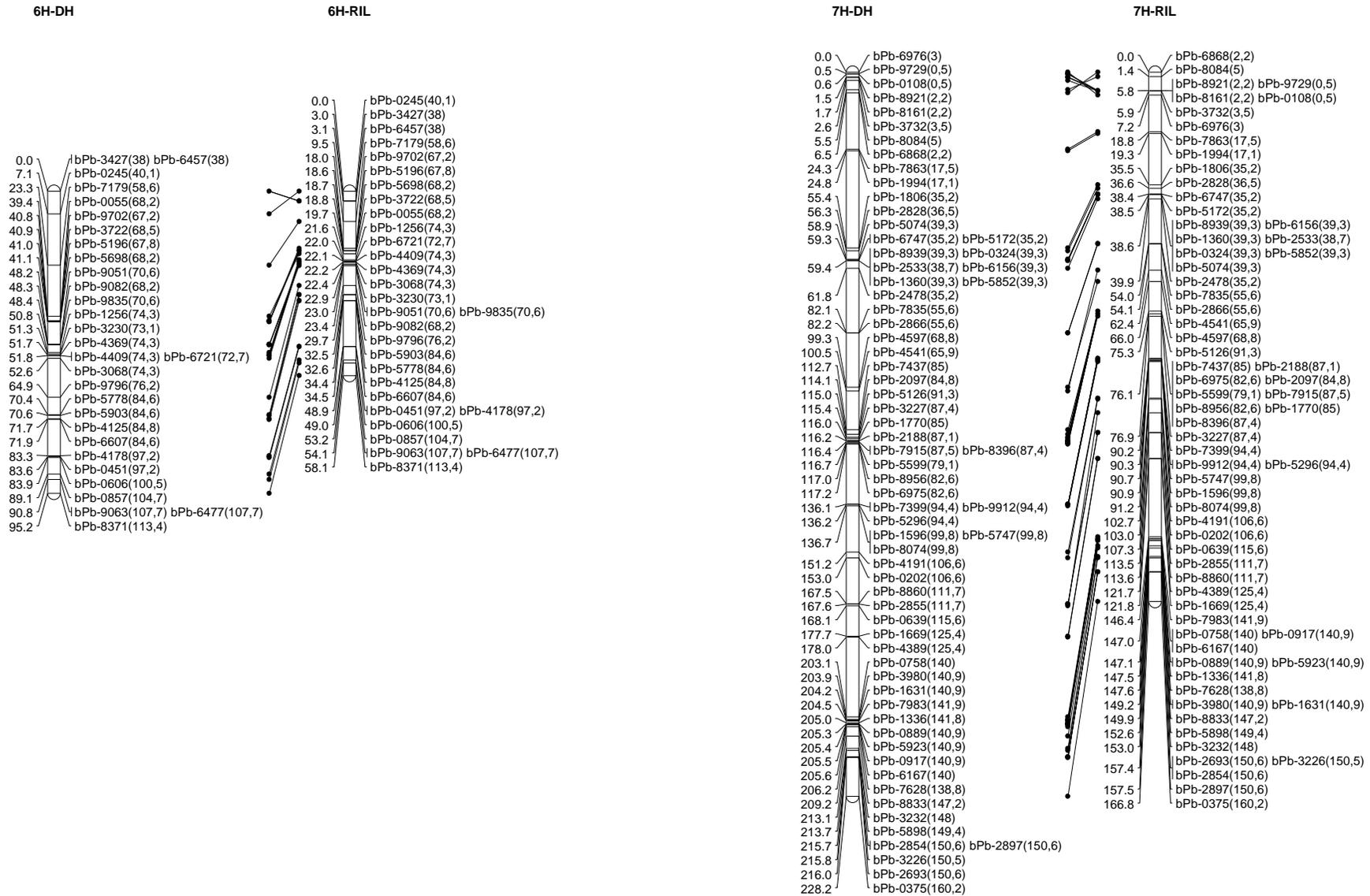


Figura 3.1 (Continuación)

3.3.2. COMPARACIÓN DE LA DISTORSIÓN DE LA SEGREGACIÓN ENTRE DHS Y RILs

Un total de 116 marcadores, de los 248 localizados en el mapa de ligamiento, mostraron distorsión a $p=0,01$. Únicamente tres DArT mostraron distorsión en ambas poblaciones. Los 113 restantes se repartían aproximadamente por igual entre las dos poblaciones mostrando, por lo tanto, porcentajes muy similares de distorsión. En la población DH el porcentaje de marcadores que presentaban distorsión era de un 23% mientras que en la población de RILs se observó un 24,6%. En la Tabla 3.3 se muestra el porcentaje de marcadores que presentan distorsión en cada cromosoma y el porcentaje que representan entre los marcadores distorsionados de cada población.

Tabla 3.3 Porcentaje que representan los marcadores distorsionados ($p=0,01$) de cada cromosoma respecto al total de marcadores que integran cada cromosoma y al total de marcadores distorsionados en cada población.

	<i>DArT distorsionados/n° DArT en el cromosoma (%)</i>		<i>DArT distorsionados/total DArT distorsionados en la población (%)</i>	
	<i>DH</i>	<i>RIL</i>	<i>DH</i>	<i>RIL</i>
1H	0	50	0	48,4
2H	16	16	7	6,5
3H	50	3,8	22,8	1,6
4H	50	8,3	10,5	1,6
5H	29,6	48,1	14	21
6H	0	0	0	0
7H	38,2	19,1	45,6	21

En el caso de la población DH el mayor número de marcadores distorsionados se localizó en el cromosoma 7H (45,6%) a favor del alelo Plaisant (Figura 3.2.g). Aunque se distribuían por una amplia zona del cromosoma, desde el bin3 al bin9, (correspondencia DArT-Bins según comunicación personal de B. Thomas), los marcadores situados entre los bin 3 y 6 presentaban mayor distorsión, con valores de $-\log(\text{prob}\chi^2) > 8$. En el cromosoma 3H se localizaban el 22,8% de los marcadores distorsionados en la población DH (Figura 3.2.c) Quedaban repartidos en tres zonas: en el bin 1, en los bins 6-9 y en el bin 15. En las dos primeras la distorsión se producía a favor de Orria mientras que esta última zona presentaba un porcentaje de Plaisant ligeramente superior. La mayor distorsión ($-\log(\text{prob}\chi^2) > 4$) se observaba en los marcadores situados en la zona central. Los

cromosomas 2H (bins 12-13) y 4H (bins 5-6) (Figura 3.2.b-d) también presentaban una importante distorsión ($-\log(\text{prob}\chi^2) > 4$) aunque con un número menor de marcadores (un 7% y un 10,5% respectivamente). En ambos casos estaba más representado el alelo de Plaisant. Un 14% de los marcadores distorsionados se situaban en el cromosoma 5H en los bins 1-2 (Figura 3.2.e). En este caso la distorsión se producía a favor de Orria con un valor de $-\log(\text{prob}\chi^2)$ entre 2 y 4. En los cromosomas 1H y 6H no se observó distorsión para la población DH.

a) Cromosoma 1H

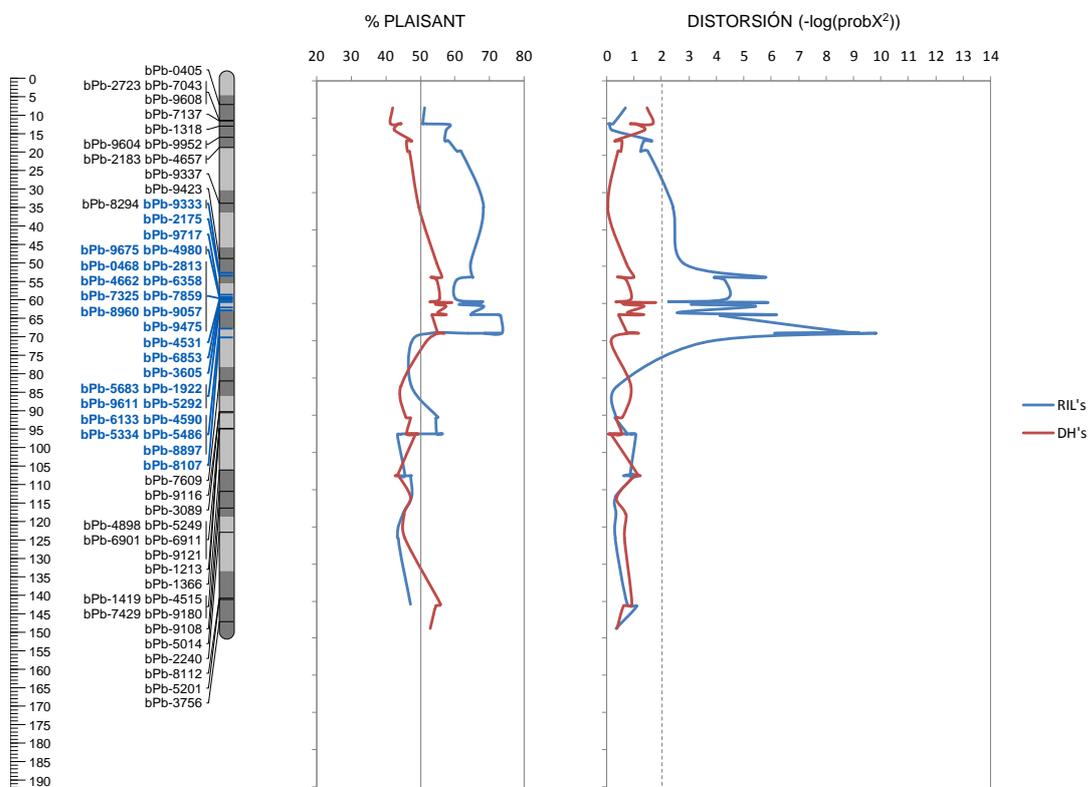
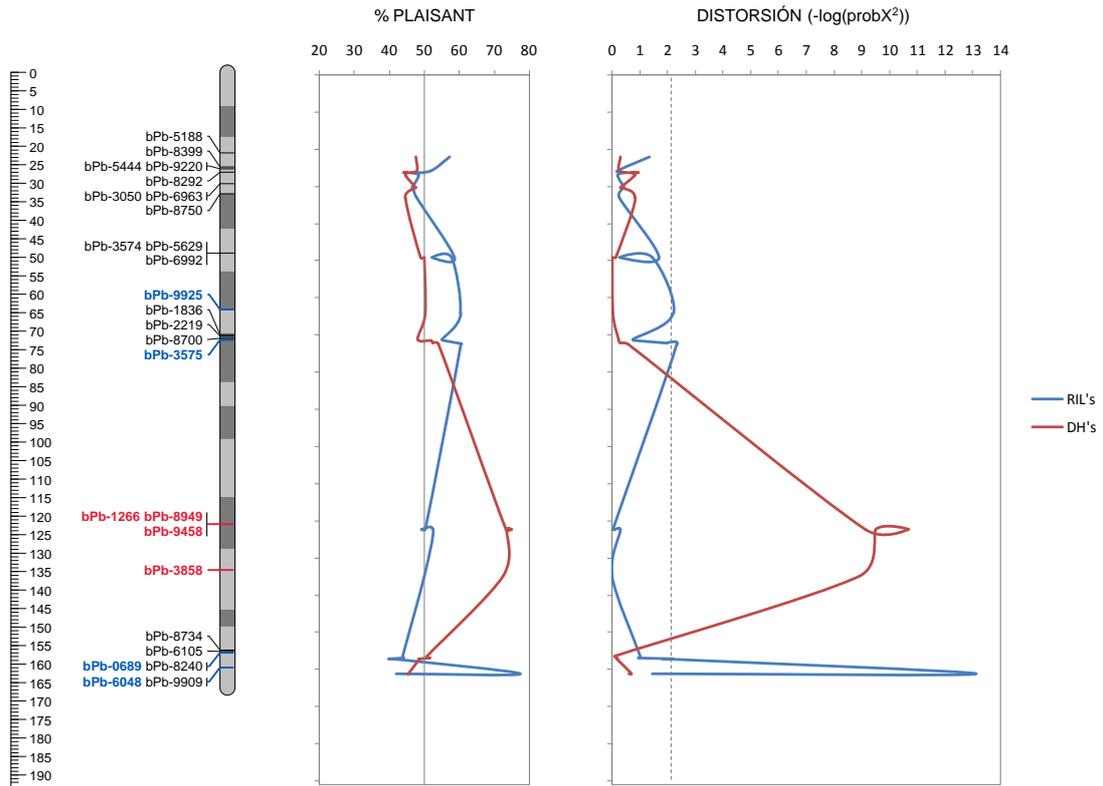
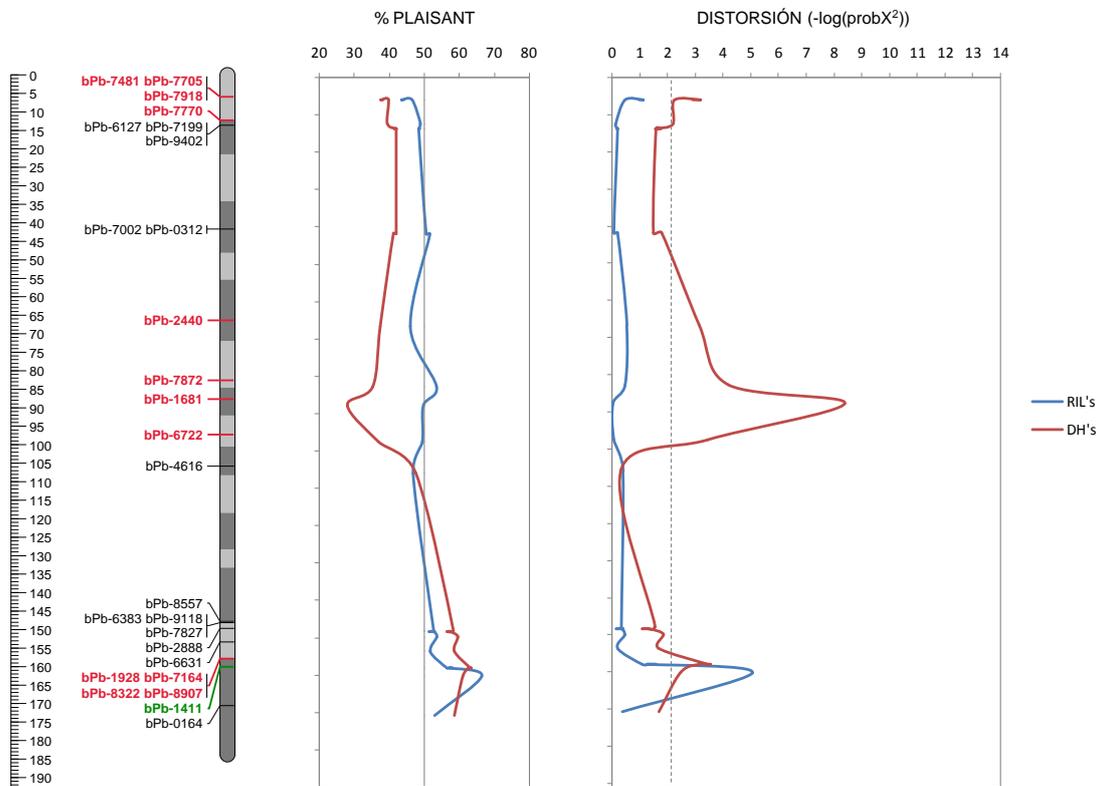


Figura 3.2 Distorsión de la segregación observada en las poblaciones DH y RIL genotipadas con 248DArT. Para cada cromosoma aparecen a la izquierda los marcadores DArT localizados en el cromosoma correspondiente según las distancias (cM) del mapa consenso (Wenzl et al. 2006). En cada cromosoma están señalados los *Bins* con diferentes tonos de gris. En el centro se representa el porcentaje de Plaisant en cada población. La línea vertical marca el 50%. A la derecha se representa la distorsión de la segregación calculada como $-\log(\text{prob}\chi^2)$. La línea de puntos se corresponde con $p=0,01$.

b) Cromosoma 2H

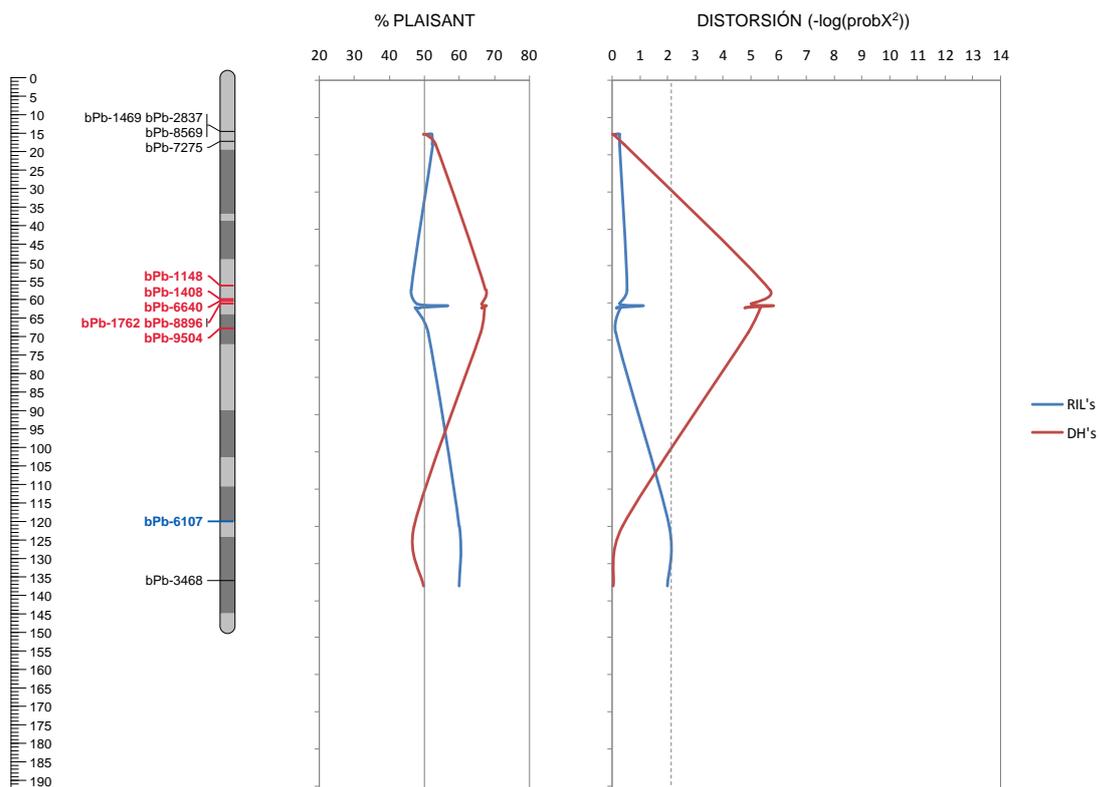


c) Cromosoma 3H

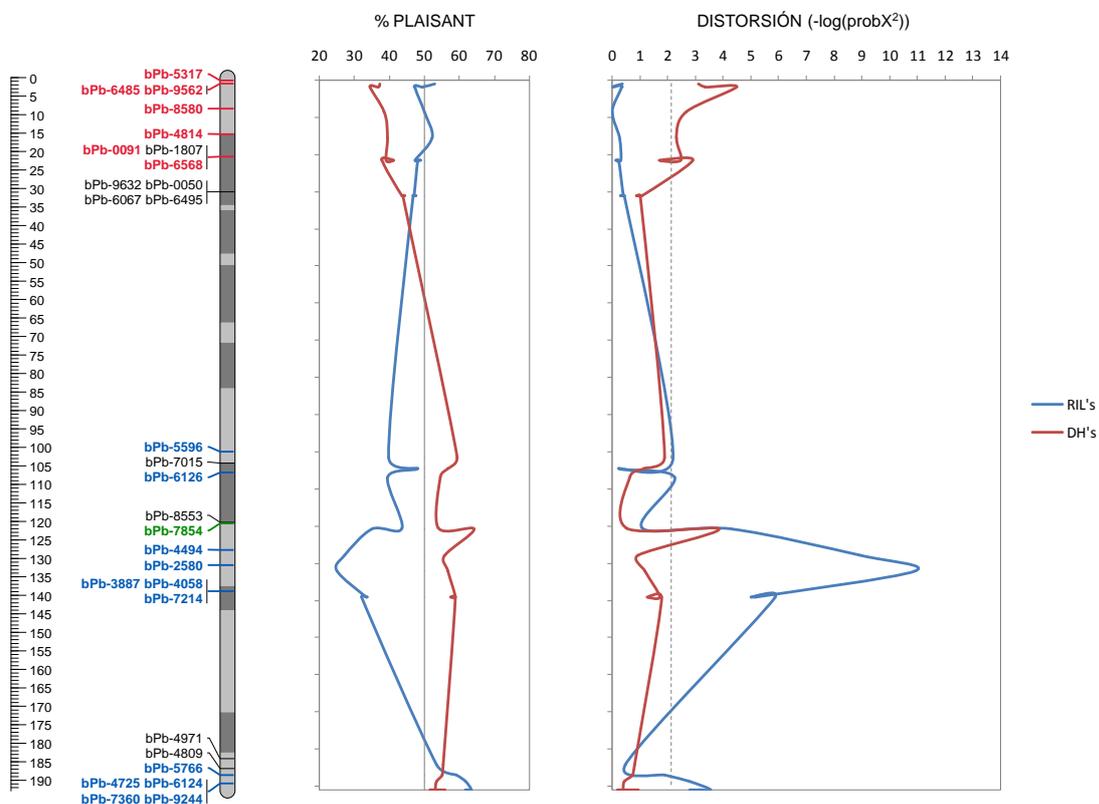


3. Distorsión de la segregación en dos poblaciones de cebada procedentes del mismo cruzamiento

d) **Cromosoma 4H**

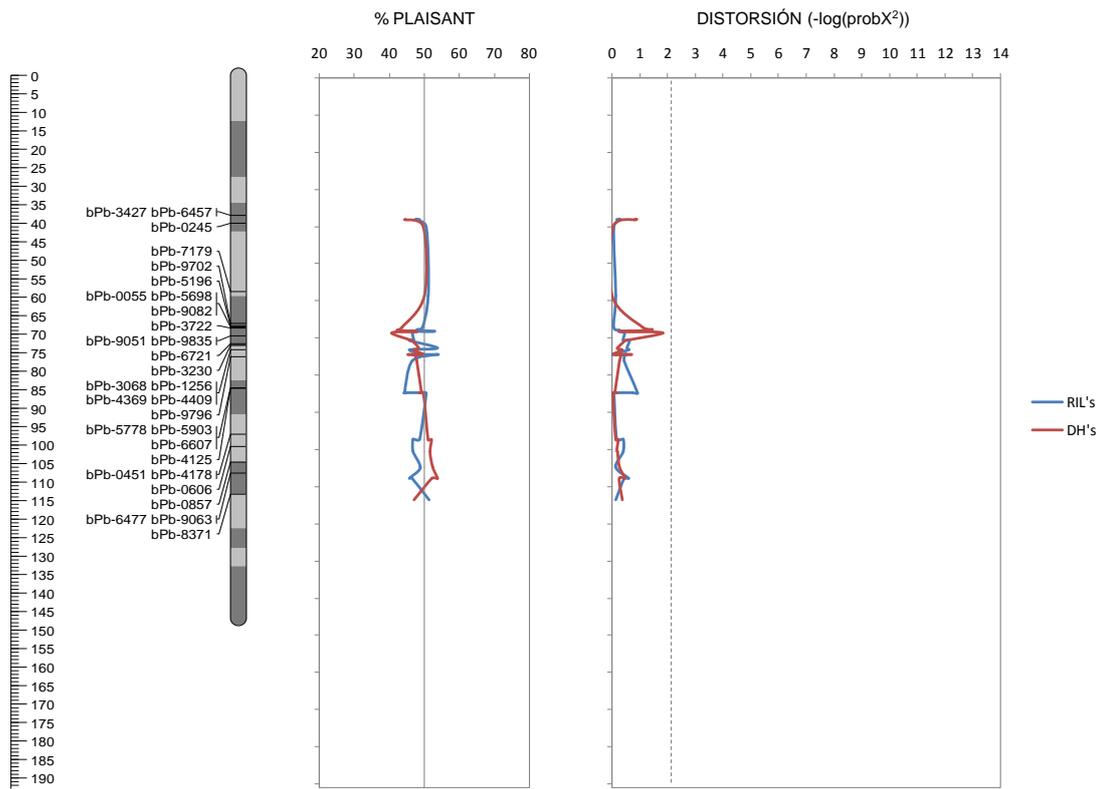


e) **Cromosoma 5H**

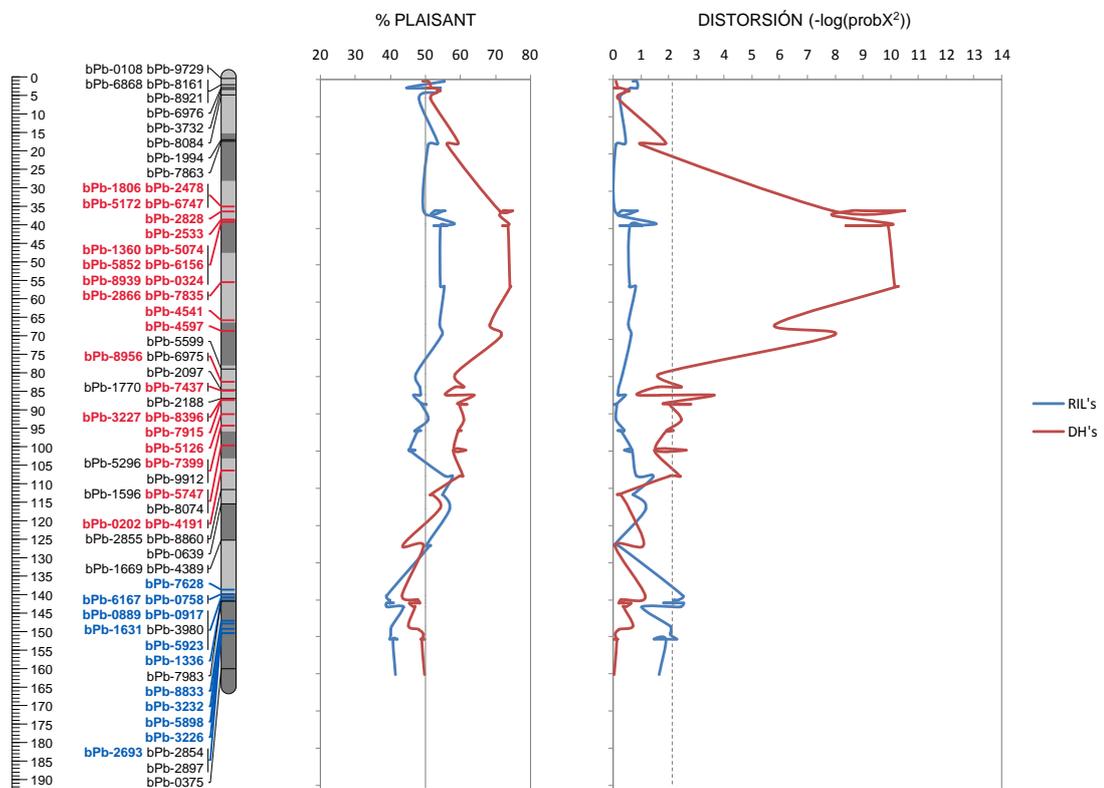


3. Distorsión de la segregación en dos poblaciones de cebada procedentes del mismo cruzamiento

f) Cromosoma 6H



g) Cromosoma 7H



En la población de RILs la mayor distorsión se observó en los cromosomas 1H y 5H. En el primero a favor de Plaisant y en segundo hacia Orria. En el 1H se situaban casi el 50% de los marcadores distorsionados en esta población, agrupados en los bins 6-9 (Figura 3.2.a) En el 5H, los marcadores con mayor distorsión se localizaban en los bins 11-12 (Figura 3.2.e) En el 7H (bin11-12) se observaba un 21% de marcadores distorsionados, en este caso a favor de Orria, aunque con un valor apenas significativo (Figura 3.2.g). En el resto de cromosomas, excepto en el 6H que no presentaba distorsión (Figura 3.2.f), se observaron algunos marcadores sueltos distorsionados. El caso más extremo, en el cromosoma 2H (bin 15), donde únicamente dos marcadores presentaban distorsión a favor de Plaisant con un valor de $-\log(\text{prob}\chi^2) = 13$ (Figura 3.2.b).

3.4. DISCUSIÓN

Se presentan en este capítulo dos mapas del mismo cruzamiento, contruidos a partir de dos poblaciones diferentes: una de líneas DHs y otra de RILs. En ambos casos se ha utilizado el mismo set de marcadores DArT. Los datos obtenidos nos han permitido realizar una comparación de la distorsión de la segregación entre los dos tipos de poblaciones.

El número de grupos de ligamiento obtenidos en ambos mapas fue bastante elevado, quedando grandes zonas sin cubrir en cada cromosoma e intervalos superiores a 20 cM dentro de los grupos obtenidos. Una de las explicaciones de esta escasa cobertura del genomio de cebada con 248 marcadores, podría ser la existencia de marcadores redundantes. En realidad, si se consideran únicamente los *loci* polimórficos observados en cada mapa, y no los marcadores individuales, el número se reduce a 186 en el caso de la población DH y 156 en la población de RILs.

Otra de las causas parece bastante evidente: el set de marcadores utilizado es bastante reducido, sobre todo si consideramos que el grupo de marcadores polimórficos obtenido en el análisis DArT era bastante superior. Se consideró adecuada la utilización de un set compartido de marcadores entre ambas poblaciones y dentro de este set se utilizaron únicamente los que estaban localizados en el mapa consenso (Wenzl et al. 2006). La explicación de esta selección fue la obtención de mapas que pudieran compararse entre sí, y a su vez, con un mapa de referencia. La incorporación de los 92 marcadores no

localizados en el consenso reduce el número de grupos de ligamiento a 13, sin embargo no aumenta demasiado la densidad del mapa y mantiene intervalos de hasta 40 cM (resultados no mostrados). Según esto, la escasa cobertura que presentan ambos mapas estaría más relacionada con la existencia de amplias zonas con escaso polimorfismo entre las variedades Plaisant y Orria que con el número de marcadores utilizado.

La ordenación de los marcadores fue similar en ambos mapas, sin embargo, las longitudes de los grupos obtenidos resultaron muy diferentes: la longitud del mapa de las RILs representaba un 73% del mapa de la población doble haploide. Un resultado muy similar se observa en He et al. 2001 entre dos poblaciones de arroz, DH y RILs, procedentes también del mismo cruzamiento.

En ambas poblaciones se observó un porcentaje similar de distorsión, 23% y 24,6% en DHs y RILs respectivamente. Estos porcentajes eran similares también a los observados en la bibliografía (Xu et al 1997, Sayed et al 2002, Li et al 2010). Sin embargo, la localización de los marcadores distorsionados era muy diferente en una y otra población, y únicamente tres marcadores presentaron distorsión en ambas poblaciones. Los marcadores con distorsión en la población DH se localizaron principalmente en los cromosomas 2H, 3H, 4H y 7H. En la población de RILs eran los cromosomas 1H y 5H los que presentaban un mayor porcentaje de marcadores distorsionados. Ninguna de las dos poblaciones presentó distorsión en el cromosoma 6H. A pesar de la baja densidad del mapa obtenido se observa que los marcadores distorsionados tienden a agruparse en zonas concretas. La existencia de “regiones de distorsión de la segregación” o SDRs (*Segregation Distortion Regions*) podría estar relacionada con una segregación causada por factores genéticos (Li et al. 2010).

La zonas distorsionadas de los cromosomas 2H y 3H se han observado en diferentes poblaciones DH de cebada obtenidas por cultivo de anteras: Rolfi/Botnia (Maninnen 2000) y Oregon Wolfe Barley (Cistue et al. 2011). La distorsión del 2H se ha observado también en Tadmor/WI2291 (Sayed et al. 2002) y en Igri/Dobla se han descrito QTLs para el número de embriones y número de plantas albinas (Chen et al. 2007). En el caso del 3H, la zona distorsionada se observa también en Igri/Franka (Graner et al. 1991) y Barque 73/*H. vulgare* spp. *spontaneum* CPI 71284-48 (Hearnden et al. 2007). Además coincide con la SDR 3.1 descrita en Li et al. (2010), en la que principalmente presentan

distorsión las dos poblaciones obtenidas por cultivo de anteras. En Manninen (2000), esta zona se relacionó con una mayor producción de plantas por antera, aunque muchas de esas plantas fueran albinas. También se han descrito QTLs para el porcentaje de plantas verdes y para el número de plantas verdes y plantas albinas obtenidas (Muñoz-Amatriaín et al. 2008).

La distorsión observada en los cromosomas 4H y 7H se observa también en Oregon Wolfe Barley (Cistué et al 2011) y la zona del 4H parece estar asociada con la respuesta al cultivo de anteras (Manninen 2000).

Por otra parte, los ensayos realizados en campo con esta población doble haploide no mostraron distorsión de la segregación significativa para ninguno de los caracteres estudiados: espigado, altura, rendimiento y peso de mil granos (Cistué et al. 2005)

En el caso de las RILs, en la zona del cromosoma 1H que presenta distorsión, se han descrito QTLs para los caracteres altura y fecha de espigado en Harrington/Morex (Marquez-Cedillo et al. 2000). En Dicktoo/Morex (Pan et al. 1994) se ha observado en la misma zona un QTL para fecha de espigado. En la zona distorsionada del 5H se localiza el gen de vernalización *Vrn-H1* y son numerosos los QTLs descritos en diferentes poblaciones p.ej. fecha de espigado, altura y peso de mil granos en Blenheim/Kym (Bezant et al. 1997); altura en Chevron/M69 (de la Pena et al. 1999); rendimiento en Cali/Bowman (Hayes et al. 1996) o altura en Harrington/Morex (Marquez-Cedillo et al. 2000).

La mayor parte de las poblaciones de mapeo utilizadas para el análisis de QTLs presentan distorsión de la segregación. Aunque las proporciones varían en función de los parentales y/o marcadores utilizados, no parece que ningún tipo de población se ajuste en un 100% a los patrones Mendelianos de segregación. Debido a esto determinados autores consideran que, puesto que la distorsión de la segregación parece inevitable en cualquier tipo de población, sería conveniente considerar la utilización de métodos de análisis de QTLs que no se vean afectados por la presencia de distorsión (Malosetti et al. 2011)

La distorsión observada en las poblaciones DH y RIL derivadas del cruzamiento Plaisant x Orria se muestra acorde con la observada en la bibliografía para poblaciones similares. Tanto los parentales como el set de marcadores utilizado son los mismos en

ambas poblaciones por lo que podemos afirmar que ésta distorsión se deriva únicamente del método de obtención utilizado en cada población. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos no parece que la utilización de uno u otro tipo de población presente una ventaja añadida.

Podemos concluir por lo tanto que, en la medida que la distorsión “normal” observada no se vea afectada por la presencia de la translocación, el empleo de una población doble haploide para su estudio sería perfectamente adecuado.

**4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA
POBLACIÓN DOBLE HAPLOIDE
PROCEDENTE DEL CRUZAMIENTO DE
ALBACETE × PLAISANT**

4.1. INTRODUCCIÓN

Tal y como se indica en la Introducción general, un mapa genético es una disposición lineal de los marcadores, con un orden y distancias determinados, basados en la recombinación que se produce entre los cromosomas homólogos durante la meiosis. Así, tanto la ordenación de los marcadores como sus distancias relativas están relacionadas con su localización física en los cromosomas.

Las translocaciones recíprocas, como la que se observa en la variedad Albacete, cambian la estructura lineal de los cromosomas por lo que las relaciones de ligamiento, entre los marcadores pertenecientes a los cromosomas translocados, se verán alteradas.

Por otra parte, la recombinación en las zonas cercanas al punto de corte y reunión de los fragmentos translocados parece ser muy reducida (Alonso-Blanco et al. 1993), por lo que marcadores de ambos cromosomas localizados en esa zona mostrarán un pseudoligamiento no esperado (Tadmor et al. 1987; Benito et al. 1994, Jauregui et al. 2001; Mahama y Palmer 2003).

Al realizar el mapa del cruzamiento entre Garfi y Nemared, del género *Prunus*, Jauregui et al. 2001, obtuvieron siete grupos de ligamiento en lugar de los ocho esperados; uno de los grupos integraba todos los marcadores pertenecientes a dos cromosomas. La presencia de cuadrivalentes en la F1 y la observación de semiesterilidad en la F2 confirmaron que el ligamiento anómalo detectado era consecuencia de una translocación recíproca. En este caso, el grupo de ligamiento obtenido mostraba los marcadores del punto de translocación en la zona central, mientras que el resto de marcadores se situaban a ambos lados, los del G6 hacia un lado y los del G8 hacia el otro.

Livingstone et al. (2000) realizaron una simulación con Mapmaker/EXP para estudiar los efectos de las mutaciones estructurales sobre la construcción de mapas de ligamiento. A partir de datos generados por el programa, y bajo una serie de condicionantes, entre los que se incluía la supresión de recombinación cerca del punto de corte de la translocación, realizaron múltiples mapas de ligamiento con el mismo *set* de datos. Los resultados obtenidos mostraron varios tipos de mapas consistentes en diferentes reorganizaciones de los marcadores entorno al punto de translocación. Basándose en este

trabajo Durrant et al. (2006) desarrollaron un paquete informático que permitía un estudio más detallado de este tipo de alteraciones cromosómicas, QuadMap. Tras realizar más de 1000 permutaciones con datos simulados concluyeron que se podía determinar el punto de corte de la translocación mediante la varianza de las distancias obtenidas entre parejas de marcadores. Considerando los brazos que se forman en el cuadrivalente como grupos independientes observaron que la varianza entre pares de marcadores del mismo grupo era muy baja mientras que entre marcadores de diferentes grupos, independientemente de si eran del mismo cromosoma o no, mostraba valores muy elevados. Los cuatro grupos, analizados de forma independiente, mostraban una ordenación y distancias normales entre los diferentes marcadores.

Los objetivos de este capítulo son varios: (i) identificar los cromosomas implicados en la translocación recíproca, (ii) construir un mapa de ligamiento que consiga reflejar la presencia de una translocación recíproca y por último (iii) localizar en la medida de lo posible el punto de corte de la translocación recíproca.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. MATERIAL VEGETAL

Se analizaron un total de 181 líneas doble haploides procedentes de la F1 del cruzamiento de Albacete y Plaisant. Todas las líneas doble haploides se obtuvieron mediante cultivo de anteras, según el protocolo descrito en Cistue *et al.* 2003, en la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza), entre los años 1998 y 2006. Para facilitar la organización del trabajo, y el análisis posterior de los datos obtenidos, se dividió la población total en dos sub-poblaciones en función de su año de obtención. Se etiquetaron como: AP1, integrada por 92 líneas doble haploides obtenidas antes del año 2006; y AP2, que agrupaba 89 líneas obtenidas en el año 2006.

4.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Para la obtención de ADN genómico de alto peso molecular se utilizaron dos protocolos diferentes. Para el genotipado con marcadores SSR se siguió el método de extracción CTAB (Doyle y Doyle 1990) con pequeñas modificaciones. El ADN extraído se

diluyó en TE a pH 8, se cuantificó a 260 nm y se guardó a -20°C para su conservación a largo plazo. Para la caracterización con marcadores DArT se utilizó el kit “*DNeasy 96 Plant Kit*” de la casa comercial *Qiagen* tal y como se especifica en el Capítulo 3, apartado 3.2.2.

4.2.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA CON MARCADORES SSR

La caracterización con estos marcadores se realizó únicamente en la sub-población AP1. Se seleccionaron para ello 60 marcadores SSR: 51 derivados de ADN genómico (con los prefijos “Bmac”, “Bmag”, “EBmac”, “GMS”, “HV” y “WM”) y 9 derivados de EST’s (con los prefijos “scsrr” y “GBM”). Todos ellos de polimorfismo conocido en Albacete \times Plaisant y localizados en diferentes mapas de cebada (Ramsay *et al.* 2000, Varshney *et al.* 2007) (Figura 4.1).

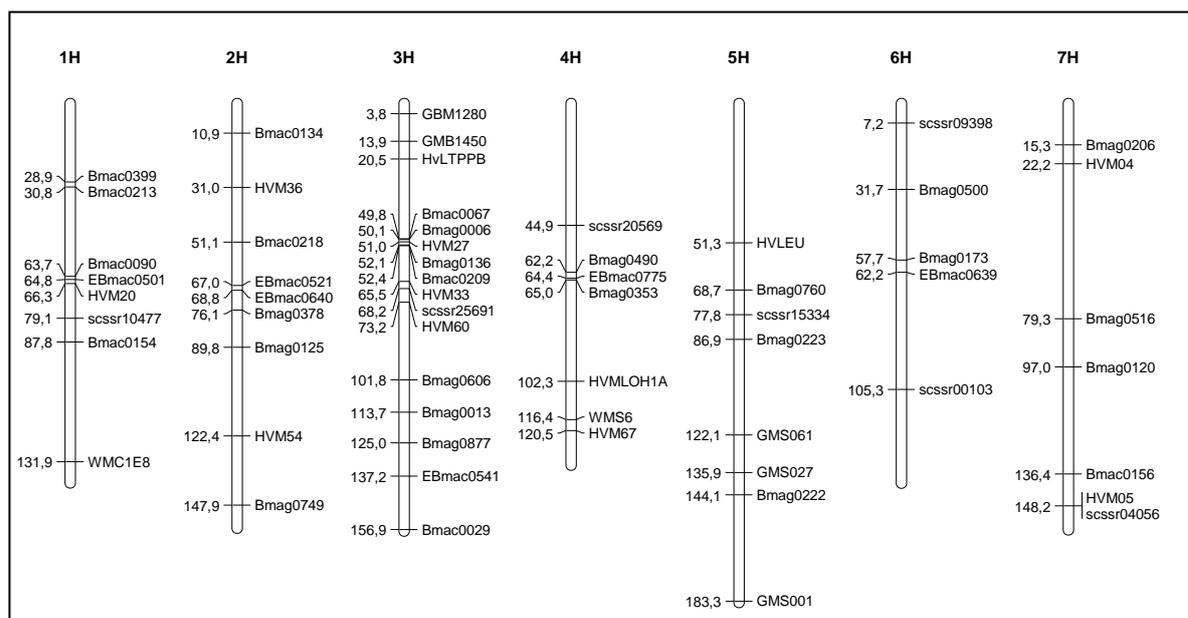


Figura 4.1 Distribución en el genoma de cebada de los 60 marcadores SSR seleccionados para la caracterización genética inicial de la población Albacete \times Plaisant. Para determinar la posición de cada marcador se ha tomado como referencia Varshney *et al.* 2007.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 15 μl en un termociclador *Mastercycler 5333 de Eppendorf*. La composición de las reacciones de PCR fue similar para todos los marcadores excepto por la concentración de cebadores;

considerablemente superior en el caso de los SSRs derivados de ESTs (Tabla 4.1). La información necesaria para la amplificación de los diferentes marcadores se obtuvo de las respectivas referencias bibliográficas: “Bmac”, “Bmag”, “EBmac” (Ramsay et al. 2000); “GMS” (Struss y Plieske 1998, Li et al. 2003); “HV” (Becker y Heun 1995, Liu et al. 1996, Pillen et al. 2000); “WM” (Liu et al. 1996); “scsrr” (Ramsay et al. 2004) y “GBM” (Varshney et al. 2006). La separación y visualización de los productos amplificados se realizó en geles de acrilamida o en secuenciador automático.

Tabla 4.1 Composición de las reacciones de PCR para el análisis de marcadores SSR

<i>Componentes</i>	<i>Stock</i>	<i>PCR (SSR genómicos)</i>	<i>PCR (EST-SSR)</i>
ADN	50 ng/μl	2 μl	2 μl
<i>Primer forward</i>	5 μM	0,45 μl	3 μl
<i>Primer reverse</i> ^(a)	5 μM	0,45 μl	3 μl
<i>Buffer</i> (Biotools)	10x / 2mM MgCl ₂	1,5 μl	1,5 μl
dNTP's (Invitrogen)	1 mM	3 μl	3 μl
ADN polimerasa <i>Tth</i> (Biotools)	5 U/μl	0,1 μl	0,1 μl
Agua milliQ (c.s.p.)		15 μl	15 μl

(a) Los marcadores analizados en ABI PRISM® 3100 llevan este *primer* marcado con los fluorocromos FAM, HEX o NED en su extremo 5'.

4.2.3.1. Electroforesis en gel de acrilamida

Los productos amplificados se mezclaron con tampón de carga FB en una proporción de 5:2 (producto/tampón) y se desnaturalizaron durante 2 minutos, a 94°C. Se cargaron 3,5 μl de cada muestra (producto + FB) en un gel de acrilamida al 6% (7M urea) montado en un secuenciador *Hoefer TM SQ3*. Para la correcta separación de los fragmentos se mantuvo la electroforesis con tampón TBE (1x), a una potencia constante de 65W, y durante un tiempo de 2 a 3 horas dependiendo del tamaño de banda del microsatélite analizado. Para determinar el tamaño de las bandas obtenidas se cargó, junto con las muestras, el marcador de peso molecular *30-300 pb AFLP Ladder de Invitrogen*.

➤ *Composición del tampón de Carga FB*

Formamida	95%
EDTA	20mM
Xylene cyanol	0,05%
Azul de bromofenol	0,05%

➤ *Composición del tampón TBE (10x)*

Tris (TRIZMA base)	108g
Ácido bórico	55g
EDTA	40 ml
Agua milliQ (c.s.p.)	1L

➤ *Composición del gel de acrilamida 6% (7M urea)*

Ready solution (acrilamida/bisacrilamida)	11,25ml
Urea	31,5ml
TBE 10x	7,5ml
Agua milliQ (c.s.p.)	75ml
APS (10%)	375µl
TEMED	37,5µl

Para la visualización de las bandas se realizó una tinción de plata según el protocolo descrito en Bassam *et al.* 1991. Para ello se fijó el gel con una disolución de ácido acético al 10% (solución fijadora) durante 20-30 minutos, se realizaron 3 lavados con agua desionizada y se sumergió durante 30-40 minutos en una solución al 0,2% (p/v) de nitrato de plata (solución de tinción). Tras la tinción se realizó un lavado con agua desionizada, durante aproximadamente 10 segundos, y se reveló con una solución de carbonato sódico anhidro (30 g/L) hasta la visualización de las bandas (solución reveladora). El proceso de revelado se detuvo con la misma disolución utilizada para la fijación del gel (ácido acético al 10%).

➤ *Solución fijadora*

Ácido acético glacial	10%	300ml
Agua desionizada	-	3L

➤ *Solución de tinción*

Nitrato de plata (NO ₃ Ag)	0,2%(p/v)	2g
Formaldehido (35%)	1,5 ml/L	3ml
Agua milliQ	-	2L

➤ *Solución de revelado*

Carbonato sódico (CO ₃ Na ₂)	30g/L	120g
Formaldehido (35%)	1,5 ml/L	6ml
Tiosulfato sódico (10mg/ml)	2 g/L	800µl
Agua milliQ	-	4L

4.2.3.2. Análisis en secuenciador automático

La separación de los fragmentos marcados con fluorocromo se realizó en el secuenciador automático *ABI PRISM® 3100-Avant de Applied Biosystems*. Para ello el producto de PCR se diluyó en una proporción de 1:5 con agua milliQ (15 µl producto / 75 µl agua milliQ). Para cargar en el secuenciador se tomó un volumen determinado de las diluciones, diferente según el fluorocromo, y se mezcló con 0,25µl del marcador de peso molecular GS500 ROX y 10 µl de formamida Hi-DiTM. El volumen de dilución añadido en cada caso fue: 1µl de las muestras con HEX, 1,5µl de las muestras con FAM y 2 µl de las muestras marcadas con NED. Para el análisis de los resultados se utilizó Genescan, software específico del secuenciador.

4.2.4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA CON MARCADORES DArT

El análisis de marcadores DArT fue realizado por la empresa *Triticarte Pty. Ltd.* Debido a la diferente disponibilidad en el tiempo de las sub-poblaciones AP1 y AP2, la caracterización con marcadores DArT se realizó de forma independiente para cada una de ellas: AP1 en el 2006 y AP2 en el 2007. El envío se realizó en placas de 96 pocillos en las que, además de las líneas doble haploides, se incluyeron muestras de los parentales Albacete y Plaisant. En todos los casos el volumen de muestra enviado fue de 50 µl de una dilución de ADN de 100 ng/µl.

Los marcadores DArT conocidos y localizados en el mapa consenso de cebada (Wenzl et al. 2006) se nombraron tal y como se ha indicado en el Capítulo 3: prefijo “bPb-” más un número de cuatro dígitos. Para aquellos marcadores cuya posición en el mapa consenso era desconocida se utilizó el número de identificación del clon (seis dígitos) precedido de “CloneID”.

4.2.5. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO Y CONSTRUCCIÓN DE MAPAS GENÉTICOS

El análisis de ligamiento se realizó con JoinMap[®]4.0 (Van Ooigen, 2006), utilizando el parámetro “*Independence LOD*” y tomando como valor mínimo de selección de grupos LOD=4. Para calcular las distancias de mapa y el orden relativo de los marcadores se utilizaron los dos algoritmos incluidos en este programa: regresión, seleccionando Kosambi como función de mapa, y máxima verosimilitud (ML). Aparentemente, si bien con este último algoritmo aparecen sobredimensionadas las distancias de mapa, la ordenación que se consigue de los marcadores, en mapas saturados, es mucho más correcta.

Se utilizó también un conjunto de “*Perl scripts*” para “limpiar” los datos obtenidos de posibles errores de genotipado (Wenzl *et al.* 2006). Este programa sustituye los errores detectados por datos perdidos y reduce el número de datos perdidos de un marcador tomando como referencia los resultados de los marcadores adyacentes. Los marcadores, o los genotipos, con un porcentaje excesivo de errores de genotipado o de datos perdidos son eliminados. Realiza también la ordenación de marcadores y el cálculo de distancias genéticas y, una vez acabado el análisis, es posible recuperar algunos cálculos intermedios, como la matriz de frecuencias de recombinación.

La representación gráfica de los mapas se realizó con el programa MapChart[®]2.2 (Voorrips 2002).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA CON MARCADORES SSR Y OBTENCIÓN DE UN MAPA DE LIGAMIENTO PRELIMINAR

En el análisis de ligamiento, realizado con JoinMap[®] 4.0, se incluyeron todos los marcadores, independientemente del porcentaje de datos perdidos que tuvieran. No se eliminó tampoco ninguna línea. Con un valor de LOD=4 se obtuvieron 14 grupos de ligamiento, que incluían 53 marcadores. Siete marcadores permanecieron no ligados. La ordenación y cálculo de distancias relativas de los marcadores dentro de cada grupo se realizó con regresión, seleccionando Kosambi como función de mapa. La representación gráfica del mapa se realizó con MapChart[®]2.2 (Figura 4.2)

La longitud total cubierta por los 14 grupos de ligamiento era de 355 cM. Trece de los grupos obtenidos se correspondían, tanto por los marcadores incluidos como por las distancias relativas existentes entre ellos, con regiones más o menos extensas de los cromosomas de cebada (Varshney *et al.* 2007). Estos grupos de ligamiento estaban formados por entre dos y cuatro marcadores y sus longitudes oscilaban entre 6 y 40 cM. En la Tabla 4.2 se detalla para cada cromosoma el número de marcadores que lo integran, los grupos de ligamiento obtenidos y la longitud total cubierta por estos grupos.

El último grupo obtenido en el análisis de ligamiento era el más numeroso (15 marcadores) y el que cubría mayor longitud del mapa (69cM). Estaba integrado por siete marcadores del cromosoma 1H y ocho marcadores del cromosoma 3H. Ocho de estos marcadores (tres del cromosoma 1H y cinco del 3H) permanecían ligados incluso con valores de LOD=20.

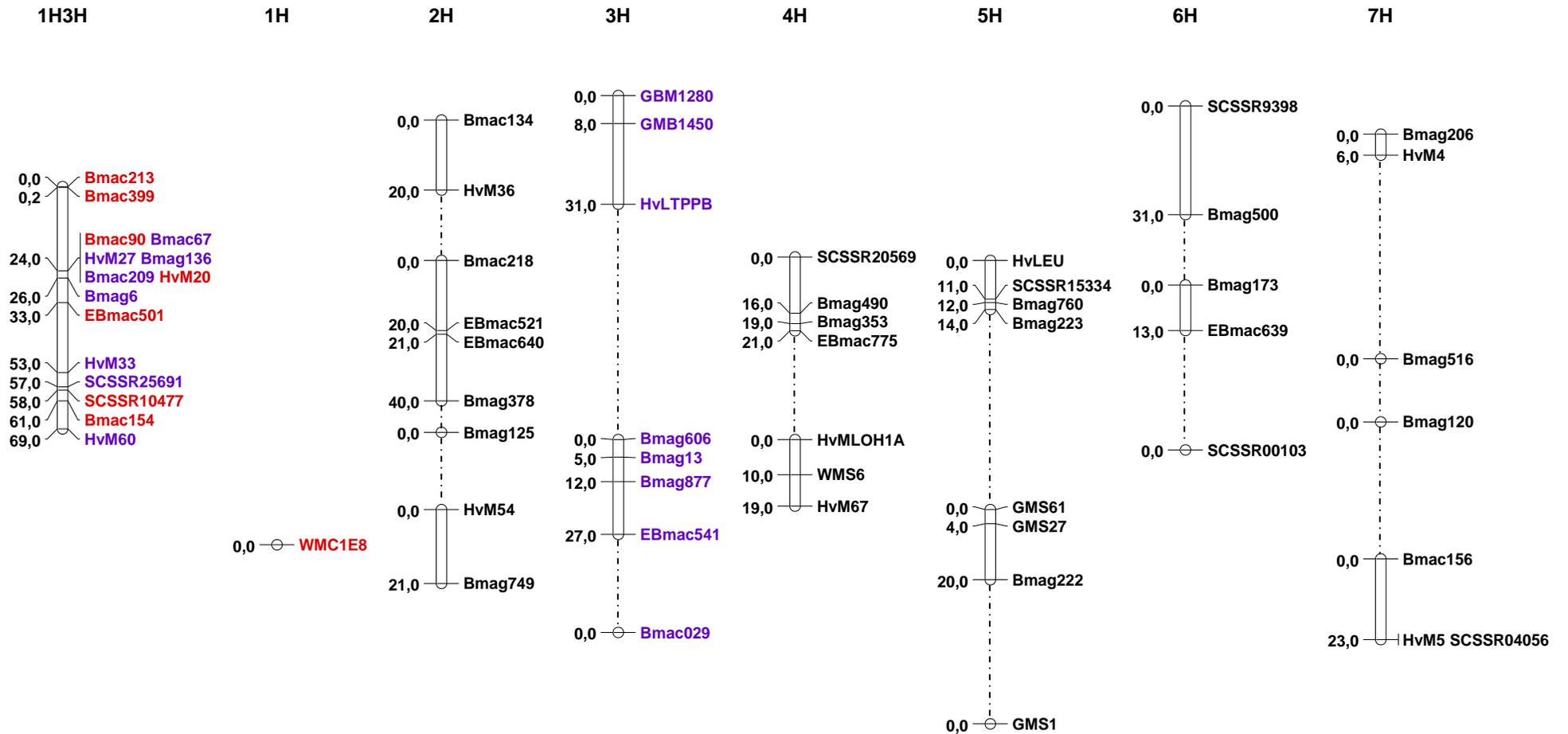


Figura 4.2 Mapa de ligamiento del cruzamiento Albacete × Plaisant con 60 marcadores SSR. Las distancias genéticas están expresadas en centiMorgans (cM) según la función de mapa Kosambi. Los cromosomas están orientados con el brazo corto en la parte superior y las distancias entre los grupos de ligamiento y los marcadores independientes son proporcionales a las distancias del mapa consenso tomado como referencia (Varshney *et al.* 2007). Los marcadores que aparecen en rojo pertenecen al cromosoma 1H y los que aparecen en azul al cromosoma 3H.

Tabla 4.2 Distribución de marcadores, grupos de ligamiento y longitudes obtenidas con los marcadores SSR

<i>Cromosomas</i>	<i>Nº de marcadores</i>	<i>Nº de grupos de ligamiento</i>	<i>Marcadores no ligados</i>	<i>Longitud (cM)</i>
1H	1	-	1	-
2H	9	3	1	81
3H	8	2	1	58
4H	7	2	-	40
5H	8	2	1	34
6H	5	2	1	44
7H	7	2	2	29
1H+3H	7+8	1	-	69
Total	60	14	7	355

4.3.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN CON MARCADORES DArT

Como se ha comentado anteriormente la caracterización con marcadores DArT se realizó de forma independiente para las sub-poblaciones AP1 y AP2. Los resultados obtenidos se agruparon en una tabla única para la realización del análisis de ligamiento y la construcción de un mapa saturado.

Con el análisis realizado por *Triticarte Pty. Ltd.* se obtuvieron un total de 691 marcadores DArT polimórficos en Albacete, Plaisant y en el conjunto de las líneas doble haploides. Sobre este conjunto inicial de datos se aplicaron los siguientes criterios de selección:

- Dentro de cada sub-población se seleccionaron aquellos marcadores que presentaban un valor de $Q > 80$. Según la información facilitada por *Triticarte Pty. Ltd.*, los marcadores con valores de Q por encima de 77 pueden considerarse bastante fiables, sin embargo, el hecho de trabajar con dos sub-poblaciones, obtenidas y analizadas en diferentes momentos, nos hizo decantarnos por un valor más seguro ($Q > 80$) que disminuyera la probabilidad de arrastrar errores en el posterior análisis.
- De los marcadores con un valor de $Q > 80$, se seleccionaron únicamente los que estaban presentes en ambas sub-poblaciones.

El set de datos común para la construcción del mapa de ligamiento constaba de 545 DArT y 181 líneas doble haploides (AP1 + AP2). De los 545 marcadores DArT, 373 estaban localizados en el mapa consenso (Wenzl *et al.* 2006). La presencia de suficientes marcadores de posición conocida era imprescindible para determinar los cromosomas implicados en la translocación recíproca y localizar el punto de corte de la misma.

Para detectar posibles errores de genotipado y disminuir el porcentaje de datos perdidos se utilizó el conjunto de “*Perl scripts*” (Wenzel *et al.* 2006). Con este programa se descartaron 20 marcadores y se redujeron los datos perdidos a menos de un 10% en el resto de marcadores.

El análisis de ligamiento se llevó a cabo con JoinMap®4.0. Para este análisis inicial se decidió prescindir de los marcadores cuya posición en el mapa consenso de cebada era desconocida. Finalmente, y bajo un criterio de selección de LOD=5, se obtuvieron 8 grupos de ligamiento que incluían un total de 367 marcadores DArT localizados en el mapa consenso. Tres de los grupos obtenidos se correspondían con los cromosomas 2H (59 marcadores), 6H (59 marcadores) y 7H (72 marcadores). Otros cuatro grupos estaban integrados por marcadores pertenecientes a zonas más o menos extensas de los cromosomas 4H (un grupo con 2 marcadores de la parte distal de 4HS y otro que incluía 20 marcadores de 4HL) y 5H (un grupo con 20 marcadores de 5HS y otro grupo con 27 marcadores de 5HL). El octavo grupo, tal y como ya se había observado en el anterior análisis con los marcadores SSR, estaba formado por los marcadores pertenecientes a los grupos 1H y 3H (108 marcadores DArT: 59 pertenecientes al cromosoma 1H y 49 del cromosoma 3H). Aproximadamente la mitad de estos marcadores, 38 y 24 DArT del 1H y 3H respectivamente, permanecían ligados incluso con criterios de selección muy estrictos (LOD=19).

La presencia de pseudoligamiento entre los marcadores pertenecientes a los cromosomas 1H y 3H se atribuyó a la existencia de la translocación recíproca. Con el objetivo de confirmar esto, y localizar de la forma más exacta posible el punto de corte de la translocación, se realizó un análisis más detallado de este grupo.

4.3.2.1. Análisis de ligamiento y construcción del mapa de los grupos implicados en la translocación

En primer lugar, se obtuvo la matriz de frecuencias de recombinación entre los 108 DArT. Como era de esperar, las frecuencias de recombinación entre los marcadores del mismo cromosoma oscilaban entre valores cercanos a cero (marcadores muy próximos según el mapa consenso) y valores próximos a 0,5 (marcadores muy alejados dentro del mismo grupo de ligamiento). Una frecuencia de recombinación de 0,5 es la que se obtiene entre las parejas de marcadores pertenecientes a diferentes grupos de ligamiento. Sin embargo, determinadas parejas de marcadores establecidas entre ambos cromosomas mostraban frecuencias de recombinación próximas a cero (Figura 4.3).

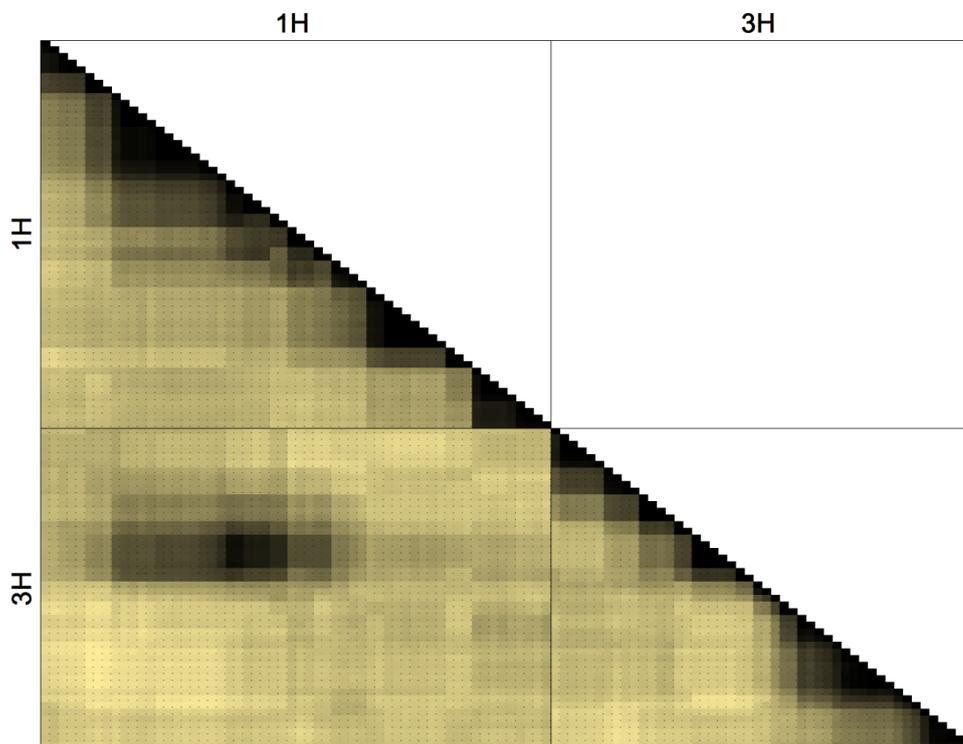


Figura 4.3 Representación gráfica de las frecuencias de recombinación obtenidas entre 108 DArT pertenecientes a los cromosomas 1H y 3H. Las tonalidades mas oscuras se corresponden con frecuencias de recombinación cercanas a 0. Dentro de cada cromosoma los marcadores están ordenados según las distancias de referencia del mapa consenso (Wenzl *et al.* 2006)

Para observar esta zona con mayor detalle se seleccionó una muestra de 37 marcadores de entre los 108 DArT, 17 del cromosoma 1H y 20 del cromosoma 3H, repartidos de la forma más homogénea posible a lo largo de cada cromosoma. En la Figura

4.4 se muestran las frecuencias de recombinación obtenidas entre estos marcadores, junto con una representación gráfica de su localización de referencia en ambos cromosomas. En el caso del cromosoma 1H las frecuencias de recombinación más bajas ($\leq 0,1$) se correspondían con los marcadores localizados en el mapa consenso en torno a los 53-67 cM. En el cromosoma 3H los marcadores con las frecuencias más bajas se situaban alrededor de los 69-72 cM. En ambos cromosomas se trataba de zonas cercanas al centrómero. El punto de corte de la translocación recíproca (TB) se situaría por lo tanto en torno a estas posiciones.

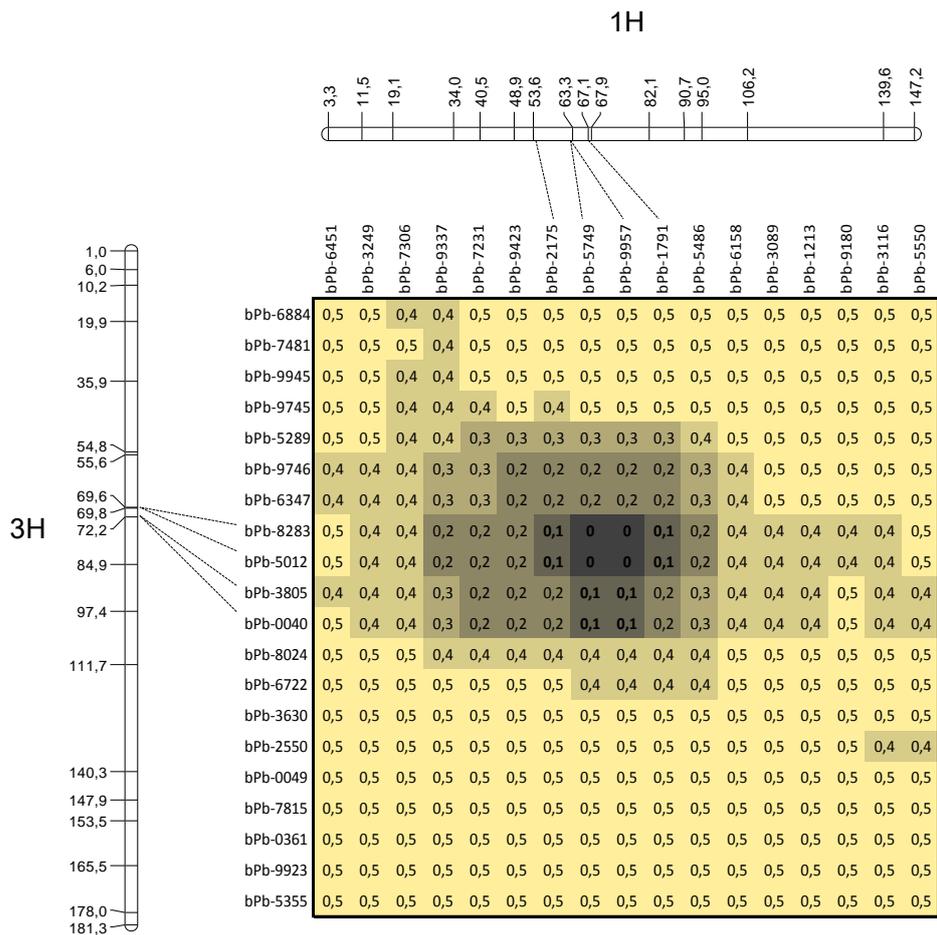


Figura 4.4 Frecuencias de recombinación obtenidas entre 37 DArT seleccionados y representación gráfica de los cromosomas 1H y 3H con éstos marcadores ordenados según las distancias de referencia del mapa consenso (Wenzl *et al.* 2006). Dentro de la tabla de frecuencias aparecen en tonalidades mas oscuras y en negra las frecuencias de recombinación $\leq 0,1$.

Tal y como se apuntaba en la introducción de este capítulo, al abordar la construcción del mapa de ligamiento correspondiente, debíamos barajar diversas hipótesis sobre el resultado:

- Obtención de un grupo de ligamiento en el que los marcadores con frecuencias de recombinación $\leq 0,1$ quedarían intercalados en la zona central. En los brazos se situarían el resto de marcadores: en un brazo los pertenecientes al cromosoma 1H y en el otro los del cromosoma 3H (Jáuregui *et al.* 2001)
- Obtención de un grupo de ligamiento en el que los marcadores con frecuencias de recombinación $\leq 0,1$ quedarían intercalados en la zona central. En los brazos se situarían, también de forma intercalada y sin separación por el cromosoma de procedencia, el resto de marcadores.
- Obtención de más de un grupo de ligamiento con diferentes combinaciones. Esto se comprobaría al realizar de forma repetida la construcción del mapa correspondiente (Livingstone *et al.* 2000; Durrant *et al.* 2006).

Se realizaron 100 mapas de ligamiento incluyendo los 108 marcadores DArT, localizados en los cromosomas 1H y 3H. En todas las repeticiones se utilizó el algoritmo ML de Joinmap[®]4.0. Los DArT, que según la tabla de frecuencias de recombinación, estaban cercanos a TB se subrayaron y se marcaron en negrita para observar fácilmente su posición en cada uno de los mapas elaborados. Tras las 100 repeticiones pudieron diferenciarse hasta seis agrupaciones diferentes. La más frecuente (59%) reunía en dos grupos de ligamiento independientes los brazos cortos de cada cromosoma con los brazos largos del otro cromosoma *i.e.* 1HS-3HL + 3HS-1HL. Manteniendo esta estructura básica de ligamiento se obtenían en realidad dos mapas cuya única diferencia residía en la distribución de los marcadores cercanos al punto de corte de la translocación. En un caso (55%) se localizaban todos en uno de los grupos de ligamiento (Figura 4.5.a) y en el otro (4%) quedaban repartidos entre los dos grupos de forma más equilibrada (Figura 4.5.b). En la siguiente distribución más frecuente (23%), cada brazo corto quedaba ligado con su correspondiente brazo largo, sin embargo, los marcadores localizados en el punto de corte de la translocación del cromosoma 1H se insertaban en la estructura formada por los marcadores del 3H (=3H') (Figura 4.5.c). Una distribución similar, pero con los marcadores cercanos a TB del 3H insertados en la estructura formada por los marcadores del 1H (=1H'), se repetía en un 11% de los mapas obtenidos (Figura 4.5.d). Los cromosomas originales, 1HS-1HL y 3HS-3HL, se obtenían únicamente en un 6% de los

casos (Figura 4.5.e). La distribución menos frecuente (1%) consistía en la unión de los brazos cortos en un grupo de ligamiento y los brazos largos en otro *i.e.* 1HS-3HS + 1HL-3HL (Figura 4.5.f).

Analizando la distribución de los marcadores, en las diferentes estructuras de ligamiento obtenidas, se observaba que:

- La distribución y ordenación de los marcadores que integraban cada uno de los brazos 1HS, 1HL, 3HS y 3HL hasta la zona del punto de corte de la translocación, permanecía constante en todos los mapas obtenidos. Cada uno de estos brazos se comportaba como un bloque compacto con la capacidad de unirse a cualquiera de los otros bloques, aunque no con la misma probabilidad.
- La distribución y localización de los marcadores situados en torno al punto de corte de la translocación (siete del cromosoma 1H y cinco del cromosoma 3H) no seguía en estos mapas un patrón fijo. En algunas distribuciones permanecían estrechamente ligados entre si mientras que en otras se repartían entre los dos grupos obtenidos.

En la Figura 4.6 se muestra el mapa que, según estos resultados, representaría mejor la relación de ligamiento entre los cromosomas 1H y 3H en el cruzamiento Albacete × Plaisant. Las distancias del mapa consenso utilizadas para determinar el punto inicial y final de cada brazo cromosómico y para acotar la zona cercana al punto de corte de la translocación recíproca se especifican en la Tabla 4.3. Para la ordenación de los marcadores dentro de cada brazo cromosómico se utilizó ML. Posteriormente se recalcularon las distancias finales con Kosambi. La longitud obtenida en el brazo 1HS era ligeramente inferior a la longitud del mapa consenso (aproximadamente un 1%). En el resto de brazos cromosómicos se obtuvo una longitud superior a la de referencia; entre un 7% en el caso del 3HS y un 44% en el 1HL. Estos dos brazos eran los que incluían el menor y el mayor número de marcadores, 16 y 30, respectivamente. La menor densidad de marcadores se obtenía en el brazo 3HL con un marcador cada 5 cM mientras que el brazo mas saturado era el 1HS con un marcador por cada 2,3 cM (Tabla 4.3). El intervalo mayor, con 36 cM, se localizaba en la parte distal del brazo 1HL.

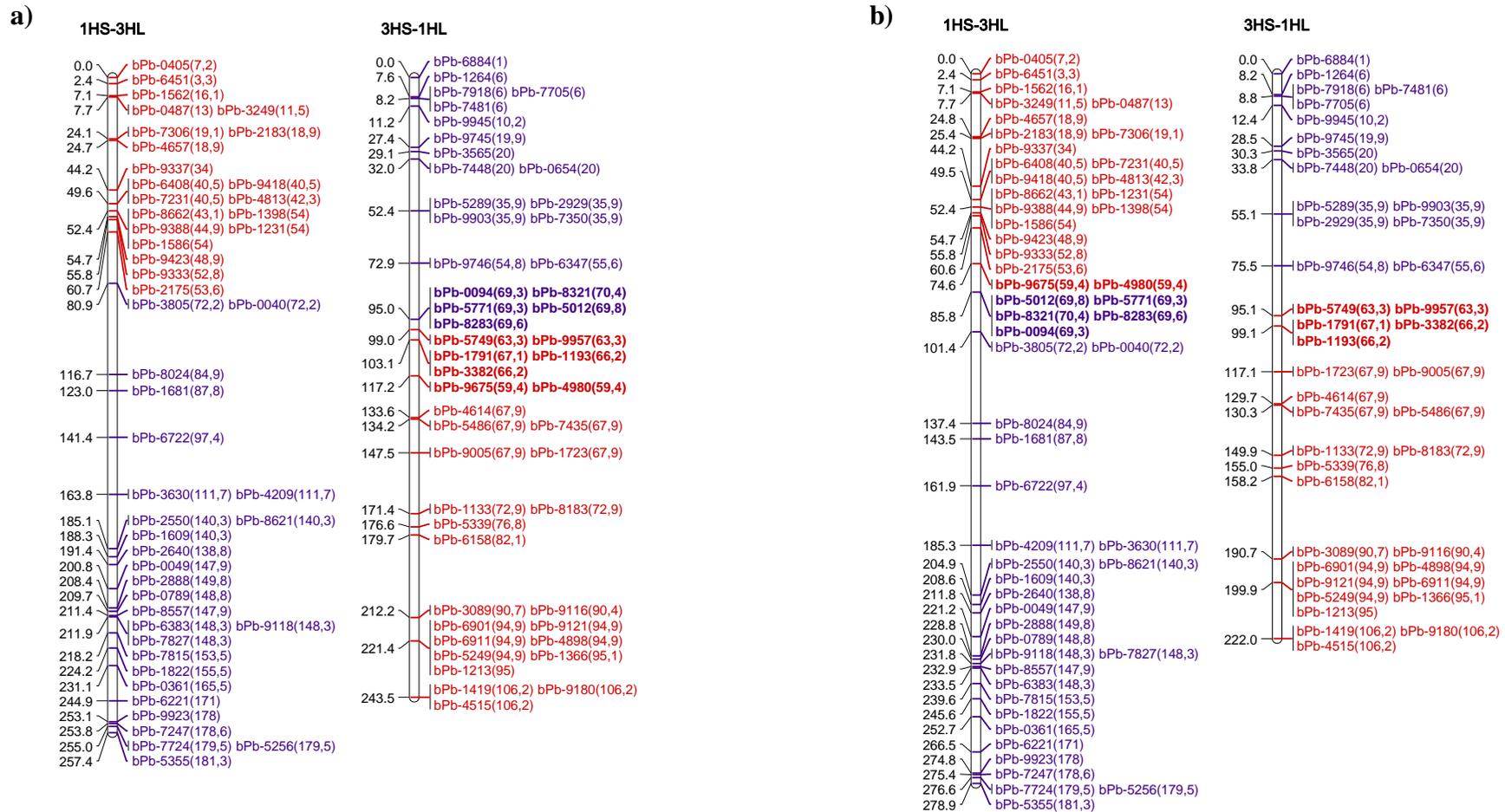


Figura 4.5. Mapas obtenidos tras 100 repeticiones con 108 DaT de los cromosomas 1H (en rojo) y 3H (en azul). Los marcadores cercanos al punto de translocación (TB) aparecen en negrita y subrayados. En cada marcador aparece entre paréntesis su posición en el mapa consenso (Wenzl et al. 2006); a) 1HS-3HL + 3HS-1HL con todos los marcadores cercanos a TB reunidos en 3HS-1HL (55%); b) 1HS-3HL + 3HS-1HL con los marcadores cercanos a TB repartidos entre los dos grupos de ligamiento (4%); c) 1HS-1HL + 3HS-3HL con marcadores de 3H insertados entre 1HS y 1HL (11%); d) 1HS-1HL + 3HS-3HL con marcadores de 1H insertados entre 3HS y 3HL (23%); e) 1HS-1HL + 3HS-3HL (6%); f) 1HS-3HS + 1HL-3HL (1%).

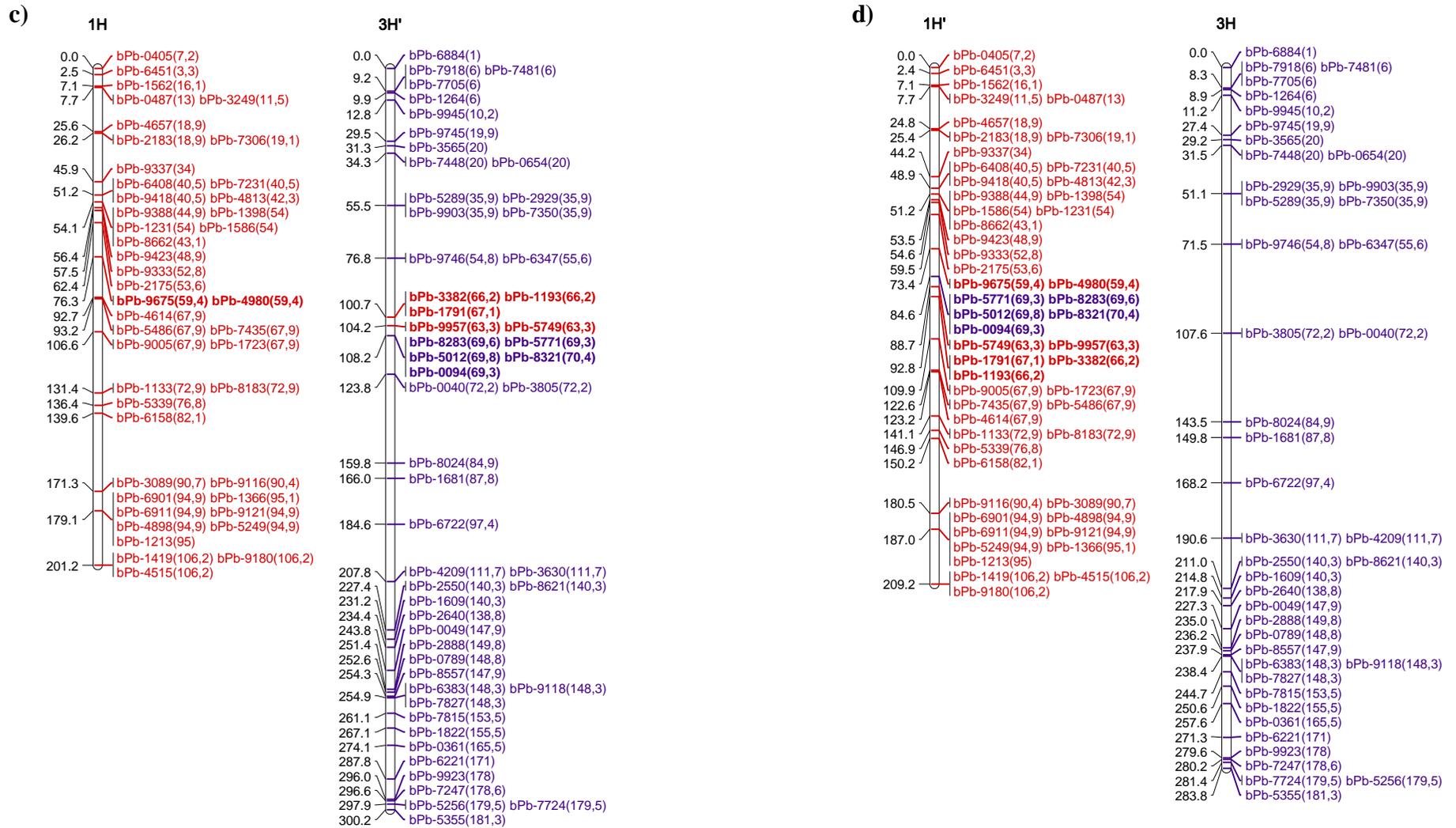


Figura 4.5 (Continuación)

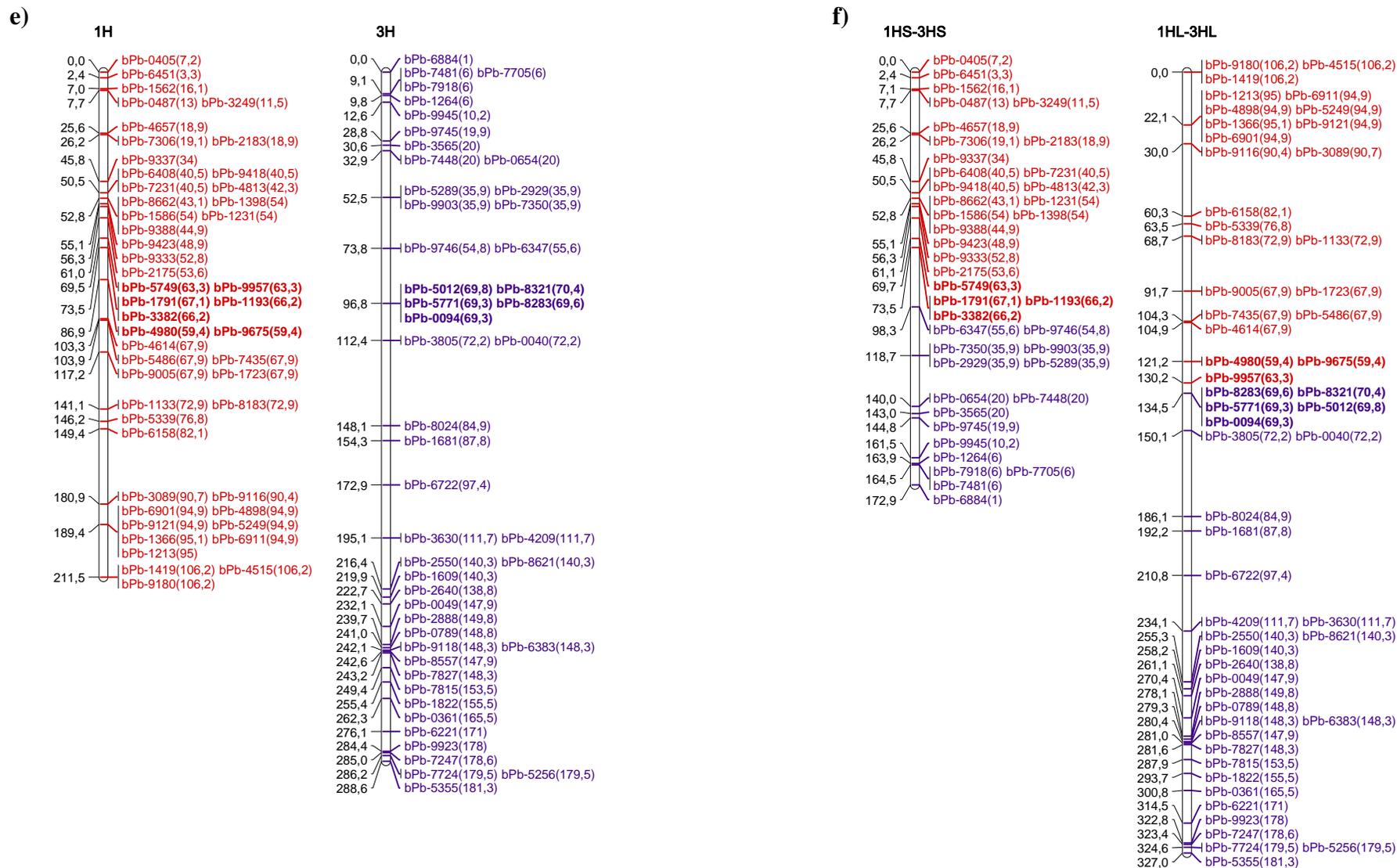


Figura 4.5 (Continuación)

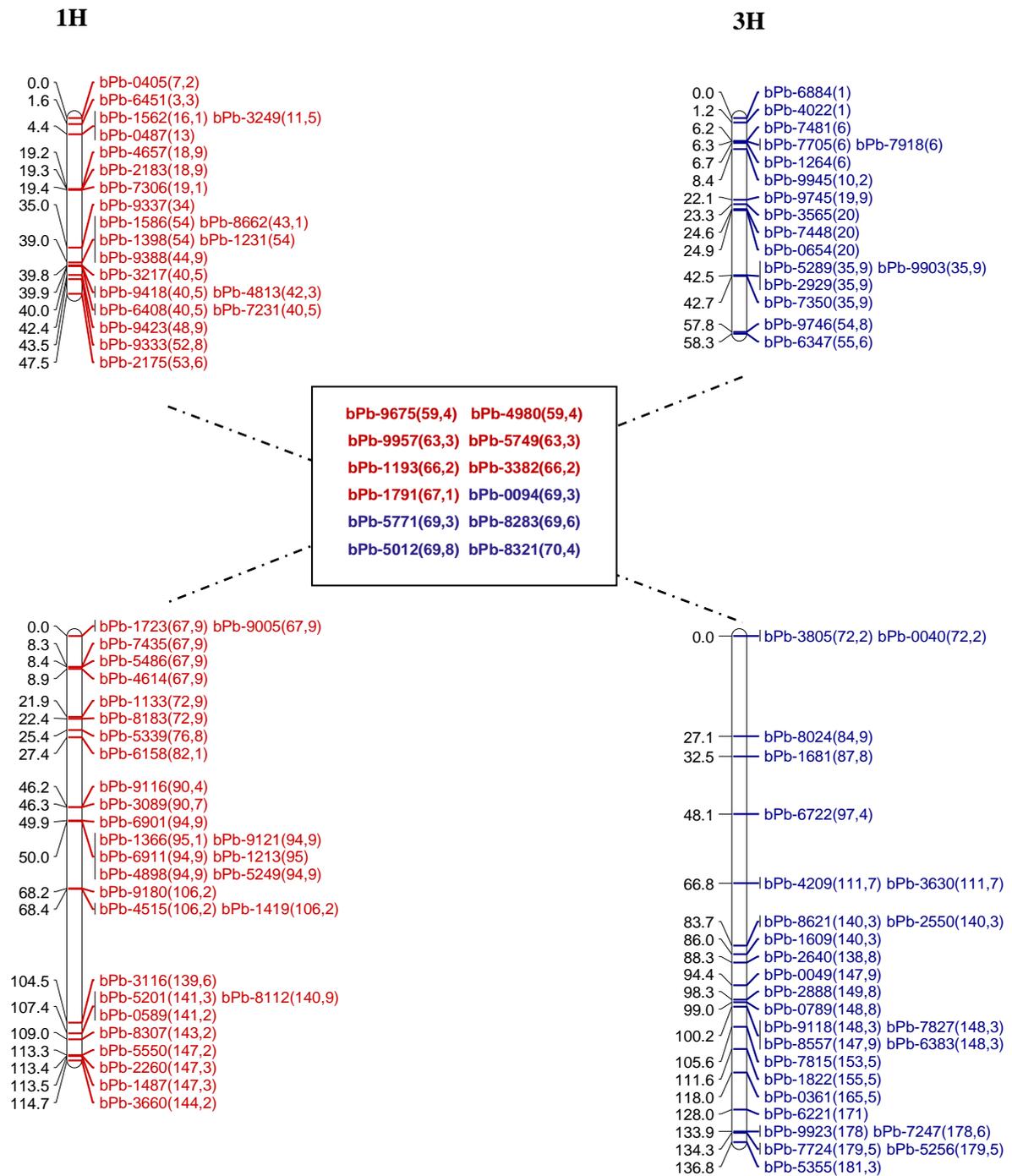


Figura 4.6 Mapa de ligamiento de los cromosomas 1H y 3H. Cada uno de los grupos se corresponde con un brazo cromosómico. En el cuadro central aparecen los marcadores de ambos cromosomas que no pueden asignarse a ningún brazo concreto. Las líneas discontinuas representan la posibilidad de ligamiento dos a dos entre los diferentes brazos incluyendo en el grupo resultante alguno de los marcadores del cuadro central, todos o ninguno. Las distancias genéticas de los brazos cromosómicos están expresadas en cM según la función de mapa Kosambi. En cada marcador aparece entre paréntesis su posición en el mapa consenso (Wenzl et al. 2006).

Tabla 4.3 Distribución de marcadores en los cromosomas 1H y 3H, longitud de los brazos cromosómicos y localización del punto de translocación según las posiciones de referencia del mapa consenso.

	<i>1HS</i>	<i>1H-TB</i>	<i>1HL</i>	<i>3HS</i>	<i>3H-TB</i>	<i>3HL</i>
Nº de marcadores	21	7	30	16	5	27
Longitud (cM)	47,5	-	114,7	58,3	-	136,8
Distancia promedio entre marcadores (cM)	2,3	-	3,8	3,6	-	5,1
Intervalo mayor (cM)	15,6	-	36,1	17,6	-	27,1
Posición en mapa consenso (cM)	3,3-54	54-67,9	67,9-147,3	1-55,6	55,6-72,2	72,2-181,3
Longitud en mapa consenso (cM)	50,7	13,9	79,4	54,6	16,6	109,1
Long. AxP / Long. Consenso	0,94	-	1,44	1,07	-	1,25

4.3.2.2. Construcción del mapa de ligamiento de los cromosomas no implicados en la translocación recíproca.

El mapa de ligamiento de los cromosomas no implicados en la translocación recíproca se realizó con los grupos obtenidos a LOD 5: siete grupos de ligamiento que incluían un total de 289 marcadores DArT, todos ellos de posición conocida en el mapa de referencia (Wenzl et al., 2006). Como se ha comentado anteriormente cada uno de los cromosomas 2H, 6H y 7H estaban formados por un único grupo de ligamiento mientras que los marcadores pertenecientes a los cromosomas 4H y 5H se distribuían en cuatro grupos de ligamiento: 4HS, 4HL, 5HS y 5HL. La ordenación de los marcadores en cada grupo se realizó utilizando el algoritmo ML de JoinMap®4.0. Posteriormente se recalcularon las distancias con Kosambi. Los marcadores pertenecientes al brazo largo del cromosoma 4H se dividieron finalmente en dos grupos: 4HL₁ y 4HL₂. El resultado se muestra en la Figura 4.7 y en la Tabla 4.4.

Los 289 marcadores pertenecientes a estos cinco cromosomas cubrían una longitud total de 1.008,1 cM, lo que suponía una densidad media de un marcador cada 3,5 cM. Esta longitud de mapa era un 30% superior que la del mapa consenso (798,9 cM). Las longitudes de cada cromosoma oscilaban entre los 164 cM de los cromosomas 4H y 6H y los 255 cM del cromosoma 2H; un 10% y un 60% superiores, respectivamente, a las del mapa consenso. El cromosoma 2H era el que presentaba un mayor número de marcadores (91), con una densidad media de un marcador cada 2,8 cM, y el cromosoma 4H el que menos, con 22 marcadores y una densidad de 7,4 cM. Este cromosoma presentaba también

el intervalo mayor (48cM), aunque en todos los grupos se observaba al menos un intervalo superior a 30cM.

Tabla 4.4 Distribución de marcadores y longitud de los cromosomas no implicados en la translocación

	2H	4H	5H	6H	7H
Nº de marcadores	91	22	47	57	72
Longitud (cM)	255,9	163,7	227,4	163,6	197,5
Distancia promedio entre marcadores (cM)	2,8	7,4	4,8	2,9	2,7
Intervalo mayor (cM)	33,7	48,0	32,0	33,0	32,5
Nº de intervalos \geq 30cM	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0
Longitud en mapa consenso (cM)	162,1	145,1	187,0	144,0	160,7
Long. AxP / Long. Consenso	1,6	1,1	1,2	1,1	1,2

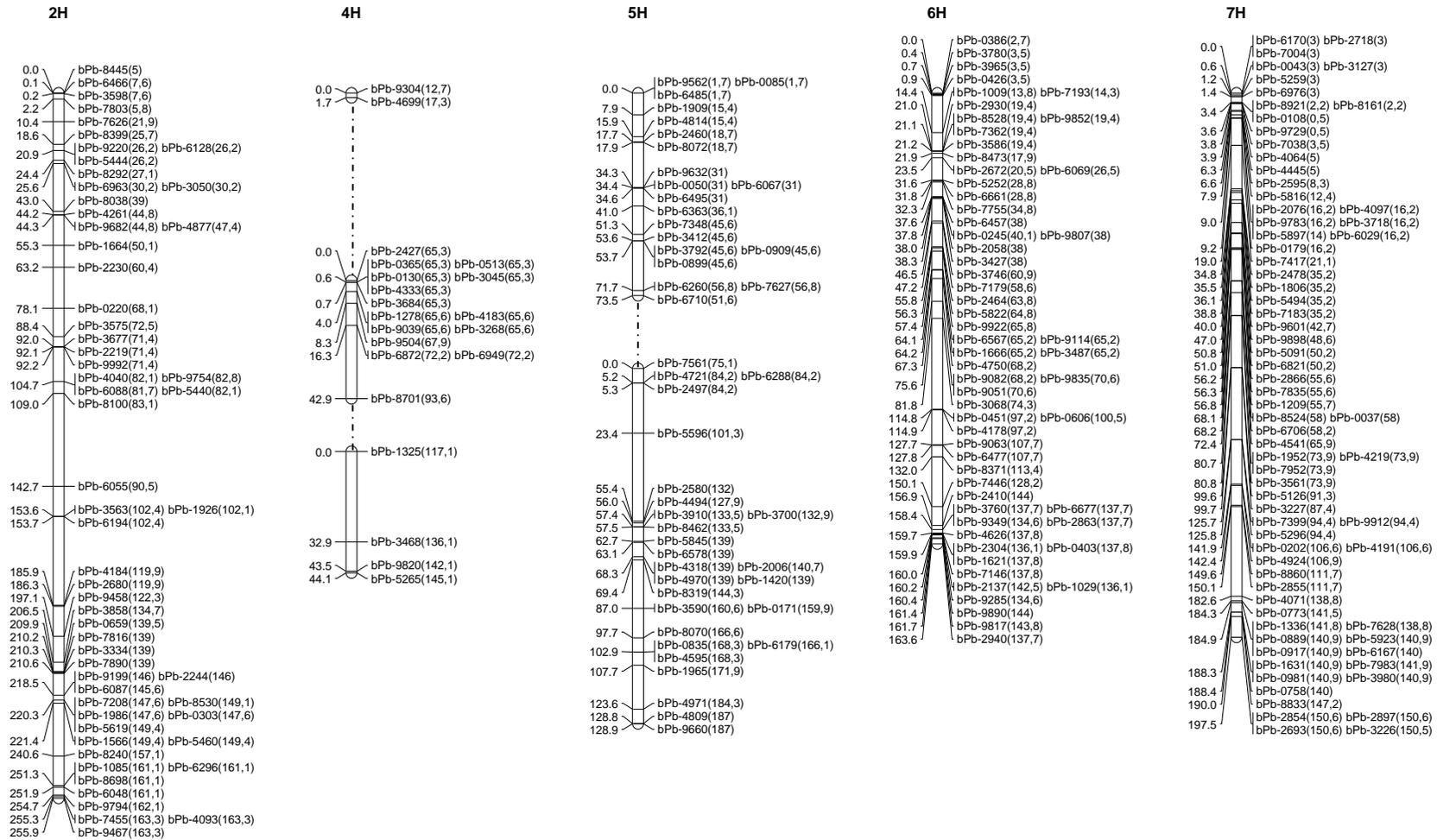


Figura 4.7 Mapa de ligamiento de los grupos no implicados en la translocación recíproca. Los cromosomas están orientados con el brazo corto en la parte superior y las distancias genéticas están expresadas en cM según la función de mapa Kosambi. En cada marcador aparece entre paréntesis su posición en el mapa consenso y las distancias entre los grupos de ligamiento son proporcionales a las distancias del mapa consenso tomado como referencia (Wenzl et al. 2006).

4.3.3. DISTORSIÓN DE LA SEGREGACIÓN

La distorsión de la segregación observada en el conjunto de 367 marcadores localizados en el mapa apenas superaba el 17% ($p < 0,01$). El 33% de los marcadores con distorsión (21 marcadores) se localizaban en dos regiones del cromosoma 5H. Una en el 5HS, con 13 marcadores, a 34-73cM según el mapa obtenido en el cruzamiento de Albacete \times Plaisant, y la segunda, en el 5HL a 97-128cM, con ocho marcadores. En ambas regiones la distorsión se producía a favor del alelo de Plaisant (Tabla 4.5)

En el cromosoma 7H se observaron también dos importantes regiones con distorsión: una entre 9-56 cM con 13 marcadores (21%) que mostraban distorsión a favor de Plaisant y otra, de menor extensión entre los 190-197 cM con 5 marcadores (8%) distorsionados a favor de Albacete.

El cromosoma 4H presentaba 16 marcadores con distorsión (25%) que se repartían también en dos regiones: una, con 14 marcadores distorsionados a favor de Plaisant en el grupo 4HL₁ (0-16cM) y una segunda, con sólo dos marcadores distorsionados a favor de Albacete, localizada en el 4HL₂ (43-44cM).

De los restantes marcadores, cinco se localizaban en el brazo largo del cromosoma 3H (27-67cM), con distorsión a favor del alelo de Albacete, y los dos últimos, favorables al alelo de Plaisant, en el brazo largo del 1H.

Tabla 4.5 Número de marcadores distorsionados y su posición en el mapa de Albacete \times Plaisant. Se incluye también el bin donde se localizarían los marcadores distorsionados

<i>Grupo de ligamiento</i>	<i>Nº de marcadores con distorsión</i>	<i>Posición en el mapa AxP (cM)</i>	<i>Bin</i>	<i>Dirección de la distorsión</i>
1HL	2	0	8	P
3HL	5	27-67	7-11	A
4HL ₁	14	0-16	6	P
4HL ₂	2	43-44	12-13	A
5HS	13	34-73	2-6	P
5HL	8	97-128	13-15	P
7H	13	9-56	2-5	P
	5	190-197	12	A

4.3.4. OBTENCIÓN DE UN MAPA SATURADO DEL CRUZAMIENTO ALBACETE × PLAISANT INCLUYENDO MARCADORES DArT Y SSR

La obtención de un mapa saturado que integrase todos los marcadores analizados se realizó en varias etapas:

- Se obtuvo un mapa de ligamiento con todos los marcadores DArT, incluyendo los DArT de posición desconocida descartados en el análisis inicial.
- Se construyó un “mapa puente” que incorporaba los marcadores SSR y DArT. Este mapa se realizó con la sub-población AP1, es decir, las 92 líneas doble haploides que habían sido genotipadas con todos los marcadores disponibles.
- Se obtuvo un único mapa a partir de estos dos utilizando la función disponible en JoinMap4.0 “*Combine Groups for Map Integration*”.

En el análisis de ligamiento con todos los marcadores DArT se obtuvieron, con un LOD=5, ocho grupos de ligamiento. Tres de ellos se correspondían con los cromosomas 2H, 6H y 7H. Los cromosomas 4H y 5H estaban divididos en cuatro grupos de ligamiento que se correspondían con sus brazos cromosómicos: 4HS, 4HL, 5HS y 5HL. El octavo grupo incluía los marcadores correspondientes a los cromosomas 1H y 3H.

En el análisis de ligamiento con los marcadores SSR y DArT, en la sub-población AP1, se obtuvieron, con un LOD=4, ocho grupos de ligamiento. Cuatro de ellos se correspondían con los cromosomas 2H, 5H, 6H y 7H. El cromosoma 4H aparecía dividido en dos grupos: 4HS y 4HL. Los marcadores correspondientes a los cromosomas 1H y 3H formaban, como en anteriores análisis, un solo grupo. Únicamente los marcadores del extremo distal del brazo 1HL se desligaban y formaban, en este caso, un grupo independiente.

La integración de los grupos obtenidos en ambos análisis daba como resultado un total de 572 marcadores (57 SSR y 515 DArT) distribuidos en siete grupos de ligamiento. Cuatro de los grupos se correspondían con los cromosomas 2H, 5H, 6H y 7H. El cromosoma 4H quedaba dividido en dos grupos y el grupo restante incluía todos los marcadores de los cromosomas 1H y 3H. Para la realización del mapa de estos dos últimos cromosomas se separaron 25 marcadores cercanos al punto de translocación (Tabla 4.6) y se dividió cada cromosoma en sus brazos correspondientes: 1HS, 1HL, 3HS y 3HL. De

estos 25 marcadores, diez estaban localizados en el cromosoma 1H a 59,4-67,1 cM y otros nueve en el 3H a 66,2-70,4 cM, según la información del mapa de referencia (Wenzl et al., 2006). De los seis restantes, uno (HVM27) estaba localizado en el cromosoma 3H a 51 cM, entre los marcadores Bmag0006 y Bmag0136, a 50 y 52 cM respectivamente (Varshney et al., 2007). Los cinco restantes eran marcadores desconocidos pero mostraban un estrecho ligamiento con todo el grupo.

Tabla 4.6 Marcadores cercanos al punto de corte de la translocación recíproca. Las posiciones que se especifican son las del mapa de referencia (Wenzl et al., 2006).

<i>1H</i>		<i>3H</i>		<i>Cromosoma no determinado</i>	
<i>Marcador</i>	<i>Posición</i>	<i>Marcador</i>	<i>Posición</i>	<i>Marcador</i>	<i>Posición</i>
bPb-9675	59,4	Bmac0067	66,2	bPb-0301	-
HVM20	59,4	Bmag0136	66,2	CloneID220814	-
bPb-4980	59,4	Bmac0209	66,5	CloneID221321	-
EBmac0501	60,7	HVM27 ⁽¹⁾	-	CloneID222624	-
bPb-5749	63,3	Bmag0006	67,2	CloneID223055	-
bPb-9957	63,3	bPb-5771	69,3		
Bmac0090	63,9	bPb-0094	69,3		
bPb-1193	66,2	bPb-8283	69,6		
bPb-3382	66,2	bPb-5012	69,8		
bPb-1791	67,1	bPb-8321	70,4		

(1) HVM27 no está posicionado en Wenzl et al. (2006), sin embargo, según Varshney et al. (2007) se localiza en el cromosoma 3H a 51 cM, entre los SSR Bmag0136 y Bmag0006.

Para la ordenación de los marcadores y el cálculo de distancias en los grupos integrados se utilizó el algoritmo de regresión seleccionando Kosambi como función de mapa. El mapa final obtenido se muestra en la Tabla 4.7 y Figura 4.8. Los 547 marcadores que incluía el mapa final integrado cubrían una longitud de 1332,8 cM, con una densidad de 2,4 cM. Esta longitud de mapa representaba un 18% más que la longitud del mapa consenso de referencia (Wenzl et al., 2006). El rango de las longitudes individuales de los grupos iba desde los 49 cM del 1HS a los 241 cM del cromosoma 2H. El cromosoma 7H era el que presentaba un mayor número de marcadores (105), con una densidad de 1,8 cM, y el 3HS el que menos (25), con una densidad de 2,4. Únicamente los grupos 1HL, 4H y 7H seguían presentando al menos un intervalo de 30 cM o superior. En el resto de grupos estos intervalos se habían reducido a menos de 30 cM. En el caso del cromosoma 5H el intervalo más grande se redujo hasta aproximadamente la mitad (15,7 cM).

Tabla 4.7 Distribución de marcadores y longitudes del mapa final del cruzamiento Albacete × Plaisant

	<i>1HS</i>	<i>1HL</i>	<i>2H</i>	<i>3HS</i>	<i>3HL</i>	<i>4H</i>	<i>5H</i>	<i>6H</i>	<i>7H</i>
Nº total de marcadores	31	36	101	25	41	41	77	90	105
SSR	2	3	9	3	8	7	8	4	5
DArT	29	33	92	22	33	34	69	86	100
Longitud en AxP (cM)	49,1	112,6	240,9	58,9	132,8	158,6	223,0	162,8	194,2
Distancia promedio entre marcadores (cM)	1,6	3,1	2,4	2,4	3,2	3,9	2,9	1,8	1,8
Intervalo mayor (cM)	10,7	36,2	28,8	17,7	20,2	48	15,7	23,6	32,5
Longitud Consenso (cM)	54,0	79,4	163,0	55,6	109,1	145,1	187,0	144,0	160,7
Long. AxP / Long. Consenso	0,91	1,42	1,48	1,06	1,22	1,09	1,19	1,13	1,21

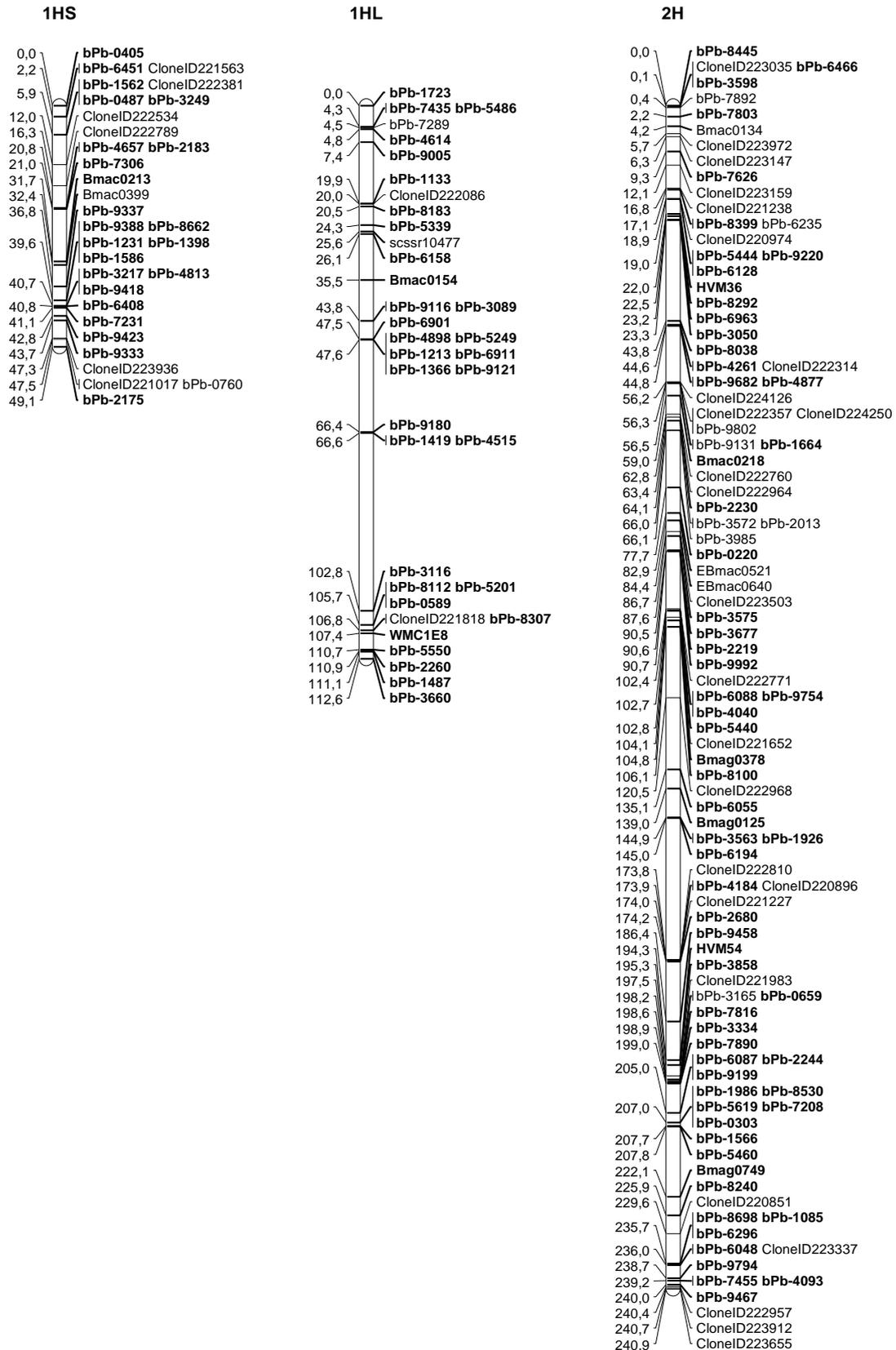


Figura 4.8 Mapa de ligamiento del cruzamiento Albacete × Plaisant con 49 SSR (subrayados) y 498 DArT. Las distancias genéticas están expresadas en cM según la función de mapa Kosambi. Los marcadores que aparecen en negrita son marcadores localizados en el mapa consenso de referencia (Wenzl et al. 2006).

4. Caracterización genética

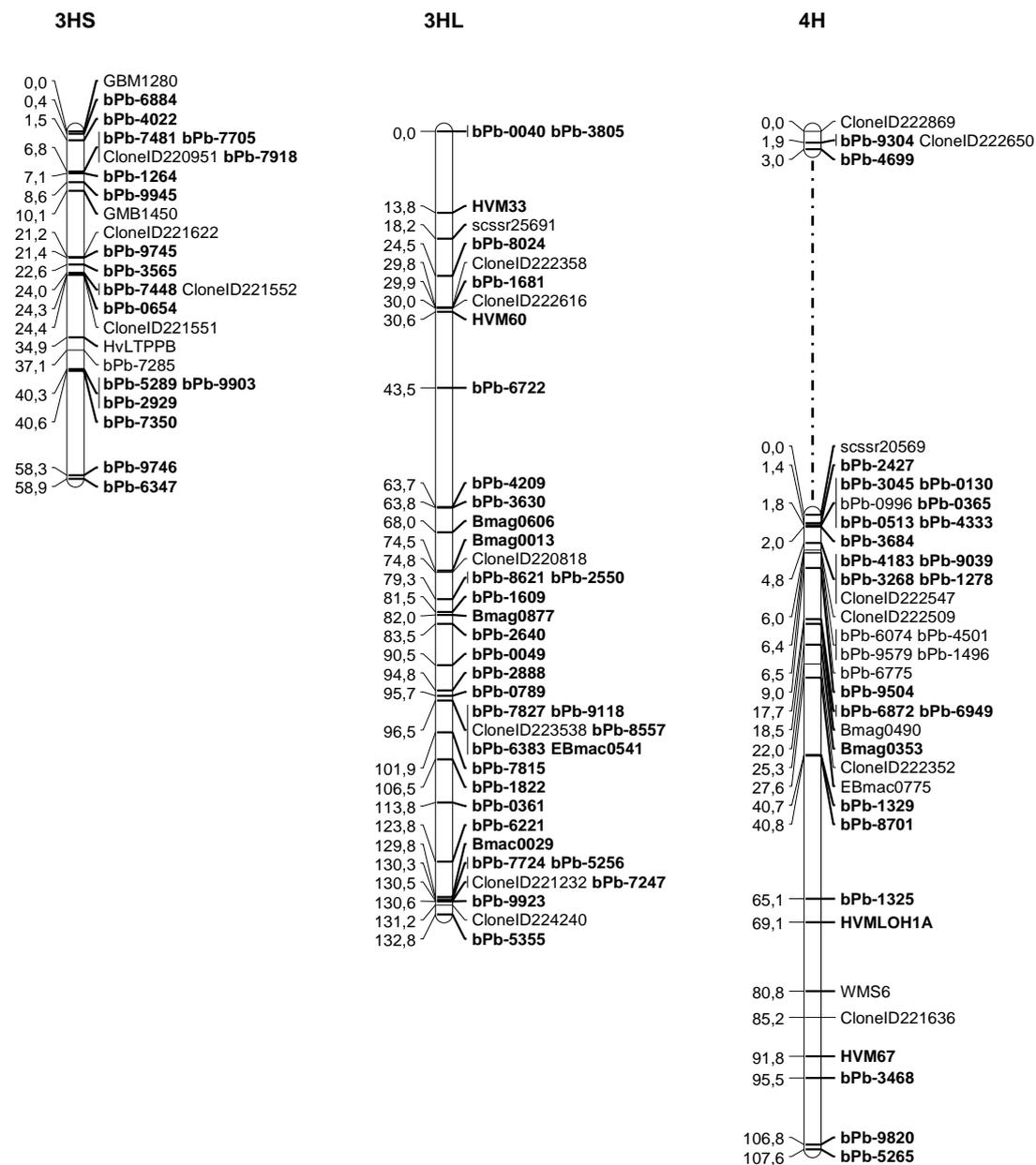


Figura 4.8 (Continuación)

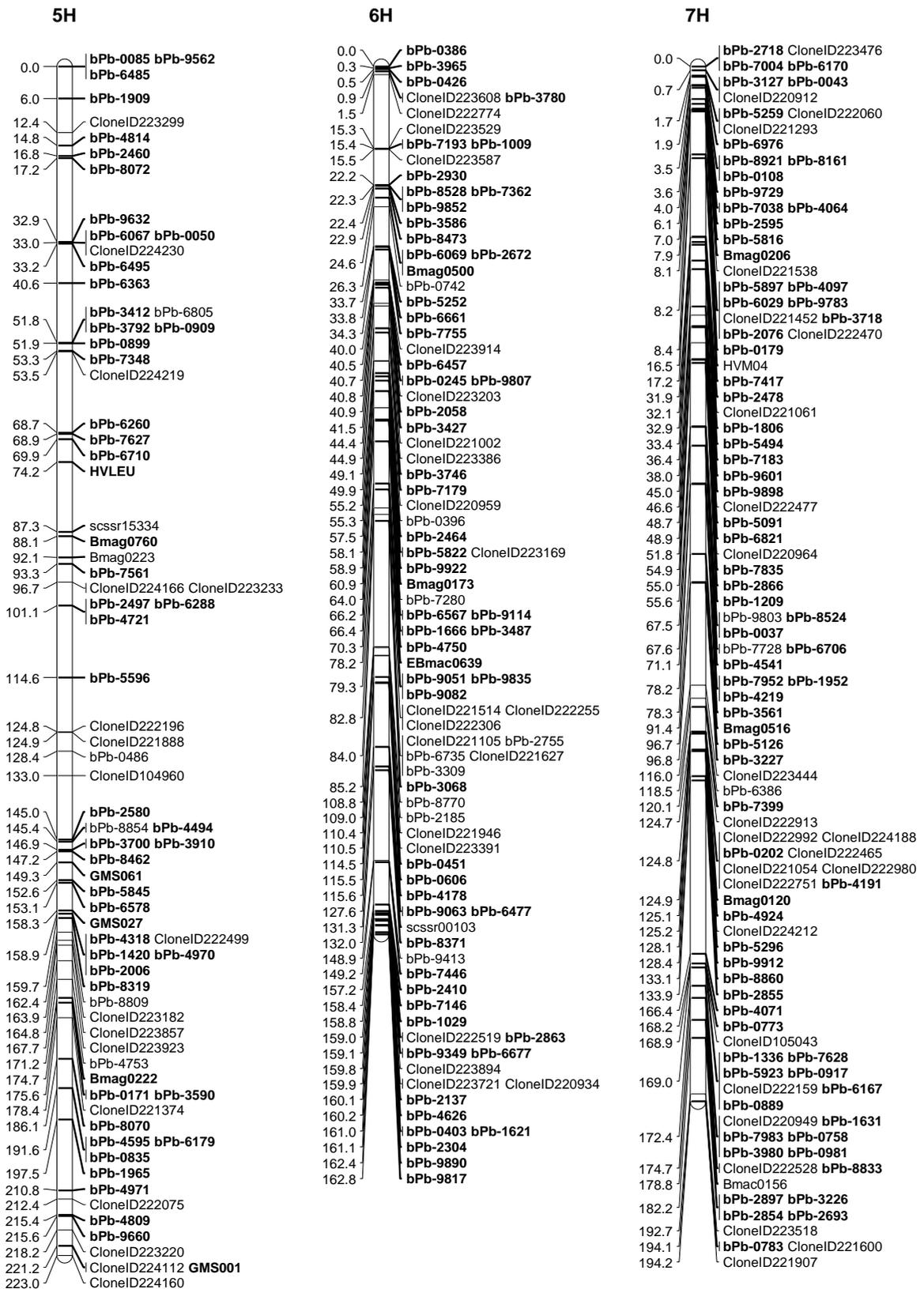


Figura 4.8 (Continuación)

4.4. DISCUSIÓN

La caracterización genética de la población doble haploide procedente del cruzamiento de Albacete, variedad de cebada portadora de la translocación recíproca, y Plaisant, con una organización cromosómica “normal”, se realizó en varias etapas en función de la disponibilidad, tanto de material vegetal, como de marcadores moleculares adecuados. Inicialmente se realizó un análisis genotípico de 92 líneas doble haploides. Se utilizaron para ello marcadores SSR, de polimorfismo conocido en Albacete × Plaisant, y localizados en diferentes mapas de cebada (Ramsay *et al.* 2000; Varshney *et al.* 2007). En el año 2006 se publicó un nuevo mapa consenso que incluía marcadores tipo DArT y SSR (Wenzl *et al.* 2006). Paralelamente, la población de doblehaploides se incrementó con la incorporación de 89 líneas nuevas. Todo esto permitió una mejor caracterización genética del conjunto de la población, la obtención de un mapa saturado que integraba marcadores SSR y DArT y la identificación de los cromosomas implicados en la translocación recíproca.

Se utilizaron un total de 60 SSR y 545 DArT para caracterizar una población doble haploide de 181 líneas. Se realizaron diversos mapas de ligamiento hasta llegar a la construcción de un mapa final saturado que incluía 57 SSR y 498 DArT. En el proceso de construcción de este mapa se identificaron los cromosomas implicados en la translocación recíproca y se localizó en cada cromosoma la zona del punto de corte de dicha translocación.

Los análisis de ligamiento realizados con los diferentes tipos de marcadores dieron como resultado entre siete y catorce grupos de ligamiento. En todos los casos uno de estos grupos incluía marcadores del cromosoma 1H y 3H. El resto de los grupos se correspondían en su totalidad o en parte con los cromosomas 2H, 4H, 5H, 6H y 7H. El pseudoligamiento observado entre los marcadores de los cromosomas 1H y 3H se atribuyó a la presencia de la translocación recíproca (Tadmor *et al.* 1987; Benito *et al.* 1994; Jáuregui *et al.* 2001). Al estudiar detalladamente la relación de ligamiento en este grupo se observaron frecuencias de recombinación $\leq 0,1$ entre marcadores de los dos cromosomas. Los marcadores con estas frecuencias de recombinación se situaban, según las posiciones del mapa de referencia (Wenzl *et al.* 2006), a 63,3-67,9 cM en el cromosoma 1H y a 69,6-72,2 cM en el cromosoma 3H.

La construcción repetida (n=100) del mapa de ligamiento correspondiente a estos dos cromosomas mostró diferentes combinaciones con un patrón común: la conservación de los cuatro brazos cromosómicos (1HS, 1HL, 3HS y 3HL) hasta posiciones cercanas a los marcadores con frecuencias de recombinación $\leq 0,1$ entre ambos cromosomas. Los brazos cromosómicos se unían entre ellos con cualquier combinación, aunque no todas las combinaciones tenían igual probabilidad: 1HS-3HL/3HS-1HL era la más probable (59%) mientras que 1HS-3HS/1HL-3HL era la más improbable (1%). Los marcadores de ambos cromosomas situados cerca del centrómero se distribuían de forma irregular en las diferentes combinaciones, sin que pudiera determinarse el brazo cromosómico al que pertenecía cada marcador en el caso de los cromosomas translocados. La posición exacta del punto de corte de la translocación no ha podido, por lo tanto, determinarse con este trabajo pero si se puede afirmar que se localiza entre 54-67,9 cM en el caso del cromosoma 1H y entre 55,6-72,2 cM en el cromosoma 3H. En el mapa final del cruzamiento Albacete \times Plaisant se representan los brazos cromosómicos de forma independiente puesto que son los que se mantienen inalterables en todas las líneas doble haploides, sean o no portadoras de la translocación recíproca.

Los grupos de ligamiento obtenidos con esta población (incluyendo los brazos 1HS, 1HL, 3HS y 3HL hasta la zona de la translocación recíproca) mostraban una alta homología en su composición y ordenación con los cromosomas del mapa consenso de referencia (Wenzl et al. 2006). Sin embargo, la longitud observada, era superior a la de referencia en todos los casos excepto en 1HS. Grupos como 1HL y 2H eran aproximadamente un 45% más largos que sus homólogos en el mapa de referencia. En general la longitud de los brazos cortos se conserva en todos los grupos mientras que en los brazos largos se observa un aumento de longitud, tanto más cuanto más largo es el cromosoma. En este trabajo se han utilizado algunas de las herramientas empleadas en Wenzl et al. (2006) para mejorar la calidad de los datos obtenidos, como el conjunto de *Perl Scripts*, sin embargo, los parámetros de exclusión de marcadores o líneas no han sido probablemente tan estrictos. Tampoco se han colapsado marcadores cosegregantes, paso que parece reducir sustancialmente la longitud de los mapas saturados.

La densidad de marcadores observada es ligeramente inferior a la de los mapas utilizados como referencia (Varsney et al. 2007; Wenzl et al. 2006). Así mismo, también los intervalos son más numerosos y en general de mayor tamaño. Llama especialmente la

atención la total falta de polimorfismo en un gran intervalo (48 cM) en el cromosoma 4H. Hay que considerar, sin embargo, que los mapas utilizados como referencia son la integración de los diferentes mapas obtenidos con varias poblaciones y no el resultado del análisis molecular de una única población como en el presente trabajo.

La distorsión de la segregación observada (17%) es ligeramente inferior a la de la población DH procedente del cruzamiento de Plaisant \times Orria. No parece, por lo tanto, que la presencia de la translocación recíproca altere lo que se podría considerar una distorsión “normal” en poblaciones doble haploides. En cuanto a las regiones distorsionadas, las de los cromosomas 3H, 4H y 7H se localizan en zonas similares en ambas poblaciones. Según esto, la utilización de una población doble haploide, para la caracterización de la translocación recíproca presente en Albacete, parece una opción perfectamente válida.

Como conclusión de este capítulo podemos decir que la translocación observada en la variedad Albacete implica a los cromosomas 1H y 3H. La posición del punto de corte de dicha translocación se sitúa aproximadamente a 61 ± 7 cM (Bin 6-8) en el cromosoma 1H y entorno a los 64 ± 8 cM (Bin 5-6) en el 3H. Las posiciones indicadas son las del mapa de ligamiento utilizado como referencia para este trabajo (Wenzl et al. 2006) y, en ambos casos, se encuentran próximas al centrómero.

5. CARACTERIZACIÓN CITOLÓGICA DE LA TRANSLOCACIÓN RECÍPROCA

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. MAPAS GENÉTICOS Y MAPAS FÍSICOS

Para que un mapa genético sea realmente útil es necesario establecer la correspondencia con el mapa físico del organismo analizado, especialmente en genomas de gran tamaño como es el caso de la cebada. Si asumimos una densidad de ADN y una tasa de recombinación constantes a lo largo de los cromosomas, la ratio Mb/cM para cebada sería aproximadamente de 4,5 (5.350Mb/1200cM). Sin embargo, la tasa de recombinación no es uniforme, presentando las zonas proximales una ausencia casi total de recombinación mientras que en las zonas distales se aprecia una tasa muy alta (Pedersen et al. 1995). Künzel et al. (2000) demostraron que las zonas de alta tasa de recombinación representan únicamente un 4,9% del genoma total de cebada, y en ellas, la ratio Mb/cM es $\leq 0,1$. Mediante técnicas de microdissección de cromosomas translocados, cuyo punto de translocación estaba físicamente localizado mediante bandeado-N y medidas de longitud de cromosomas, y utilizando marcadores RFLPs (mapa de Igri x Franka; Graner et al. 1991, Graner y Bauer, 1993), consiguieron relacionar distancias físicas y genéticas en los siete cromosomas de cebada. Sus resultados muestran también que marcadores que cosegregan en los mapas genéticos en zonas centroméricas se localizan en realidad en zonas distales de ambos brazos cromosómicos, separados por amplias zonas en las que la recombinación es prácticamente inexistente. En esta misma línea, pero utilizando otro tipo de marcadores como AFLPs o SSRs, existen trabajos que establecen relación entre mapas genéticos y físicos en los cromosomas de cebada 3H (Künzel y Waugh 2002), 7H (Serizawa et al. 2001) y en el brazo largo del cromosoma 1H (Taketa et al. 2002)

5.1.2. ANÁLISIS DEL CARIOTIPO

Los cromosomas de células eucariotas en metafase tienen una morfología determinada i.e. su tamaño, posición del centrómero y la presencia o ausencia de constricción secundaria son características de cada cromosoma (Schwarzacher 2003). Durante años, el estudio cariotípico de las diferentes especies se ha basado en la determinación del número, longitud total y longitud de los brazos de los cromosomas en metafase. Estas observaciones, así como la identificación de los cromosomas con constricciones secundarias y satélites, son muy útiles en estudios de filogenia y pueden

realizarse con tinciones simples. Estas características, sin embargo, pueden resultar insuficientes en especies donde la longitud de los cromosomas sea similar o no exista apenas diferencia entre los brazos cromosómicos. Por otra parte el procedimiento experimental empleado para obtener las preparaciones cromosómicas puede distorsionar estas medidas considerablemente (Leitch y Heslop-Harrison 1993).

En cebada, el cromosoma 1H, con una ratio (brazo largo/brazo corto) de aproximadamente 1,4 es el más pequeño por lo que suele reconocerse sin demasiada dificultad. Los cromosomas 5H y 6H, con ratios de 2 y 1,6 respectivamente, tienen una morfología muy diferente del resto, debido a la presencia de satélites, por lo que su identificación también es sencilla. El resto de cromosomas 2H, 3H, 4H y 7H son difíciles de identificar con tinciones simples. (Singh 2003).

Las técnicas de tinción diferencial Giemsa, en especial las bandas C y bandas N contribuyeron en gran medida a la identificación de todos los cromosomas de cebada. El cromosoma 2H parece ser el mayor de los cromosomas sin satélite, con una ratio de 1,26. Los cromosomas 3H y 4H presentan tinciones muy intensas; aproximadamente el 50% del cromosoma 4H es heterocromatina. Sus ratios aproximadas son, respectivamente: 1,3 y 1,2. El cromosoma 7H, el tercero en longitud, es metacéntrico y presenta una ratio de 1 (Singh 2003).

5.1.3. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

La técnica de hibridación *in situ* es una herramienta muy potente capaz de localizar secuencias específicas de nucleótidos en regiones concretas de los cromosomas. Gracias a ella nos es posible relacionar la información molecular de secuencias de ADN con su situación física en el genoma.

La concepción de esta técnica es muy simple y se basa en la capacidad del ADN para desnaturalizarse, separando así la doble cadena, y renaturalizarse, formando de nuevo una doble hélice con su cadena complementaria o con las secuencias específicas introducidas que reciben el nombre de sondas.

La técnica de hibridación *in situ* fue descrita por primera vez por Gall y Pardue (1969) y desde entonces ha experimentado numerosas modificaciones y mejoras. La más relevante fue, sin duda, la sustitución de las sondas radioactivas por otros métodos de detección más rápidos y sencillos basados en sistemas enzimáticos. Actualmente el método más extendido es la combinación de biotina y digoxigenina unidos a las sondas y detectados por avidina y sus derivados, o por anticuerpos unidos a moléculas fluorescentes (Schwarzacher 2003).

El desarrollo de esta técnica para el estudio de cromosomas de plantas no ha sido tan rápido como en humanos y animales, principalmente por la dificultad técnica para obtener células mitóticas en metafase completamente limpias, sin restos de citoplasma o pared celular y por lo tanto sin impedimentos para una correcta hibridación. Hoy en día, sin embargo, estas dificultades técnicas están superadas, y la utilización de FISH para la identificación y caracterización de cromosomas de plantas es habitual (Cuadrado y Jouve 1997; Cuadrado y Schwarzacher 1998; Brown et al. 1999; Nagy et al. 2002; Stephens et al. 2004).

En cebada los genes ribosómicos 18S-5.8S-26S y 5S se localizaron mediante FISH con las sondas pTa71 y pTa794 (Leitch y Hesslop-Harrison 1992; 1993). En ambos casos se observa un patrón específico que se puede utilizar para la identificación de los cromosomas de esta variedad. La sonda pTa71 hibrida en zonas específicas de los brazos cromosómicos 1HS, 2HS, 5HS, 6HS y 7HS. Con pTa794 se pueden localizar los genes 5S rRNA en los brazos 2HL, 3HL, 4HL y 7HS.

Cuadrado y Jouve (2007) mostraron que determinadas repeticiones de trinucleótidos del tipo (ACT)₅ o (AGG)₅, no estaban distribuidas al azar en el genoma de cebada, sino que mostraban patrones característicos que permitían la identificación de todos los cromosomas. La utilización conjunta de determinados oligonucleótidos con las sondas pTa71 o pTa794 permite una identificación muy precisa de todos los brazos cromosómicos de cebada.

El objetivo de este capítulo es la identificación mediante FISH de los brazos cromosómicos de la variedad de cebada Albacete, de forma que se pueda determinar físicamente cuales están implicados en la translocación recíproca. Para ello se utilizarán las

sondas pTa71 y pTa794 junto con el trinucleótido (ACT)₅. Previamente se realizará una comprobación de la presencia de la translocación en las líneas DHs mediante la observación de metafases de células madre de polen procedentes del cruzamiento de los DHs por Plaisant.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. COMPROBACIÓN CITOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE LA TRANSLOCACIÓN EN LA POBLACIÓN DOBLE HAPLOIDE

Se sembraron 40 líneas de la población DH retrocruzadas por el parental Plaisant (DH x P) para la obtención de células madre de esporas en meiosis. Se realizaron cuatro siembras a lo largo de los años 2003-04: 24/10/2003 (siete líneas), 28/01/2004 (13 líneas), 01/04/2004 (14 líneas), 01/05/2004 (seis líneas). En todos los casos se mantuvieron aproximadamente cuatro semanas en cámara fría (4°C). Pasado ese tiempo se trasladaron a invernadero (24°C). Las espigas para la extracción de anteras se cortaron con entre seis y ocho semanas de desarrollo en invernadero, se fijaron con Carnoy durante 24 horas y se guardaron en etanol de 96°. La búsqueda de células madre en metafase meiótica se inició siempre por las flores centrales de la fila central, teóricamente las más avanzadas. Las anteras se tiñeron con Carmín acético al 3% sobre un portaobjetos y se aplastaron con ayuda de un cubre para su observación en un microscopio Carl Zeiss con objetivo de inmersión 63x. Las imágenes se tomaron con una cámara electrónica sistema CoolSNAP con *software* propio.

- Solución *Carnoy*
 - Etanol absoluto 75%(v/v)
 - Ácido acético glacial 25%(v/v)

- Solución Carmín acético 3%
 - Acético 45% (v/v)
 - Carmín (Sigma) 3gr/100ml

5.2.2. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

5.2.2.1. Obtención y preparación de anteras procedentes de híbridos de Albacete × Plaisant para la obtención de células madre de polen en metafase

Para la obtención de células madre en meiosis de híbridos de Albacete x Plaisant se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado anterior. En este caso de cada una de las flores se separó una sola antera para su observación al microscopio. Una vez confirmada la presencia de metafases en una de las anteras se guardaron las otras dos para proceder a su hibridación.

5.2.2.2. Obtención y preparación de raíces de Albacete para la obtención de células mitóticas en metafase

Se pusieron a germinar semillas de Albacete en placas Petri sobre papel de filtro humedecido donde se mantuvieron durante 24 horas a 25°C, en oscuridad. Posteriormente, se guardaron a 4°C durante 72 horas. Pasado ese tiempo se incubaron a 25°C para estimular la actividad meristemática radicular y tras 24 horas pudieron obtenerse las raicillas. Se cortó aproximadamente 1,5 cm de las raíces obtenidas, se introdujeron en tubos Eppendorf con agua destilada y se mantuvieron en hielo picado durante 24 horas para conseguir una acumulación de metafases. Transcurrido ese tiempo se retiró el agua de los tubos, se secaron un poco las raíces con papel de filtro y se fijaron con Carnoy. Se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente y finalmente se guardaron en cámara fría a 4°C.

5.2.2.3. Obtención de preparaciones cromosómicas

El material fijado (raíces y anteras) se lavó dos veces (durante 5 y 20 minutos) con una solución amortiguadora de citrato/citrato sódico (pH 4,8). Posteriormente se realizó un tratamiento enzimático con una mezcla de celulasa y peptinasa tal y como se describe en Schwarzacher *et al.* 1989. Finalizado el tiempo de digestión, aproximadamente una hora a 37°C, se lavó dos veces el material (5 y 20 minutos) con la solución amortiguadora, y se transfirió a un portaobjetos sobre una gota de ácido acético al 45%. En este paso es recomendable calentar ligeramente ya que, el calor, junto con el ácido acético, favorece la

degradación de las diferentes estructuras celulares que pueden suponer un obstáculo para una correcta hibridación. Una vez retirados los residuos celulares se aplastó el material con la ayuda de un cubreobjetos.

Con ayuda de un microscopio de contraste de fases se revisaron las preparaciones y se seleccionaron aquellas con buenas metafases. Las preparaciones elegidas se congelaron con anhídrido carbónico. Tras la congelación, se retiraron los cubres de las preparaciones con ayuda de un bisturí y se dejaron secar al aire.

➤ *Solución amortiguadora ácido cítrico/citrato sódico, pH 4,8*

A. Ácido cítrico monohidrato 0,1M

B. Citrato-2-hidrato trisódico 0,1M

Stock 10x: 40ml A + 60ml B

Solución de uso 1x: stock/agua destilada (1:9)

➤ *Solución enzimática*

A. Celulasa (Calbiochem) 2% (p/v)

Pectinasa 20% (p/v)

B. Celulasa (Onozuka) 2% (p/v)

Pectinasa 20% (p/v)

Solución de uso 2x: A/B (4:1)

5.2.2.4. Sondas utilizadas

Las sondas de ADN ribosomal utilizadas fueron pTa71 y pTa794. En ambos casos se trata de un plásmido obtenido de *Triticum aestivum* con insertos de genes ribosomales: pTa71 contiene la secuencia de los genes ribosomales de 18S-5 y 8S-25S (45S rDNA) y espaciadores intergénicos (Gerlach y Bedbrook, 1979), y pTa794 contiene la secuencia del gen ribosomal 5S rDNA y espaciadores intergénicos (Gerlach y Dyer, 1980)

Para la hibridación de las metafases meióticas se utilizó la sonda pTa71 marcada con biotina (fluorescencia roja) y la sonda pTa794 marcada con digoxigenina (fluorescencia verde). Ambas sondas se marcaron utilizando el kit de marcaje por “nick translation” de Roche. Para la hibridación de las metafases mitóticas ambas sondas

estaban marcadas con digoxigenina. Las metafases mitóticas, además de con pTa71 y pTa794, se hibridaron con el trinucleótido (ATC)₅ marcado con biotina, en ambos extremos, suministrado por la casa comercial Roche.

Las señales obtenidas con las sondas ribosomales, pTa794 y pTa71, fueron identificadas de acuerdo con el patrón de distribución común en distintas variedades de cebada, descrito en Leitch y Hesslop-Harrison (1993) y en Pedersen y Linde-Laursen (1994) (Figura 5.1) La identificación de las bandas obtenidas con el oligonucleótido (ACT)₅ se realizó según el patrón de distribución de este SSR en la variedad Plaisant descrito en Cuadrado y Jouvé (2007) (Figura 5.2). En ambas figuras el diámetro de las señales representadas está relacionado con la intensidad con la que se observan habitualmente. Las menos intensas no son visibles en algunas preparaciones.

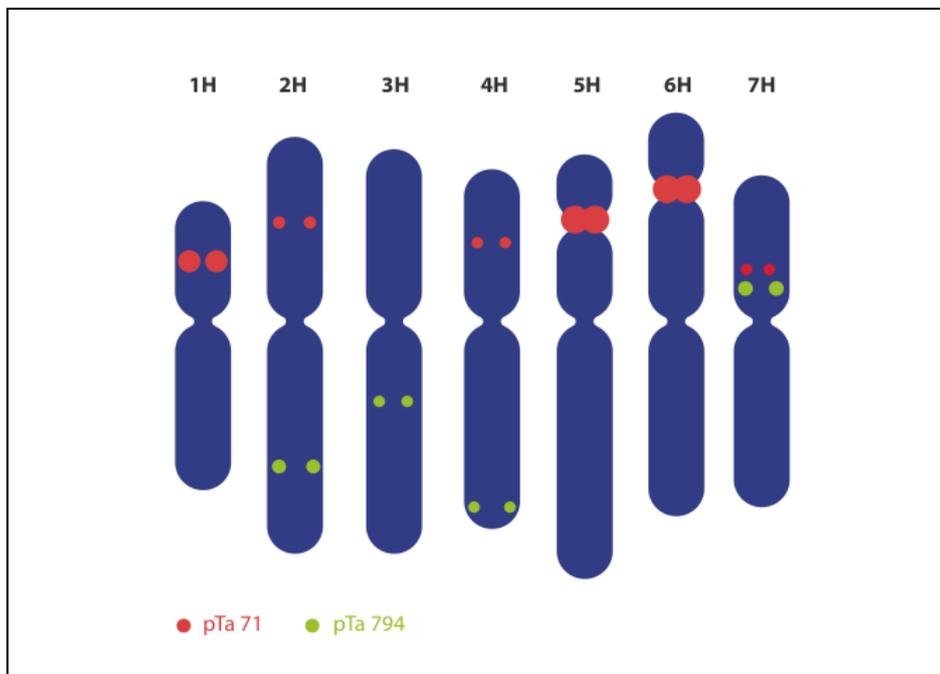


Figura 5.1 Patrón de distribución aproximada de 45S rDNA (pTa71) y 5S rDNA (pTa794) en cebada; pTa71 estaría marcado con biotina (rojo) y pTa794 con digoxigenina (verde).

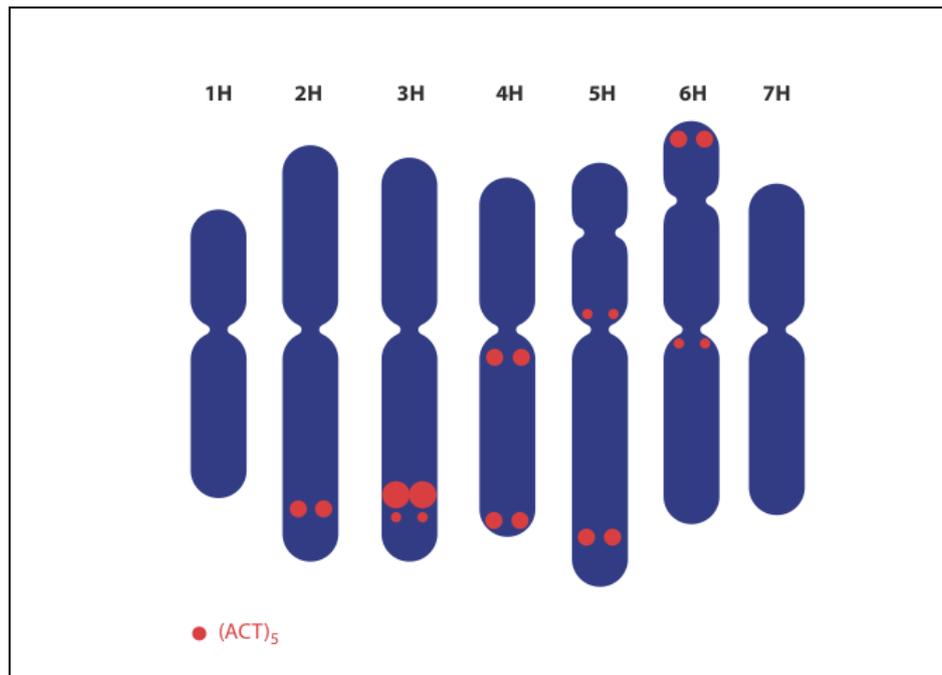


Figura 5.2 Patrón de distribución aproximada del oligonucleótido (ACT)₅ en los siete cromosomas de cebada; el marcaje de la sonda se habría realizado con biotina (rojo).

5.2.2.5. Hibridación

La hibridación *in situ* fluorescente se llevó a cabo según el protocolo descrito en Cuadrado et al. (2000). Las preparaciones secadas al aire se sometieron a un tratamiento previo a la hibridación:

Tratamiento con RNAsa: se añadió a cada preparación 100µl de una dilución 1:100 de la disolución stock (10mg/ml) en solución salina (2xSSC). Se cubrieron con un cubre de plástico y se incubaron durante 1h a 37°C. Tras la incubación se lavaron con 2xSSC (10 min).

Fijación con paraformaldehído: para fijar mejor todas las estructuras se utilizó una disolución al 4% de paraformaldehído con 2ml de NaOH 1M. Tras la fijación a temperatura ambiente se realizó un nuevo lavado con 2xSSC (10min).

Deshidratación: para la deshidratación las preparaciones se pasaron por una serie de etanol a 70-90-100% y se mantuvieron aproximadamente 5min en cada una.

Desnaturalización: el último paso antes de la hibridación es la desnaturalización de los cromosomas y de las sondas (pTa71 y pTa794). En realidad este paso se realiza al mismo tiempo para ambos cuando se añade sobre la preparación la mezcla de hibridación. Sin embargo, para asegurar la desnaturalización de las sondas, es recomendable realizar una desnaturalización previa a 70°C de la mezcla de hibridación con las sondas incorporadas. En el caso del oligonucleótido (ACT)₅ este paso no sería necesario pero al ir con las sondas pTa71 y pTa794 se mantuvieron durante 5min en un baño a 70°C. Una vez incorporada la mezcla de hibridación a las preparaciones cromosómicas (30µl en cada preparación), la desnaturalización conjunta se realizó en un termociclador *PTC-100 Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc) con el siguiente programa: 5' a 75°C; 2' a 55°C; 30'' a 50°C; 1' a 45°C; 2' a 42°C; 5' 40°C; 5' a 38°C.

Finalizada la desnaturalización, la hibridación de las muestras se llevó a cabo a 37°C en una cámara húmeda durante toda la noche (mínimo 16 horas). Tras añadir la mezcla de hibridación las preparaciones se cubrieron con un cubre de plástico.

➤ Mezcla de hibridación (volumen final 30µl)	
Formamida 100%	50% (v/v)
Dextrano sulfato 50%	10% (v/v)
20xSSC	2x
10% SDS en agua	0,1% (p/v)
DNA de salmón (10ng/µl)	0,33 ng/µl
Sondas	50-100ng cada una

Tras la hibridación se realizó una serie de lavados (aumentando la fuerza de lavado) para retirar las uniones inespecíficas y las sondas mal hibridadas. Los lavados se realizaron a 42°C, con agitación, en el siguiente orden:

- 2xSSC 5min
- 20% (v/v) formamida en 0,1xSSC 10min
- 0,1xSSC 5min
- 2xSSC 5min

- 4xSSC/Tween (0,2%) 5min
- 4xSSC/Tween (0,2%) 5min a T^a ambiente

Tras los lavados, y antes de proceder a la detección de las sondas con los correspondientes anticuerpos, se incubaron las muestras con una solución al 5% de BSA en 4xSSC/Tween (0,2%). Se añadieron 100µl/preparación, se cubrieron con un cubre de plástico y se mantuvieron 5 min a T^a ambiente. De esta forma se bloqueaban los sitios de posible unión inespecífica del anticuerpo.

La detección de las sondas marcadas con Biotina y Digoxigenina se realizó con streptavidina-Cy3 (Sigma) y antidigoxigenina-Fitc (Roche), respectivamente. Para ello se añadieron en cada muestra 50µl de de la disolución al 5% de BSA con 1:300 de streptavidina-Cy3 y 1:50 de antidigoxigenina-Fitc. Se cubrieron con un cubre de plástico y se incubaron durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron dos veces con 4xSSC/Tween (0,2%) a T^a ambiente.

Para la contratinción se añadieron 100µl de DAPI en cada preparación y se mantuvieron durante 15 min a T^a ambiente. Tras eliminar el DAPI con 4xSSC/Tween (0,2%), las preparaciones se montaron con una solución “anti-fade” (Vector)

5.2.2.6. Visualización y captación de imágenes

Las preparaciones se examinaron en un microscopio Zeiss Axiophot con epifluorescencia. Las imágenes se tomaron de forma separada para cada filtro con una cámara CCD (Nikon DS) y posteriormente se procesaron con Adobe Photoshop.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. PRESENCIA DE LA TRANSLOCACIÓN EN LAS LÍNEAS DOBLE HAPLOIDES

De las 40 líneas híbridas analizadas se observaron células en metafase en 25 líneas. De éstas una se descartó por la imposibilidad de observar con claridad la existencia o no del cuadrivalente (Tabla 5.1). La mayor parte de las líneas en las que no se identificaron

metafasas pertenecían a las últimas siembras mientras que de las dos primeras tandas se localizaron células en metafase de prácticamente todas.

De las líneas en las que se localizaron metafasas, doce mostraban cinco bivalentes y el anillo o cuadrivalente característico de la translocación recíproca (Figura 5.3a-b) En las otras doce se identificaron los siete bivalentes (Figura 5.3c-d)

Tabla 5.1 Relación de líneas DHs retrocruzadas por Plaisant en las que se observaron células madre de polen en metafase. Se incluye la fecha de siembra y el resultado de las observaciones citológicas.

<i>Línea</i>	<i>Fecha de siembra</i>	<i>Observación de anillo en metafase</i>
802 x P	24/10/2003	si
806 x P	24/10/2003	si
814 x P	24/10/2003	no
815 x P	24/10/2003	si
816 x P	24/10/2003	dudas
1727 x P	24/10/2003	si
803 x P	28/01/2004	si
805 x P	28/01/2004	no
809 x P	28/01/2004	no
810 x P	28/01/2004	no
813 x P	28/01/2004	no
817 x P	28/01/2004	no
828 x P	28/01/2004	si
829 x P	28/01/2004	no
1726 x P	28/01/2004	si
1730 x P	28/01/2004	si
30200 x P	01/04/2004	si
30203 x P	01/04/2004	si
30367 x P	01/04/2004	no
30382 x P	01/04/2004	no
31066 x P	01/04/2004	si
31076 x P	01/04/2004	no
31098 x P	01/04/2004	si
30377 x P	01/05/2004	no
31077 x P	01/05/2004	no

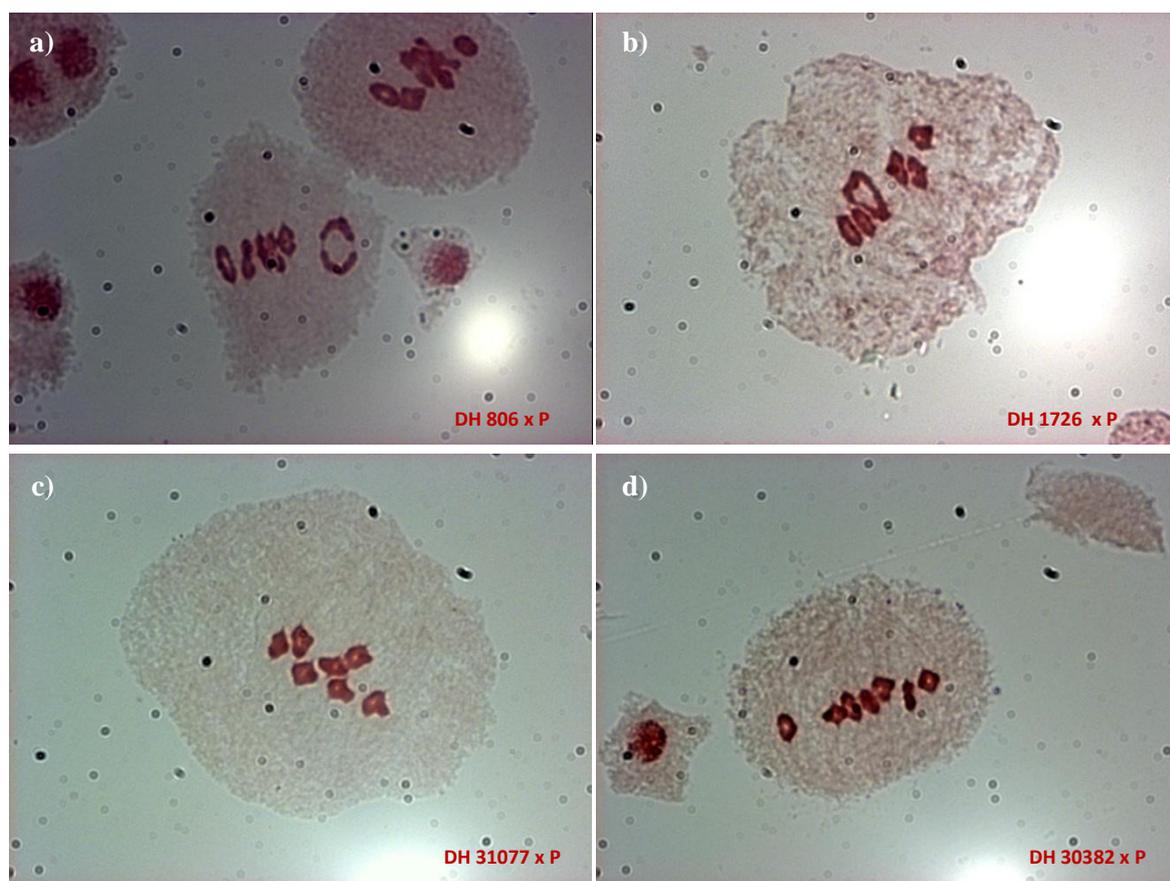


Figura 5.3 Microfotografías de células madre de polen en metafase; a-b) células mostrando un cuatrivalente y cinco bivalentes en metafase correspondientes a las líneas 806xP y 1726xP; c-d) células mostrando los siete bivalentes, correspondientes a los siete cromosomas normales de cebada, observados en las líneas 31077xP y 30382xP.

5.3.2. FISH

Los resultados de la hibridación *in situ* fluorescente se muestran en la Figura 5.4. Las preparaciones obtenidas de células madre de polen de Albacete × Plaisant, mostraron cinco bivalentes y un cuatrivalente o “anillo” (Figura 5.4a-c). Como se ha comentado en el apartado anterior, este último es indicativo de la presencia de la translocación recíproca. La hibridación con la sonda pTa71 (45S rDNA) permitió identificar con claridad los bivalentes formados por los cromosomas 5H y 6H, puesto que son los que presentan las señales de mayor intensidad. Se observaron también dos señales en el cuatrivalente. Su intensidad, algo menor que las señales de 5H y 6H, pero claramente visibles, sugerían la implicación del cromosoma 1H en la translocación recíproca. Por otra parte, la hibridación con la sonda pTa794 (5S rDNA) facilitó la identificación del cromosoma 7H, ya que es el único que presenta ésta señal en una localización proximal. En este cromosoma no se

detectó la señal de la sonda pTa71. Se detectaron también señales muy claras de la sonda pTa794 en otro de los bivalentes y en el cuadrivalente, sin embargo, no fue posible discernir a que cromosomas (2H, 3H o 4H) pertenecía cada una de ellas.

La hibridación de las células mitóticas procedentes del meristemo radicular de Albacete, con las sondas ribosomales y con el trinucleótido (ACT)₅, si permitió la identificación de todos los cromosomas (Figura 5.4d-e). Las señales obtenidas con pTa71 (45S rDNA), igual que en las preparaciones anteriores, no dejaban lugar a dudas sobre la identificación de los cromosomas 5H y 6H. Como se ha comentado anteriormente la siguiente señal más intensa obtenida con esta sonda se localiza en el brazo corto del cromosoma 1H (1HS) por lo que la identificación de este cromosoma tampoco supuso ningún problema. La utilización de la sonda pTa794, conjuntamente con la anterior, permitió la identificación de los cromosomas 2H y 7H. Una señal de poca intensidad en el brazo corto (pTa71), junto con otra más intensa en la parte distal del brazo largo (pTa794), identificaban el cromosoma 2H. El cromosoma 7H quedaba caracterizado por dos pares de señales (pTa71 + pTa794) localizadas en el brazo corto. Las señales correspondientes al brazo corto del cromosoma 4H (pTa71) y las localizadas en los brazos largos de los cromosomas 3H y 4H (pTa794) resultaron muy poco intensas.

La hibridación con el trinucleótido (ACT)₅ mostró con claridad las bandas localizadas en los cromosomas 2H (parte distal del brazo largo), 3H (zona media-distal del brazo largo) y 4H (presencia de dos bandas en el brazo largo una en la parte proximal y otra en la parte distal). Se distinguían también las bandas proximales pertenecientes a los cromosomas 5H (brazo corto) y 6H (brazo largo).

En el cariotipo obtenido a partir de las microfotografías de las preparaciones de Albacete (Figura 5.4f-g) se puede observar que la señal de pTa71 correspondiente al brazo corto del cromosoma 1H y la señal de (ACT)₅ que identifica el brazo largo del cromosoma 3H coincidían en el mismo cromosoma.

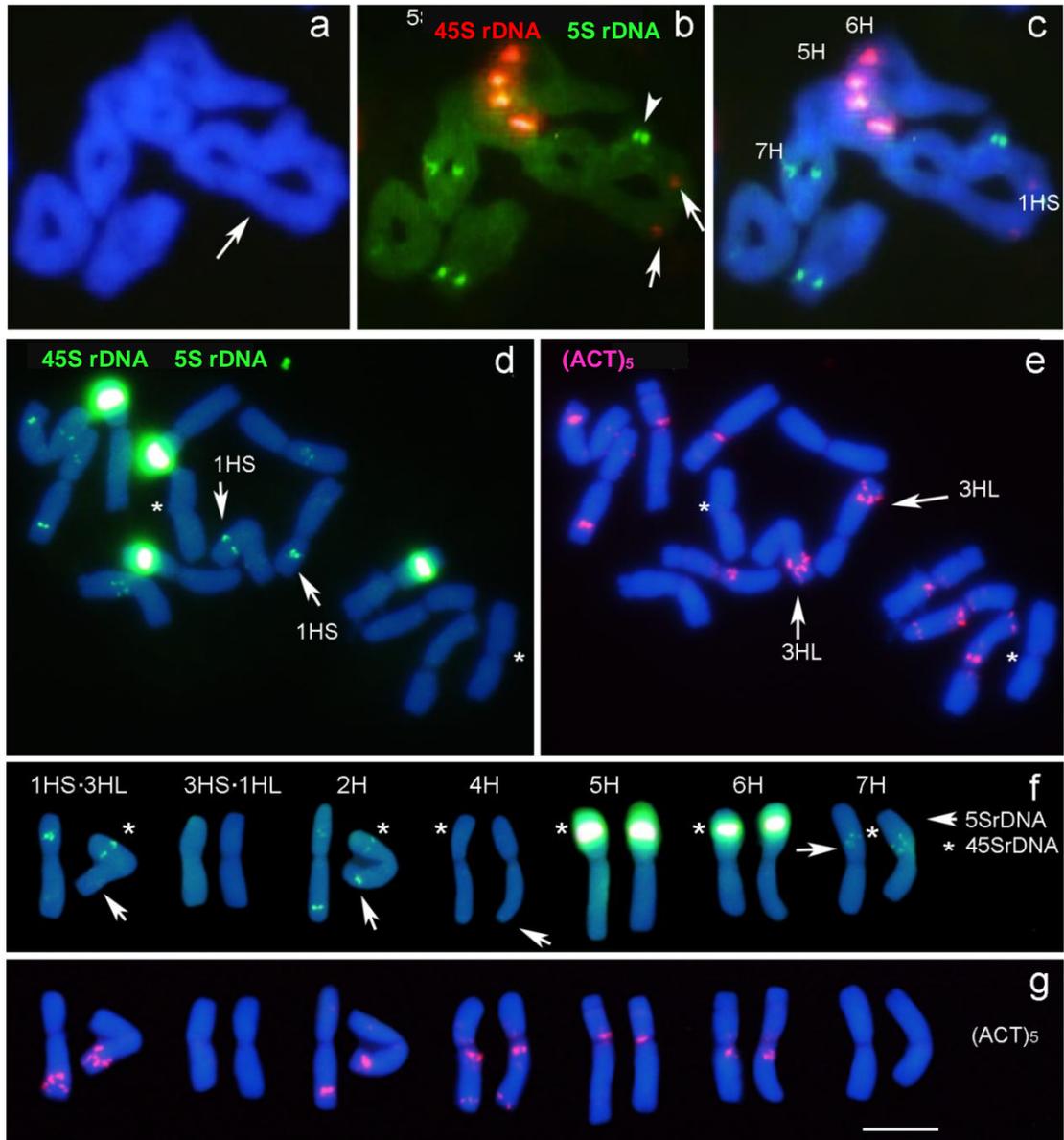


Figura 5.4 Microfotografías de FISH. (a-c) Metafase de células madre de polen de un híbrido de Albacete × Plaisant. La hibridación *in situ* fluorescente se ha realizado con las sondas ribosomales pTa71 (45S rDNA) y pTa794 (5S rDNA). (d-e) Metafase mitótica de células de la raíz de Albacete; (d) resultado de la hibridación con las sondas ribosomales pTa71 y pTa794; las señales de pTa71 localizadas en los brazos cortos del cromosoma 1H aparecen señaladas mediante flechas; (e) resultado de la hibridación con el trinucleótido (ACT)₅; la señal característica obtenida con este oligonucleótido en el brazo largo del cromosoma 3H está indicada mediante flechas. (f-g) Cariotipo de Albacete obtenido a partir de las microfotografías (d) y (e); (f) las señales resultantes de la hibridación con las sondas pTa71 (45S rDNA) y pTa794 (5SrDNA) están indicadas con asteriscos y flechas respectivamente; (g) resultado de la hibridación con el trinucleótido (ACT)₅.

observan señales con ninguna de las sondas y que con toda probabilidad está formado por el brazo corto del cromosoma 3H y el brazo largo del 1H. Las bandas obtenidas en 1HS y 3HL parecen completas por lo que el punto de corte de la translocación se situaría entre ambas.

Según los datos genéticos el punto de corte de la translocación se situaría en ambos cromosomas muy cercano al centrómero (bin7 en 1H y bin6 en 3H). Sin embargo, tal y como muestra Künzel et al (2000) los marcadores que cosegregan en zonas centroméricas estarían en realidad situados en zonas distales de ambos brazos cromosómicos, separados por amplias zonas de nula o escasa recombinación.

La hibridación con la sonda pTa71 en el brazo 1HS se localiza a un 37% desde el centrómero (Leitch y Heslop-Harrison 1992) mientras que las bandas con (ACT)₅ en el 3HL se sitúan aproximadamente a un 70-80% (A. Cuadrado, comunicación personal). Estas señales delimitarían en ambos brazos la zona del punto de corte, en el caso del cromosoma 3H una zona muy amplia que abarca prácticamente todo el brazo largo.

Para disminuir un poco esta distancia, y establecer una zona probable en 3HS y 1HL, podemos recurrir a los trabajos publicado por Künzel et al. 2002 y Taketa et al 2002. En el primero realizaron una integración del mapa físico y genético del cromosoma 3H. En el segundo, del brazo largo del cromosoma 1H, con el objetivo de localizar físicamente un gen de esterilidad. En ambos casos utilizaron marcadores microsatélites que están localizados en un mapa de referencia (Ramsay et al. 2000) por lo que es posible realizar una comparación con los marcadores utilizados en el mapa de Albacete x Plaisant. La Figura 5.6 muestra la localización física de algunos SSR utilizados en los trabajos de referencia y en la población Albacete x Plaisant. En el cromosoma 1H, la distancia más próxima al centrómero en el brazo largo, en la que se localizan SSR, es de un 30% aproximadamente según Taketa et al (2002). Esta posición en el mapa físico corresponde a marcadores localizados muy cerca de los implicados en la translocación de Albacete, sin embargo, con la información disponible no podemos asegurar su localización. En el cromosoma 3H, Künzel et al. (2002) localizaron los SSR implicados en la translocación en ambos brazos cromosómicos y bastante separados: a 57-69% desde el centrómero en el brazo corto (Bmac0067; Bmag0136, Bmag0006) y a 32% en el brazo largo (Bmac0209). La posición física de estos SSR, junto con la información obtenida con FISH acotarían una

zona bastante amplia en ambos cromosomas, situada a ambos lados del centrómero, en la que se localizaría el punto de corte de la translocación recíproca.

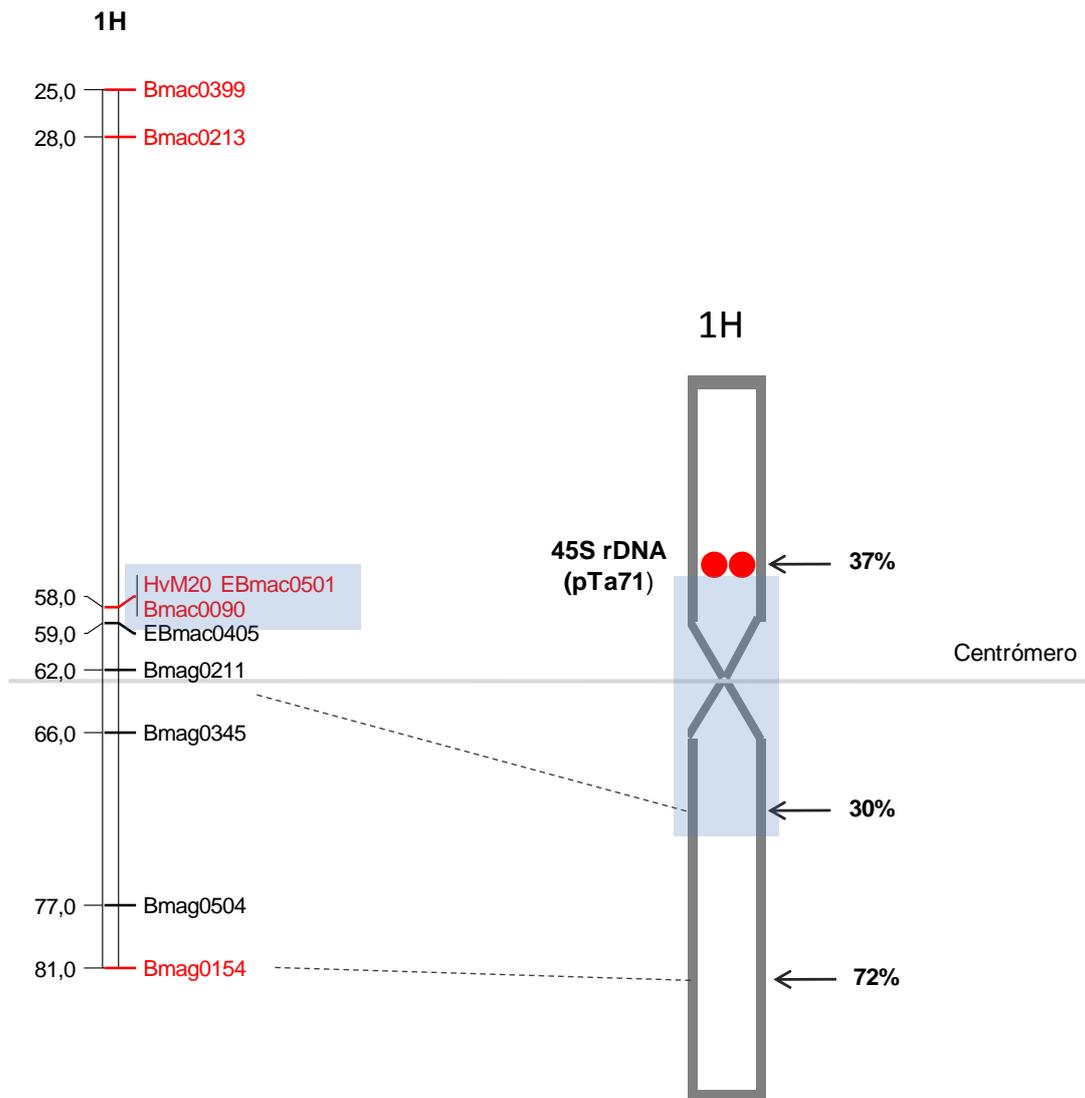


Figura 5.6 Localización de marcadores SSR en el mapa físico de los cromosomas 1H y 3H. Para cada cromosoma se representa a la izquierda el mapa genético y a la derecha el mapa físico. En el mapa genético se señalan, en rojo, los SSRs utilizados en el mapa de Albacete x Plaisant y, subrayados, los SSRs que aparecen en los trabajos de referencia para cada cromosoma (Taketa et al 2002; Künzel et al. 2002). Las distancias están en cM según el mapa publicado por Ramsay et al. (2000). Los SSRs situados en la zona de la translocación, según el análisis de ligamiento, aparecen sombreados en azul. En el mapa físico se indican, además de los porcentajes de longitud a los que se sitúan los SSRs, las señales obtenidas tras el análisis de FISH con las sondas pTa71 (1H) y (ACT)₅ (3H). Sombreada en azul se indica la zona de cada cromosoma en la que, de acuerdo con los datos de este trabajo, podría localizarse el punto de corte de la translocación recíproca.

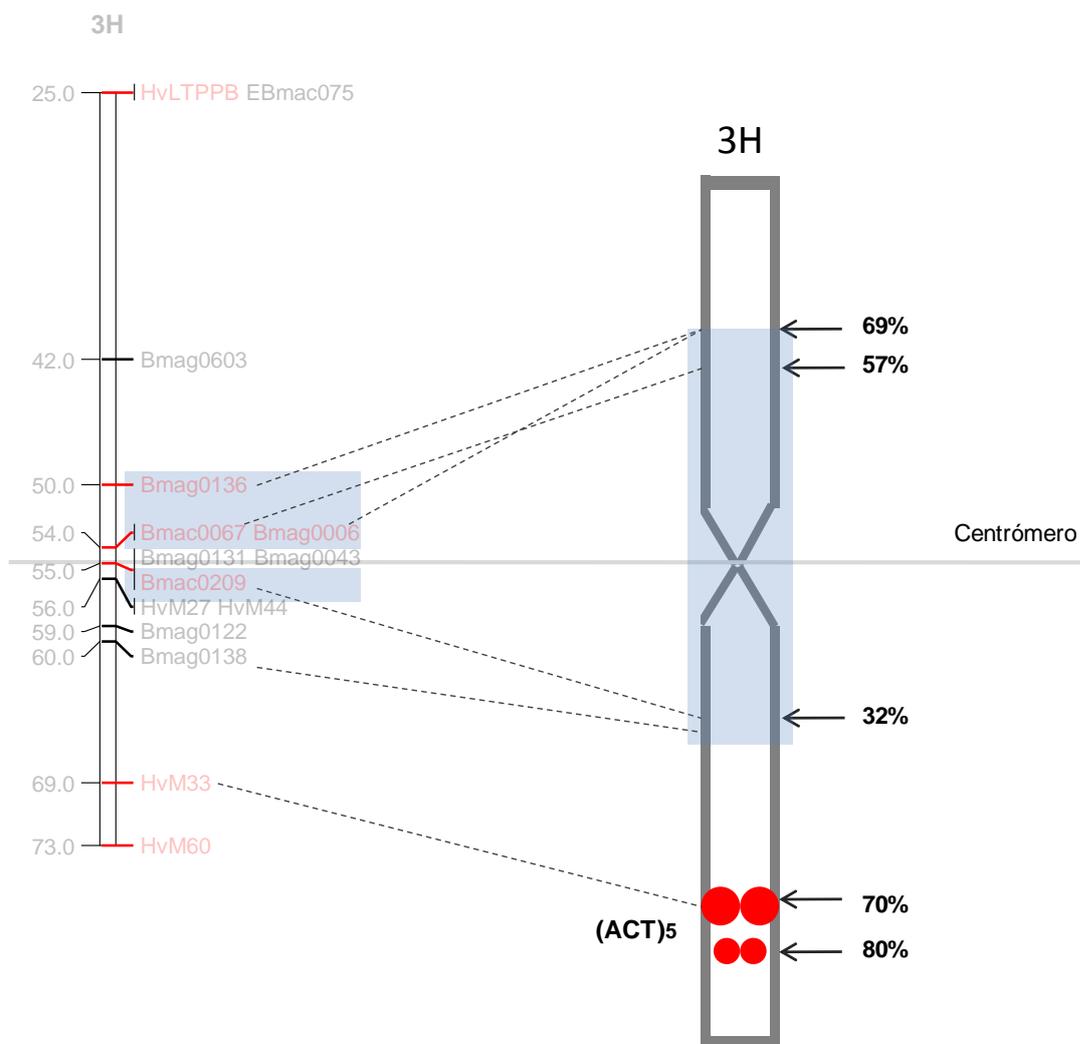


Figura 5.6 (Continuación)

Como conclusión se puede decir, que los datos citológicos confirman los resultados moleculares y por lo tanto se puede afirmar sin ninguna duda que la translocación recíproca de Albacete se ha producido entre los cromosomas 1H y 3H. El punto de rotura se localiza físicamente en la zona comprendida entre un 37% del 1HS y un 30% del 1HL, y entre un 57% del 3HS y un 32% del 3HL. Hay que añadir que si este punto de corte se localiza en zona heterocromática no parece posible que su posición exacta pueda ser determinada utilizando únicamente mapas genéticos.

**6. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA
TRANSLOCACIÓN RECÍPROCA E
IDENTIFICACIÓN DE QTLs**

6.1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los caracteres cuantitativos, como el rendimiento, la fecha de espigado o el tamaño de grano, están controlados por una gran variedad de genes que presentan interacciones entre ellos y con el ambiente. Esto hace que su distribución fenotípica sea de tipo continuo e impredecible basándose únicamente en el genotipo. Las zonas del genoma asociadas a esos caracteres reciben el nombre de QTLs (*Quantitative Trait Loci*).

Un QTL es una asociación estadística entre una región del genoma y un carácter. Evidentemente, si queremos que la región del genoma asociada esté lo más acotada posible, necesitaremos un mapa de ligamiento con una gran densidad de marcadores. En este sentido el desarrollo de mapas genéticos saturados ha supuesto un gran avance en la identificación de numerosos QTLs para caracteres agronómicos, de calidad de grano y de resistencia a estreses bióticos y abióticos. Asociar estos QTLs a un gen determinado es una tarea mucho más complicada. Una región de 20 o 30 cM es gigantesca desde un punto de vista molecular y puede contener centenares de genes de decenas de miles de polimorfismos.

Para el mapeo de QTLs en una población procedente de un cruzamiento simple se deben escoger líneas parentales que difieran en el carácter de interés (Arús et al. 2001) y realizar una detallada toma de datos que incluya varias repeticiones y/o varios años de ensayos. Uno de los factores que más afecta en la detección de QTLs es el tamaño de la población. En poblaciones demasiado pequeñas se suelen detectar un escaso número de QTLs, se sobreestiman los efectos de los que sí han sido identificados y se cuantifican mal las interacciones entre los mismos (Vales et al. 2005). En poblaciones experimentales, el número de QTLs detectados debería interpretarse como el mínimo número que segregan en una población.

En la bibliografía se describen bastantes QTLs localizados en la zona de la translocación recíproca. En el cromosoma 1H únicamente se han identificado QTLs para fecha de espigado y altura, localizados en el bin 7, en Harrington/Morex (Marquez-Cedillo et al. 2001). Sin embargo para el cromosoma 3H se describen numerosos QTLs en el bin 6 como por ejemplo rendimiento, fecha de espigado, altura y encamado en Steptoe/Morex

(Hayes et al. 1993), peso de mil granos en Blenheim/E224/3 (Thomas et al. 1995; Powell et al. 1997), número de granos por espiga en Blenheim/Kym (Bezant et al. 1997) o altura en Harrington/Morex (Marquez-Cedillo et al. 2001).

El objetivo de este capítulo es establecer una posible relación entre la translocación recíproca y determinados caracteres de interés agronómico. Para ello se tomaron datos en campo durante dos años en dos localidades diferentes.

6.2. MATERIALES Y METODOS

6.2.1. MATERIAL VEGETAL

Durante los años 2005/2006 y 2006/2007 se evaluaron en campo un total de ochenta y siete líneas doble haploides procedentes del cruzamiento de Albacete × Plaisant (Tabla 6.1). Ochenta y cinco de estas líneas pertenecían a la sub-población AP1 por lo que estaban caracterizadas con marcadores SSR y DArT. Las dos restantes, DH818 y DH31091, se utilizaron en los ensayos de campo, pero no se incluyeron en los análisis genotípicos por lo que no pudieron incluirse en el análisis de QTL.

Los datos genéticos disponibles permitieron clasificar la mayor parte de las líneas en función de la presencia o ausencia de la translocación recíproca. Así, de las ochenta y cinco líneas con información genética, 34 presentaban la translocación y 44 no. Siete líneas no pudieron clasificarse en ningún grupo.

Como testigos se utilizaron hasta seis variedades diferentes (Tabla 6.1): los parentales Albacete y Plaisant; la variedad de seis carreras Orria, descrita en el Capítulo 3, y las variedades Cierzo, Azara y Barbarrosa. Cierzo y Azara son variedades española de seis carreras procedentes del cruzamiento de Plaisant x Orria. Ambas presentan una amplia adaptación a diferentes condiciones climáticas, aunque su mejor comportamiento productivo se ha observado en los secanos de las zonas templadas y frías húmedas. Barbarrosa es una variedad francesa de seis carreras seleccionada a partir del cruzamiento (Hauter x (Hatif de Grignon x Ares)) x Ager. A pesar de su antigüedad es una variedad muy productiva y que se adapta a condiciones climáticas muy diversas.

Tabla 6.1 Número de líneas doble haploides evaluadas y testigos utilizados en cada ensayo

<i>Año</i>	<i>Localidad</i>	<i>Número de líneas doble haploides evaluadas</i>	<i>Testigos</i>	<i>Testigos adicionales</i>
2005/06	Gimenells (G6)	81	Albacete, Plaisant, Cierzo y Azara	
	Foradada (F6)	82	Albacete, Plaisant, Cierzo y Azara	
2006/07	Gimenells (G7)	87	Albacete, Plaisant y Cierzo	Azara, Orria y Barbarrosa
	Foradada (F7)	87	Albacete, Plaisant y Cierzo	Azara, Orria y Barbarrosa

6.2.2. CONDICIONES DE ENSAYO

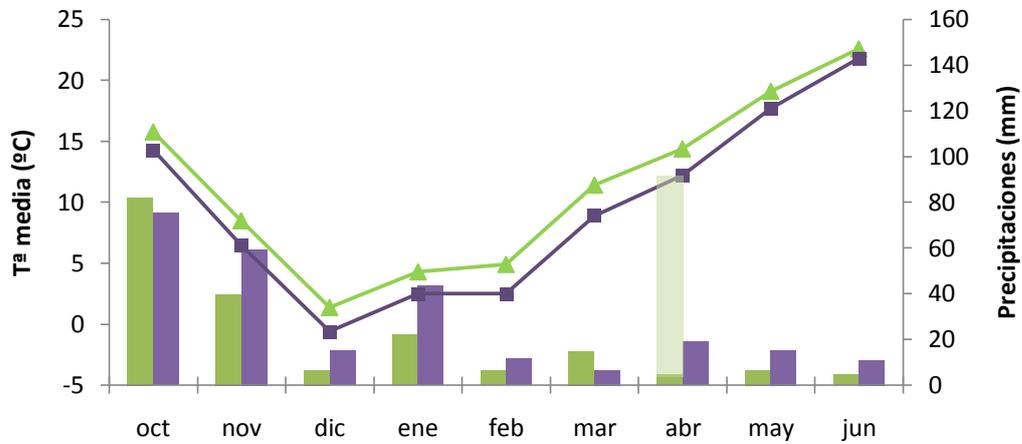
Los ensayos se realizaron durante los años 2005/2006 y 2006/2007 en las localidades de Foradada (41°51'N, 1°0'E; 407 m) y Gimeneles (41°37'N, 0°22'E; 248 m), ambas situadas en la provincia de Lleida (Cataluña). Gimeneles (G) está situada en zona de regadío y Foradada (F) en zona de secano. La diferencia de altitud entre ambas localidades hace que en Foradada se registren temperaturas inferiores que en Gimeneles, especialmente durante los meses de invierno (Figura 6.1). Los datos climáticos se obtuvieron de la *Xarxa Agrometeorològica de Catalunya* (<http://xarxes.meteocat.com>) de las estaciones más cercanas a los ensayos: la estación de Gimeneles, a 1,5Km del ensayo, y la estación de Oliola, a 13 Km del ensayo de Foradada.

El año 2006, debido a la escasez de precipitaciones en los meses de primavera, se regó el ensayo de Gimeneles (Figura 6.1.a). Los fertilizantes y herbicidas se aplicaron siguiendo las prácticas habituales para maximizar el rendimiento y no fue necesaria la aplicación de pesticidas o fungicidas.

Todos los ensayos se realizaron con un diseño en bloques incompletos al azar con dos repeticiones. Cada una de las parcelas de ensayo tenía una superficie de 3,6 m² y consistía en 8 surcos de 3 metros de longitud separados por 0,15 metros. En los ensayos realizados durante 2005/2006 en Foradada y Gimeneles, F6 y G6 respectivamente, se disponía de 200 parcelas organizadas en dos bloques de 5 filas x 20 columnas cada uno. Se utilizaron 4 testigos con 5 repeticiones por bloque (Figura 6.2.a). Los ensayos realizados en 2006/2007, *i.e.* F7 y G7, contenían 216 parcelas organizadas en dos bloques de 6 filas x 18 columnas. En este caso se utilizaron tres testigos con 6 repeticiones por bloque (Figura

6.2.b). En estos ensayos fue necesario rellenar tres parcelas de cada bloque con testigos adicionales (Tabla 6.1).

a)



b)

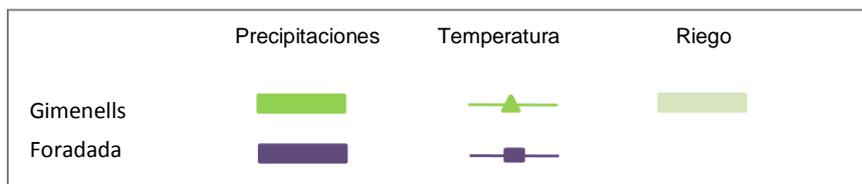
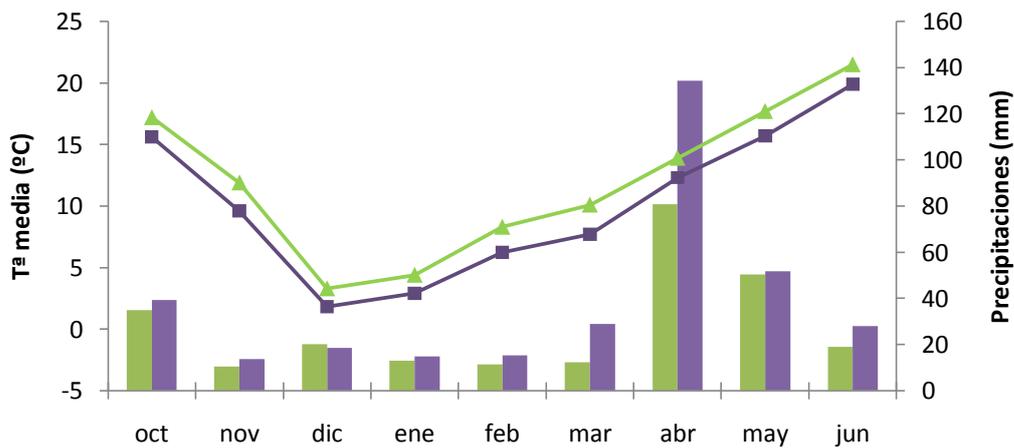
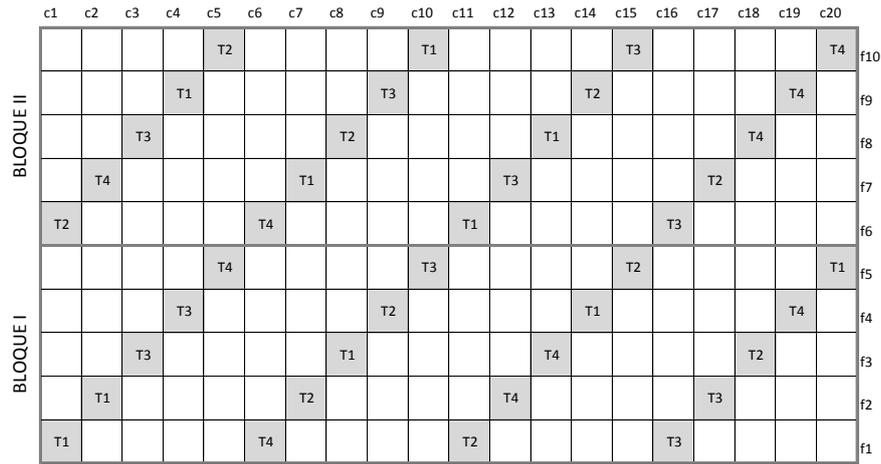


Figura 6.1 Precipitación acumulada y temperaturas medias registradas en las estaciones de Gimenells y Oliola durante los años de ensayo; a) 2005/2006 y b) 2006/2007.

Las fechas de siembra fueron el 19 y 21 de noviembre en G6 y F6 respectivamente.. En la campaña 2006/2007 se adelantó la fecha de siembra de Foradada al 31 de octubre y el 13 de noviembre se sembró en Gimennells. La densidad de siembra fue de 350 granos/m². La cosecha de 2006 se realizó los días 16 y 23 de junio en Gimennells y Foradada respectivamente. En 2007 se cosechó el 14 de junio en Gimennells y el 6 de julio en Foradada. En el momento de la cosecha se tomó 1kg de muestra de cada parcela.

a)



b)

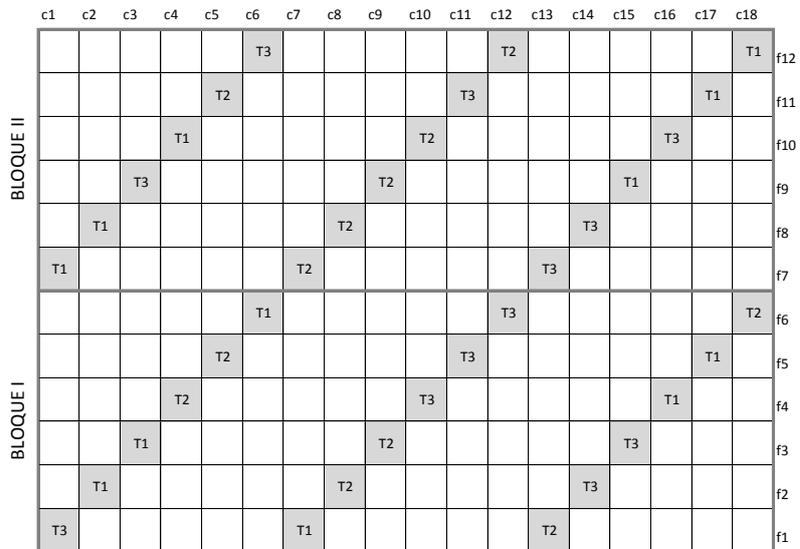


Figura 6.2 Esquema de los ensayos de campo mostrando la organización de las parcelas en cada bloque y la disposición de los testigos (T1=Albacete, T2=Plaisant, T3=Cierzo, T4=Azara); **a)** Ensayo 2005/2006; **b)** Ensayo 2006/2007.

6.2.3. CARACTERES ESTUDIADOS

➤ Vigor inicial (vi)

Tras una valoración visual se adjudicó a cada parcela un valor entre 0-5 en función de su aspecto. Se realizaron dos observaciones, separadas por 5-7 días, al menos dos semanas antes del inicio de la fecha de encañado. El valor utilizado fue la media de las dos observaciones.

➤ Fecha de encañado (DtJ)

La fecha de encañado se registró cuando aproximadamente en el 50% de los tallos principales de la parcela podía detectarse el primer nudo. El carácter se expresó en días transcurridos desde la fecha de siembra

➤ Fecha de espigado (DtH)

La fecha de espigado registrada para cada genotipo corresponde al momento en el que aproximadamente el 50% de los tallos de la parcela presentaba la espiga visible. El carácter se expresó en días transcurridos desde la fecha de siembra.

➤ Fecha de madurez (DtM)

La fecha de madurez se registró cuando aproximadamente el 50% de las espigas de la parcela presentaban el grano maduro. El carácter se expresó en días transcurridos desde la siembra.

➤ Elongación del tallo (DfJtH)

Este carácter expresa los días transcurridos entre la fecha de encañado y la fecha de espigado.

➤ Llenado de grano (DfHtM)

El carácter expresa los días transcurridos entre la fecha de espigado y la fecha de madurez.

➤ Rendimiento (yld)

El rendimiento se calculó a partir del peso obtenido por la cosechadora en cada parcela (3,6 m²). El carácter se expresó en toneladas por hectárea (t/ha).

➤ Peso de 1000 granos (TKW)

Se obtuvo el número de granos contenidos en 10 gramos de muestra de cada parcela. Con el valor obtenido se calculó el peso de 1000 granos. El carácter se expresó en gramos (g)

➤ Altura, último nudo, extrusión, pedúnculo y longitud de la espiga

La determinación de estos caracteres se realizó a partir de las medidas realizadas en campo al inicio de la fase de madurez. Para ello se seleccionó una planta representativa de la parcela y sobre ella se tomaron las siguientes medidas: longitud del tallo desde la base hasta a) último nudo, b) base de la espiga, c) inserción de la hoja bandera y d) ápice de la espiga. Con estas medidas se determinaron los caracteres de estudio: altura (d), último nudo (a), extrusión (b-c), pedúnculo (b-a), longitud de la espiga (d-b). Todos los caracteres se expresaron en centímetros (cm).

6.2.4. RELACIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN CON CARACTERES DE INTERÉS

AGRONÓMICO. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la posible relación entre la presencia de la translocación recíproca y alguno de los caracteres estudiados se llevó a cabo un contraste de significación, entre las líneas portadoras de la translocación y las no portadoras, de un modo independiente para cada uno de los cuatro ensayos y para el conjunto de todos ellos. El análisis se realizó con el programa SAS/STAT (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

6.2.5. ANÁLISIS DE QTL

El análisis de QTL, mediante el procedimiento CIM (*Composite Interval Mapping*), se llevó a cabo con el programa GenStat versión 14 que permite el análisis multilocalidad y la selección del mejor modelo mixto para cada uno de los caracteres. Los datos originales de partida no son las medidas individuales de cada parcela sino los valores BLUEs (*Best Linear Unbiased Estimators*) corregidos espacialmente.

El programa Genstat permite estimar directamente los predictores genéticos para las zonas no polimórficas y establece los niveles de significación en base a $-\log(\text{p-valor})$ de acuerdo a distintos algoritmos determinados por el mapa genético de la población

segregante. En este el caso el valor mínimo de significación quedó establecido en $-\log(p\text{-valor}) = 3,283$

Los marcadores utilizados para el análisis de QTLs fueron los 367 DArT localizados en el mapa de referencia (Wenzl et al. 2006). Para facilitar la comparación de los resultados obtenidos con la bibliografía se utilizaron las distancias de éste mapa consenso. En los cromosomas 1H y 3H se descartaron los marcadores cercanos al punto de corte de la translocación y se representaron sus brazos cortos y largos de forma separada (1HS, 1HL, 3HS y 3HL)

6.3. RESULTADOS

6.3.1. RELACIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN RECÍPROCA CON CARACTERES DE INTERÉS AGRONÓMICO

El resultado del contraste de significación realizado entre las líneas doble haploides portadoras de la translocación y las no portadoras se muestra en la Tabla 6.2. Se incluyen también los resultados obtenidos entre los parentales Albacete y Plaisant.

El carácter peso de mil granos (TKW), resultó muy significativo ($p \leq 0.01$) entre las líneas portadoras y no portadoras, tanto para el conjunto de los ensayos como de forma individual en cada uno de ellos. La media de todos los ensayos para las líneas translocadas fue superior con 32,02 g frente a los 29,17 g de las líneas no translocadas. El contraste de significación entre los parentales Albacete y Plaisant, para este carácter, solo resultó significativo en F6.

Ningún otro carácter resultó significativo para el conjunto de los cuatro ambientes. De forma individual para cada uno de ellos, únicamente en F7 resultaron significativos: el rendimiento y vigor inicial, con valores superiores para las líneas translocadas; la fecha de encañado, más tardía para las no portadoras de la translocación; el tiempo de elongación del tallo, más largo en las líneas con translocación, y la medida de la extrusión, de mayor longitud en las líneas translocadas.

Tabla 6.2 Contraste de significación entre los DH portadores de la translocación y los no portadores, para el conjunto de ambientes y para cada uno forma individual. Se incluyen también los resultados obtenidos entre Albacete y Plaisant

	<i>Rendimiento (t/ha)</i>						<i>Peso de 1000 granos (g)</i>					
	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>
Efectos principales	4,16	3,89	0,0194	3,92	3,88	0,6737	32,02	29,17	<0,0001	30,85	30,46	0,5019
F6	3,20	3,14	0,6652	3,82	3,40	0,0208	33,33	30,63	0,0016	34,81	30,66	0,0008
F7	3,77	3,34	0,0044	3,60	3,20	0,0227	29,04	26,02	0,0004	26,94	25,77	0,2927
G6	3,84	3,54	0,0450	3,48	4,05	0,0033	33,13	30,35	0,0012	30,90	32,60	0,1627
G7	5,82	5,57	0,0870	4,77	4,88	0,5149	32,60	29,69	0,0006	30,76	32,79	0,0816

	<i>Vigor inicial (I - 5)</i>						<i>Encañado (días)</i>					
	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>
Efectos principales	2,81	2,64	0,1056	3,15	2,67	<0,0001	134,3	135,9	0,1046	131,5	137,2	<0,0001
F6	3,16	2,96	0,0971	3,30	3,24	0,6107	139,0	139,2	0,8989	138,0	138,6	0,5715
F7	2,62	2,31	0,0103	3,07	2,17	<0,0001	147,2	151,4	0,0005	142,2	154,2	<0,0001
G6	3,13	3,10	0,7503	3,48	3,30	0,1786	127,4	127,1	0,8215	126,0	126,2	0,8447
G7	2,32	2,22	0,4323	2,76	1,98	<0,0001	123,7	125,8	0,0706	120,0	129,8	<0,0001

	<i>Espigado (días)</i>						<i>Madurez (días)</i>					
	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>
Efectos principales	165,8	166,5	0,2220	165,7	164,5	<0,0001	201,2	201,2	0,9267	202,0	200,3	<0,0001
F6	166,2	166,9	0,3719	167,2	162,2	<0,0001	196,7	196,7	0,8530	197,8	194,6	<0,0001
F7	181,1	181,9	0,2805	179,5	181,1	0,0008	220,1	220,2	0,8274	221,9	221,0	0,1393
G6	156,1	156,8	0,3405	156,3	154,2	<0,0001	191,1	190,7	0,3037	191,7	189,0	<0,0001
G7	159,6	160,6	0,2029	159,7	160,6	0,0500	197,0	197,1	0,7233	196,7	196,5	0,6795

Tabla 6.2 (Continuación)

	<i>Elongación del tallo (días)</i>						<i>Llenado de grano (días)</i>					
	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>
Efectos principales	31,4	30,7	0,2918	34,2	27,3	<0,0001	35,5	34,67	0,0632	36,3	35,8	0,1278
F6	27,1	27,6	0,5936	29,3	23,6	<0,0001	30,6	29,89	0,2442	30,6	32,3	0,0185
F7	33,8	30,5	0,0004	37,3	26,9	<0,0001	39,0	38,26	0,2068	42,4	39,9	0,0004
G6	28,7	26,7	0,3189	30,4	28,0	0,0253	35,0	33,92	0,0576	35,2	34,9	0,6761
G7	36,0	34,8	0,2065	39,7	30,6	<0,0001	37,4	36,61	0,1861	37,0	35,9	0,0926

	<i>Altura (cm)</i>						<i>Último nudo (cm)</i>					
	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>
Efectos principales	87,18	86,14	0,3881	91,57	80,47	<0,0001	52,93	51,47	0,1341	57,05	46,94	<0,0001
F6	70,09	68,81	0,4301	76,46	64,90	0,0005	44,36	42,13	0,0744	49,51	39,11	<0,0001
F7	98,49	98,53	0,9786	99,69	93,36	0,0367	59,18	59,82	0,5985	60,21	53,51	<0,0001
G6	84,72	82,60	0,1935	87,88	81,47	0,053	51,39	48,64	0,028	55,53	44,67	<0,0001
G7	95,41	94,61	0,6186	102,26	82,15	<0,0001	56,82	55,29	0,2133	62,97	50,47	<0,0001

	<i>Pedúnculo (cm)</i>						<i>Longitud espiga (cm)</i>					
	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>
Efectos principales	27,81	27,93	0,8547	28,57	27,84	0,4279	6,38	6,68	0,0379	5,93	7,63	<0,0001
F6	19,82	20,26	0,6527	21,63	19,07	0,1817	5,91	6,27	0,1116	5,30	6,80	0,0016
F7	32,65	31,95	0,4627	33,40	32,11	0,4655	6,56	6,78	0,3138	5,96	7,79	<0,0001
G6	26,70	26,84	0,8851	26,26	27,95	0,3814	6,56	6,96	0,0829	6,30	8,40	<0,0001
G7	32,04	32,65	0,5282	33,00	32,23	0,6649	6,47	6,71	0,2975	6,17	7,55	0,0018

	<i>Extrusión (cm)</i>					
	T	NT	<i>p-value</i>	A	P	<i>p-value</i>
Efectos principales	4,16	3,89	0,0194	3,92	3,88	0,6737
F6	3,20	3,14	0,6652	3,82	3,40	0,0208
F7	3,77	3,34	0,0044	3,60	3,20	0,0227
G6	3,84	3,54	0,0450	3,48	4,05	0,0033
G7	5,82	5,57	0,0870	4,77	4,88	0,5149

6.3.1. ANÁLISIS DE QTL

Los resultados obtenidos tras el análisis de QTLs para cada uno de los caracteres estudiados se muestran en la Figura 6.3(a-m). Un resumen de la localización de los QTLs identificados, con sus efectos aditivos y el porcentaje de variabilidad explicado aparecen en la Tabla 6.3.

➤ Vigor inicial (vi)

Para este carácter se identificaron dos QTL muy significativos en los cromosomas 1HL (114,6cM) y 5H (119cM). Se localizó también un tercer QTL de menor importancia en el cromosoma 2H a 25,7 cM. El efecto aditivo de los tres era positivo para Albacete.

➤ Fecha de encañado (DtJ)

Se identificaron dos QTLs en los cromosomas 1H (114,6cM) y 5H (127,9cM), significativos para este carácter en los ambientes F7 y G7. El efecto aditivo de los dos QTLs era positivo para Plaisant lo que se traducía en fechas de encañado más tardías para este parental. El QTL más significativo ($-\log(P)=18,8$) estaba localizado en 1H. Era el que presentaba mayor efecto aditivo (6 y 4 días en F7 y G7 respectivamente) y explicaba un mayor porcentaje de la variabilidad observada (75% en F7 y 45 % en G7). La suma de ambos QTLs tenía un efecto aditivo de hasta 8 días en F7 y de 6,8 días en G7 y explicaban un porcentaje de variabilidad del 80% en F7 y del 64% en G7.

➤ Fecha de espigado (DtH)

Para este carácter se identificaron tres QTLs con un nivel de significación similar ($-\log(P)\approx 8$), localizados en los cromosomas 1H (114,6cM), 2H (68,1cM) y 7H (48,6cM). El QTL del 1H coincidía con los QTL identificados para “vigor inicial” y “encañado”. Este QTL solo era significativo en los ambientes F7 y G7 y presentaba un efecto aditivo positivo para Plaisant (2,2 días en F7 y 0,8 días en G7). El efecto del QTL localizado en 7H también era positivo para Plaisant (entre 0,8 y 1,7 días). Se observaba en todos los ambientes, aunque los mayores efectos se correspondían con F6 y G6. El efecto aditivo del QTL en 2H era positivo para Albacete y mantenía un valor constante en todos los ambientes (1 día). Los efectos aditivos de estos tres QTLs proporcionaban una fecha de espigado algo más tardía en Plaisant. Los tres QTLs explicaban entre un 20% en F6 y un

53% en F7 de la variabilidad observada para este carácter. El QTL localizado en 1H era responsable de un 36% de la variabilidad explicada en F7.

➤ Elongación del tallo (DfJtH)

Se detectaron cuatro QTLs significativos para este carácter en los cromosomas 1H (114,6cM), 2H (68,1cM), 5H (110,2cM) y 7H (42,7cM). Todos ellos coincidían, o se localizaban en posiciones cercanas, con los QTLs encontrados para los caracteres “vigor inicial”, “encañado” y/o “espigado”. El más significativo ($-\log(P)=12$) se localizaba en el 1H y tenía un efecto aditivo para Albacete que se observaba únicamente en F7 (3,8 días) y G7 (2,9 días); igual que sucedía en encañado y espigado pero con efecto contrario. Este QTL explicaba más de la mitad de la variabilidad observada en estos dos ambientes. Los otros tres QTLs tenían un nivel de significación similar ($-\log(P)=7-8$). El efecto del QTL localizado en 2H era similar al observado en la fecha de espigado: positivo para Albacete y constante en todos los ambientes (0,8 días). El QTL del 5H también era positivo para Albacete y significativo en todos los ambientes, aunque su efecto era más importante en F7 (1,6 días) y G7 (2,5 días). El QTL del cromosoma 7H mostraba un pequeño efecto aditivo, positivo para Plaisant, de 0,8 días en F6 y G6, mientras que en G7 se observaba un efecto positivo para Albacete de 1,2 días. En F7 no se observó ningún efecto significativo para este QTL. La suma de efectos de los cuatro QTLs mostraba un tiempo de elongación del tallo en Albacete, en F7 y G7, entre 6 y 7 días más largo que el tiempo de elongación en Plaisant. En F6 y G6, la diferencia entre ambos era de apenas 0,7 días. De la variabilidad total explicada por estos cuatro QTLs en F7 (65%) y G7(70%), el QTL en 1H era el responsable de un 53% y de un 36% respectivamente. En F6 y G6 la variabilidad explicada por el conjunto de QTLs era bastante menor, 27% y 28% respectivamente.

➤ Fecha de madurez (DtM)

Se detectó un QTL para este carácter en el cromosoma 2H, en una posición cercana al QTL de espigado (71,4cM). Se trataba de un QTL muy poco significativo, apenas superior al nivel mínimo de significación establecido en $-\log(P)=3,283$. Presentaba un efecto positivo para Albacete de 0,4-0,6 días, observable únicamente en G7 y F7, y explicaba un 10% de la variabilidad observada en G7 y un 12% en F7.

➤ Llenado de grano (DfHtM)

Para este carácter se encontraron tres QTLs con un nivel de significación similar ($-\log(P) \approx 5$) en los cromosomas 1H (114,6cM), 2H (71,4cM) y 7H (48,6cM), coincidentes con los QTLs observados en uno o varios de los caracteres anteriores (“vigor inicial”, “encañado”, “espigado”, “elongación de tallo” y “madurez”). El QTL en 1H mostraba un efecto positivo para Albacete, en F7 y G7, de 1,6 y 0,4 días respectivamente. El efecto del QTL en 7H también era positivo para Albacete y, en este caso, se mantenía constante en todos los ambientes (0,7 días). Para el QTL localizado en 2H se observó un efecto positivo para Plaisant muy similar en F6, F7 y G7 (0,8-0,9 días), pero no se observó ningún efecto significativo en G6. El porcentaje de variabilidad explicado por estos tres QTLs en F7 y G7 era de un 40% y un 32% respectivamente. Del 40% de F7, el QTL localizado en 1H era responsable de un 27%. La variabilidad explicada por estos QTLs en los otros dos ambientes era de un 16% en F6 y de un 10% en G6.

➤ Rendimiento (yld)

Los QTLs encontrados para rendimiento eran en general muy poco significativos. El más importante para este carácter ($-\log(P)=4,9$) se situaba en el cromosoma 1H (49cM) y presentaba, igual que los otros dos QTLs, un efecto aditivo positivo para Albacete. En este caso el efecto aditivo presentaba un valor constante (0,24 t/ha) en todos los ambientes. El segundo QTL se localizaba en el cromosoma 2H en una posición similar a los QTLs descritos anteriormente para los caracteres de fenología (71,4cM). Mostraba un efecto aditivo de 0,2 t/ha en F6. El último QTL detectado para este carácter estaba en el cromosoma 4H (67,9cM) y apenas superaba el nivel mínimo de significación ($-\log(P)=3,283$). Se observaba en este QTL un efecto aditivo similar a los otros dos (0,2 t/ha) en F7. La variabilidad explicada por estos tres QTLs iba desde un 7% en G6 hasta un 24% en F7.

➤ Peso de 1.000 granos (tkw)

Para este carácter se encontraron dos QTLs poco significativos ($-\log(P)=3,5-4$). Uno en la parte distal de 3HS (1cM) y otro en el cromosoma 5H (133,5cM) en una posición similar a los QTLs de “vigor inicial”, “encañado” y “elongación del tallo”. El efecto aditivo de ambos era positivo para Plaisant. En el primer caso se observaba un efecto aditivo de entre 0,9g y 1,6g en F7, G6 y G7. El segundo QTL (5H) se observaba

únicamente en F7, con un efecto aditivo de 0,8g. El porcentaje de variabilidad explicado por la suma de estos dos QTLs era del 12% en F7, 17% en G6 y 6% en G7.

➤ Altura

Para el carácter altura se detectó un QTL bastante significativo ($-\log(P)=6,4$) localizado en el cromosoma 1H, próximo a los QTLs para los caracteres de fenología (122,9cM). Mostraba en F7 un efecto aditivo positivo para Albacete de hasta 6 cm y explicaba un 46,7% de la variabilidad observada.

➤ Último nudo

Para este carácter se encontraron dos QTLs significativos ($-\log(P)=4-4,5$). Uno en la parte distal del brazo largo del cromosoma 2H (161,1cM) y otro en la parte distal del 3HS (1cM). El primero mostraba un efecto aditivo positivo para Albacete (2 cm) en G7. El efecto aditivo del 3HS, también positivo para Albacete, era constante en todos los ambientes y tenía un valor similar al anterior (1,9 cm). La variabilidad total explicada por estos dos QTLs oscilaba entre 6,8% y 25% dependiendo del ambiente.

➤ Pedúnculo

Se encontraron dos QTLs para la longitud del pedúnculo. El más significativo ($-\log(P)=5,1$) estaba localizado en el cromosoma 7H (35,2 cM) y mostraba un efecto aditivo positivo para Albacete que se mantenía constante en todos los ambientes (1,32 cm). El segundo se localizaba en el 1H en la misma posición que el QTL para el carácter “altura” (122,9 cM). Este QTL tenía un efecto aditivo positivo para Albacete algo superior que el anterior (2,63 cm) pero solo se observaba en F7. De la variabilidad total explicada por los dos QTLs en F7 (41,6%), el segundo era responsable de un 35%. En el resto de ambientes el QTL del 7H explicaba entre un 8% y un 15% de la variabilidad observada.

➤ Extrusión

Para este carácter se identificó un QTL significativo ($-\log(P)=5,2$) en el cromosoma 1H, coincidente con los QTL para los caracteres “altura” y “pedúnculo” (122,9 cM). Mostraba un efecto positivo para Albacete en F7 (2,86 cm) y explicaba en este ambiente un 41,6% de la variabilidad observada.

➤ Espiga

Para la longitud de la espiga se encontró un QTL muy poco significativo ($-\log(P)=3,6$) en la parte distal del brazo corto del 5H (1,7 cM). Presentaba un efecto aditivo positivo para Plaisant en F7 y G7 de 0,24 cm y 0,41 cm respectivamente. La variabilidad explicada en G7 también era superior, un 17,3% frente al 7,7% explicado por este QTL en F7.

a) Vigor inicial

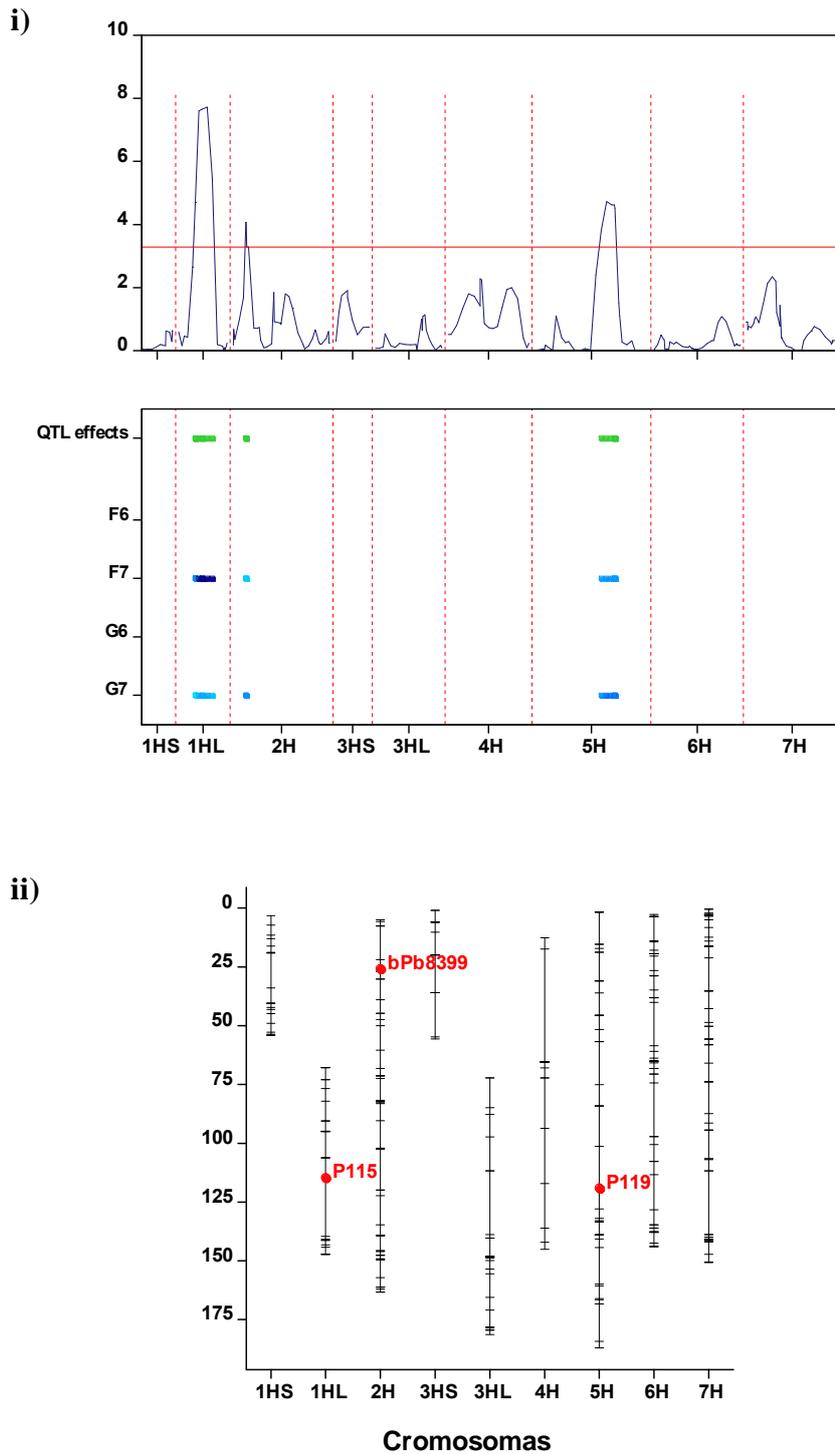


Figura 6.3 Análisis de QTLs. Para cada carácter se indica: **i)** Significación de los QTLs identificados, efectos principales y efectos aditivos en cada ambiente (en azul, efecto positivo para Albacete y en anaranjado, efecto positivo para Plaisant); **ii)** Posición en el mapa de referencia (Wenzl et al. 2006) de los marcadores más significativos para cada QTL. Los marcadores en rojo indican un efecto constante del QTL en todos los ambientes. Los marcadores en azul indican efectos variables en función del ambiente (Gx E)

b) Encañado

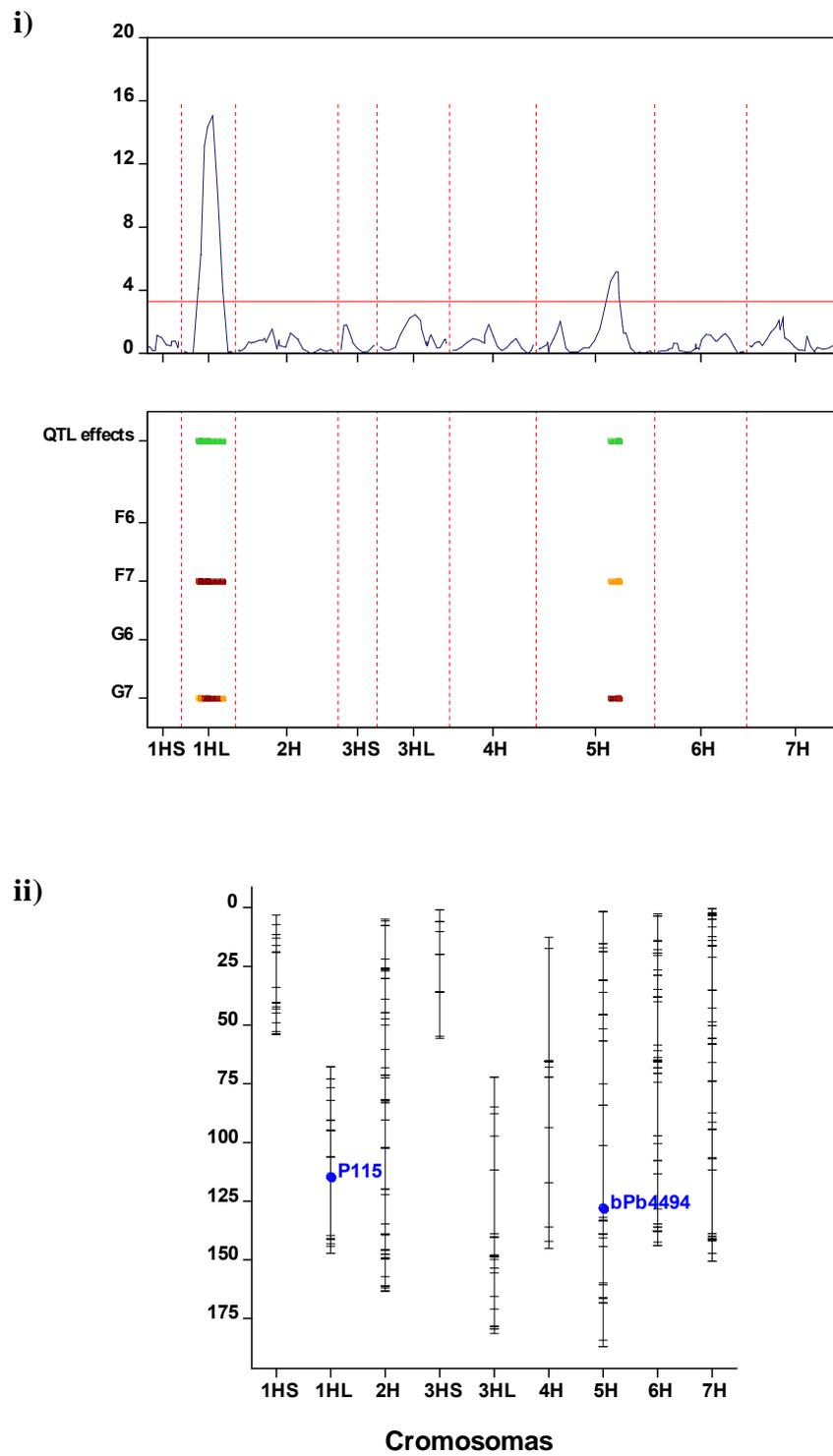


Figura 6.3 (Continuación)

c) Espigado

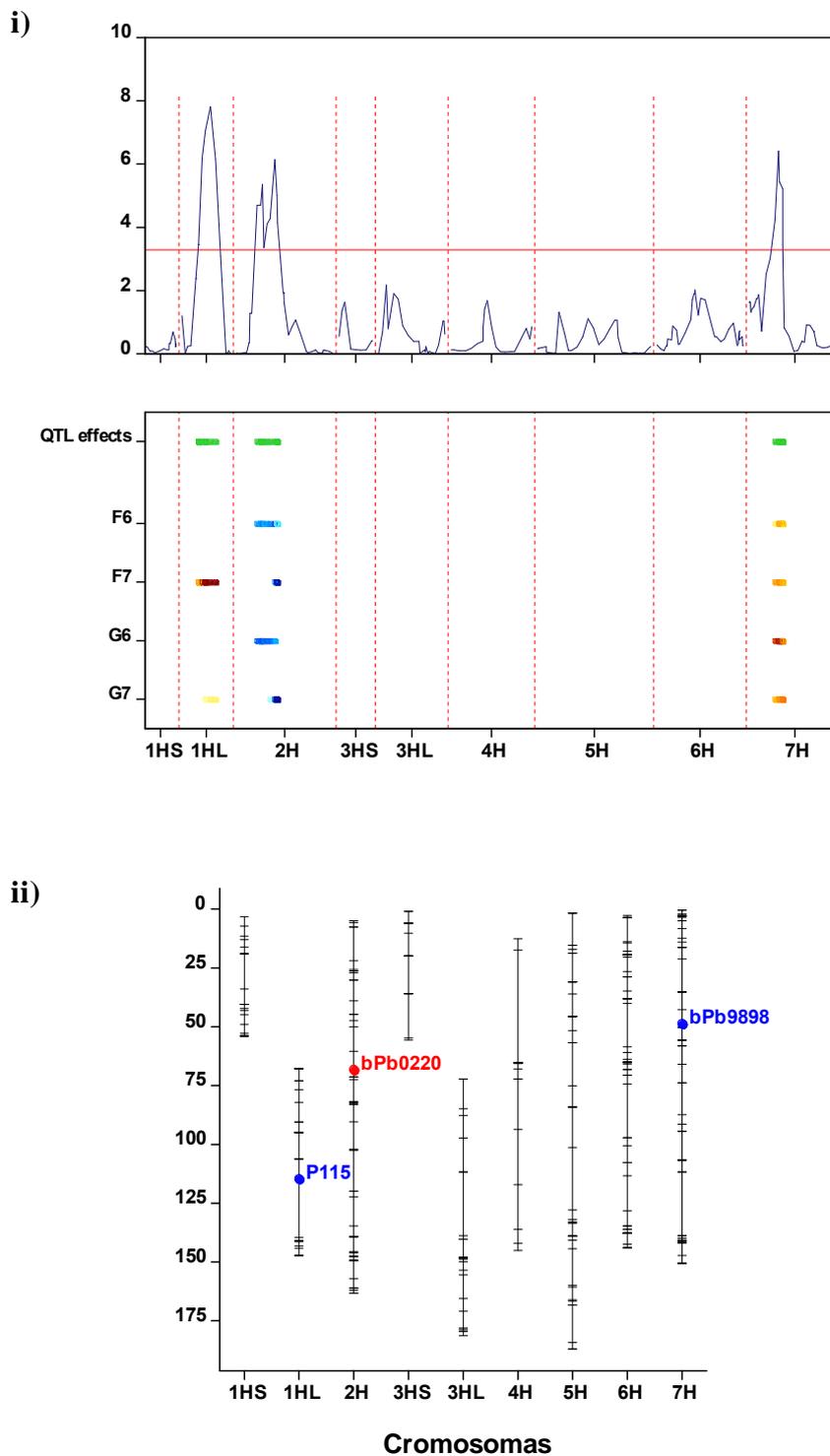


Figura 6.3 (Continuación)

d) Elongación del tallo

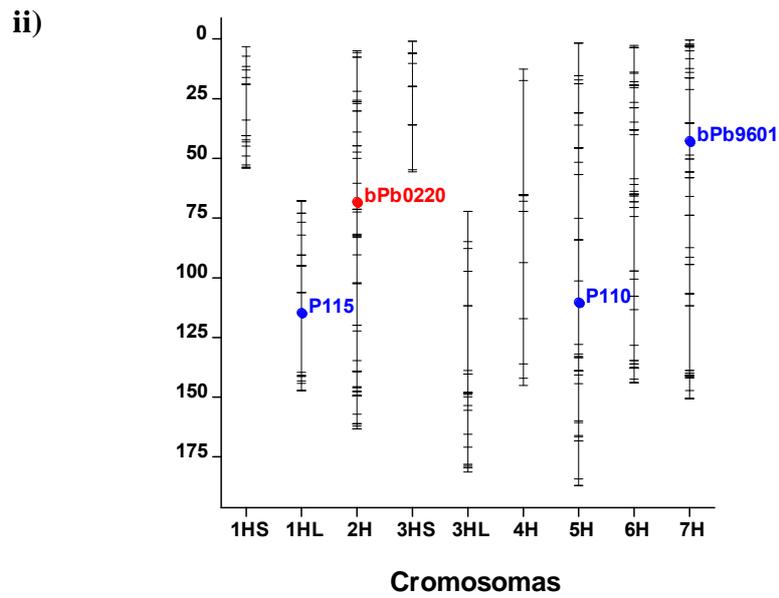
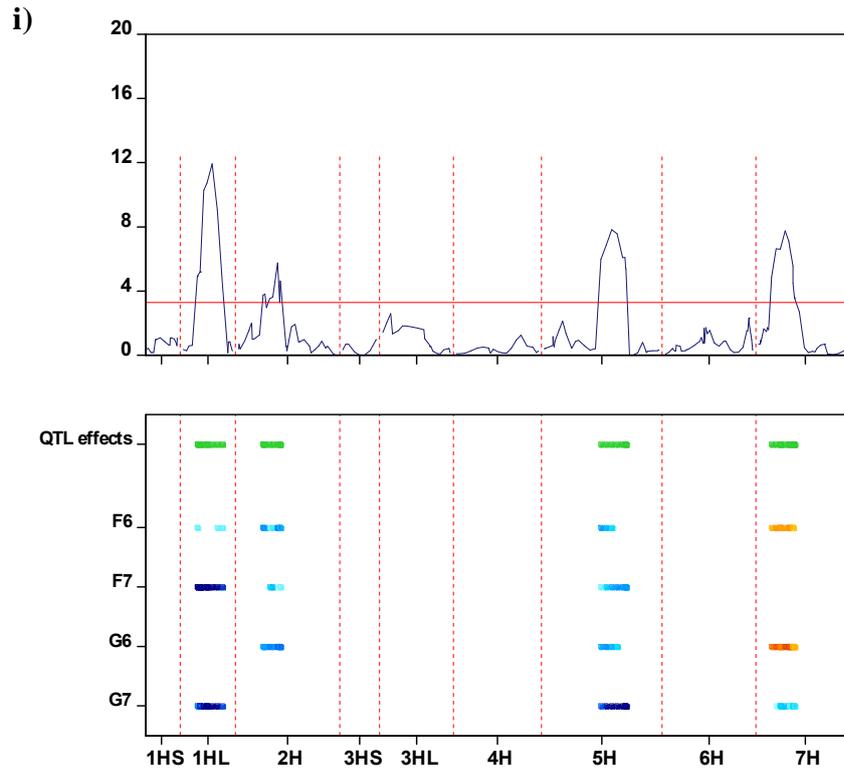


Figura 6.3 (Continuación)

e) Madurez

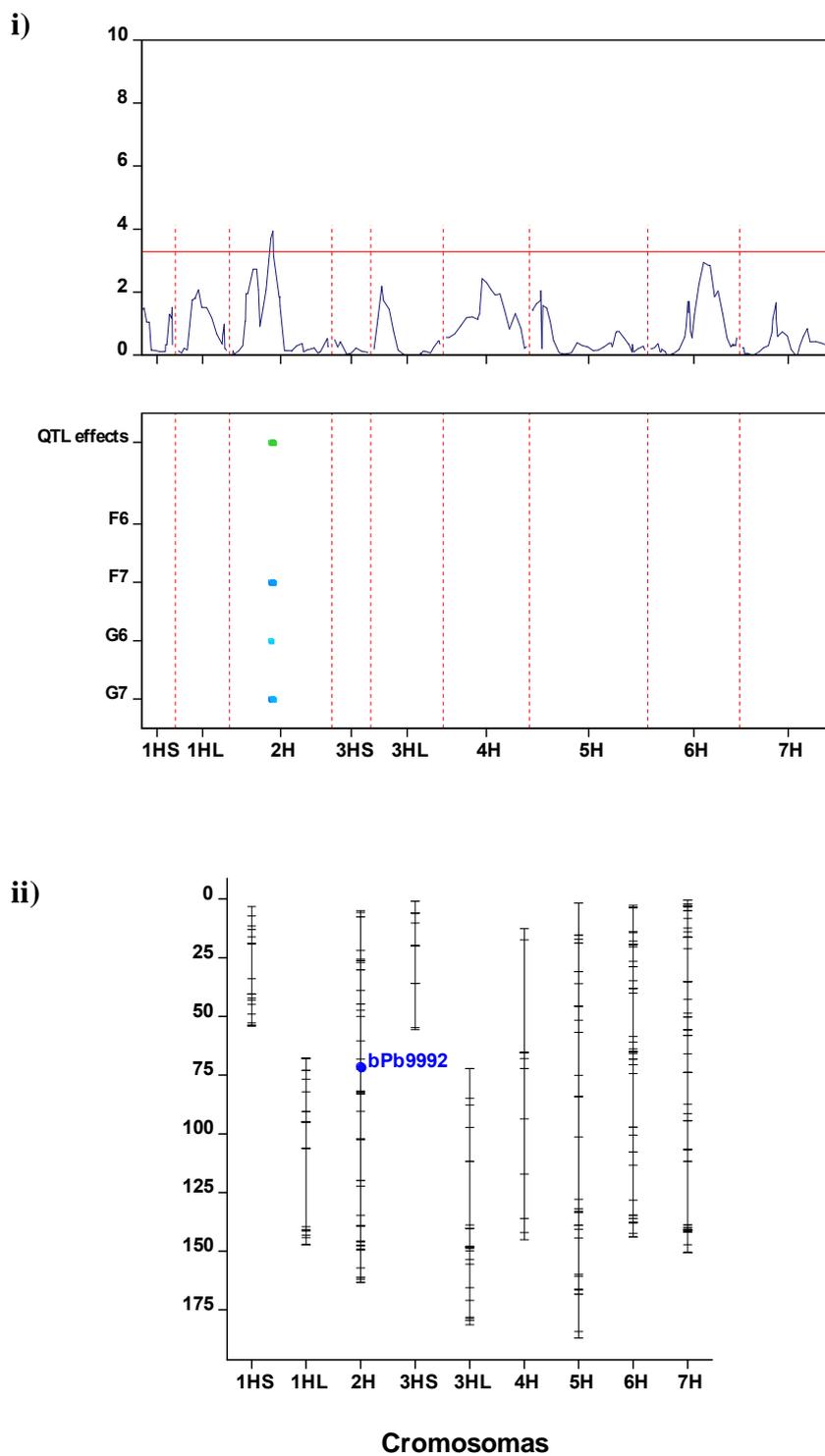


Figura 6.3 (Continuación)

f) Llenado de grano

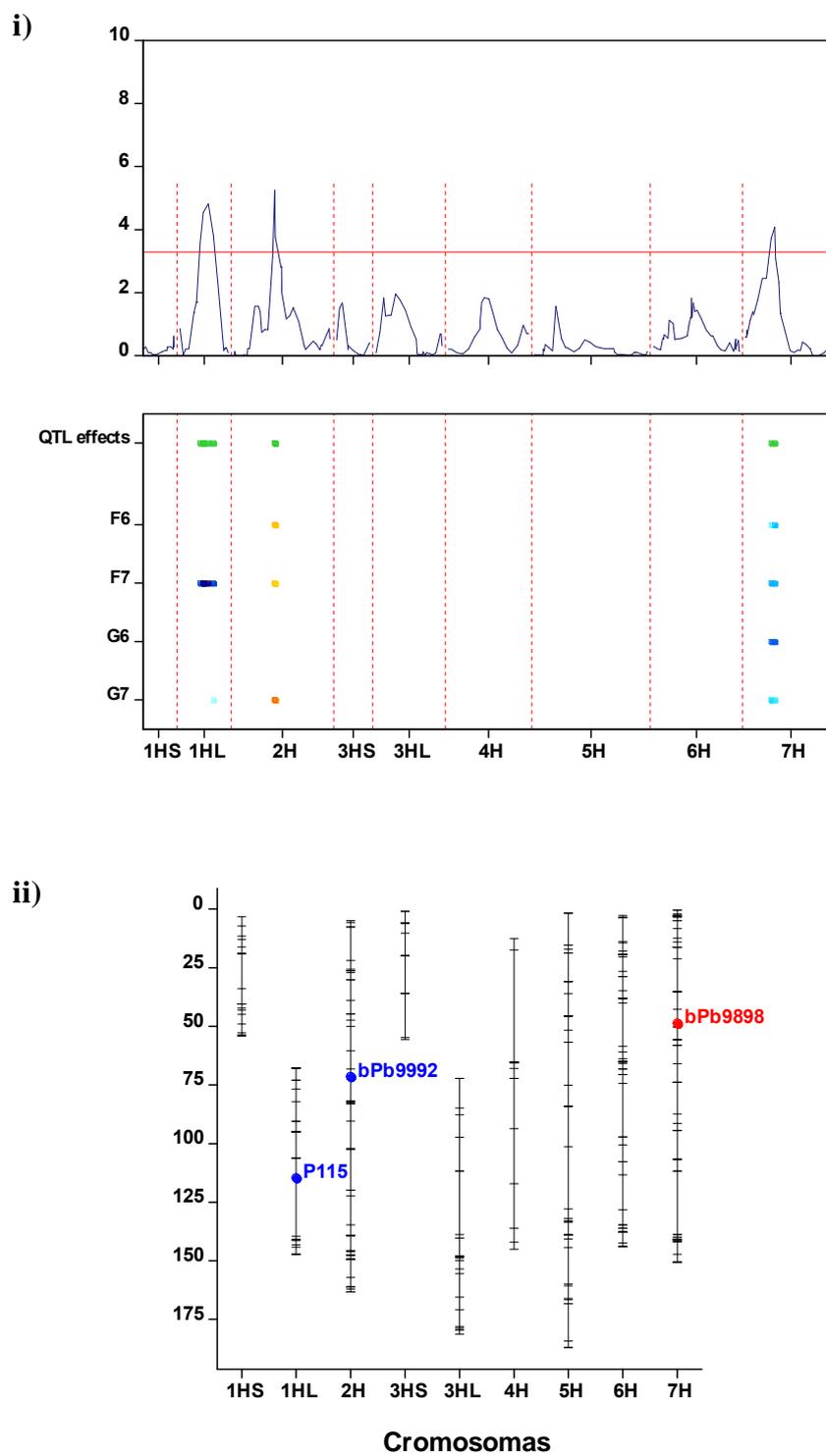


Figura 6.3 (Continuación)

g) Rendimiento

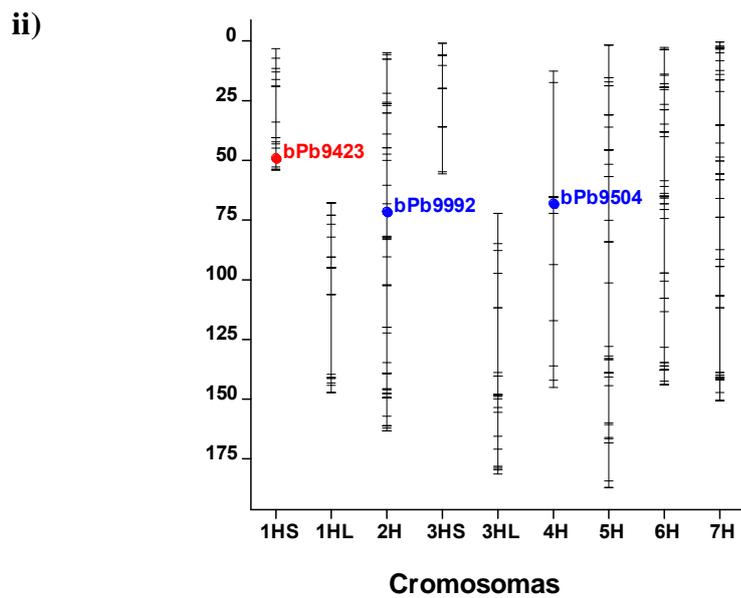
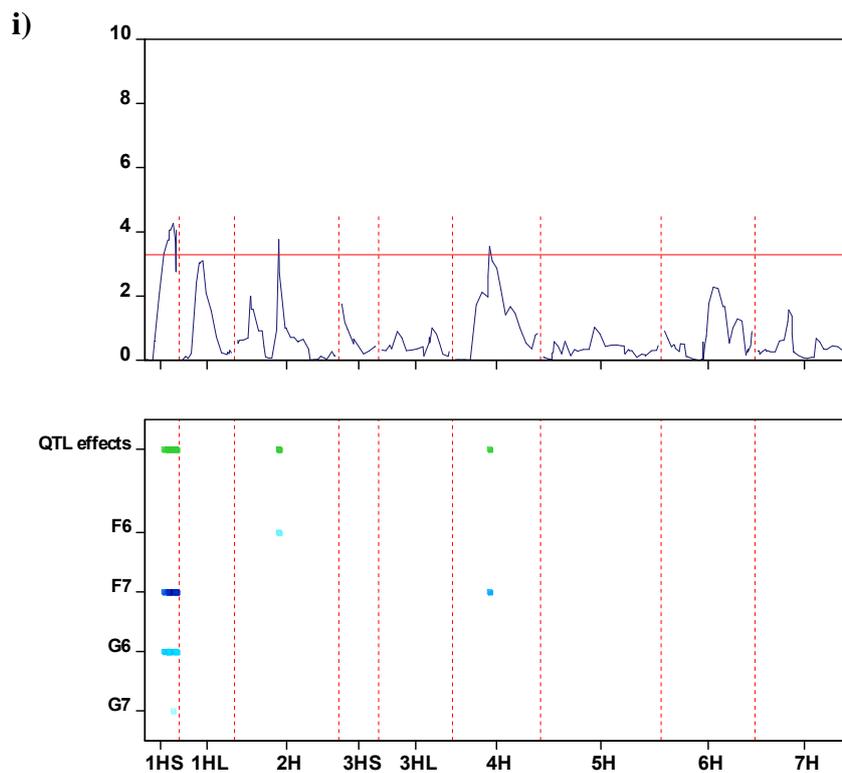


Figura 6.3 (Continuación)

h) Peso de 1000 granos

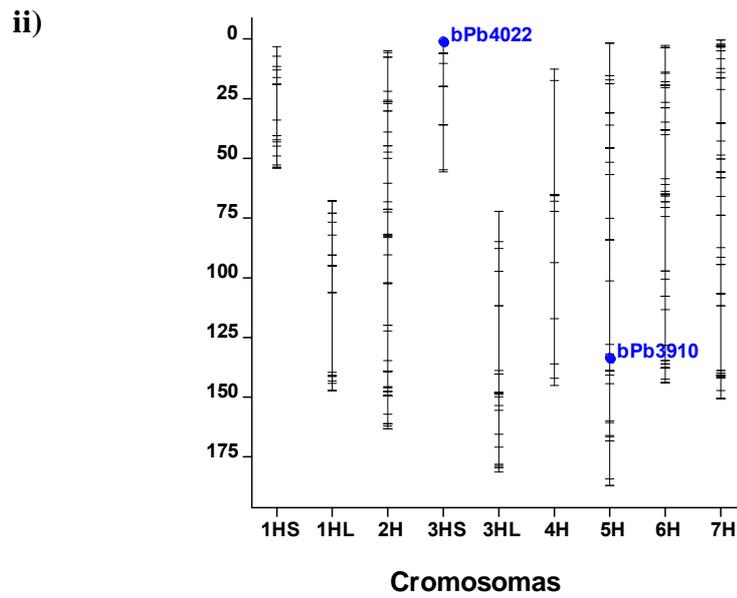
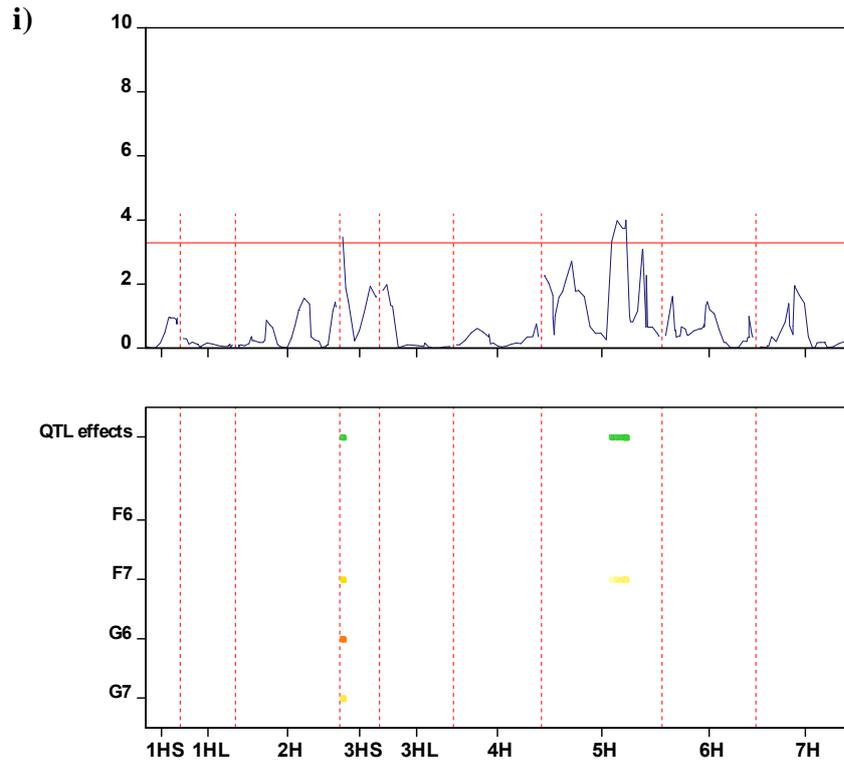


Figura 6.3 (Continuación)

i) Altura

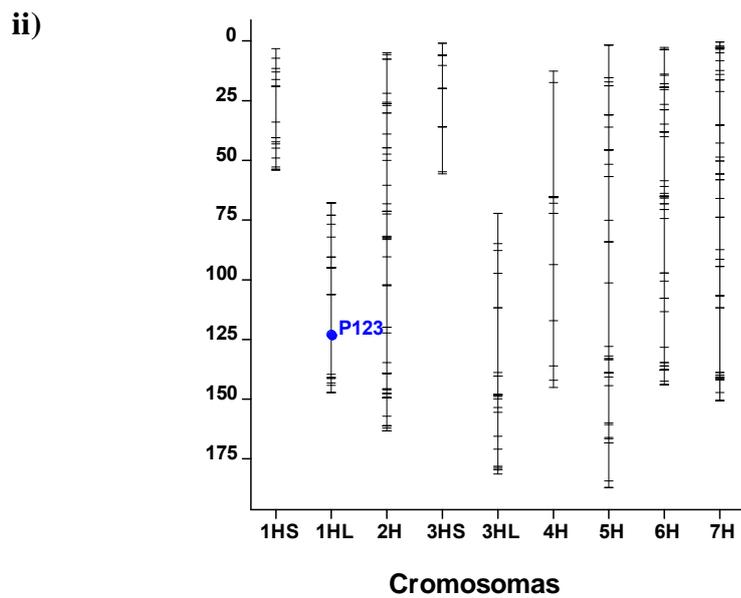
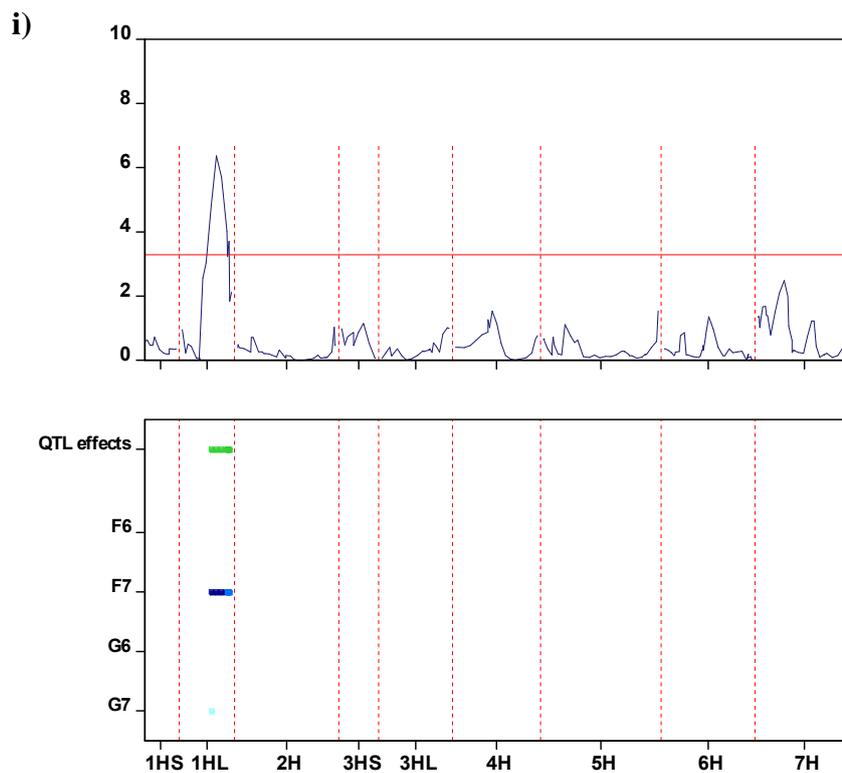


Figura 6.3 (Continuación)

j) Último nudo

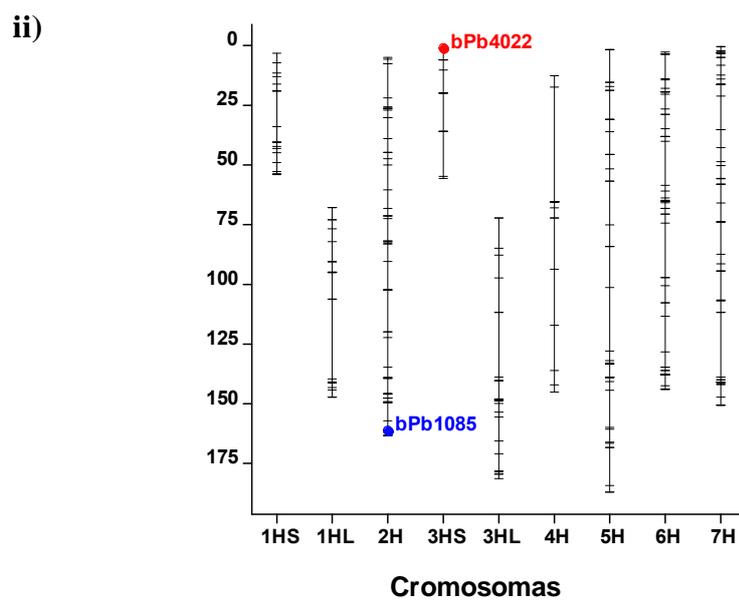
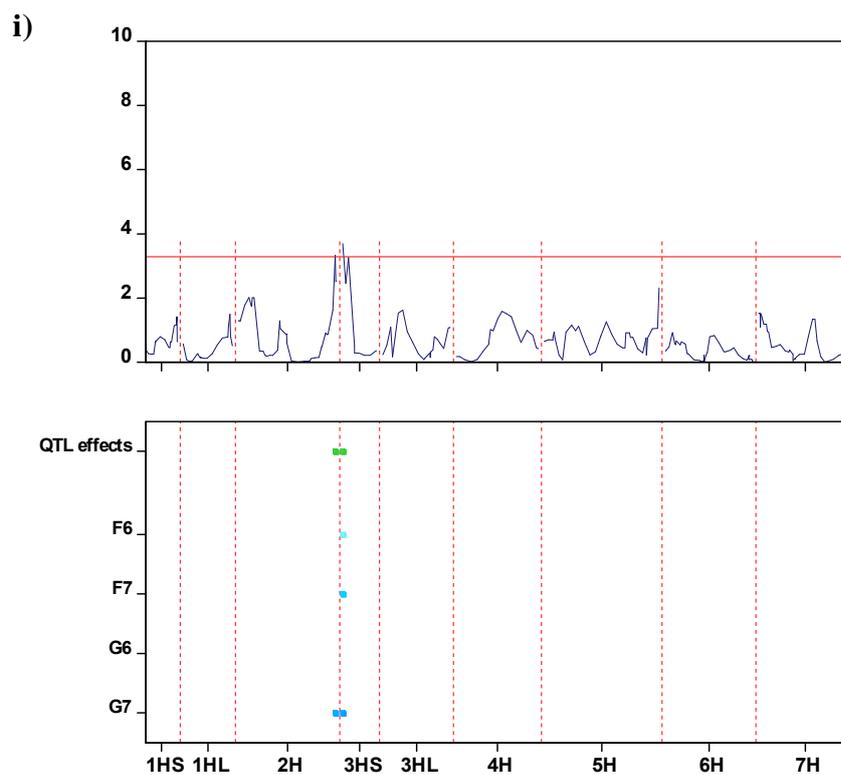


Figura 6.3 (Continuación)

k) Pedúnculo

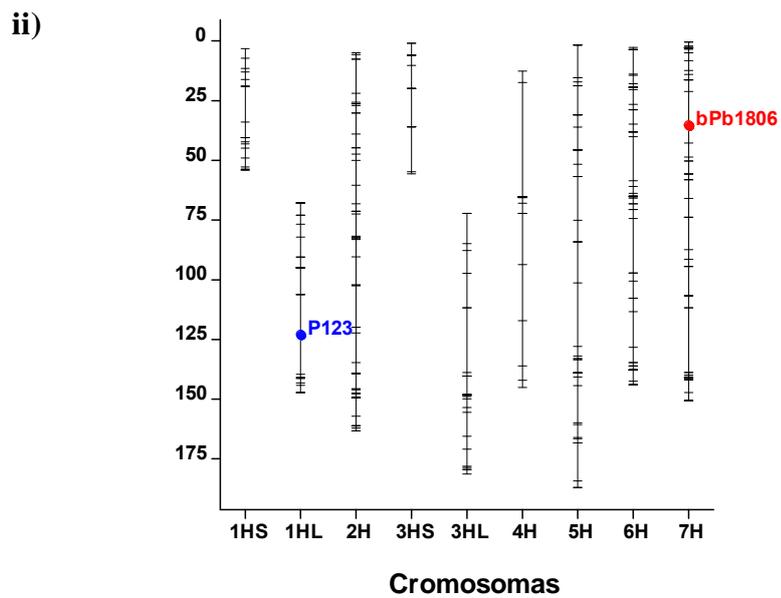
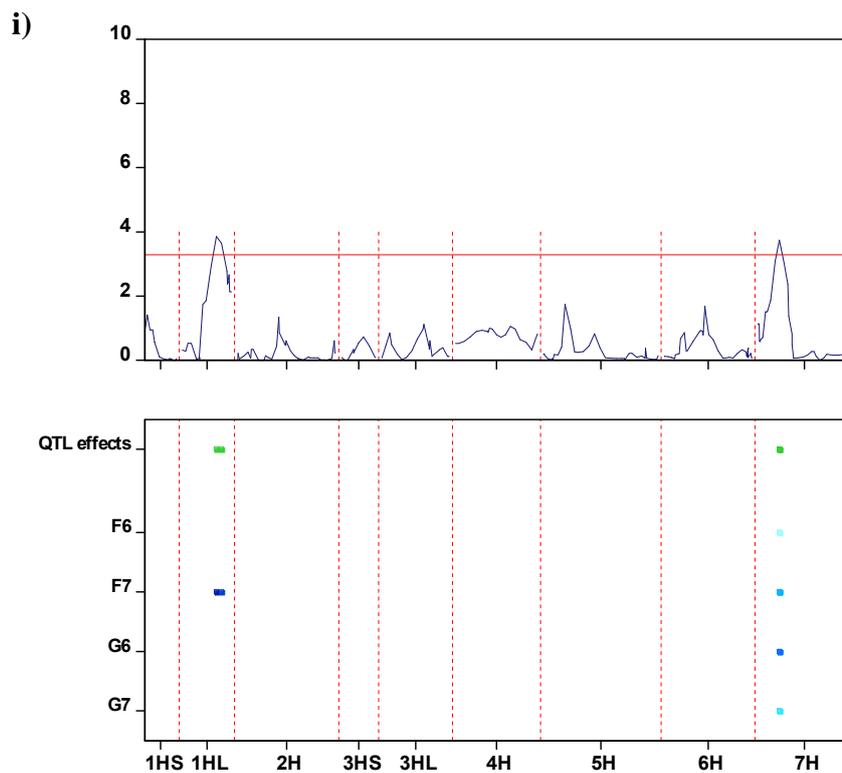


Figura 6.3 (Continuación)

I) Extrusión

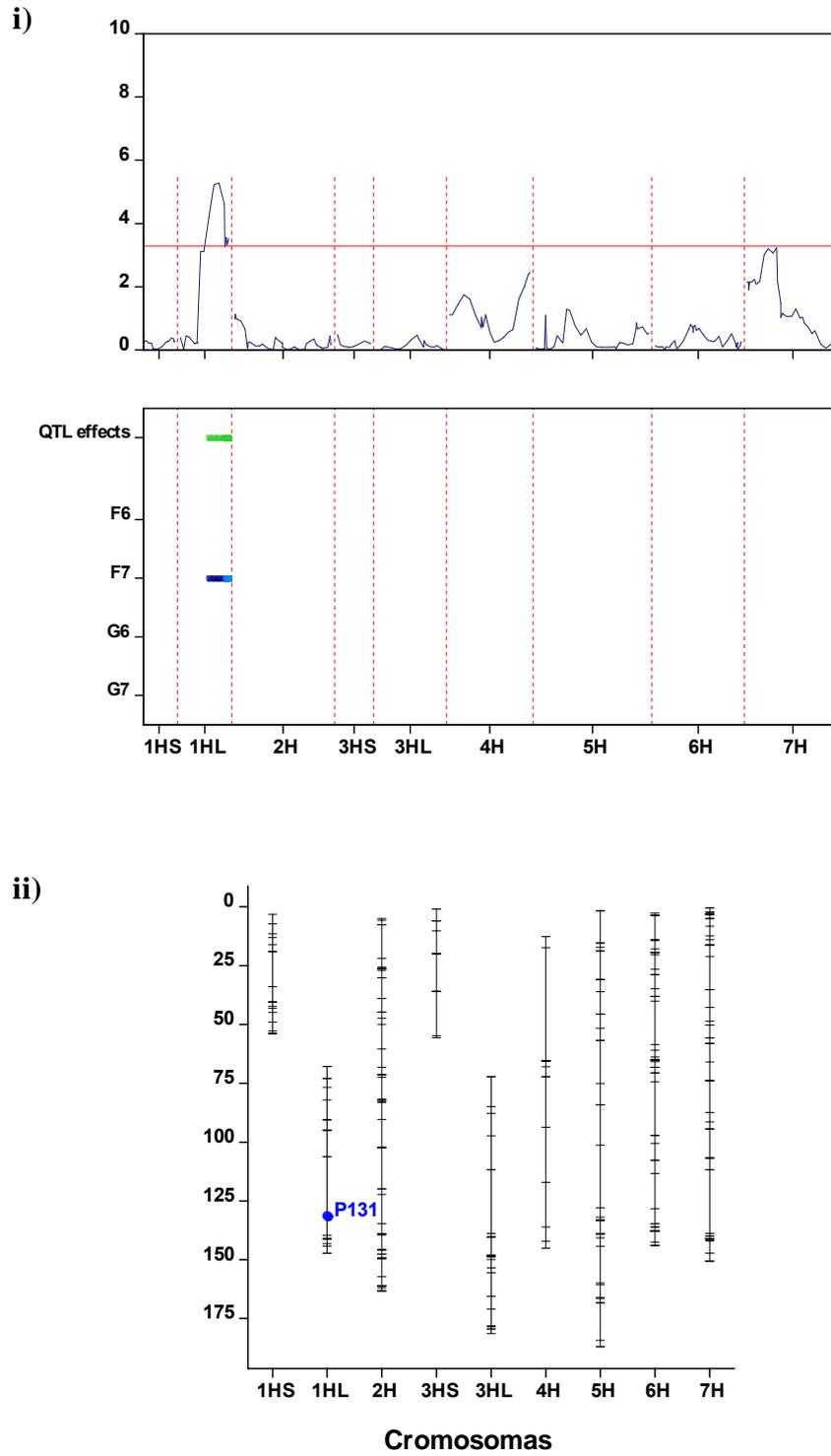


Figura 6.3 (Continuación)

m) Espiga

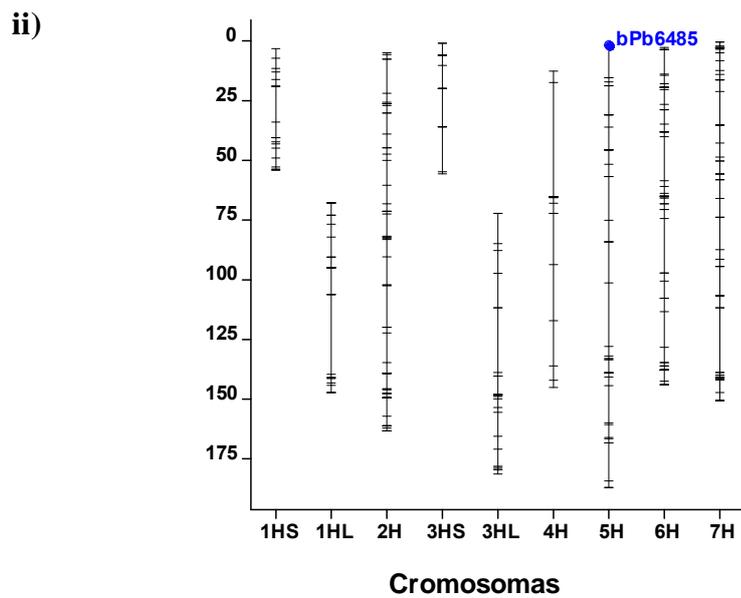
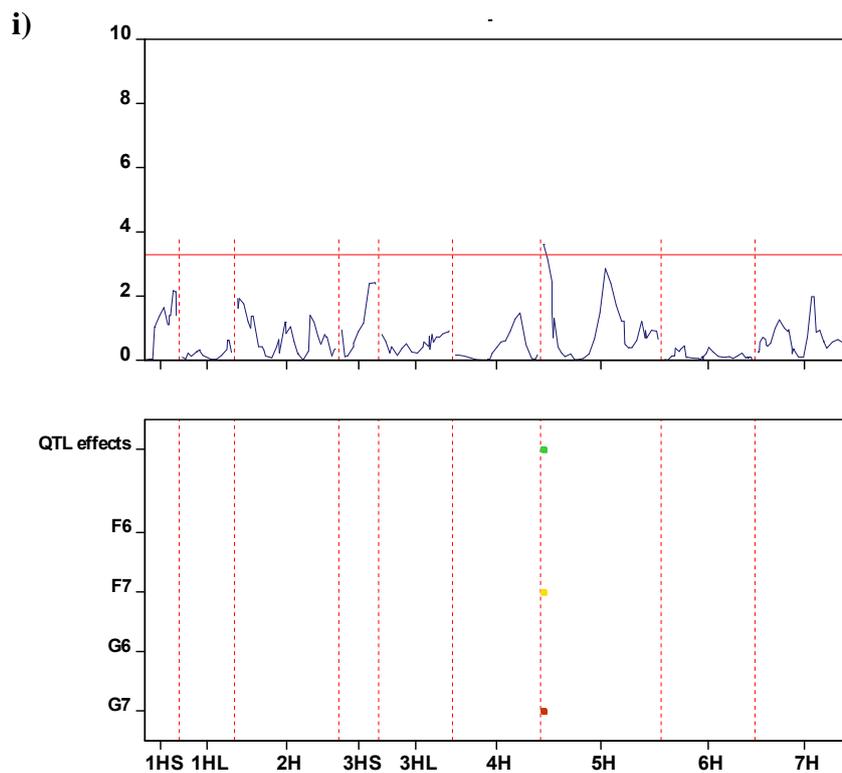


Figura 6.3 (Continuación)

Tabla 6.3 Resumen de los QTLs identificados en la población DH procedente del cruzamiento Albacete × Plaisant. Para cada locus se indica el cromosoma, posición (cM) en el mapa de referencia (Wenzl et al. 2006), bin y significación (-log10(P)). Se indica también el efecto aditivo y la variabilidad explicada en cada ambiente. Los efectos en azul son positivos para Albacete y en naranja positivos para Plaisant.

Carácter	Locus	Cromosoma	Posición (cM)	Bin	-log10(P)	Efecto aditivo				Variabilidad explicada (%)			
						F6	F7	G6	G7	F6	F7	G6	G7
Vigor inicial (0-5)	P115	1H	114,6	12	8,7	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	10,8	22,9	13,3	24,5
	bPb-8399	2H	25,7	3	4,4	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14	3,5	7,4	4,3	7,9
	P119	5H	119,0	10	7,9	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	8,3	17,5	10,1	18,8
Encañado (días)	P115	1H	114,6	12	18,8	-	6,26	-	4,11	-	75,2	-	44,3
	bPb-4494	5H	127,9	11	5,2	-	1,88	-	2,74	-	6,8	-	19,6
Espigado (días)	P115	1H	114,6	12	8,2	-	2,22	-	0,82	-	36,5	-	11,2
	bPb-0220	2H	68,1	7	7,8	-1,06	-1,06	-1,06	-1,06	8,1	8,3	11,1	18,8
	bPb-9898	7H	48,6	5	8,4	1,28	1,08	1,66	0,78	11,9	8,6	27,3	10,2
Elongación del tallo (días)	P115	1H	114,6	12	12,1	-	-3,81	-	-2,91	-	52,9	-	35,8
	bPb-0220	2H	68,1	7	7,3	-0,79	-0,79	-0,79	-0,79	9,7	2,3	14,6	2,6
	P110	5H	110,2	10	7,8	-0,71	-1,60	-0,65	-2,46	7,8	9,3	9,8	25,6
	bPb-9601	7H	42,7	4	7,9	0,80	-	0,78	-1,19	9,9	-	14,2	6,0
Madurez (días)	bPb-9992	2H	71,4	8	3,9	-	-0,60	-	-0,41	-	12,1	-	10,2
Llenado de grano (días)	P115	1H	114,6	12	5,0	-	-1,63	-	-0,42	-	27,0	-	4,4
	bPb-9992	2H	71,4	8	5,5	0,92	0,91	-	0,79	10,2	8,4	-	15,8
	bPb-9898	7H	48,6	5	5,1	-0,69	-0,69	-0,69	-0,69	5,8	4,9	10,4	12,2
Rendimiento (ton/ha)	bPb-9423	1H	49,0	6	4,9	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	8,2	14,2	7,1	10,2
	bPb-9992	2H	71,4	8	3,7	-0,21	-	-	-	6,2	-	-	-
	bPb-9504	4H	67,9	6	3,4	-	-0,20	-	-	-	10,2	-	-
Peso 1000 granos (g)	bPb-4022	3H	1,0	1	3,5	-	0,94	1,65	1,03	-	7,0	16,7	6,4
	bPb-3910	5H	133,5	11	4,0	-	0,82	-	-	-	5,3	-	-
Altura (cm)	P123	1H	122,9	13	6,4	-	-6,02	-	-	-	46,7	-	-
Último nudo (cm)	bPb-1085	2H	161,1	15	4,1	-	-	-	-1,98	-	-	-	13,0
	bPb-4022	3H	1,0	1	4,5	-1,90	-1,90	-1,90	-1,90	8,9	10,3	6,8	12,0
Pedúnculo (cm)	P123	1H	122,9	13	4,0	-	-2,63	-	-	-	35,0	-	-
	bPb-1806	7H	35,2	3	5,1	-1,32	-1,32	-1,32	-1,32	15,4	8,9	8,9	7,7
Extrusión (cm)	P123	1H	122,9	13	5,2	-	-2,86	-	-	-	41,6	-	-
Espiga (cm)	bPb-6485	5H	1,7	1	3,6	-	0,24	-	0,41	-	7,7	-	17,3

6.4. DISCUSIÓN

Tras la caracterización citogenética de las líneas doble haploides, y la consiguiente identificación de los cromosomas implicados en la translocación recíproca, se procedió a la caracterización fenotípica. El objetivo principal de esta caracterización era comprobar si la presencia o ausencia de la translocación recíproca tenía un efecto directo en algún carácter de interés agronómico y/o una posible relación con la resistencia de Albacete a ambientes extremos de frío y sequía.

Utilizando los datos de la caracterización genotípica se dividieron las líneas doble haploides en portadoras y no portadoras de la translocación (34-T/44-NT) y se realizó un contraste de significación para el conjunto de los ensayos y de forma independiente para cada uno de ellos. Únicamente el peso de mil granos (TKW) resultó claramente significativo para cada uno de los ambientes y en el conjunto de todos ellos. Curiosamente entre los parentales Albacete y Plaisant este carácter solo fue significativo en F6. Además, excepto en este ensayo (F6), los doble haploides portadores de la translocación, muestran valores de peso de mil granos (TKW) ligeramente superiores que el parental Albacete. La combinación de la translocación recíproca con determinados alelos de Plaisant podría explicar esta ligera superioridad para las líneas doble haploides con translocación. La utilización de líneas de sustitución o líneas isogénicas, portadoras de la translocación recíproca en un determinado *background* de Plaisant, ayudaría a determinar la veracidad de esta hipótesis. (Han et al. 1999; Kandemir et al. 2000)

Para rendimiento se observaron valores ligeramente superiores en las líneas portadoras de la translocación aunque sin resultados claramente significativos excepto en F7. Es probable que el tamaño de la población utilizada en estos ensayos no sea suficiente como para detectar diferencias significativas por lo que sería conveniente la realización de ensayos que incluyeran un mayor número de líneas que permitieran comprobar esta tendencia.

En el análisis de QTLs se identificaron un total de 26 QTLs significativos implicados en los caracteres estudiados. La mayor parte de ellos, y también los más significativos, se encontraron para los caracteres relacionados con el crecimiento y desarrollo de la planta; principalmente para vigor inicial, fechas de encañado y espigado,

elongación del tallo y llenado de grano. La distribución de estos QTLs en el genoma coincidía con la posición de los genes *PPDH2*, *VRNHI*, *Eam6* y *eps-7L* relacionados, respectivamente, con respuesta a fotoperiodo, floración o precocidad intrínseca (Figura 6.4). La asociación de los QTLs con determinados genes de floración podría explicar las diferencias significativas detectadas en los patrones de desarrollo de Albacete y Plaisant. El carácter vigor inicial se muestra siempre superior en Albacete aunque no de forma significativa en F6 y G6. En F7 y G7, donde los valores de vigor inicial se muestran significativos, también es más temprana para Albacete la fecha de encañado y espigado. En F6 y G6 la fecha de encañado es similar para ambos parentales mientras que la de espigado es más tardía para Albacete.

El gen *PPDH2*, localizado en el 1HL, y cercano a QTLs para vigor inicial, encañado, elongación del tallo y llenado de grano explicaría parte de estos resultados. El alelo dominante *PPDH2*, presente en Albacete pero no en Plaisant, se asocia con floraciones tempranas en plantas que no han sido completamente vernalizadas (Casao et al. 2011). De esta forma, en años con inviernos algo más templados, como el 2007, la expresión de este gen aceleraría el desarrollo de Albacete.

Al efecto causado por *PPDH2* en vigor inicial y encañado, se sumaría el efecto del gen de floración *VRNHI*. Este gen, localizado en el 5HL y junto al que se han identificado QTLs de vigor inicial, encañado y elongación del tallo, incrementa gradualmente su expresión con el aumento del tiempo de vernalización. Sin embargo, el alelo *VRNHI-4*, que es el que presenta Albacete, parece expresarse incluso con periodos muy cortos de vernalización. El alelo invernal típico *vrnHI*, presente en Plaisant, necesita más tiempo de frío para llegar a niveles de expresión detectables (Casao et al. 2011). Al igual que en *PPDH2*, las temperaturas registradas en el 2007, habrían causado una expresión diferencial y acelerado el crecimiento de Albacete. En años con inviernos más fríos, como el 2006, la expresión de este gen habría sido similar en ambos genotipos por lo que no se observan diferencias en vigor inicial o en la fecha de encañado.

En el caso de la fecha de espigado, el efecto de *PPDH2* se vería compensado por el gen de precocidad *Eam6*, localizado en el cromosoma 2H y para el que se han encontrado QTLs asociados a fecha de espigado y madurez en numerosas poblaciones (Marquez-Cedillo et al. 2001; Boyd et al. 2003; Cuesta-Marcos et al. 2008; Castro et al. 2008). Junto

a él se han identificado en este trabajo QTLs de espigado, madurez, elongación del tallo y llenado de grano. Sus efectos son opuestos a los detectados en el cromosoma 1H y se traducen en un retraso de la fecha de espigado de Albacete. En F7 y G7 este retraso compensaría en cierta medida el desarrollo temprano de Albacete, disminuyendo así la diferencia de fecha de espigado entre ambos genotipos. En F6 y G6, con un invierno más frío, *PPDH2* no tendría efecto significativo, sin embargo, para los QTLs asociados a *Eam6*, se observa en ese año un efecto superior que el detectado en F7 y G7. Esto explicaría la fecha de espigado más tardía que se observa en Albacete durante el año 2006.

El tiempo de elongación del tallo, superior para Albacete en todos los ambientes, se explicaría también por la expresión diferencial de estos genes. En F7 y G7 el encañado de Albacete es mucho más temprano que en Plaisant sin embargo, su fecha de espigado no se adelanta en la misma medida debido posiblemente a la expresión de *Eam6*. En F6 y G6 ambos genotipos encañan aproximadamente en la misma fecha pero el espigado en Plaisant es más temprano, prolongándose así la fase de elongación en Albacete.

En el cromosoma 7H también se han identificado QTLs para espigado, elongación del tallo y llenado de grano. Cerca de estos QTLs se localiza el gen *VRNH3*, sin embargo, Albacete y Plaisant, no muestran polimorfismo en distintas regiones del gen (Casas et al. 2011). También en 7HS aunque bastante más alejado se localiza el gen de precocidad *eps7s*, descrito en otras población aunque con efectos muy pequeños y poco significativos (Laurie et al. 1995). En Albacete/Plaisant sin embargo los efectos mostrados por los QTLs localizados en esta zona, asociados o no a *eps7s*, son bastante significativos. Su interpretación sin embargo es bastante confusa. En espigado y llenado de grano hay un efecto constante en todos los ambientes, positivo en el primer caso para Plaisant y para Albacete en el segundo. En elongación del tallo muestra un efecto positivo para Plaisant en F6 y G6, y positivo para Albacete en G7, ambiente en el que la fase de elongación de este genotipo presenta mayor duración.

Para determinados caracteres relacionados con la arquitectura de la planta, como altura total, pedúnculo y extrusión también se identificaron QTLs, bastante significativos localizados en el 1HL entre *PPDH2* y el gen *eam8*, también relacionado con diferencias en la fecha de floración en condiciones de fotoperiodo corto (Franckowiak 1997). Estos QTLs proporcionan a Albacete mayor longitud en F7, lo que podría estar relacionado con la

explicación propuesta para los caracteres de desarrollo ya que, en general, los QTLs para fecha de espigado, suelen tener efecto en otros caracteres importantes como el rendimiento o la altura (Hayes et al. 1993; Bezant et al. 1996).

Para los caracteres de rendimiento (yld) y peso de mil granos (TKW) se identificaron QTLs muy poco significativos. El QTL de rendimiento localizado en 1HS está muy próximo a la zona del punto de corte de la translocación recíproca y tiene un efecto positivo constante para Albacete (+0,24t) lo que apoyaría la tendencia observada en el contraste de significación.

Para concluir podemos decir que de todos los caracteres analizados únicamente el peso de mil granos se muestra significativamente relacionado ($P \leq 0,01$) con la presencia de la translocación recíproca. Respecto al análisis de QTLs, el número detectado parece bastante numeroso, si tenemos en cuenta el reducido tamaño de la población de ensayo, en especial para caracteres relacionados con floración. La posible asociación de estos con determinados genes de respuesta a fotoperiodo o vernalización explica con claridad las diferencias observadas entre Albacete y Plaisant.

Figura 6.4 Localización en el mapa de ligamiento de Albacete x Plaisant de los QTLs identificados en la población DH. En cada pareja aparece a la izquierda el grupo de ligamiento con los DArT y a la derecha la localización de los bins. Las distancias en cM se indica mediante la regla de la izquierda y corresponden a las distancias del mapa consenso (Wenzl et al. 2006). Entre cada pareja aparecen los genes más cercanos a los QTLs localizados. En azul, los QTLs con efecto aditivo positivo para Albacete, en naranja los QTL con efecto aditivo positivo para Plaisant. alt=altura de la planta, ext=extrusión, DtJ=fecha de encañado, DtH=fecha de espigado, DtM=fecha de madurez, DfJtH=elongación del tallo, DfHtM=llenado de grano, nudo=longitud del último nudo, ped=longitud del pedúnculo, tkw=peso de 100 granos, vi=vigor inicial, yld=rendimiento.

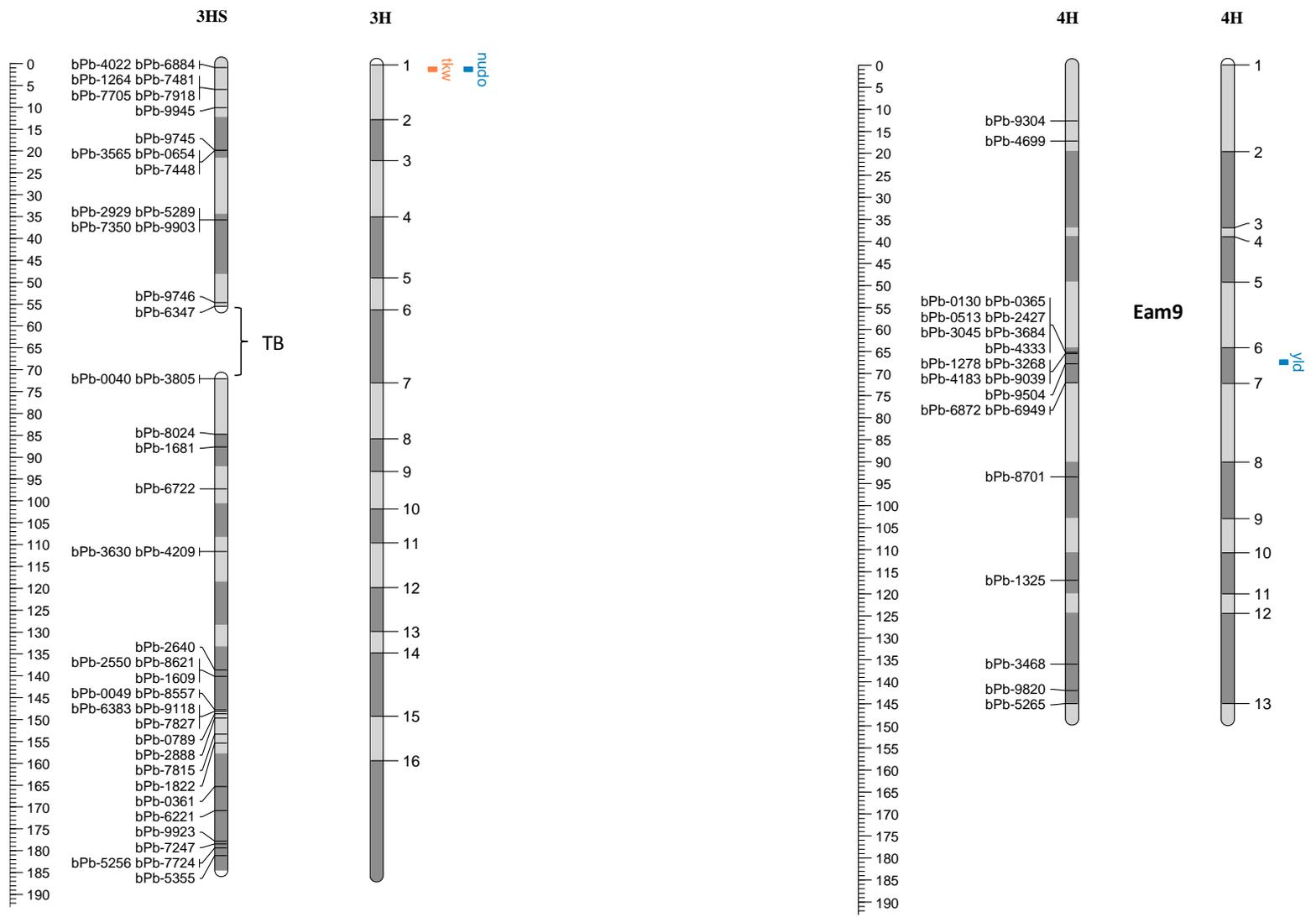


Figura 6.4 (Continuación)

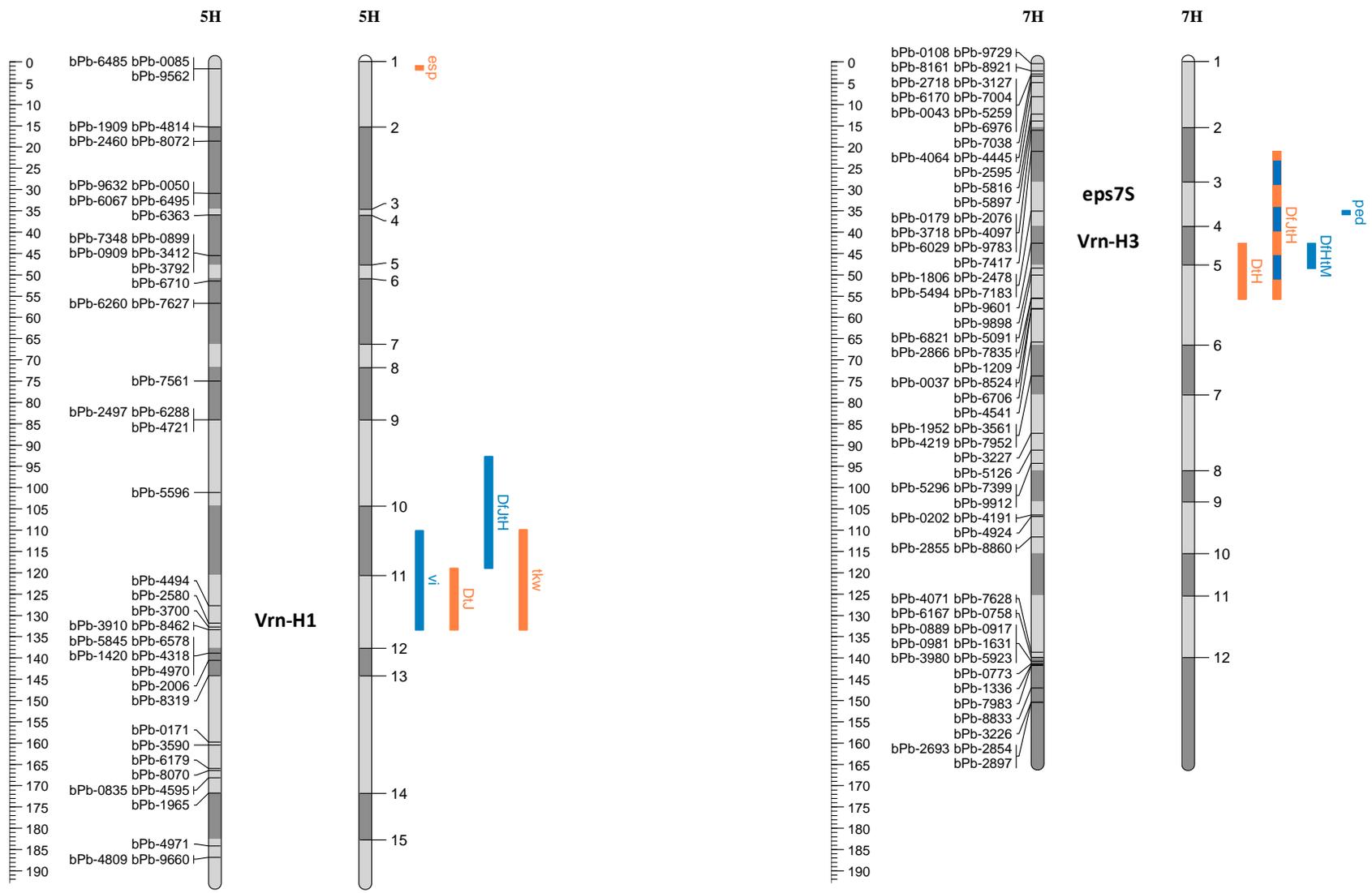


Figura 6.4 (Continuación)

7. CONCLUSIONES

1. La distorsión de la segregación observada en las poblaciones de líneas doble haploides (DHs) y de líneas puras recombinantes (RILs) derivadas del mismo cruzamiento muestra porcentajes similares aunque diferente localización. En el caso de las RILs se ha observado distorsión en marcadores cercanos a genes de desarrollo mientras que las líneas DHs presentan distorsión en zonas con genes de androgénesis.
2. Los mapas de ligamiento realizados en ambas poblaciones muestran menor longitud en el caso de la RILs. Este resultado coincide con la bibliografía sin embargo no se ha podido encontrar una explicación razonable para el mismo.
3. Los resultados obtenidos en la caracterización genética de la población doble haploide derivada del cruzamiento de Albacete y Plaisant, junto con el resultado de la hibridación *in situ* fluorescente de metafases de Albacete muestran sin ninguna duda que la translocación recíproca implica a los cromosomas 1H y 3H.
4. El análisis de ligamiento y la construcción de un mapa saturado con marcadores DArT y SSR en la población doble haploide derivada de Albacete x Plaisant permiten localizar el punto de corte de la translocación recíproca en los bin 7-8 del cromosoma 1H y en los bin 5-6 del cromosoma 3H.
5. La combinación de los resultados genéticos y citológicos permite establecer en el mapa físico de cebada la zona aproximada en la que se localizaría el punto de corte de la translocación recíproca y se situaría entre un 37% del brazo 1HS y un 30% del 1HL, y entre un 57% del 3HS y un 32% del brazo 3HL.
6. De los caracteres agronómicos estudiados en la población doble haploide derivada de Albacete x Plaisant únicamente el peso de mil granos se muestra asociado de forma significativa a la translocación recíproca mostrando las líneas portadoras valores superiores para este carácter.
7. Se han identificado QTLs muy significativos para los caracteres vigor inicial, fecha de encañado, fecha de espigado y fase de elongación del tallo asociados a los genes de respuesta a fotoperiodo y vernalización, *PPDH2* y *VRNH1*, y al gen de precocidad

intrínseca *Eam6* que explican coherentemente las diferencias significativas que presentan Albacete y Plaisant para estos caracteres.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Blanco C, Goicoechea PG, Roca A, Giraldez R (1993) A cytogenetic map on the entire length of rye chromosome 1R, including one translocation breakpoint, three isozyme loci and four C-bands. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 85:735-744
- Arús P, Cubero JI, García-Mas J, Rallo L (2001). Marcadores moleculares en genética y mejora de plantas. En: Caballero JL, Valpuesta V, Muñoz J (eds) *Introducción a la biotecnología vegetal: métodos y aplicaciones*. Publicaciones obra social y cultural Cajasur, pp 265-295.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196: 80-83.
- Becker J, Heun M (1995) Barley Microsatellites - Allele Variation and Mapping. *Plant Molecular Biology* 27:835-845
- Benito C, Llorente F, Henriques-Gil N, Gallego FJ, Zaragoza C, Delibes A, Figueiras AM (1994) A map of rye chromosome 4R with cytological and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics* 87:941-946
- Bezant J, Laurie D, Pratchett N, Chojecki J, Kearsey M (1997) Mapping QTL controlling yield and yield components in a spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross using marker regression. *Molecular Breeding* 3:29-38
- Boyd WJR, Li CD, Grime CR, Cakir M, Potipibool S, Kaveeta L, Men S, Jamal-Kamali MR, Barr AR, Moody DB, et al (2003) Conventional and molecular genetic analysis of factors contributing to variation in the timing of heading among spring barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes grown over a mild winter growing season. *Aust J Agric Res* 54: 1277–1301
- Brown SE, Stephens JL, Lapitan NLV, Knudson DL (1999) FISH landmarks for barley chromosomes (*Hordeum vulgare* L.). *Genome* 42:274-281
- Casao MC, Karsai I, Igartua E, Gracia MP, Veisz O, Casas AM (2011) Adaptation of barley to mild winters: A role for PPDH2. *BMC Plant Biology* 11: 164
- Casas AM, Djemel A, Ciudad FJ, Yahiaoui S, Ponce LJ, Contreras-Moreira B, Gracia MP, Lasa JM, Igartua E (2011) *HvFT1 (VrnH3)* drives latitudinal adaptation in Spanish barleys. *Theoretical and Applied Genetics* 122:1293-1304
- Castro AJ, Hayes P, Viega L, Vales I (2008) Transgressive segregation for phenological traits in barley explained by two major QTL alleles with additivity. *Plant Breeding* 127:561-568
- Catcheside DG (1939) A position effect in *Oenothera*. *J. Genet.*, 38: 345-352
- Catarino S, Alvarez E, Campa A, Vieira R, Roca A, Giraldez R (2006) Identification and physical mapping of induced translocation breakpoints involving chromosome 1R in rye. *Chromosome Research* 14:755-765
- Chen X, Cistue L, Munoz-Amatriain M, Sanz M, Romagosa I, Castillo A, Valles M (2006) Genetic markers for doubled haploid response in barley. *Euphytica*

8. Referencias bibliográficas

- Cistue L, Vallés MP, Echavarri B, Sanz JM, Castillo A (2003) Barley anther culture. In: Maluszynski M, Kasha KJ, P. FB, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 29-34
- Cistue L, Echavarri B, Batlle F, Soriano M, Castillo A, Valles MP, Romagosa I (2005) Segregation distortion for agronomic traits in doubled haploid lines of barley. *Plant Breeding* 124:546-550
- Cistué L, Cuesta-Marcos A, Chao S, Echávarri B, Chutimanitsakun Y, Corey A, Filichkina T, Garcia-Mariño N, Romagosa I, Hayes P (2011) Comparative mapping of the Oregon Wolfe Barley using doubled haploid lines derived from female and male gametes. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 122:1399-1410
- Colson I, Delneri D, Oliver SG (2004) Effects of reciprocal chromosomal translocations on the fitness of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Reports* 5:392-398
- Comings DE and Okada TA (1970) Whole-mount electron microscopy of the centromere region of metacentric and telocentric mammalian chromosomes. *Cytogenetics*, 9: 436-449.
- Costa JM, Corey A, Hayes PM, Jobet C, Kleinhofs A, Kopisch-Obusch A, Kramer SF, Kudrna D, Li M, Riera-Lizarazu O, Sato K, Szucs P, Toojinda T, Vales MI, Wolfe RI (2001) Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: a phenotypically polymorphic doubled-haploid population. *Theoretical and Applied Genetics* 103:415-424
- Cuadrado A, Jouve M (1997) Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Secale*. *Genome* 40:309-317
- Cuadrado A, Schwarzacher T (1998) The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma* 107:587-594
- Cuadrado A, Schwarzacher T, Jouve N (2000) Identification of different chromatin classes in wheat using in situ hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. *Theoretical and Applied Genetics* 101:711-717
- Cuadrado A, Jouve N. (2007) The nonrandom distribution of long clusters of all possible classes of trinucleotide repeats in barley chromosomes. *Chromosome Research* 15:711-720.
- Cuesta-Marcos A, Igartua E, Ciudad F, Codesal P, Russell J, Molina-Cano J, Moralejo M, Szűcs P, Gracia M, Lasa J, Casas A (2008) Heading date QTL in a spring × winter barley cross evaluated in Mediterranean environments. *Molecular Breeding* 21:455-471
- De la Pena RC, Smith KP, Capettini F, Muehlbauer GJ, Gallo-Meagher M, Dill-Macky R, Somers DA, Rasmusson DC (1999) Quantitative trait loci associated with resistance to *Fusarium* head blight and kernel discoloration in barley. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 99:561-569
- Dobzhansky TH (1936) position effect on genes. *Biol. Rev.*, 11: 351-361.
- Doyle JJ, Doyle JL. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus* 12:13-15.

- Dufour P, Johnsson C, Antoine-Michard S, Cheng R, Murigneux A, Beckert M (2001) Segregation distortion at marker loci: variation during microspore embryogenesis in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 102:993-1001
- Durrant JD, Gardunia BW, Livingstone KD, Stevens MR, Jellen EN (2006). An algorithm for analyzing linkages affected by heterozygous translocations: QuadMap. *Journal of Heredity* 97:62-66.
- Foisset N, Delourne R (1996) Segregation distortion in androgenic plants. In: Jain SM, Spory SK, and Veilleux RE (eds), *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2:189—201
- Francki M, Walker E, Crawford A, Broughton S, Ohm H, Barclay I, Wilson R, McLean R (2009) Comparison of genetic and cytogenetic maps of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) using SSR and DArT markers. *Molecular Genetics and Genomics* 281:181-191
- Franckowiak JD (1997) Revised linkage maps for morphological markers in barley, *Hordeum vulgare*. *Barley Gent. Newsl*, 26: 9-21
- Gall JG, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *PNAS* 63 (2): 378-383
- Gerlach WL, Bedbrook JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* 7:1869-1885
- Gerlach WL, Dyer TA (1980) Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Research* 8:4851-4865
- González A (2008) Técnicas de interés en la mejora de cebadas tolerantes a sequía y a temperaturas elevadas. I. Estabilidad de las membranas celulares. *Agroecología* 3: 55-60
- Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63:751-762
- Graner A, Jahoor A, Schondelmaier J, Siedler H, Pillen K, Fischbeck G, Wenzel G, Herrmann RG (1991) Construction of an RFLP Map of Barley. *Theoretical and Applied Genetics* 83:250-256
- Graner A, Bauer E (1993) RFLP mapping of the ym4 virus resistance gene in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 86:689-693
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al (2000) *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition.. New York: W. H. Freeman.
- Han F, Ullrich SE, Clancy JA, Romagosa I (1999) Inheritance and fine mapping of a major barley seed dormancy QTL. *Plant Science* 143:113-118

- Hayes PM, Blake TK, Chen THH, Tragoonrung S, Chen F, Pan A, Liu B (1993) Quantitative trait loci on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 7 associated with components of winterhardiness. *Genome* 36: 66-71
- Hayes P, Prehn D, Vivar H, Blake T, Comeau A, Henry I, Johnston M, Jones B, Steffenson B, St. Pierre CA (1996) Multiple disease resistance loci and their relationship to agronomic and quality loci in a spring barley population. *JQTL* 2: <http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/jqtl/>
- He P, Li JZ, Zheng XW, Shen LS, Lu CF, Chen Y, Zhu LH (2001) Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross. *Crop Science* 41:1240-1246
- Hearnden PR, Eckermann PJ, McMichael GL, Hayden MJ, Eglinton JK, Chalmers KJ (2007) A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. *Theor Appl Genet* 115:383-391
- Heun M, Kennedy AE, Anderson JA, Lapitan NLV, Sorrells ME, Tanksley SD (1991) Construction of a Restriction-Fragment-Length-Polymorphism Map for Barley (*Hordeum-Vulgare*). *Genome* 34:437-447
- Isla R., Angas P, Cantero-Martinez C, Aragues, R (1999). Desarrollo radicular y aereo de la cebada (*Hordeum vulgare* L.) en condiciones salinas. [Root and aerial development of barley (*Hordeum vulgare* L.) in saline conditions] *Investigación agraria.Producción y protección vegetales-INIA (España)* v. 14(1-2) p.83-99
- Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A (2001) Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res* 29:E25
- Jáuregui B, Vicente MCd, Messeguer R, Felipe A, Bonnet A, Salesses G, Arus P. (2001) A reciprocal translocation between 'Garfi' almond and 'Nemared' peach. *Theoretical and Applied Genetics* 102:1169-1176.
- Kandemir N, Jones BL, Wesenberg DM, Ullrich SE, Kleinhofs A (2000) Marker-assisted analysis of three grain yield QTL in barley (*Hordeum vulgare* L.) using near isogenic lines. *Molecular Breeding* 6:157-167
- Kasha KJ, Kao KN (1970). High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225: 874-876.
- Kleinhofs A, Kilian A, Saghai 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 B, Sorrells M, Heun M, Franckowiak JD, Hoffman D, Skadsen R, Steffenson BJ (1993) A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theoretical and Applied Genetics* 86:705-712
- Kleinhofs, A. and F. Han (2002). Molecular Mapping of the Barley genome. En: *Barley Science: Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality* (G. Slafer et al. Eds.). New York, The Haworth Press

- Konishi, T. and I. Linde-Laursen (1998) Spontaneous chromosomal rearrangements in cultivated and wild barleys. *Theor. Appl. Genet.* 75:237-243.
- Kosterin OE, Pukhnacheva NV, Gorel FL, Berdnikov VA (1999) Location of the breakpoints of four reciprocal translocations involving linkage group V and their influence on recombination distances between neighboring markers. *Pisum Genetics* 31:13-20
- Künzel G, Korzun L, Meister A (2000) Cytologically Integrated Physical Restriction Fragment Length Polymorphism Maps for the Barley Genome Based on Translocation Breakpoints. *Genetics* 154:397-412
- Künzel G, Waugh R (2002) Integration of microsatellite markers into the translocation-based physical RFLP map of barley chromosome 3H. *Theoretical and Applied Genetics* 105:660-665
- Lacadena JR (1989) *Genética* (4ª edición) ed. AGESA, Madrid
- Lapitan VC, Redoña ED, Abe T, Brar DS (2009) Molecular characterization and agronomic performance of DH lines from the F1 of *indica* and *japonica* cultivar of rice (*Oryza sativa* L.). *Field Crops Res* 112:222-228
- Laurie DA, Griffiths S, Dunford RP, Christodoulou V, Taylor SA, Cockram J, Beales J, Turner A (2004) Comparative genetic approaches to the identification of flowering time genes in temperate cereals. *Field Crops Research* 90:87-99
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS (1992) Physical Mapping of the 18s-5.8s-26s Ribosomal-Rna Genes in Barley by Insitu Hybridization. *Genome* 35:1013-1018
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS. (1993) Physical Mapping of 4 Sites of 5s Rdna Sequences and One-Site of the Alpha-Amylase-2 Gene in Barley (*Hordeum-Vulgare*). *Genome* 36:517-523.
- Li H, Kilian A, Zhou M, Wenzl P, Huttner E, Mendham N, McIntyre L, Vaillancourt R (2010) Construction of a high-density composite map and comparative mapping of segregation distortion regions in barley. *Molecular Genetics and Genomics* 284:319-331
- Li JZ, Sjakste TG, Roder MS, Ganai MW (2003) Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 107:1021-1027
- Linde-Laursen I, Heslop-Harrison JS, Shepherd KW, Taketa S (1997) The barley Genome and its Relationship with the Wheat Genomes. A Survey with an Internationally Agreed Recommendation for Barley Chromosome Nomenclature. *Hereditas* 126:1-16
- Liu ZW, Biyashev RM, Saghai Maroof MA (1996) Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor Appl Genet* 93:869-876
- Livingstone KD, Churchill G, Jahn MK. (2000) Linkage mapping in populations with karyotypic rearrangements. *J Hered* 91:423-428.

8. Referencias bibliográficas

- Lu HL, Romero-Severson JR-S, Bernardo RB (2002) Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 105:622-628
- Mahama AA, Palmer RG (2003) Translocation breakpoints in soybean classical genetic linkage groups 6 and 8. *Crop Science* 43:1602-1609
- Malosetti M, van Eeuwijk F, Boer M, Casas A, Elía M, Moralejo M, Bhat P, Ramsay L, Molina-Cano J-L (2011) Gene and QTL detection in a three-way barley cross under selection by a mixed model with kinship information using SNPs. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 122:1605-1616
- Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (2003) Doubled haploid production in crop plants: a manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp 21-52.
- Manninen OM (2000) Associations between anther-culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100:57-62
- Marquez-Cedillo LA, Hayes PM, Kleinhofs A, Legge WG, Rosnagel BG, Sato K, Ullrich SE, Wesenberg DM (2001) QTL analysis of agronomic traits in barley based on the doubled haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm groups. *Theoretical and Applied Genetics* 103:625-637
- Martín A (2002). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. En: Nuez F, Carrillo JM, Lozano R (eds) *Genómica y mejora vegetal*. Junta de Andalucía, Ediciones Mundi-Prensa, Sevilla, pp 37-64.
- McCouch SR and Doerge RW (1995) QTL mapping in rice. *Trends in Genetics*. Vol. 11, 12:482-487
- Muller HJ (1940) Bearings of the 'Drosophila' work on systematics. *The New Systematics*:185-268
- Muñoz-Amatriain M, Castillo AM, Chen XW, Cistue L, Valles MP (2008) Identification and validation of QTLs for green plant percentage in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Molecular Breeding* 22:119-129
- Nagy ED, Molnar-Lang M, Linc G, Lang L (2002) Identification of wheat-barley translocations by sequential GISH and two-colour FISH in combination with the use of genetically mapped barley SSR markers. *Genome* 45:1238-1247
- Osborn TC, Butrulle DV, Sharpe AG, Pickering KJ, Parkin IAP, Parker JS, Lydiate DJ (2003) Detection and effects of a homeologous reciprocal transposition in *Brassica napus*. *Genetics* 165:1569-1577
- Palmer CE, Keller WA (2005). Overview of Haploidy. En: Palmer CE, Keller WA, Kasha KJ (eds) *Haploids in crop improvement II*. Springer-Verlag, Berlin, pp 3-9.

- Pan A, Hayes PM, Chen F, Chen THH, Blake T, Wright S, Karsai I, Bedö Z (1994) Genetic analysis of the components of winterhardiness in barley (*Hordeum vulgare* L.). TAG Theoretical and Applied Genetics 89:900-910
- Paterson AH. (1996) Making genetic maps. In: A.H. Paterson (Ed.), Genome Mapping in Plants, pp. 23–39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas.
- Pedersen C, Linde-Laursen I (1994) Chromosomal locations of four minor rDNA loci and a marker microsatellite sequence in barley. Chromosome Research 2:65-71
- Pedersen C, Giese H, Linde-Laursen I (1995) Towards an Integration of the Physical and the Genetic Chromosome Maps of Barley by in Situ Hybridization. Hereditas 123:77-88
- Perez-Ortín JE, Querol A, Puig S, Barrio E (2002) Molecular Characterization of a Chromosomal Rearrangement Involved in the Adaptive Evolution of Yeast Strains. Genome Res 12:1533-1539
- Pillen K, Binder A, Kreuzkam B, Ramsay L, Waugh R, Förster J, León J (2000) Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. Theor Appl Genet 101:652-660
- Powell W, Thomas WTB, Baird E, Lawrence P, Booth A, Harrower B, McNicol JW, Waugh R (1997) Analysis of quantitative traits in barley by the use of amplified fragment length polymorphisms. Heredity 79: 48-59
- Qi X, Stam P, Lindhout P (1998) Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. Theoretical and Applied Genetics 96:376-384
- Ramsay L, Macaulay M, Ivanissevich SD, MacLean K, Cardle L, Fuller J, Edwards KJ, Tuveesson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmiroli N, Sjakste T, Ganai M, Powell W, Waugh R. (2000) A simple sequence repeat-based linkage map of barley. Genetics 156:1997-2005.
- Ramsay L, Russell J, Macaulay M, Booth A, Thomas WTB, Waugh R (2004) Variation shown by molecular markers in barley: genomic and genetic constraints. Aspects Appl Biol 72:147-154.
- Rieger R, Michaelis A, Green MM (1968) Glossary of Genetics and Cytogenetics. Classical and Molecular (3rd edition revised) Allen & Unwind, Ltd., London, 507 pp
- Sanchez-Monge E, Jouve N (1989) Genética (2^a edición). Omega. Barcelona
- Sayed H, Kayyal H, Ramsey L, Ceccarelli S, Baum M (2002) Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) detected by simple sequence repeat (SSR) markers. Euphytica 125:265-272
- Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS. (1989) In situ Localization of Parental Genomes in a Wide Hybrid. Ann Bot 64:315-324.

- Schwarzacher T (2003) DNA, chromosomes, and in situ hybridization. *Genome* 46:953-962
- Serizawa N, Nasuda S, Shi F, Endo TR, Prodanovic S, Schubert I, Kunzel G (2001) Deletion-based physical mapping of barley chromosome 7H. *Theoretical and Applied Genetics* 103:827-834
- Singh, R. J. *Plant Cytogenetics* (CRC Press, Boca Raton,2003).
- Spofford JB (1976) Position effect variegation in *Drosophila*. In *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 1c, M. Asburner and E. Novitski, eds. (Florida: Academic Press), 955-1018
- Stephens JL, Brown SE, Lapitan NLV, Knudson DL (2004) Physical mapping of barley genes using an ultrasensitive fluorescence in situ hybridization technique. *Genome* 47:179-189
- Struss D, Plieske J (1998) The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor Appl Genet* 97:308-315
- Tadmor Y, Zamir D, Ladizinsky G (1987) Genetic-Mapping of an Ancient Translocation in the Genus *Lens*. *Theoretical and Applied Genetics* 73:883-892.
- Taketa S, Choda M, Ohashi R, Ichii M, Takeda K (2002) Molecular and physical mapping of a barley gene on chromosome arm 1HL that causes sterility in hybrids with wheat. *Genome* 45:617-625
- Taylor DR, Ingvarsson PK (2003) Common features of segregation distortion in plants and animals. *Genetica* 117:27-35
- Thomas W, Powell W, Waugh R, Chalmers KJ, Barua U, Jack P, Lea V, Forster B, Swanston J, Ellis RP (1995) Detection of quantitative trait loci for agronomic, yield, grain and disease characters in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) TAG *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1037-1047
- Thomas WTB, Forster BP, Gertsson B. (2003) Doubled haploids in breeding. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) *Doubled haploid production in crop plants: a manual*. Kluwer Acad Publ, Dordrecht, pp 337-350
- Torjek O, Witucka-Wall H, Meyer RC, Korff Mv, Kusterer B, Rautengarten C, Altmann T (2006) Segregation distortion in *Arabidopsis* C24/Col-0 and Col-0/C24 recombinant inbred line populations is due to reduced fertility caused by epistatic interaction of two loci. TAG *Theoretical and Applied Genetics* 113:1551-1561
- Vales MI, Schon CC, Capettini F, Chen XM, Corey AE, Mather DE, Mundt CC, Richardson KL, Sandoval-Islas JS, Utz HF, Hayes PM (2005) Effect of population size on the estimation of QTL: a test using resistance to barley stripe rust. *Theoretical and Applied Genetics* 111:1260-1270

- Van Ooijen JW. (2006) JoinMap 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands.
- Varshney RK, Grosse I, Hähnel U, Siefken R, Prasad M, Stein N, Langridge P, Altschmied L, Graner A (2006) Genetic mapping and BAC assignment of EST-derived SSR markers proves non-uniform distribution of genes in the barley genome. *Theor Appl Genet* 113:239-250.
- Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Roder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Niks RE, Graner A. (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet* 114:1091-1103.
- Vázquez JF, Sánchez-Monge E (1987) Meiotic behaviour and fertility of three cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) and their mutants induced by irradiation. *Caryologia* 40 (4): 381-385.
- von Wettstein-Knowles, P. (1992). Cloned and mapped genes: Current status. In *Barley: Genetics, Biochemistry Molecular Biology and and Biotechnology*, (Shewry, P.R. Ed.) Wallingford: C.A.B. International, pp 73-98.
- Voorrips RE. (2002) MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity* 93 (1): 77-78.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Vandele T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) Aflp - a New Technique for DNA-Fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414
- Wenzl P, Carling J, Kudrna D, Jaccoud D, Huttner E, Kleinhofs A, Kilian A (2004) Diversity Arrays Technology (DArt) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:9915-9920
- Wenzl P, Li H, Carling J, Zhou M, Raman H, Paul E, Hearnden P, Maier C, Xia L, Caig V, Ovesna J, Cakir M, Poulsen D, Wang J, Raman R, Smith KP, Muehlbauer GJ, Chalmers KJ, Kleinhofs A, Huttner E, Kilian A. (2006) A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BMC Genomics* 7:(12 August 2006).
- Xu Y, Zhu L, Xiao J, Huang N, McCouch SR (1997) Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F₂, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics* 253:535-545
- Zivy M, Devaux P, Blaisonneau J, Jean R, Thiellement H (1992) Segregation distortion and linkage studies in microspore-derived double haploid lines of *Hordeum vulgare* L. *Theoretical and Applied Genetics* 83:919-924
- Zohary D, Hopf M (1988). *Domestication of plants in the old world*. Clarendon, Oxford.