

# **MARCADORES CITOGENÉTICOS MOLECULARES Y SUS APLICACIONES EN LA MEJORA GENÉTICA VEGETAL**

Nicolás Jouve, Angeles Bernardo, Angeles Cuadrado y Pilar Rubio  
Departamento de Biología Celular y Genética,  
Universidad de Alcalá de Henares (Madrid)

Consuelo Soler

Unidad de Mejora de Plantas, S.G.I.T., Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias,  
Alcalá de Henares (Madrid)

## **1. INTRODUCCIÓN**

La Mejora Genética Vegetal es un tecnología, que integra un conjunto de actividades sobre la base del conocimiento de numerosas ciencias. Su finalidad es la obtención de nuevos genotipos de plantas cultivadas que satisfagan mejor las necesidades humanas. Los objetivos de mejora pueden ser muy diversos y de diferente importancia en su priorización. De lo que se trata es de transformar genéticamente las plantas útiles para aumentar su producción, o su calidad, o para conferir resistencia a enfermedades, o tolerancia a agentes ambientales adversos, o para lograr formas de mejor adaptación a nuevas condiciones de cultivo, o para facilitar la mecanización de las labores relacionadas con los cultivos, etc.. Dado que se trata de una mejora genética y por definición heredable, en este tipo de tecnologías queda implícita la necesidad de conocer la regulación genética de los caracteres que se deseen mejorar. Se entiende además, que en el fondo de todo carácter, hay genes, secuencias de ADN cuya actividad o inactividad en el momento y lugar adecuado de la planta, pueden determinar el tipo de manifestación que se desee mejorar. Interesa por lo tanto habilitar métodos de diagnóstico que permitan conocer la presencia o no de los genes de interés.

## 2. EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO EN LA MEJORA

La mejora genética vegetal bien sea de caracteres cualitativos o cuantitativos requiere la utilización de técnicas de caracterización de aquéllo que se maneja. Como de lo que se trata es de transformar genéticamente a la planta, interesa principalmente conocer si el gen o genes que se desean introducir en una variedad o línea determinada están presentes en el genoma. Es decir “diagnosticar” qué planta tiene y cual no los genes objeto de mejora. La observación fenotípica directa supone la adopción de técnicas de determinación fenotípica que minimicen lo mas posible los efectos del ambiente, para lo que se han de cultivar las plantas a analizar, junto a los parentales de partida en caso de tratarse de material segregante, y otros genotipos a modo de testigos. Todo este material debe cultivarse en parcelas o campos de ensayo muy uniformes, bien cuidados y con un control de riegos y microclimas muy riguroso. Esto es especialmente esencial cuando los caracteres a mejorar están regulados por sistemas poligénicos, aditivos y muy dependientes del ambiente en su manifestación.

Muchos de los problemas asociados a la estimación fenotípica en un programa de mejora, podrían ser solucionados mediante el uso del “diagnóstico molecular”, basado en el estudio de las secuencias de ADN responsables de los caracteres que se desean introducir en una planta para su mejora. La utilización de los “marcadores moleculares” se convierten de esta manera en una herramienta extremadamente útil en la mejora de plantas.

El término “mejora molecular” se utiliza para describir programas de mejora vegetal que se apoyan en el uso de diagnósticos por medio de secuencias de ADN. La manera exacta en la que se apliquen estos diagnósticos genéticos en la mejora dependerá de numerosas consideraciones, tanto biológicas como económicas. En cualquier caso, parece obvia la utilidad de un diagnóstico lo más precoz posible, basado en el estudio del genoma o parte del genoma desde las primeras células o tejidos de plántulas recién germinadas, sin necesidad de esperar al desarrollo completo de la planta. Hay que tener en cuenta el costo de los análisis para diagnosticar la presencia de los marcadores, ya que en mejora genética habrá situaciones en las que haya que seleccionar los individuos de interés entre miles de plantas.

Otra consideración que tenemos que plantearnos se refiere a la procedencia de las secuencias que deseamos analizar. Si hablamos de mejora genética convencional, estamos refiriéndonos probablemente a las prácticas de “selección”, simplemente aprovechando la diversidad espontanea existente en las poblaciones, o la generada mediante cruzamientos intervarietales, es decir entre diversos genotipos de una misma especie. En estos casos resulta especialmente útil el diagnóstico del ADN a que se refiere la “mejora molecular”.

### 3. LA MEJORA CITOGÉNÉTICA Y EL DIAGNÓSTICO CITOGÉNÉTICO

Pero además, existe un campo muy interesante de la mejora que utiliza una gama variada de métodos citogenéticos, y que básicamente aprovechan la variación genética generada mediante la manipulación de los cromosomas. Esta se refiere normalmente a la práctica de la transferencia de bloques génicos, regiones cromosómicas, cromosomas completos o genomas, de unas especies en otras, mediante el aprovechamiento de mecanismos de hibridación interespecífica y la recombinación o variación cromosómica, inducidos o espontáneos. Todo parte de la idea de crear nuevas fuentes de variación genética, que trascienda la que se puede encontrar en las poblaciones habituales que utilizan los mejoradores, bien sean poblaciones indígenas no mejoradas, cultivares primitivos, o genotipos de diversas colecciones y procedencias. Desde el punto de vista de lo que se pretende hacer, las técnicas citogenéticas añaden varios enteros de audacia e imaginación respecto a la mejora genética vegetal clásica, ya que las plantas que se obtienen en ocasiones son espectacularmente interesantes e inéditas y de difícil o imposible logro por la naturaleza. El interés radica sobre todo en la novedad de lo que se trata de obtener, que suele buscar la reunión de caracteres repartidos en formas vegetales más distantes que las que habitualmente se utilizan en la mejora genética convencional. Otra de las ventajas es la de incorporar un nuevo germoplasma, que sí no fuese de aplicación inmediata en la mejora, sirviese para su utilización como formas puente para la introducción de genes o regiones del genoma en especies cultivadas, en nuevos programas de mejora. El inconveniente de estas nuevas formas vegetales radica en su capacidad de aplicación directa en competencia con las especies tradicionales de cultivo con las que en cierta medida han de competir.

Es un hecho que las técnicas empleadas en la mejora convencional tienden a disminuir el germoplasma de las especies cultivadas debido a una utilización de una gama cada vez más restringida de genotipos selectos (Feldman and Sears 1981). Como consecuencia de esto, existe una tendencia cada vez mayor hacia una homogeneización del material base útil para la mejora. La “mejora citogenética” pretende inyectar en los programas de mejora nuevos materiales con que ampliar la base de la diversidad a utilizar.

El proceso de introducción de genes o fragmentos cromosómicos de unas especies en otras es genéricamente conocido como *introgresión*, y se ha utilizado con bastante frecuencia en los últimos años para incrementar la variabilidad en numerosas especies cultivadas. A ello ha contribuido de forma decisiva en los últimos años la posibilidad de obtener híbridos entre especies distantes mediante el desarrollo de técnicas de cultivo “in vitro”, que permiten “rescatar” embriones de otra forma inviables, o regenerar plántulas a partir de explantes de tejidos vegetativos de híbridos estériles.

Normalmente se parte de la hibridación interespecífica o intergenérica, y lo que se pretende es la introducción de genes de una especie “donante” en otra “receptora”, de la que se trata a posteriori de recuperar sus características

genéticas mediante retrocruzamientos, conservando los caracteres deseados de la "donante". Una alternativa es el uso directo del alopoloide derivado de la duplicación cromosómica del híbrido interespecífico. Tschermak y Bleier (1926) fueron los primeros en identificar una forma alopoloide debida a la duplicación cromosómica espontánea de un híbrido entre un trigo tetraploide, *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* y una especie emparentada, *Aegilops ovata*. Esto demostró la posibilidad de obtener híbridos interespecíficos fértiles útiles para la mejora del trigo, y por extensión de otras especies cultivadas. A finales de los años treinta, los mejoradores de plantas recibieron la ayuda inestimable del descubrimiento de las propiedades poliploidizantes de un alcaloide, la colchicina que se extrae de la liliácea *Colchicum autumnale*, (Blakeslee 1937, Eigsti 1938). Desde entonces las hibridaciones interespecíficas e intergenéricas han dado paso al desarrollo de numerosos alopoloides sintéticos. El mejor ejemplo de alopoloide artificial es el *xTriticosecale* Wittmack, conocido como triticale, término acuñado por Lindschau y Oehler (1935) para designar las formas derivadas del cruzamiento entre un trigo hexaploide *Triticum aestivum* ( $2n=6x=42$ ) y el centeno, *Secale cereale* ( $2n=14$ ). Estas formas fueron creadas para unir la rusticidad del centeno con la capacidad productiva del trigo. Con posterioridad se obtendrían también triticales a partir de trigos tetraploides *Triticum turgidum* ( $2n=4x=28$ ).

La hibridación interespecífica y la obtención de alopoloides servirían además para desarrollar la producción de otros tipos de formas derivadas, que implican constituciones cromosómicas mixtas, inéditas y no ensayadas por la naturaleza. De este modo, se pueden manejar híbridos interespecíficos o alopoloides, retrocruzándolos por las especies parentales o con formas aneuploides, para producir las llamadas *líneas de adición* y *líneas de sustitución* referidas a los cromosomas de una especie en otra, siendo normalmente la receptora una especie cultivada, y la donante una silvestre u otra cultivada. Este tipo de manipulación de la constitución cromosómica es muy útil como material de partida para realizar transferencias génicas e introgresiones de unas especies en otras, salvando las dificultades que a veces presenta la recombinación entre cromosomas de especies diferentes. También son de utilidad para la localización génica.

#### 4. LOS MARCADORES DE UTILIDAD EN EL ANÁLISIS DE LA INTROGRESIÓN

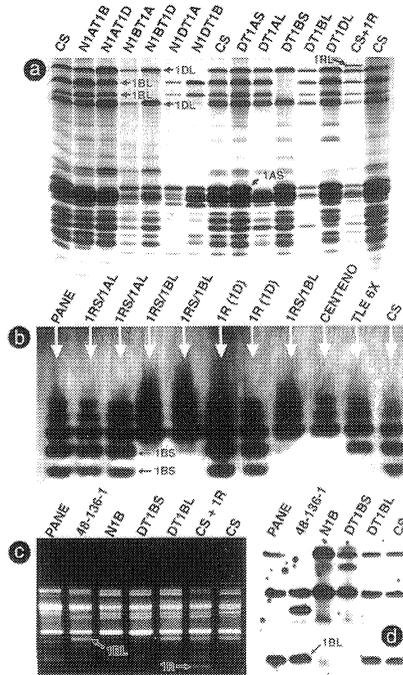
Existen diversas posibilidades de análisis de la introducción de la variación genética en las plantas cultivadas. Concretándonos a la detección de la introgresión interespecífica, podemos señalar cuatro tipos de métodos: el análisis del apareamiento meiótico, el uso de marcadores bioquímicos, la utilización de marcadores moleculares, y la observación directa mediante técnicas de citogenética molecular. En lo que sigue, nos referiremos a cada uno de estos métodos, dedicando mayor atención al último que permite la observación directa de la introgresión sobre el genoma receptor.

El análisis del comportamiento meiótico implica la realización de cruzamientos entre las plantas en las que se supone hay regiones cromosómicas introducidas desde una especie donante y probadores portadores de cromosomas de ésta especie. De esta manera, se ha analizado por ejemplo la introgresión de regiones cromosómicas de centeno en trigo, utilizando como probadores líneas de adición trigo/centeno, que contienen un par de cromosomas o de brazos cromosómicos determinados de centeno añadidos al genoma del trigo.

La segunda aproximación consiste en la utilización de marcadores proteínicos o isoenzimáticos. El método implica el análisis de la expresión de los genes de la especie donante en determinados tejidos de la especie receptora, mediante la aplicación de técnicas de separación de isoenzimas y proteínas por electroforesis. Los marcadores isoenzimáticos y proteínicos han supuesto una importante aportación por su sencillez metodológica, rapidez de diagnóstico y economía. No obstante, el principal obstáculo que plantean es el de disponer de una gama suficiente y amplia de marcadores polimórficos repartidos por el genoma, y localizados en los cromosomas, para poder identificar las regiones cromosómicas afectadas por la introgresión.

Respecto a los marcadores moleculares, parece obvio, que si se puede utilizar el polimorfismo intraespecífico de secuencias de ADN para el diagnóstico en los procesos de mejora convencional, el método se hace más útil en los casos de introgresión, es decir para distinguir ADN de diferentes especies. Sencillamente, a medida que se diferencian las especies, sus genomas tienden a ser más diversos y las secuencias de ADN presentan más diferencias, lo que amplifica la capacidad de discernir el ADN extraespecífico incorporado. Lo contrario también tiene su lógica. Dos especies están más emparentadas cuanto más secuencias de ADN presentan en común. Dejando a un lado la utilidad de estos fundamentos en el campo de los análisis de variabilidad en poblaciones, filogenias o distancias evolutivas, resulta obvio que la información que se derive de este tipo de estudios es de gran interés en Mejora, ya sea para la explotación de los recursos genéticos de las especies silvestres afines a las cultivadas, o durante la selección del material segregante.

La gama de técnicas diferentes que sirven para detectar la introgresión es amplia. En lo que sigue nos ceñiremos a la utilización de los “marcadores moleculares”, y en particular a su interés en conexión con la “mejora citogenética”. La idea es la de analizar la introgresión de bloques génicos, regiones cromosómicas, cromosomas o genomios completos en el material bajo análisis, aplicando técnicas de Biología Molecular, y más en concreto las que se relacionan con el análisis de secuencias de ADN o de regiones cromosómicas que se distinguen en base a su naturaleza molecular.



**Figura 1.-** Diversos marcadores y su localización cromosómica mediante la utilización de formas aneuploides identificadas. a) Marcadores electroforéticos de gluteninas de alto y bajo peso molecular (HMW y LMW). La electroforesis se realiza en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS. Para su localización cromosómica se han utilizado formas nuli-tetrasómicas de la variedad 'Chinese Spring' de trigo común, *Triticum aestivum*. Sobreimpresionado se indican las combinaciones cromosómicas utilizadas y las bandas producto de los genes marcadores encontrados en los brazos largos de los cromosomas 1B, 1D, 1R y corto del 1A. b) Marcadores electroforéticos de isoenzimas de Fosfoglucoisomerasa (PGI), observadas en gel de almidón. Para su localización cromosómica se han utilizado formas con una translocación del brazo corto 1R de centeno unido al largo del 1B del trigo común, *Triticum aestivum*. Sobreimpresionado se indican las combinaciones cromosómicas utilizadas. Las Pgi codificadas por un gen homeólogo del trigo y centeno se diferencian por su diferente migración. c) Marcador molecular tipo RAPD para detectar un producto de amplificación de una secuencia presente en el brazo largo del cromosoma 1B del trigo, *T. aestivum* y otro del 1R del centeno, *Secale cereale*. Como cebador se ha utilizado la secuencia OP-07, de operón. d) Marcador molecular de RFLP, para diagnosticar presencia de uno u otro alelo en la segregación de un híbrido intervarietal entre un trigo español 'Pané 247', y otro de origen americano, '136'. La sonda utilizada es la UAH-39 obtenida por Loarce y col. (1996) en el Departamento de Bio Celular y Genética de la Universidad de Alcalá. Las fotografías a, b y c corresponden a material de estudio de la Tesis doctoral de Pilar Rubio.

En la Tabla 1 se registran las principales características de diferentes sistemas de diagnóstico de la introgresión con indicación de los métodos de mejora en los que resultan especialmente útiles. En la Fig. 1 se muestran algunos ejemplos de marcadores isoenzimáticos, proteínicos y moleculares, cuya localización cromosómica se vé facilitada y/o reforzada mediante la utilización de aneuploides. A este respecto, la localización genética en el trigo se ve muy facilitada gracias a la utilización de las series de formas aneuploides de constitución cromosómica conocida. En particular, resultan muy útiles las formas que mantienen la condición nulisómica para un par cromosómico, cuya deficiencia se compensa con la tetrasomía para otro par homeólogo. De los marcadores moleculares indicados en la Tabla, no todos tienen la misma utilidad ni resuelven con la misma eficacia todos los problemas. En Mejora Genética Vegetal, como en todos los campos de las ciencias experimentales, la mejor prueba en favor de una hipótesis es la acumulación de varias pruebas, y desde este punto de vista, es decisión del mejorador, y dependerá de la capacidad del centro en el que desarrolle su trabajo, el contar con el utillaje necesario y los equipos suficientes para combinar diversos tipos de técnicas en la comprobación de la introgresión. De todas formas, la mejora genética vegetal es lo suficientemente compleja, e integra tal diversidad de intereses, que para una u otra finalidad parece conveniente tener a punto el mayor número posible de técnicas.

Al llegar a este punto, nos podemos preguntar sobre el ámbito de mayor interés de los marcadores citogenéticos, frente al resto de los marcadores moleculares. Es importante adelantar que las técnicas de marcado cromosómico son difíciles de aplicar para análisis de poblaciones de muchos individuos. Su campo de aplicación se concreta al diagnóstico cromosómico, y en este sentido se pueden estudiar varios cientos de plantas en una temporada, pero no miles como a veces se requiere en programas de mejora. De modo que los marcadores citogenéticos nos van a ser más útiles en el conocimiento de las características de un material particular, o de una descendencia de número reducido de individuos. Por contrapartida la observación directa de la introgresión tiene la fuerza de lo irrefutable del diagnóstico que se desea averiguar, basado en la visualización de la región del genoma afectada. Trataremos estos aspectos, con algún ejemplo concreto, para después terminar con la presentación de algunos ejemplos de la utilización de las técnicas citogenéticas para la detección de introgresión.

## **5. LOS MARCADORES MOLECULARES Y CITOGÉNÉTICOS Y EL ANÁLISIS DE LA INTROGRESIÓN**

La incorporación de cromatina de una especie en otra mediante el injerto cromosómico, o sustitución cromosómica parcial, o total ha resultado ser de gran utilidad en la mejora. La forma de obtención de estos materiales exige una planificación en la que se contemple la obtención de híbridos interespecíficos, o de líneas de adición o sustitución, o el manejo de aneuploides, casi siempre como formas intermedias, de las que por procesos de retrocruzamiento y

selección se deriven las líneas portadoras de la introgresión. Como ejemplo podemos citar la utilización de los híbridos de trigo y centeno, o del triticale por el trigo, para obtener líneas de trigo portadoras de translocaciones o regiones cromosómicas de cromosomas del centeno. Este es el caso de trigos con la translocación del brazo corto del cromosoma 1R (1RS) en sustitución de los homeólogos 1AS, 1BS o 1DS. En los últimos años se han utilizado líneas de trigo conteniendo la translocación 1RS/1BL en programas de mejora en todo el mundo. El incremento de la productividad está asociado a la presencia de genes en el brazo corto del cromosoma 1R, determinantes de resistencia a enfermedades (Mettin y col. 1973, Zeller 1973, Driscoll y Jensen 1964, Stewart y col. 1968) e insectos (Martin y col. 1976, Sebesta y Wood 1978). Sin embargo, estas líneas pierden calidad proteínica. La introducción de cromatina de una especie en otra se traduce en algunos casos en una pobreza de la calidad o de alguna de las características de interés aplicado en la especie receptora, lo que obliga a reducir el tamaño de las regiones introducidas, a la región correspondiente a las secuencias o genes de interés. En este sentido, se ha de romper el ligamiento entre genes con características agronómicas deseables y no, para lo que se puede recurrir a la inducción de la recombinación interespecífica, entre cromosomas de genomas homeólogos. En algunas especies se conocen genes reguladores del apareamiento y se disponen de mutantes capaces de ejercer el papel de promotores del apareamiento homeólogo, como ocurre con la mutación *ph1b* descubierta por Sears en los trigos (Sears 1977). Diferentes grupos están trabajando en esta dirección (Koeberner y Shepherd 1986, Shepherd y col. 1990, Cuadrado y col. 1996).

Una alternativa que permite introducir secuencias de una especie en otra de forma mas restringida implica la aplicación de técnicas de Biología Molecular. Se trata de “transformar” las plantas receptoras por medio de la introducción de secuencias de genes de funciones de interés en la mejora. Para ello es necesario poner a punto una tecnología encaminada al aislamiento de las secuencias, su clonación y combinación con promotores de expresión adecuados. Estas se introducen a continuación en vectores apropiados para la canalización al genoma de las células receptoras mediante diversas técnicas, tales como agroinfección, transferencia génica directa, electroporación, biolística, etc (Paszkowski y col., 1984; Murray, 1991). Culmina el proceso la expresión en las células, tejidos y plantas resultantes, y la obtención de plantas transgénicas. Los métodos presentan dificultades que son diferentes dependiendo de la especie, tipos de genes, vectores de clonación, mecanismo de transferencia, etc.

Sea cual sea la fuente de la variación genética extraespecífica y el método de su obtención, interesa en último término la utilización de “marcadores” para detectar la presencia del material extraespecífico en las plantas receptoras. Según se hayan transferido secuencias de genes concretos, por métodos biotecnológicos, o regiones cromosómicas mas o menos grandes, por métodos citogenéticos, se utilizarán “marcadores moleculares” o “marcadores citogenéticos”, respectivamente, en la detección. La ventaja de la detección citogenética, es que no solo se tiene una evidencia directa de la presencia del material extraespecífico en el genoma de la planta receptora, sino además se obtiene información sobre su extensión, número de copias, distribución de las

mismas por el genoma y su posición en el mismo. Los marcadores citogenéticos que ofrecen la mejor aproximación para la detección de las regiones introducidas son los que permiten su visualización en el conjunto del cariotipo. De ellos, el “bando-C” y la “hibridación *in situ*” (ISH), representan dos niveles de mayor a menor aproximación. El bando-C solo es útil para regiones cromosómicas grandes, o cromosomas completos que se puedan identificar por el patrón de bandas que presentan. Las técnicas de ISH son mucho más potentes y a ellas nos vamos a referir con mas detalle.

El bando-C consiste en una tinción diferencial que permite desvelar las zonas de especial abundancia en ADN repetitivo, usualmente compuesto por diversas familias de secuencias que se concentran en las regiones de heterocromatina constitutiva. Estas, en general se localizan en zonas próximas al centrómero y a los telómeros, y ocasionalmente aparecen también en zonas intercalares. El bando-C permite establecer mapas de distribución de la heterocromatina de cada cromosoma del cariotipo, y en consecuencia hacer comparaciones de los patrones observados en diferentes especies. A pesar de la sensibilidad de las técnicas de bando para la identificación de los cromosomas de muchas especies de plantas cultivadas, existen importantes limitaciones, tales como la ausencia de bandas intersticiales, y el notable grado de polimorfismo observado, especialmente en las especies alógamas, lo que hace difícil la caracterización inequívoca de los cromosomas, o la distinción de cromosomas homeólogos en las especies donante y receptora de regiones que se desean introducir de la primera en la segunda. Por otra parte, las técnicas de bando tiñen toda la heterocromatina constitutiva sin diferenciar la composición molecular de su ADN (Lapitan y col. 1986).

En los últimos años se ha producido un avance notable en el estudio de los cromosomas gracias a la aparición de nuevas técnicas de citogenética molecular, y mas en particular la hibridación *in situ*. Esta tecnología fue inicialmente desarrollada por Gall y Pardue (1969) e independientemente por John y col. (1969), e implica la localización citológica de ADN marcado sobre los cromosomas. La técnica originalmente utilizaba el marcaje radioactivo y la autoradiografía como método de detección. Más aún, como las técnicas de clonaje no se habían desarrollado, la hibridación estaba restringida a secuencias que podían ser purificadas por los métodos bioquímicos convencionales (ADN satélite, ADN viral, ARN ribosomales). Durante la década de los ochenta se desarrollaron nuevos sistemas de marcaje de los ácidos nucleicos de forma no radioactiva, con el fin de paliar los problemas derivados del uso de radioactividad en los laboratorios de citogenética, normalmente no preparados para ello. Así, los ácidos nucleicos se pueden conjugar directamente con moléculas fluorescentes (Baumann 1981) o con enzimas (Renz y Kurz 1984). En un principio, los mejores resultados se consiguieron con las reacciones inmunológicas mediadas por la incorporación enzimática al ADN prueba de bases modificadas unidas a biotina, digoxigenina, dinitrofenol, o de nucleótidos halogenados (BrdU, FdU). Mas recientemente se puso en práctica la utilización de bases modificadas unidas a fluorocromos. Sea cual sea la molécula utilizada para el marcaje del ácido nucleico que se desea hibridar al cromosoma, el siguiente paso sería la visualización al microscopio de los lugares de hibridación.

Esta puede lograrse por muy distintos caminos, dependiendo del tipo de marcado y de su detección directa o indirecta: autorradiografía, fluorescencia, quimioluminiscencia, o mediante precipitados coloreados generados normalmente por una reacción enzimática.

La hibridación *in situ* es una técnica muy útil para conocer la posición física de secuencias de ADN repetidas, o de elevado número de copias. Sin embargo, su principal limitación reside en la dificultad de detectar secuencias de copia única o de bajo número de copias, especialmente en cromosomas de plantas. Aún así, la técnica puede servir para la identificación de cromosomas en cuantas especies se han probado, mediante la aplicación de determinadas secuencias repetitivas. En este sentido se trata de una técnica mas informativa que el bandedo-C. El avance de las técnicas de ISH respecto al bandedo-C estriba en que permiten conocer la composición molecular de la región marcada, y desvelar los tipos de secuencias de las familias de ADN repetitivo que componen la heterocromatina constitutiva (Miklos y John 1979). La información de la localización cromosómica de las secuencias repetitivas es muy interesante, no solo para detectar introgresión, sino para comprender el posible papel de estas secuencias en la organización estructural de la cromatina y en la expresión génica.

Una mención especial merece la técnica de marcado y detección con fluorocromos, conocida por FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization). En la detección mediante fluorescencia, se pueden hibridar a los cromosomas varias pruebas de ADN, que se diferencian mediante la utilización de fluorocromos diferentes, se pueden aplicar de forma simultanea o sucesiva, y se visualizan con filtros adecuados a la longitud de onda a la que emite cada fluorocromo cuando se excita con luz UV. La disponibilidad de varios fluorocromos diferentes, acoplados a distintos anticuerpos, hace posible el marcado múltiple (Nederlof y col. 1989). Incluso se pueden lograr marcados de la misma sonda con varios colores para obtener colores mezcla (Dauwerse y col. 1992). La técnica de FISH fue aplicada por primera vez por Maluszynska y Schweizer (1989) en plantas en la detección de ADN ribosomales en *Crepis capillaris*, lo que dio buenos resultados para la localización de secuencias repetidas (Maluszynska y Heslop-Harrison 1991). También ha sido posible la detección de varias secuencias repetidas simultáneamente (Leitch y col. 1991a; Cuadrado y Jouve, 1994; Cuadrado y col., 1995). o mediante la utilización de la hibridación *in situ* genómica, la detección de translocaciones o de introgresión interespecífica en cereales (Heslop-Harrison y col. 1990; Cuadrado y Jouve, 1995) y de genomioms completos (Leitch y col. 1990 y 1991b, Schwarzacher y col. 1989 y 1992, Mukai y col. 1993). Los avances obtenidos con la hibridación *in situ* de fluorescencia, han posibilitado la detección de secuencias de bajo número de copias y de secuencias únicas (Pinkel y col. 1986, Lawrence y col. 1988). La variada gama de técnicas de FISH actualmente disponibles extienden los niveles de resolución de las marcas visibles sobre los cromosomas desde varios megabases a unos pocos kilobases de ADN. De esta forma, la técnica de FISH ha permitido la localización física de un locus de una B-hordeína en *Hordeum vulgare* (Lehfer y col. 1993). Mas recientemente se han localizado loci menores de rRNA y marcadores de microsatélites en la misma especie (Pedersen y Linde-Laursen

1994, Pedersen y col. 1996). Las técnicas actuales permiten llegar a detectar señal de FISH asociadas a núcleos interfásicos, cromosomas metafásicos, cromosomas separados por citocentrifugación, regiones de cromosomas obtenidas por micromanipulación, y fibras de ADN previamente aisladas (Heiskanen y col. 1996). Cada una de estas posibilidades plantea diferentes problemas de tipo estratégico y técnico, y ofrece diferentes aplicaciones, pero en general se trata de un campo de interés creciente por sus enormes posibilidades. Aquí, nos referiremos únicamente a las técnicas de observación de cromosomas en metafase, e indicaremos algunos resultados prácticos de detección de introgresión, realizados en nuestro laboratorio de Citogenética de la Universidad de Alcalá.

Respecto a la observación de los cromosomas metafásicos, marcados con sondas de FISH, se pueden llegar a detectar señales combinadas de varias secuencias, reconocer su posición y orden relativo respecto al centrómero y telómero, analizar su presencia en los pares de homólogos, o en otros cromosomas del cariotipo. Naturalmente, los cromosomas durante la metafase están en su grado máximo de condensación, y esta circunstancia inhibe la capacidad de visualizar señales de sondas de ADN no repetitivo o de bajo número de copias. Para mejorar las condiciones de detección, es preciso utilizar cromosomas menos condensados, en prometafase o metafase temprana, en los que la cromatina está menos condensada.

Quizás una de las aplicaciones más directas de la técnica de FISH, es la de analizar la introducción de la variación genética extraespecífica por el diferente marcaje y análisis simultáneo y directo de los genomas, cromosomas o regiones cromosómicas de las diferentes especies implicadas. En este sentido vamos a ver algunos ejemplos, que demuestran la capacidad de análisis de la técnica de FISH en una serie de líneas derivadas de híbridos en los que han intervenido trigos, triticales y centeno.

Así, en un trabajo reciente hemos demostrado la capacidad de distinguir cromatina de *S. montanum* en dos tipos de líneas del trigo común *T. aestivum* cv. 'Chinese Spring', originalmente portadoras de la adición del brazo 5R<sup>m</sup>S de aquella especie silvestre (Cuadrado y Jouve, 1995). Mediante el marcado simultáneo y sucesivo de varias pruebas de ADN repetitivo y secuencias codificantes del ADN ribosomal 5S, se ha podido determinar la pérdida de dicho brazo como adición extraespecífica, y el injerto de un fragmento cromosómico del centeno silvestre incorporado en el extremo distal de un cromosoma trigo en ambas líneas, del que se ha determinado la longitud y el punto exacto de la rotura. El análisis de bandeado-C llevado a cabo con anterioridad (Montero y col. 1986) en una de las líneas sirvió para detectar un bloque importante de heterocromatina de un cromosoma de *S. montanum* en el brazo corto del cromosoma 5B. Sin embargo, no fue posible determinar, ni la magnitud, ni el punto exacto por donde se había producido el intercambio, ni la organización interna del segmento injertado, ni el cromosoma de la especie silvestre potencialmente donante de la región introducida, si bien se pensó que podía tratarse del propio cromosoma 5R<sup>m</sup>. Impedían más precisión las propias limitaciones del bandeado-C, de las que hablamos anteriormente.

La hibridación *in situ* genómica nos ha permitido determinar la magnitud del fragmento implicado en la translocación. La identificación del mismo requiere el conocimiento del mapa físico de *S. montanum*. Por ello, partimos de la aplicación de FISH con varias sondas de ADN repetitivo, para conocer el patrón de distribución de las mismas en cada uno de los cromosomas de la especie silvestre. De este modo determinamos que la región incorporada corresponde al extremo distal de los brazos cromosómicos 2R<sup>mL</sup>, 2R<sup>mS</sup> o 7R<sup>mL</sup> de *S. montanum*. Por la distribución de dos tipos de secuencias repetitivas de 120pb y 480pb, pudimos descartar el brazo 5R<sup>mS</sup>, y la mayoría de restantes brazos del cariotipo de la especie silvestre.

Con más facilidad fue posible determinar la existencia de translocaciones del brazo corto IRS, unido al largo IBL, en la variedad portuguesa de *T.aestivum* cv. 'Lima', y en una línea de trigo de origen francés denominada '9906'. Los resultados de la aplicación de FISH en la primera de ellas, confirman la supuesta introgresión que se basaba en un análisis de proteínas de reserva. Esta línea se caracteriza por la incorporación de todo el brazo IRS, siendo el cromosoma recombinante IRS/IBL. Todas las células interfásicas de las numerosas plantas analizadas presentan dos marcas indicando la fijación en homocigosis de la citada translocación céntrica. La identificación del cromosoma recombinante resulta fácil una vez que se conoce el mapa físico del brazo IRS por la hibridación con las sondas pTa71, y pSc119.2. Los resultados del análisis FISH en la línea francesa '9906', al igual que en el caso anterior, indican que se trata de una translocación fijada en homocigosis.

Otro ejemplo interesante de la importancia de la introgresión en la mejora de los cereales, y del interés de los marcadores citogenéticos en su caracterización, lo ofrece un estudio reciente que hemos desarrollado en colaboración con investigadores portugueses de las Universidades de Beira y Coimbra en Portugal. Estos habían identificado y recolectado muestras de cultivares primitivos de un trigo denominado genéricamente 'Barbela' que se cultiva en el nordeste de la Península Ibérica, que presenta una extraordinaria capacidad de adaptación a suelos pobres y una elevada tolerancia al aluminio (pH por debajo de 5,0). Las formas de 'Barbela' constituyen una amplia gama de razas locales tradicionales y por el aspecto de algunas de ellas sugerían el mantenimiento de introgresión de centeno, a través de cruzamientos interespecíficos espontáneos. Pruebas de 'dot blot' demostraban la presencia de ADN de centeno en dos formas determinadas, denominadas 'Barbela I' y 'Barbela III' (Silva et al. 1995a y b). En una primera aproximación desarrollada en el laboratorio de Citogenética de la Universidad de Alcalá, aplicamos las técnicas de GISH (hibridación *in situ* genómica) y confirmamos la presencia de cromatina de centeno. Con el fin de caracterizar el bloque introducido y el cromosoma receptor, aplicamos el FISH, utilizando sondas de ADN repetitivo de centeno (pSc119.2) y trigo (pAs1) que previamente nos habían permitido hacer mapas físicos en las especies donante y receptora (Cuadrado 1994) y de otras que codifican para dos tipos de secuencias de ARN ribosomal (pTa71 y pTa794). Con ello pudimos identificar un cromosoma de trigo, el 5D, receptor en la región distal de su brazo corto de un injerto de un segmento de un cromosoma de centeno. Este procedería probablemente del extremo distal del

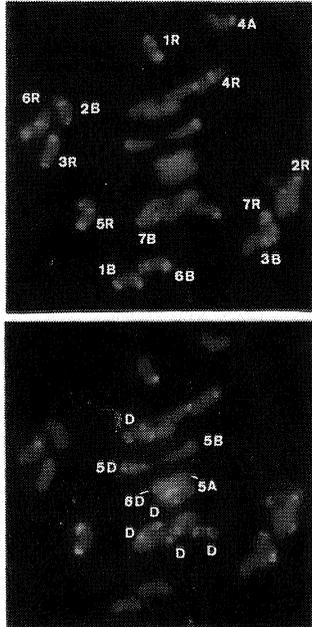
brazo corto del cromosoma 5R, portador de un sistema genético de tolerancia a elevadas dosis de aluminio en suelo (Silva et al., 1996). Esta translocación parece inhibir la expresión del NOR del brazo corto del cromosoma 5D, probablemente debido a una pérdida sustancial del locus que se encuentra en su región distal.

El tamaño de las regiones introducidas puede llegar a ser aún más pequeño. En tales casos la aplicación de la técnica de FISH puede ser aún más determinante. Tal es el caso de una serie de líneas recombinantes de trigo-centeno, que tratan de incorporar fragmentos menores del brazo corto del cromosoma 1R en el cromosoma 1D (1DL.1DS/1RS) obtenidas por Robert Koebner en el John Innes Centre en Norwich, Inglaterra (Koebner y col. 1986). En un análisis llevado a cabo en nuestro laboratorio de citogenética, hemos tratado de obtener información de la localización de secuencias de ADN de centeno en estas líneas, mediante la utilización de la técnica de FISH simultánea y/o sucesiva. En primer lugar, la presencia de cromatina de centeno en las citadas líneas se confirma utilizando ADN total de centeno y trigo, mediante la técnica de GISH. La caracterización de la cromatina se ha llevado a cabo con las sondas pTa71 y pSc119.2, que hibridan en los loci para el ADNr (26S, 5.8S y 18S) y ADN repetitivo de 120pb, respectivamente, que previamente se habían localizado en el brazo cromosómico 1RS, faltando por el contrario en el brazo cromosómico 1DS. Resultados previos indicaban la presencia de marcadores bioquímicos y moleculares de centeno en el brazo corto del cromosoma 1D en las líneas denominadas 'WD' y 'WR'. Estas líneas se seleccionaron en función de la presencia de determinados marcadores bioquímicos y caracteres agronómicos, como la resistencia a la roya del tallo procedente de *Secale* y por su calidad panadera (Koebner y col. 1986). Se trataba por tanto de seleccionar formas recombinantes portadoras del fragmento de menor tamaño posible, y portadoras de genes centeno, incluidos el responsable de la resistencia a la roya, proteínas de reserva, isoenzimas y marcadores de RFLP. La aplicación de la técnica de FISH permitiría localizar y evaluar la importancia de la región translocada. De este modo, demostramos que las líneas 'WR1', 'WD1' y 'WD2', presentan cromatina de centeno en posición distal del brazo corto de un cromosoma trigo. Las líneas 'WD' presentan un fragmento más pequeño de centeno que la línea 'WR1', lo cual está de acuerdo con los resultados de presencia o ausencia del gen *Sec-R1*, que se localiza en posición distal en el brazo 1RS (Gustafson y col. 1990), y del que se conoce su posición relativa con respecto a otros marcadores moleculares (Lawrence y Appels 1985, Wang y col. 1991, Devos y col. 1993). El fragmento introducido de centeno presente en las líneas 'WD1' y 'WD2', según demuestran nuestros resultados con FISH es similar. Todas las plantas de las líneas 'WR1' y 'WD1' estudiadas fueron homocigóticas para el cromosoma recombinante. Por el contrario, la línea 'WD2' estaba segregando, viéndose plantas con ninguno, uno o los dos cromosomas recombinantes. Por último, las líneas 'WR2' y 'WR5' podrían llevar cromatina de trigo en su parte distal o tratarse de cromatina centeno que ha perdido parte de las familias repetidas características de los télómeros, o que carecen de ellas dado el polimorfismo que caracteriza el télómero 1RS. Si por el contrario se trata de recombinación trigo/centeno, debe tratarse de un fragmento muy pequeño. Otras dos líneas: 'WR3' y 'WR4' presentan la familia de 120pb en la región distal del cromosoma recombinante, lo que es característico de la

región terminal del brazo 1RS. Todas estas líneas son portadoras del gen *Gli-D1*, que se localiza en la parte más distal de cromosoma 1D. La recombinación interespecífica necesaria para el intercambio del cromosoma 1D y 1R podría deberse a la influencia del gen *ph1b*, utilizado en los híbridos de que derivan todos estos materiales.

La mejor aplicación de la técnica del FISH en mejora de plantas es la de la detección y caracterización cualitativa de modificaciones del genoma de plantas, variedades o líneas que se desean investigar por existir la sospecha de que hay alguna modificación en el genoma. Su principal limitación es la del análisis cuantitativo, o si se prefiere la de su aplicación a una muestra amplia de plantas, debido a la propia laboriosidad de las técnicas y el coste económico. De cualquier modo, la combinación de la técnica de FISH y otros marcadores moleculares del tipo de los mencionados anteriormente, abren todo tipo de posibilidades al análisis cualitativo y cuantitativo a los mejoradores.

Por último, la capacidad de la técnica del FISH puede trascender la simple detección de regiones introducidas, sí se utiliza en análisis meióticos, en conexión con estudios del comportamiento del apareamiento cromosómico. Por ejemplo, en un estudio reciente hemos aplicado la técnica de FISH para el análisis del comportamiento cromosómico en las meiosis de híbridos interespecíficos entre trigo y centeno bajo la influencia de la mutación *ph1b* (Fig. 2). Esta mutación correspondiente al gen *Ph1* cuyo locus está en el cromosoma 5B del trigo, promueve el apareamiento entre cromosomas homeólogos de los genomios diferentes reunidos en el híbrido. La aplicación de una serie de sondas de diversos genomios, para revelar los cromosomas implicados en las asociaciones meióticas homeólogas y heterólogas han permitido conocer las diferentes frecuencias de apareamiento que presenta cada cromosoma. En este estudio se ha puesto de manifiesto la capacidad de estas técnicas para explicar la obtención de formas con intercambios no necesariamente homeólogos, de gran interés aplicado para la mejora.



**Figura. 2.-** Marcado cromosómico mediante la aplicación de la técnica de FISH. Se trata de una célula en metafase I de meiosis de un híbrido entre un trigo común ‘Chinese Spring’ portador de una mutación de apareamiento, *ph1b*, que promueve apareamiento entre cromosomas homeólogos de distintos genomios, y centeno, *S. cereale*. Las dos fotografías corresponden a la misma célula. a) marcado con rodamina (rojo) de la sonda pSc119.2 de *S. cereale*, que hibrida en cromosomas de los genomios R y B. Esta fotografía se ha superpuesto a la contratinción con DAPI (azul). b) Marcado con fluoresceína (verde) de la sonda pAs1 de *Aegilops squarrosa*, especie diploide donante del genomio D de los trigos. Se pone de manifiesto la capacidad de identificación de genomios y cromosomas de estos marcadores citogenéticos moleculares.

## 6. REFERENCIAS

- Baumann JGJ, Weigant J, Van Dujin P 1981. Cytochemical hybridization of fluorochrome labelled RNA. III. Increased sensitivity by the use of anti-fluorescein antibodies. *Histochemistry* 73:181-193
- Blakeslee A. 1937. De'doublement du nombre de chromosomes chez les plantes par traitement chimique. *CR Acad Sci Paris* 205:476-479.
- Cuadrado A 1994. Obtención de mapas de FISH en cromosomas de los genomios A, B, D y R de *Triticum* y *Secale* y su aplicación para resolver problemas citogenéticos. Tesis Doctoral, Univ. de Alcalá de Henares.

- Cuadrado A, Jouve N. 1994. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-triticale. *Chromosome Research* 3: 331-338.
- Cuadrado A, Jouve N. 1995. Fluorescence in situ hybridization and C-banding analyses of highly repetitive DNA sequences in the heterochromatin of rye (*Secale montanum* Guss) and wheat incorporating *S. montanum* chromosome segments. *Genome* 38: 795-802
- Cuadrado A, Ceoloni C, Jouve N. 1995. Variation in highly repetitive DNA composition of heterochromatin in rye studied by FISH. *Genome* 38: 1061-1063
- Cuadrado A, Vitelozzi F, Jouve N, Ceoloni C. 1996. Fluorescence in situ hybridization with multiple probes applied to the analysis of wheat-rye chromosome pairing. *Theor. Appl. Genet.* (En prensa).
- Dauwerse JG, Wiegant J, Raap AK, Breuning MH, van Ommen GJB 1992. Multiple colors by fluorescence *in situ* hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Human Mol Genet* 8:593-598
- Devos KM, Atkinson MD, Chinoy CN, Francis HA, Harcourt RL, Koebner RMD, Liu CJ, Masojc P, Xie DX, Gale MD 1993. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor Appl Genet* 85:673:680
- Driscoll JC, Jensen NF 1964. Characteristics of leaf rust resistance transferred from rye to wheat. *Crop Sci* 4:372-374
- Eigsti, O. 1938. A cytogenetical study of colchicine effects in the induction of polyploidy in plants. *Proc Nat Acad Sci* 24:56-63.
- Feldman M, Sears ER 1981 The wild gene resources of wheat. *Sci. Amer* 244:102-112
- Heiskanen M, Peltonen L, Palotie A 1996 Visual mapping by high resolution FISH. *Trends Genet* 12: 379-382.
- Gall JG, Pardue ML 1969 Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 63:378-383
- Gustafson JP, Butler E, McIntyre CL 1990. Physical mapping of a low-copy DNA sequences in rye *Secale cereale* L. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1899-1902
- Heslop-Harrison JS, Leitch AR, Schwarzacher T, Anamthawat-Jonsson K 1990. Detection and characterization of 1B/1R translocations in hexaploid wheat. *Heredity* 65:385-392

- John H, Birnstiel M, Jones K 1969. RNA:DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-587
- Koebner RMD, Shepherd KW 1986. Controlled introgression to wheat of genes from rye chromosome arm 1RS by induction of allosyndesis. 1. Isolation of recombinants. *Theor Appl Genet* 73:197-208
- Koebner RMD, Appels R, Shepherd KW 1986. Rye heterochromatin. II. Characterization of a derivative from chromosome 1DS.1RL with a reduced amount of the major repeating sequence. *Can J Genet Cytol* 28:658-664
- Lapitan NLV, Sears RG, Rayburn AL, Gill BS 1986. Wheat-rye translocations. Detection of chromosome breakpoints by *in situ* hybridization with a biotin-labeled DNA probe. *J Hered* 77:415-419.
- Lawrence GJ, Appels R 1985. Mapping the nucleolus organizer region, seed protein loci and isozyme loci on chromosome 1R in rye. *Theor Appl Genet* 71:742-749
- Lawrence JB, Villnave CA, Singer RH 1988. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping *in situ*: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 52:51-61
- Lehfer H, Busch W, Martin R, Herrmann RG 1993. Localization of the B-hordein locus on barley chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosoma* 102:428-432
- Leitch AR, Mosgoller W, Schwarzacher T, Bennet MS, Heslop-Harrison JS 1990. Genomic *in situ* hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids. *J Cell Sci* 915:335-341
- Leitch AR, Schwarzacher T, Mosgoller W, Bennet MS, Heslop-Harrison JS 1991a. Parental genomes are separated throughout the cell cycle in plant hybrid. *Chromosoma* 101:206-213
- Leitch IJ, Leitch AR, Heslop-Harrison 1991b. Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous *in situ* hybridization of two differently labelled fluorescent probes. *Genome* 34:329-333
- Lindschau M, Oehler E 1935. Untersuchungen am konstant intermediären additiven Rimpauschen Weizen-Roggen-Bastarden. *Der Zuchter* 7: 228-233.
- Loarce Y, Hueros G, Ferrer E. 1996. A molecular linkage map of rye. *Theor Appl Genet.* 92 (en prensa)
- Maluszynska J, Schweizer D 1989. Ribosomal RNA genes in B chromosomes of *Crepis capillaris* detected by non-radioactive *in situ* hybridization. *Heredity* 62:59-65

- Maluszynska J, Heslop-Harrison JS 1991 . Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1:159-166
- Martin TJ, Harvey TL, Livers RW 1976 . Resistance to wheat streak mosaic virus and its vector, *Aceria tulipae*. *Phytopathology* 66:346-349
- Mettin D, Bluthner WD, Scheel G 1973. Additional evidence on spontaneous 1B/1R wheat-rye substitutions and translocations. *Proc 4<sup>th</sup> Int. Wheat Genet Symp.* Columbia. 179-184
- Miklos GLG, John B 1979. Heterochromatin and satellite DNA in man: properties and prospects. *Am J Hum Genet* 31:264-280
- Mukai Y, Nakahara Y, Yamamoto M 1993. Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome* 36:489-494
- Montero M, Sanz J, Jouve N 1986. Meiotic pairing and alpha-amylase phenotype in a 5B/5R<sup>m</sup> *Triticum aestivum* - *Secale montanum* translocation line in common wheat. *Theor Appl Genet* 73:122-128
- Murray DR 1991. Advanced methods in plant breeding and biotechnology. DR Murray Ed C.A.B Inter. Wallingford
- Nederlof PM, Robison D, Abuknesha R, Wiegat J, Hopman AHN, Tanke HJ, Raap AK 1989 Three-color fluorescence *in situ* hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 11:20-27
- Paszkowski J, Shillito RD, Saul MW, Mandak V, Hohn T, Hohn B, Potrykus I 1984. Direct gene transfer to plants. *EMBO J* 3:2717-31722
- Pedersen C, Linde-Laursen I 1994. Chromosomal locations of four minor rRNA loci and a marker microsatellite sequence in barley. *Chromosome Research* 2: 67-71.
- Pedersen C, Rasmussen SK, Linde-Laursen I 1996. Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the Triticeae (Poaceae) by *in situ* hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome* 39:93-104.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW 1986. Cytogenetic analysis using quantitative high-sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Nat Acad Sci USA* 83:2934-2938
- Rafalski JA, Tingey SV 1993. Genetic diagnosis in plant breeding: RAPFs, microsatellites and machines. *Trends Genetics* 9:275-279.

- Renz M, Kurz C 1984. A colorimetric method for DNA hybridization. *Nucleic Acid Res* 12:3435-3444
- Sears ER 1977. An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can J Genet Cytol* 19:585-593
- Schwarzacher T, Leith AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS 1989. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot.* 64:315-324.
- Schwarzacher T, Anamthawat-Jonsson K, Harrison GE, Islam AKMR, Jia JZ, King IP, Leitch AR, Miller TE, Reader SM, Rogers WJ, Shi M, Heslop-Harrison JS 1992. Genomic *in situ* hybridization to identify allien chromosomes and chromosome segments in wheat. *Theor Appl Genet* 84:778-786
- Sebesta, EE y Wood J<sup>R</sup> EA 1978. Transfer of greenbug resistance from rye to wheat with x-rays. *Agrom Abst* 1978:61-62
- Shepherd KW, Singh NK, Gupta RB, Koebner RMD 1990. Quality characteristics of wheat-rye translocation and recombinant lines En: L. O'Brien L, FW. Ellison, RA. Hare y MC. Mackay Eds. *Proc 6<sup>th</sup> Assembly Wheat Breed Soc Aust*, Tamworth, Australia pp 459-463
- Silva JP, Vieira R, Mello-Sampayo T 1995a Aluminium effect on the physiological and genetic behaviour of Barbela, a bread wheat from Northeastern Portugal. *Chrom Res* 3: suppl. 1 .
- Silva JP, Vieira R, Mello-Sampayo T 1995b Genetic variability in Barbela, a bread wheat from Northeastern Portugal. *European Heat Aneuploidy Cooperative EWAC Newsletter*: 110.
- Silva JP, Vieira R, Mello-Sampayo T, Cuadrado A, Jouve N 1996 A cytogenetic analysis of rye introgression into a Portuguese bread wheat cultivar Barbela. *Chromosome Research* 4: 399-400.
- Stewart DM, Gilmore JR EC, y Ausemus ER 1968. Resistance to *Puccinia graminis* derived from *Secale cereale* incorporated into *Triticum aestivum*. *Phytopathology* 58:508-511
- Tschermak E, Beier H 1926 *Ber. Dt. Bot Gesell.* 44: 110-132.
- Wang ML, Atrison MD, Chinoy CN, Devos KM, Harcourt RL, Liu CJ, Rogers WJ, Gale MD 1991. RFLPs-based genetic map of rye *Secale cereale* L chromosome 1R. *Theor Appl Genet* 82:174-178
- Zeller FJ 1973. 1B/1R wheat-rye chromosome substitutions and translocations. *Proc 4<sup>th</sup> Int Wheat Genet Symp.* Missouri Agric Exper. Station, Columbia, MO. 209-211