

## CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA GENÉTICO PARA TRIGO HARINERO MEDIANTE RFLPs Y SSRs

### CONSTRUCTION OF A RFLPs AND SSRs MAP FOR BREAD WHEAT

Héctor Guillén-Andrade<sup>1\*</sup>, Mireille M. Khairallah<sup>2</sup>, Ravi P. Singh<sup>2</sup>,  
Fernando Castillo González<sup>3</sup> y Dave Hoisington<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Campo Experimental Valle de México, INIFAP. Apdo. Postal No. 10, C.P. 56230, Chapingo, Edo. de México. México. Tel. (01) 5954-2877. Fax. (01) 5954-6528. <sup>2</sup> Centro de Biotecnología Aplicada, CIMMYT. 6-641, 06600. México. D.F. Tel. (01) 5952-1900. Fax. (01) 5952-1983. <sup>3</sup> Especialidad de Genética, IREGEP, Colegio de Postgraduados 56230, Montecillo, Edo. de México. México Tel. (01) 5804-5957. Fax. (01) 5804-5962.

\* Autor responsable.

#### RESUMEN

Una población de 117 líneas endogámicas recombinantes (RILs) F<sub>6</sub>, derivada de la cruce de las variedades Frontana e INIA66, se analizó mediante el uso de marcadores moleculares para construir un mapa genético que servirá de base para determinar los QTL de caracteres que segregan en la población. Un segundo objetivo fue determinar el potencial conjunto de la utilización de dos tipos de marcadores: RFLPs y los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs), en el análisis genético de una especie de genoma complejo, como el que posee el trigo harinero (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). Los progenitores se analizaron con 822 sondas de RFLPs y 68 pares de iniciadores. Mientras que los RFLPs mostraron un nivel bajo de polimorfismo (29 %), los SSRs tuvieron una mayor capacidad de detección del mismo (40 %). El análisis de las 117 RILs con 158 sondas RFLPs y 27 SSRs permitió la formación de 26 grupos de ligamiento. La especificidad de los SSRs fue un factor importante para la correcta designación de los grupos de ligamiento. Los resultados muestran que la combinación de diferentes clases de marcadores es una mejor estrategia para superar la limitante del nivel bajo de polimorfismo detectado al utilizar exclusivamente marcadores RFLPs en especies como el trigo.

Palabras clave adicionales: *Triticum aestivum* L., marcadores moleculares, polimorfismo.

#### SUMMARY

A population of 117 F<sub>6</sub> recombinant inbred lines (RILs) derived from the crossing of cultivars Frontana and INIA66, was analyzed with the aid of molecular markers in order to construct a genetic map. This map will be utilized for QTL determination of those complex traits segregating in the population. A second objective was to determine the joint potential of two types of molecular markers: RFLPs and SSRs for the analysis of a species with a complex genome, such as the one of bread wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). The parental genotypes were analyzed with 822 RFLPs probes and 68 primers. In spite of its number, the SSRs showed a larger number of polymorphic loci (40 %) than the RFLPs (29 %). The information generated with the analysis of the 117 RILs with 158 RFLPs probes and 27 SSRs resulted in 26 linkage groups. The specificity of the SSRs was important for the adscription of markers

to linkage group where they were clustered. The results showed that the combination of different types of molecular markers is a good strategy to avoid the problem of a low level of polymorphisms when a single type of markers is utilized in species such as bread wheat.

Additional index word: *Triticum aestivum* L., molecular markers, polymorphism.

#### INTRODUCCIÓN

El trigo harinero (*Triticum aestivum* L. em. Thell.), 2n=6X=42, AABBDD, originado hace aproximadamente 10 000 años, proviene de la cruce de un trigo tetraploide (*Triticum turgidum* L., 2n=4X=28, AABB) con el diploide *Triticum tauschii* (Coss.) Schmall. (Syn. *Aegilops squarrosa* L., 2n=2X=14, DD) (Gill *et al.*, 1991). El trigo es uno de los cultivos alimenticios más importantes en el mundo, por lo que el entendimiento de la organización de su genoma es de utilidad para propósitos de mejoramiento y para la localización de genes de interés agronómico. El hecho de que el trigo harinero sea alohexaploide y que la información genética esté triplicada, hace que los análisis genéticos sean complejos. Otro aspecto importante es la presencia de tres genomas homólogos que le permiten tolerar pérdidas o adiciones de cromosomas, lo cual no es posible en especies diploides. El hecho de que tenga un genoma extremadamente grande (16 x 10<sup>9</sup> pb) y de origen reciente desde el punto de vista evolutivo (Devos y Gale, 1993), lo hace interesante para estudios de genética. El alto nivel de secuencias altamente repetidas y un nivel bajo de polimorfismo ha limitado la construcción de mapas genéticos dentro de la especie de *T. aestivum*.

Con los avances en la biología molecular, se ha generado una clase nueva de marcadores genéticos al nivel



de ADN, siendo los denominados polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), los primeros de este tipo (Botstein *et al.*, 1980). En la última década se ha desarrollado una nueva generación de marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la ADN-polimerasa (PCR) (Williams *et al.*, 1990). Una clase de ellos son las secuencias simples repetidas (SSRs) o microsatélites, compuestas de secuencias de dos a seis bases repetidas una tras otra como (GT)*n* o (CT)*n*, que se encuentran dispersas en genomas de organismos eucariotes (Tautz y Renz, 1984). Esta clase de polimorfismo es fácilmente detectable mediante el uso de iniciadores específicos que flanquean la región de estos *loci* y su amplificación vía PCR (Weber y May, 1989; Litt y Luty, 1989). Los microsatélites han facilitado la construcción de mapas en organismos diferentes (Weissenbach *et al.*, 1992; Copeland *et al.*, 1993); por ejemplo, en el género *Brassica*, en la soya (*Glycine max*) y otras 34 especies vegetales se ha estimado la frecuencia y el número de microsatélites (Lagercrantz *et al.*, 1993; Morgante y Olivieri, 1993). Las ventajas de los microsatélites sobre otro tipo de marcadores basados en los sistemas de PCR, resulta de su potencial de análisis automatizado y de su naturaleza codominante (Rafalski y Tingey, 1993). Además, los microsatélites pueden producir una variación de diez veces mayor que los RFLPs (Senior y Heun, 1993; Bell y Ecker, 1994).

Debido a que el análisis de polimorfismo es el factor principal involucrado en la utilidad de los marcadores moleculares para la construcción de mapas de ligamiento, el presente trabajo se planteó con la finalidad de comparar la utilidad conjunta de los marcadores RFLPs y SSRs en relación a su capacidad de detección de polimorfismo y, por ende, su viabilidad en la construcción de mapas genéticos de trigo harinero (*T. aestivum* L. em. Thell.).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material genético.** Los estudios se realizaron utilizando un grupo de 117 líneas endogámicas recombinantes (RILs) F<sub>6</sub>, derivado de la cruce de las variedades Frontana (Fronteira/Mentana) e INIA66 (Lerma rojo 64/Sonora 64). Estos progenitores se caracterizaron por mostrar resistencia y susceptibilidad, respectivamente, a varias enfermedades incluyendo la roya café o de la hoja, causada por *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. La población de 117 RILs se generó de la cruce de esos progenitores seguida de selección de espigas individuales, a partir de plantas F<sub>1</sub>. Todos los materiales fueron proporcionados por el Dr. Ravi P. Singh del Programa de Trigo del Cen-

tro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

**Análisis de RFLPs.** Las sondas de RFLPs utilizadas tienen el siguiente origen: las denominadas como ATMI provienen de la Universidad de Sidney, Australia; las BCD, CDO, y WG fueron proporcionadas por la Universidad de Cornell, Ithaca, Estados Unidos; las KSU son originarias de la Universidad Estatal de Kansas, Estados Unidos; las IPSR son del Laboratorio Cambridge de Norwich, Inglaterra; las GLK de la Universidad de Kyoto, Japón; las CSL del CSIRO, Camberra, Australia; las FB del INRA, Francia; las PCR del Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT, México, y las RZ del Programa de Investigación del Genoma del Arroz, Instituto STAFF, Kamiyokoba, Japón. Todos los *loci* cartografiados fueron designados como se indica a continuación: *Xbcd*, *Xcdo*, *Xcsl*, *Xfb*, *Xglk*, *Xipsr*, *Xksu*, *Xpcr*, *Xrz* y *Xwg*.

El método de extracción a base de CTAB (bromuro de hexadecil- trimetil-amonio) descrito por Saghai-Marouf *et al.* (1984), se utilizó para obtener el ADN de los progenitores y las 117 RILs a partir de tejido foliar liofilizado y molido. Posteriormente, el ADN se digirió con cada una de las siguientes enzimas de restricción: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *XbaI* y *DraI*. De las 822 sondas utilizadas en combinación con las cinco enzimas de restricción, las que detectaron polimorfismo en el ADN de los progenitores, se utilizaron luego para hibridar con las muestras de ADN de cada una de las 117 RILs F<sub>6</sub>. Los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (0.7 %, p/v) y se transfirieron a membranas de nylon neutras (MSI, Magnagraph) mediante procedimientos tipo Southern. Las sondas se amplificaron y se marcaron mediante técnicas de PCR utilizando 5 % de digoxigenina d-UTP y se detectaron mediante el sistema quimioluminiscente antidigoxigenina-AMPPD. Las sondas se removieron de las membranas con una solución de 0.1X SSC (citrate de sodio salino), 0.1 % (p/v) SDS (dodecil sulfato de sodio), y posteriormente se lavaron durante 10 min a 90 °C. Lo anterior permitió reutilizar las membranas cinco veces en promedio (Hoisington *et al.*, 1994).

**Análisis de los microsatélites (SSRs).** Se utilizó un total de 68 pares de iniciadores desarrollados en Gatersleben, Alemania y descritos por Plachske *et al.* (1995), Roder *et al.* (1995) y Korzum *et al.* (1997). Los iniciadores que detectaron polimorfismo en los progenitores se utilizaron posteriormente con un subgrupo de 60 RILs F<sub>6</sub>, seleccionadas al azar de la población en análisis. Las condiciones de amplificación incluyeron los siguientes



componentes de reacción: solución amortiguadora 1X;  $MgCl_2$ , 2mM; dNTPs, 0.2 mM de cada uno; Taq ADN polimerasa 1U; 0.25 mM de cada iniciador; 20 ng de ADN templado y agua bidestilada para un volumen total de reacción de 20  $\mu$ L. La amplificación se logró en un termociclador Ericomp, TwinBlock™ System Thermocycler, con el programa siguiente: un ciclo de iniciación (un minuto a 93 °C), 30 ciclos para permitir la separación de las cadenas, anillamiento de los iniciadores y extensión de la cadena (un minuto a 93 °C, dos minutos a 60 °C, dos minutos a 72 °C) y un ciclo de terminación (cinco minutos a 72 °C). La identificación de los productos de amplificación se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida a 6 % (p/v) (acrilamida/bisacrilamida 19:1). Luego que el polimorfismo se definió bien, se procedió a utilizar geles de la mezcla de agarosa Methaphor y SeaKem en proporción 1:1. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1  $\mu$ g/mL) durante 20 minutos, previo a la toma de la fotografía instantánea con un equipo Polaroid.

**Construcción del mapa de ligamiento.** Los datos moleculares de los RFLPs y los SSRs se capturaron y verificaron con ayuda del paquete computacional HyperMapdata (Hoisington y González-de-León, 1993). La segregación de cada *locus* marcador se determinó mediante un análisis de ji-cuadrada para probar las desviaciones de las proporciones de la segregación mendeliana esperada (1:1). El mapa de ligamiento se construyó para las 117 RILs mediante el programa de cómputo MAP-MAKER (Macintosh versión 2.0; LOD=2.5 y theta=3.0) (Lander *et al.*, 1987). Las frecuencias de recombinación se transformaron a distancias genéticas mediante la función de cartografía de Haldane (Haldane, 1919).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Polimorfismo detectado con RFLPs.** De un total de 822 sondas RFLPs empleadas con las líneas progenitoras, 34 % resultaron ilegibles por su pobre resolución. El factor principal de ilegibilidad y el más frecuente fue la presencia de barridos en los carriles. Esto probablemente resulta de la hibridación no específica con la alta proporción de secuencias repetidas presentes en el genoma (Gale *et al.*, 1990) y ocurre con mayor frecuencia cuando se utilizan sistemas de detección basados en quimioluminiscencia. La segunda forma de ilegibilidad fue la ausencia de bandas, por la falta de homología. Este factor se observó principalmente cuando se hibridaron sondas provenientes de arroz (*Oryza sativa* L.) (RZ); la

mayoría de éstas exhibieron ausencia total de bandas a pesar de haberse probado varias condiciones de lavado de la sonda. Estos resultados confirman que los patrones de hibridación en trigo son complejos, debido al carácter alohexaploide y al tamaño de su genoma.

Del total de sondas legibles, 29 % detectaron polimorfismo. Los niveles bajos de polimorfismo determinados con este tipo de marcadores son congruentes con los reportados en otros trabajos en trigo (Chao *et al.*, 1989; Gill *et al.*, 1991; Kam-Morgan *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1990; Liu y Tsunewaki, 1991), y en cebada (*Hordium vulgare* L.) (Graner *et al.*, 1991).

En la Figura 1 se presentan los resultados de acuerdo a cada una de las genotecas utilizadas.

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de las sondas probadas con las líneas progenitoras por grupo de sondas. En la respuesta por tipo de sonda, 74.5 % de las sondas genómicas (ADNg) fueron legibles y de las de ADN complementario (ADNc) sólo 59 %. Esta misma tendencia se observó al considerar la detección de polimorfismo; 35 % se alcanzó con las sondas de ADNg, mientras que con las de ADNc se detectó 23 %. Al respecto se ha indicado que no existe una tendencia clara (Kochert, 1994) y aunque esto no se ha probado, puede considerarse que las secuencias entre genes podrían ser más variables que los mismos genes y, por tanto, las sondas de ADNg podrían detectarlo. Por otra parte, las sondas de ADNc no sólo detectan variación en la región codificadora del gen correspondiente, sino también en regiones que flanquean el gen; entonces se podría esperar mayor polimorfismo en estas últimas regiones respecto de la región codificadora del mismo gen. Esto probablemente sea el factor responsable del mayor polimorfismo detectado cuando las sondas de ADNc se han utilizado como marcadores RFLPs en otros cultivos (Landry *et al.*, 1987; Miller y Tanksley, 1990).

Los resultados de las 158 sondas que detectaron polimorfismo (Cuadro 1) indican que con la enzima *EcoRV* se logró el mayor nivel (50.6 %), y con *HindIII* el menor (36.8 %). Las cinco enzimas de restricción empleadas reconocen una secuencia de seis pares de bases, lo que implica que un número similar de secuencias de nucleótidos en el genoma fueran analizadas. Con base en el origen del polimorfismo detectado con este tipo de marcadores (Scholotterer y Tautz, 1992), es probable que el



# CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA GENÉTICO PARA TRIGO HARINERO

Porcentaje de sondas

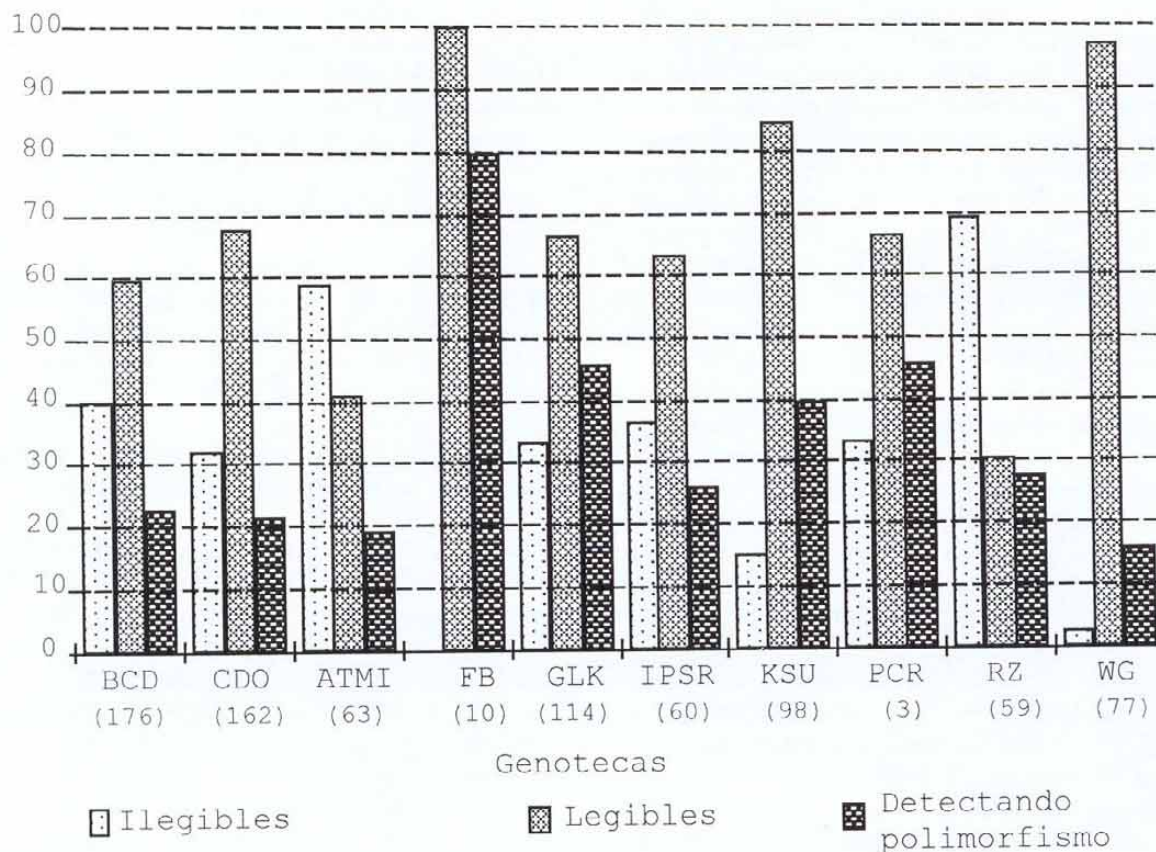


Figura 1. Polimorfismo (%) detectado por genoteca entre Frontana e INIA66. El cálculo se hizo a partir de las sondas legibles.

polimorfismo determinado en este trabajo, sea el reflejo de cambios en secuencias completas de ADN producto de inversiones, deleciones, etc., más que a simples sustituciones de pares de bases, como se ha reportado en la literatura.

**Polimorfismo detectado con los SSRs.** De los 68 pares de iniciadores de microsatélites utilizados con los progenitores, 12 de ellos no dieron productos de amplificación, 27 (48.2 %) detectaron polimorfismo y de éstos, 24 se emplearon con un subgrupo de 60 RILs F<sub>6</sub>. El nivel mayor de polimorfismo detectado mostró la viabilidad de los microsatélites como una herramienta alternativa o complementaria para incrementar el número de *loci* en segregación en cualquier población; sobre todo en especies que por su complejidad genómica y su nivel bajo de polimorfismo, son difíciles de analizar mediante marcadores RFLPs (Lee *et al.*, 1995; Roder *et al.*, 1995; Plaschke *et al.*, 1995, 1996). Una ventaja adicional resultante del uso de este tipo de marcadores, como se muestra en la Figura 2, consiste en la posibilidad de

analizar dos pares de *loci* distintos en un mismo gel. Lo anterior permite reducir el tiempo y costo hasta en 50 % en el proceso de cartografía. Además, tanto los SSRs como los RFLPs son marcadores específicos y codominantes.

**Segregación de marcadores.** De los 158 RFLPs analizados en la población, 72 *loci* se mostraron como dominantes; 43 de ellos para el progenitor Frontana, y 29 para INIA66. Los 53 restantes presentaron segregación codominante. El alto número de *loci* de tipo dominante probablemente está sobreestimado, lo que puede ser producto de la complejidad de los patrones de bandas obtenidos ya que en algunos casos no fue posible distinguir entre dos bandas y se tomaron como dominantes. En lo que respecta a los marcadores SSRs, todos (24) fueron del tipo codominante. Después de aplicar el procedimiento de pruebas múltiples de rechazo secuencial de Bonferroni (Holm, 1979), para estimar cocientes apropiados de Error Tipo I, únicamente tres *loci* marcadores RFLPs



Cuadro 1. Polimorfismo (%) detectado entre Frontana e INIA66 mediante RFLPs.

| Genoteca          | No. de sondas | Enzima de restricción |               |                 |              |              |
|-------------------|---------------|-----------------------|---------------|-----------------|--------------|--------------|
|                   |               | <i>Eco</i> R1         | <i>Eco</i> RV | <i>Hind</i> III | <i>Xba</i> I | <i>Dra</i> I |
| ATMI <sup>1</sup> | 5             | 80.0                  | 40.0          | 40.0            | 40.0         | 20.0         |
| BCD <sup>2</sup>  | 24            | 37.5                  | 66.7          | 20.8            | 33.3         | 33.3         |
| CDO <sup>2</sup>  | 24            | 37.5                  | 50.0          | 12.5            | 45.8         | 54.7         |
| FB <sup>1</sup>   | 8             | 12.5                  | 12.5          | 37.5            | 37.5         | 25.0         |
| GLK <sup>1</sup>  | 35            | 48.5                  | 60.0          | 48.7            | 45.7         | 42.9         |
| IPSR <sup>2</sup> | 10            | 40.0                  | 50.0          | 10.0            | 0.0          | 50.0         |
| KSU <sup>1</sup>  | 33            | 36.4                  | 45.4          | 45.4            | 51.5         | 42.4         |
| PCR <sup>1</sup>  | 2             | 100.0                 | 100.0         | 100.0           | 100.0        | 100.0        |
| RZ <sup>2</sup>   | 5             | 20.0                  | 40.0          | 20.0            | 0.0          | 20.0         |
| WG <sup>1</sup>   | 12            | 50.0                  | 41.7          | 33.3            | 50.0         | 58.3         |
| TOTAL             | 158           | 46.2                  | 50.6          | 36.8            | 40.4         | 44.6         |

Sondas de <sup>1</sup>ADNg y <sup>2</sup>ADNc

(*Xbcd1184*, *XksuF2* y *Xrz72*) presentaron una segregación distorsionada.

**Mapa de ligamiento.** Los grupos de ligamiento se hicieron para las 117 RILs F6 (Figura 3). La información de datos moleculares incluyó 149 *loci*, de los que 125 fueron marcadores RFLPs y 24 marcadores SSRs. De estos últimos, 12 no se asociaron a alguno de los grupos de ligamiento formados. El número de *loci* marcadores por subgrupo de ligamiento fluctuó de dos hasta 15, sumando una longitud total de 1396 cM, y una densidad promedio entre marcadores de 18.4 cM. Los 26 grupos de ligamiento reportados, en lugar de los 21 de que está constituido el genoma (ABD) de trigo harinero, son el resultado del nivel de saturación alcanzado por grupo de ligamiento; es decir, la distancia (cM) entre los subgrupos es tal que no es posible su integración. El mapa producto de este estudio tiene una saturación de acuerdo con Kochert (1993), de sólo 40 % en relación con uno apropiado para estudios de cartografía cromosómica en trigo, por lo que la utilización futura de un mayor número de marcadores podrá definir cada uno de los tres subgrupos que forman a cada uno de los siete grupos de ligamiento establecidos para el trigo harinero.

Las asociaciones de marcadores se asignaron a grupos de ligamiento tomando en consideración su orden lineal en cada grupo, con base en los mapas que se han publicado para esta especie (Nelson *et al.*, 1995abc; Schachemayr *et al.*, 1994; van Deynse *et al.*, 1995) y, utilizando la información de ubicuidad genómica de los microsatélites, esto último fue determinante para la identificación de los subgrupos de ligamiento.

**Perspectivas de la utilización de los marcadores RFLPs y SSRs en el trigo.** El polimorfismo es el factor principal involucrado en la utilidad de los marcadores

moleculares para la construcción de mapas de ligamiento. Los marcadores RFLPs se han utilizado con éxito en la construcción de mapas de ligamiento en muchas especies vegetales (Bernatzky y Tanksley, 1986; Helentjaris, 1987; Landry *et al.*, 1987; Bonierbale *et al.*, 1988; McCough *et al.*, 1988; Heun *et al.*, 1991). Sin embargo, en trigo la mayoría de los mapas de ligamiento se ha hecho con base en poblaciones generadas de cruza inter-específicas, como lo muestran algunos publicados para esta especie (Devos y Gale, 1993; Chao *et al.*, 1989; Marino *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 1995; Van Deynze *et al.*, 1995; Xie *et al.*, 1993). Lo anterior ha sido producto del nivel bajo de polimorfismo detectado (Cheung *et al.*, 1992; Roder *et al.*, 1995; Bernard *et al.*, 1997) con este tipo de marcadores, como ha sido confirmado en este trabajo. En cuanto a los microsatélites, el reducido número de SSRs utilizado (16) para la construcción del mapa de ligamiento se debe a que en el tiempo en que se realizó la investigación el desarrollo de los SSRs para el trigo estaba en su etapa inicial. No obstante, los resultados confirman su utilidad en esta especie, ya que además de las ventajas descritas por otros autores (Lee *et al.*, 1995), su especificidad genómica es una característica importante porque proporciona información adicional para la correcta designación de los grupos de ligamiento durante el proceso de construcción del mapa, actividad que en especies como el trigo es verdaderamente compleja, más aún cuando no se cuenta con un buen número de marcadores asociados a los diferentes grupos. Una ventaja adicional de los microsatélites es que pueden utilizarse en laboratorios en donde no se cuenta con la infraestructura requerida para aplicar métodos radioactivos. Aunque en la actualidad todavía su desarrollo es costoso y prolongado, estos marcadores pueden ser utilizados de manera complementaria a otros tipos de marcadores, como los RFLPs y AFLPs.



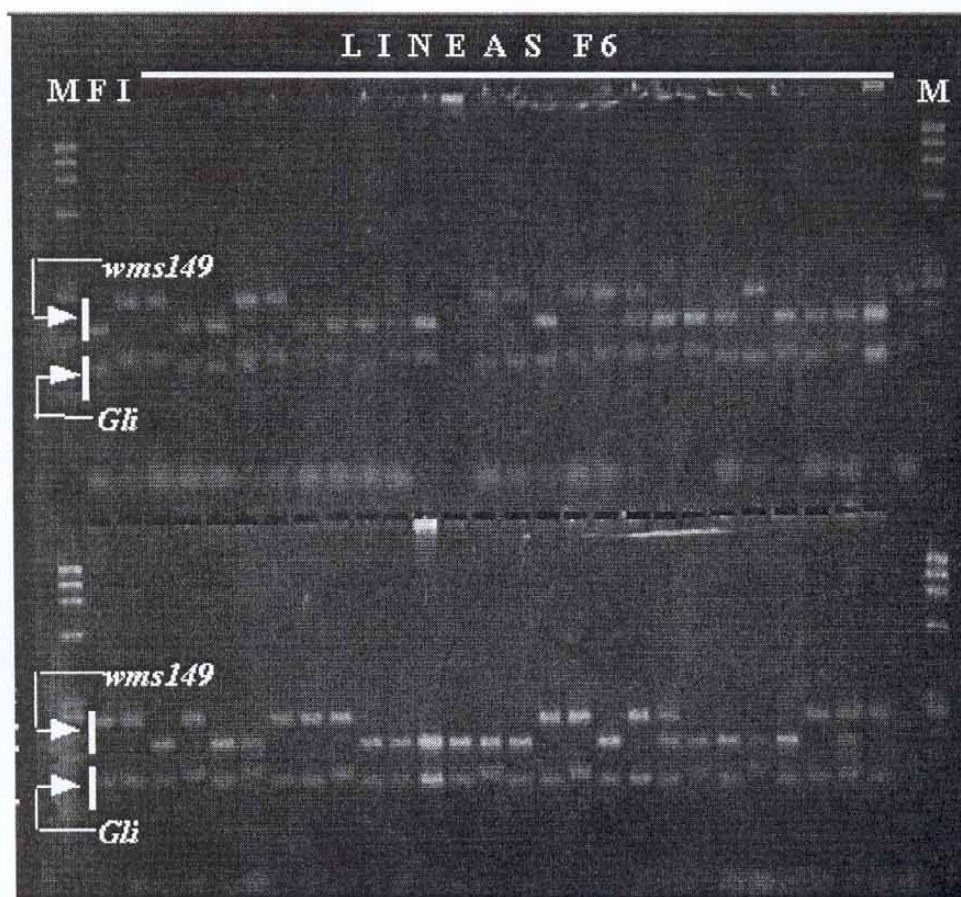


Figura 2. Polimorfismo detectado con dos loci SSRs (*wms149* y *Gli*) en un subgrupo de 60 RILs F<sub>6</sub>. Se indica el marcador de peso molecular  $\Phi$ X174/HaeIII (M) y Frontana (F) e INIA66(I).

El mapa producto de este trabajo servirá de base para el desarrollo de uno con un grado de saturación tal que permita el estudio de los QTL responsables de la resistencia a algunas enfermedades de importancia económica mundial en este cultivo, como son las roya de la hoja (*Puccinia recondita*) y del tallo (*Puccinia graminis*) entre otras, y cuyos genes de resistencia se encuentran segregando en la población de RILs utilizada para la construcción del mapa de ligamiento.

### CONCLUSIONES

La combinación de las clases diferentes de marcadores moleculares hace factible los estudios del genoma de trigo harinero al superar la limitante del bajo nivel de polimorfismo característico de esta especie.

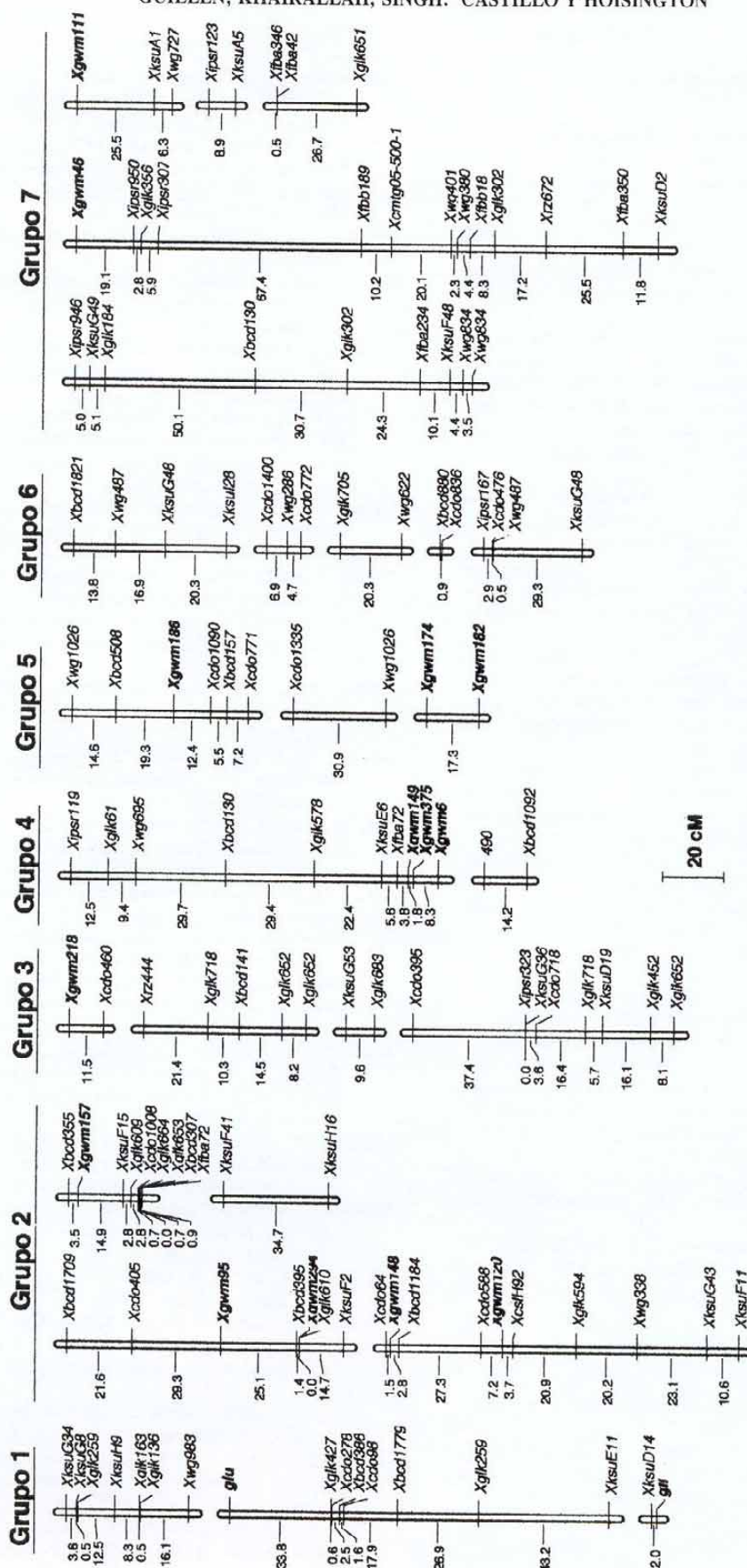
Un nivel mayor (40 %) de polimorfismo se determinó con los marcadores SSRs que detectado mediante los RFLPs.

La utilización de los SSRs facilitó la designación de los grupos de ligamiento.

Se construyó un mapa genético de trigo harinero con una longitud total de 1396 cM y con una densidad promedio entre marcadores de 18.4 cM.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal técnico del Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT por su valiosa colaboración durante el desarrollo de la investigación, en especial a Javier Alarcón, Elsa Espinosa y Susana Paniagua, por el excelente trabajo de laboratorio; a Susan Groh por colaborar en la captura y verificación de datos moleculares. De la misma manera se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por proporcionar la beca que permitió llevar a cabo la investigación.



Longitud total: 1396 cm  
Densidad promedio: 18.4 cm

Figura 3. Grupos de ligamiento obtenidos con base en la utilización de 125 marcadores RFLPs y 16 marcadores SSRs, en un grupo de 117 RILs F6 producto de la cruz de Frontana x INIA66. Los números a la izquierda indican la distancia (cm) entre los marcadores.



## BIBLIOGRAFÍA

- Apuya, N.R., B.L. Frazier, P. Keim, E.J. Roth, and K.G. Lark. 1988. Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Theor. Appl. Genet.* 75: 889-901.
- Bell, C.J. and J.R. Ecker. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genome* 19: 137-144.
- Bernartsky, R. and S.D. Tanksley. 1986. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112: 887-898.
- Bonierbale, M., R.L. Plaisted, and S.D. Tanksley. 1988. RFLP maps of potato and tomato based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution. *Genetics* 120: 1095-1103.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Chao, S., P.S. Sharp, A.J. Worland, E.J. Warham, R.M. Koebner, and M. D. Gale. 1989. RFLP based-genetic maps of wheat homeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78: 495-504.
- Cheung, W.Y., G. Moore, T.A. Money, and M.D. Gale. 1992. *HpaII* library indicates 'methylation-free islands' in wheat and barley. *Theor. Appl. Genet.* 84: 739-746.
- Copeland, N.G., N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, J.T. Eppig, L.J. Maltais, J.C. Miller, W. F. Dietrich, A. Weaver, S.E. Lincoln, R.G. Stein, J.H. Nadeau, and E.S. Lander. 1993. A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects. *Science* 262: 57-66.
- Devos, K.M., M.D. Atkinson, C.N. Lloyd, J.C. Raines, and M.D. Gale. 1992. The coding sequence for sedoheptulose-1,7-bisphosphatase detects multiple homologues in wheat genomic DNA. *Theor. Appl. Genet.* 85: 133-135.
- \_\_\_\_\_, and M.D. Gale. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84: 567-572.
- \_\_\_\_\_, and M.D. Gale. 1993. The genetic map of wheat and their potential in plant breeding. *Outlook on Agriculture* 22: 93-99.
- \_\_\_\_\_, T. Millan, and M.D. Gale. 1993. Comparative RFLP maps of the homeologous group 2 chromosomes of wheat, rice and barley. *Theor. Appl. Genet.* 85: 784-792.
- Dick, P.L. 1987. The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 29: 467-469.
- Gale, M.D., S. Chao, and J. Sharp. 1990. RFLP mapping in wheat: progress and problems. In: Gustafson J.P. (ed). *Gene manipulation in plant improvement II*. Plenum Press, N.Y. pp: 353-356.
- Gill, K.S., E.L. Lubbers, B.S. Gill, W.J. Raupp, and T.S. Cox. 1991. A genetic linkage map of *Triticum tauschii* (DD) and its relationship to the genome of bread wheat (AABBDD). *Genome* 34: 362-374.
- Graner, A., A. Jahoor, J. Schondelmaier, H. Siedler, K. Pillen, G. Fishbeck, G. Wenzel, and R.G. Herrmann. 1991. Construction of an RFLP map of Barley. *Theor. Appl. Genet.* 83: 250-256.
- Haldane, J.B.S. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8: 299-309.
- Helentjaris, T. 1987. A genetic map for maize based upon RFLPs. *Trends Genet.* 3: 217-221.
- Heun, M., A.E. Kennedy, J.A. Anderson, N.L.V. Lapitan, M.E. Sorrells, and S.D. Tanksley. 1991. Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 34: 437-447.
- Hoisington, D., M. Khairallah, and D. González-de-León. 1994. Laboratory Protocols CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 2a. ed. México, D.F. CIMMYT. 63 p.
- \_\_\_\_\_, and D. González-de-León. 1993. Hyper Map Data. A Hyper Card stack for entry and analysis of molecular genetic segregation data. *Agronomy Abstracts. Annual Meetings, Cincinnati Ohio. Nov 7-12.* p 70.
- Holm, S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6: 65-70.
- Kam-Morgan, L. N.W., B.S. Gill, and S. Muthukrishnan. 1989. DNA restriction fragment polymorphism: a strategy for a genetic of D genome of wheat. *Genome* 32: 724-732.
- Kochert, G. 1994. RFLP technology. In: R.L. Phillips and I.K. Vasil (eds.), *DNA-based markers in plants*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp: 8-38.
- Korzun, V., A. Börner, A.J. Worland, C.N. Law, and M.S. Röder. 1997. Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 95: 149-155.
- Lagercrantz, U., H. Ellegren, and L. Andersson. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21: 1111-1115.
- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barrow, M.J. Daly, S.E. Lincoln, and L. Newburg. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for construction primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Landry, B.S., R.V. Kesseli, B. Farrara, and R.W. Michelmore. 1987. A genetic map of lettuce and morphological markers. *Genetics* 116: 331-337.
- Lee, S.J., G.A. Penner, and K.M. Devos. 1995. Characterization of loci containing microsatellite sequences among canadian wheat cultivars. *Genome* 38: 1037-1040.
- Litt, M. and J.A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397.
- Liu, Y.G. and K. Tsunewaki. 1991. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. II. Linkage maps of the RFLP sites in common wheat. *Jpn. J. Genet.* 66: 617-633.
- \_\_\_\_\_, N. Mori, and K. Tsunewaki. 1990. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. I. Genomic DNA library construction and RFLP analysis in common wheat. *Jpn. J. Genet.* 65: 367-380.
- Marino, C.L., J.C. Nelson, Y.H. Lu, M.E. Sorrells, P. Leroy, N.A. Tulee, C.R. Lopes, and G.E. Hart. 1996. Molecular genetic maps of the group 6 chromosomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). *Genome* 39: 359-366.
- McCough, S., G. Kochert, Z. Yu, Z. Wang, G. Khush, W. Coffman, and S.D. Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76: 815-829.
- Miller, J.C. and S.D. Tanksley. 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 80: 437-448.
- Morgante, M. and A.M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Nelson, J.C., E.A. Van Deynze, E. Autrique, M.E. Sorrells, Y.H. Lu, M. Merlino, M. Atkinson, and P. Leroy. 1995a. Molecular mapping of wheat homeologous group 2. *Genome* 38: 516-524.
- \_\_\_\_\_, J.C., M.E. Sorrells, E.A. Van Deynze, Y.H. Lu, M. Merlino, M. Atkinson, M. Bernard, P. Leroy, J.D. Faris, and J.A. Anderson. 1995b. Molecular mapping of wheat. Major genes and rearrangements in homeologous groups 4, 5, and 7. *Genetics* 141: 721-731.
- \_\_\_\_\_, J.C., E.A. Van Deynze, E. Autrique, M.E. Sorrells, Y.H. Lu, S. Negre, M. Bernard, and P. Leroy. 1995c. Molecular



- mapping of wheat. Homoeologous group 3. *Genome* 38: 525-533.
- Plaschke, J., M.W. Ganal, and M.S. Roder. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1001-1007.
- \_\_\_\_\_, J., A. Borner, K. Wendehake, M.W. Ganal, and M.S. Roder. 1996. The use of wheat aneuploids for the chromosomal assignment of microsatellite loci. *Euphytica* 89: 33-40.
- Rafalski, J.A. and S.V. Tingey. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9: 275-280.
- Roder, M.S., J. Plaschke, S.U. Konig, A. Borner, M.S. Sorrells, S.D. Tanksley, and M.W. Ganal. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246: 327-333.
- Saghai-Marouf, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen, and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *P.N.A.S.* 81: 8014-8018.
- Sax, K. 1923. The Association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8: 552-560.
- Schachemayr, G., H. Siedler, M.D. Gale, H. Winzeler, M. Winzeler, and B. Keller. 1994. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 88: 110-115.
- Scholotterer C. and D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic. Acids Res.* 20: 211-215.
- Senior, M.L. and M. Heun. 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36: 884-889.
- Sharp, P.J., S. Chao, S. Desai, and M.D. Gale. 1989. The isolation, characterization and application in the *Triticeae* of a set of wheat RFLP probes identifying each homeologous chromosome arm. *Theor. Appl. Genet.* 78: 342-348.
- Tautz, D. and M. Renz. 1984. Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12: 4127-4137.
- Van Deynse, A.E., J. Dubcovsky, K.S. Gill, J.C. Nelson, M.E. Sorrells, J. Dvorak, B.S. Gill, E.S. Lagudah, S.R. McCouch, and R. Appels. 1995. Molecular-genetic maps for group 1 chromosomes of *Triticeae* species and their relation to chromosomes in rice and oat. *Genome* 38: 45-59.
- Weber, J.L. and P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum Genet.* 44: 388-396.
- Weissenbach, J., G.G. Yapav, C. Dib, A. Vignal, J. Morissette, P. Millasseau, G. Vaysseix, and M. Lathrop. 1992. A second generation linkage map of the human genome. *Nature* 359: 794-801.
- Williams, J.G.K., A. Kubelk, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Xie, D.X., K.M. Devos, G. Moore, and M.D. Gale. 1993. RFLP-based genetic maps of the homoeologous group 5 chromosome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 87: 70-74.