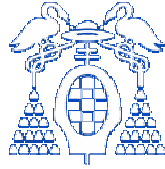


UNIVERSIDAD DE ALCALA
Facultad de Biología
Departamento Biología Celular y Genética



Tesis doctoral

*Análisis de la Diversidad Genética en una Colección de Poblaciones
Españolas de *Brachypodium distachyon* como Material de Base
para la mejora y Aplicaciones Biotecnológica.*

Rifka HAMMAMI
2011

GUILLERMO BODEGA MAGRO, PROFESOR TITULAR DE BIOLOGÍA CELULAR Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ,

CERTIFICA:

Que **Dña. Rifka HAMMAMI**, Ingeniero agrónomo, ha realizado la Tesis Doctoral titulada: *“Análisis de la Diversidad Genética en una Colección de Poblaciones Españolas de *Brachypodium distachyon* como Material de Base para la mejora y Aplicaciones Biotecnológica”* en el Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Alcalá, y reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste, firma en Alcalá de Henares, a seis de mayo de dos mil once.

Guillermo Bodega Magro

NICOLÁS JOUVE DE LA BARREDA, CATEDRÁTICO DE GENÉTICA Y JUAN MANUEL GONZÁLEZ TRIGUERO, PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada ***“Análisis de la Diversidad Genética en una Colección de Poblaciones Españolas de *Brachypodium distachyon* como Material de Base para la mejora y Aplicaciones Biotecnológica”*** realizada bajo su dirección por **Dña. Rifka HAMMAMI** en el Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Alcalá, se considera ya finalizada y puede ser presentada para su exposición y defensa

Y para que conste, firman en Alcalá de Henares, a seis de mayo de dos mil once.

Nicolás Jouve de la Barreda

Juan Manuel González Triguero

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2006-09018-C02-01GL; AGL-2009-10373), así como a la beca FPI concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (BES-2007-14361).

♣ *A la memoria de mi querido padre*

*Hoy necesito abrir este diálogo imposible
Este diálogo que solo es un pobre monólogo
Y te dedico esta tesis Papa!
Y te digo que nunca te he olvidado
Que nunca volverás a estar conmigo
Que nunca volveré a coger tu mano
Y sin embargo
Hoy siento que mi alma no está sola
Que tú, nunca te has ido de mi lado.*

♣ *A la revolución del Jazmín (14/01/2011)*

AGRADECIMIENTOS

Estos años han marcado mucho mi vida. No todo han sido alegrías y mentiría si dijera lo contrario pero también ha habido buenos momentos que no olvidaré. El doctorado, Además de un reto académico, ha sido también un largo viaje donde uno se acaba descubriendo a sí mismo tal y como es, conociendo lo mejor y lo peor que lleva dentro. Hay ciertas personas que en este tiempo han aportado su ayuda para que yo pudiera completar este viaje y quisiera hacerlas participes de mi gratitud

Primero y antes que nada, dar gracias a *DIOS* que ha iluminado los rincones del largo camino que me ha traído hasta aquí.

Debo agradecer de manera especial y sincera al Profesor *Nicolás Jouve* por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad de guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de la tesis, sino también en mi formación como investigadora. Gracias Nicolás por facilitarme muchas cosas sobre todo al final cuando tuve que ir y venir varias veces.

Quiero extender un sincero agradecimiento al Profesor *Juan Manuel González*, por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento en Genética. Le agradezco también por sus siempre atentas y rápidas respuestas a las diferentes inquietudes surgidas durante el desarrollo de las diferentes etapas del trabajo. Gracias Juan por la magnífica orientación y la amistad.

Un agradecimiento muy especial va a la Dra. Angelines Cuadrado, por el conteo cromosómico del material y sus famosas hibridaciones, también por su preocupación constante por mi trabajo y mi bienestar. Quiero agradecer también a la Dra. Consuelo Soler la confianza depositada en mí brindándome la oportunidad de trabajar con su material vegetal.

Mi más sincero agradecimiento y cariño a Eva Friero. Ella fue una bendición en los momentos más difíciles del trabajo experimental de la tesis. Gracias también por tener siempre tendida su mano amiga.

Agradezco la amistad recibida durante estos años de los profesores y becarios del Departamento de Genética de la Universidad de Alcalá de Henares: Yolanda Loarce por su motivación positiva y para estar siempre dispuesta a echar una mano; Esther Ferrer, por sus consejos, Angelines Bernardo, Pilar Rubio, Araceli Fominaya, Chelo la secretaria del departamento por su disponibilidad y ayuda, María Jesús Sanz y Ruth Pérez amigas del

laboratorio, gracias por los buenos momentos compartidos y el apoyo sobre todo en la fase final cuando más lo necesitaba .A aquellos que me han aceptado como soy quiero decir con mucho cariño y respeto muchas gracias por adoptarme como un miembro más del grupo, seguro que de cada uno llevo un recuerdo y espero dejar una buena huella.

Por último, pero no menos importante, quiero dar las gracias de todo corazón a mi familia. A mis padres, por darme todo sin esperar nada a cambio, por aguantar mi ausencia durante mucho tiempo, ellos tienen todo el mérito de cada uno de mis logros en la vida, por saber esperar con impaciencia este importante evento aunque mi padre ha quitado este mundo pocos meses antes de disfrutar de este paso, pero siempre sentí el orgullo en su cara. Papa ningún hombre dejara tanta huella en mi vida como la has dejado tu. A mis queridas hermanas y amigas Sameh y Dhouha por su apoyo y amor: Sameh eres un cielo, si soy quien soy ahora porque tú eres mi hermana, Dhouha, todavía mi acuerdo del 23 de julio de 2003 cuando me acompañaste para el examen oral de la escuela de agrónomos y tuviste que quedar fuera toda una mañana esperándome en el sol. A mí hermano Kamel con el compartí una infancia feliz que guardo en el recuerdo, por ser siempre una persona con la que puedo contar con ella. A mis cuñados Mohamed y Morthadha por el cariño y la comprensión. Esa tesis va dedicada también a mis sobrinos la alegría de mi vida: Chouaib, tu presencia en mi vida me da mucha energía. Yacine, no te preocupes cariño un día vas a entender donde ha ido el abuelo. Hachim, tienes el talento de un artista. Yasmine, si quieres seguir el mismo camino que yo tendrás que pensar en una buena compañía.

A todos mis amigos pasados y presentes, pasados por ayudarme a crecer y madurar y presentes por estar siempre conmigo apoyándome en todas las circunstancias posibles, también son parte de este logro. Los recuerdo.

Finalmente, deseo expresar una mención muy especial a Talel, quien confió profundamente en mí y él descubrió que en la generosidad, el esfuerzo, la dedicación y la ayuda no tiene límites. Gracias por darme la estabilidad sentimental y por estar a la vez amigo, compañero y novio. Ahora que nos queda poco para estar juntos, tengo que cumplir todas mis promesas.

Abreviaturas

- **µg:** microgramos
- **µl:** microlitro.
- **2.4-D:** Ácido 2.4-Dicloro fenoxia acético.
- **ADN:** Ácido Deóxirribo-Nucleico.
- **ANOVA:** Analisis de la varianza (**A**nalysis **O**f **V**ariance).
- **APS:** peroxidisulfato amónico.
- **cm:** centímetro.
- **dNTP:** 2-deoxinucleótidos Trifosfato.
- **EDTA:** Ácido Etilen-Diamino Tetra-aético.
- **g:** gramo.
- **gl:** Grados de libertad.
- **ISSR:** Inter-Microsatélites (Inter-Short Sequences Repeats).
- **M:** Molar.
- **mg:** miligramo.
- **min:** minuto.
- **ml:** mililitro.
- **Mm:** milímetro.
- **mM:** miliMolar.
- **MS:** medio de *Murashige δ skoog*.
- **MSm:** medio de *Murashige δ skoog*. Preparado con maltosa
- **mV:** milivoltios.
- **ng:** nanogramos
- **°C:** grados centígrados.
- **p/v:** (peso/volumen).
- **pb:** pares de bases.
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- **SDS:** Dodecil Sulfato Sódico.
- **SSR:** Microsatélites (Short Sequences Repeats).
- **TEMED:** N,N, N, N-tetra-methylethylendiamin.
- **Tris:** 2- amino-2-2 (hidroximetil) 1-1-3- propanodiol.
- **U:** unidades de actividad enzimática

Índice

Índice	i
Lista de figuras	iv
Lista de tablas.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL	3 -
1.2 TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>Brachypodium</i>	4 -
1.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS DEL GÉNERO <i>Brachypodium</i>	5 -
1.4 DISTRIBUCIÓN Y HÁBITATS ECO GEOGRÁFICOS DEL GÉNERO <i>Brachypodium</i> .-	6 -
1.5 CITOLOGÍA DEL GENERO <i>Brachypodium</i>	8 -
1.6 <i>Brachypodium distachyon</i> : COMO ESPECIE MODELO GENÓMICO	11 -
1.7 <i>B. distachyon</i> UN PUENTE ENTRE EL ARROZ Y LA TRIBU Triticeae	12 -
1.8 LA COMPOSICIÓN DEL GENOMA DE <i>B. distachyon</i>	14 -
1.9 USO ECOLÓGICO DEL GÉNERO <i>Brachypodium</i>	16 -
1.10 RECURSOS GENÉTICOS.....	17 -
1.11 PROTEÍNAS DE RESERVA DEL ENDOSPERMO DE SEMILLAS DE CEREALES-	19 -
1.12 MARCADORES MOLECULARES PARA ESTUDIAR LA VARIABILIDAD GENÉTICA.....	23 -
1.12.1 Los microsatélites (SSR).....	23 -
1.12.2 Los microsatélites en el genoma de <i>B. distachyon</i>	25 -
1.12.3 Los intermicrosatélites (Inter Simple Sequence Repeats: ISSRs)	26 -
1.13 EMBRIOGENESIS SOMATICA.....	28 -
1.13.1 La embriogénesis somática en las gramíneas	28 -
1.13.2 Factores que afectan a la embriogénesis somática en cereales	30 -
1.13.3 El cultivo <i>in vitro</i> de embriones inmaduros en cereales bajo diferentes concentraciones de hormonas de crecimiento.....	31 -
1.13.4 <i>Brachypodium distachyon</i> y la respuesta al cultivo <i>in vitro</i>	32 -
2. OBJETIVOS.....	35 -
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39 -
3.1 MATERIAL VEGETAL	41 -

3.2 DATOS MORFOLÓGICOS.....	- 42 -
3.3 CULTIVO <i>in vitro</i> DE EMBRIONES INMADUROS.....	- 45 -
3.3.1. Obtención de embriones cigóticos inmaduros de <i>B. distachyon</i>	- 46 -
3.3.2. Composición de los medios de cultivo	- 47 -
3.3.3 Siembra de los embriones inmaduros en medios de cultivo	- 51 -
3.3.4 Regeneración de Callos.....	- 51 -
3.3.5 Obtención de plántulas.....	- 52 -
3.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL ENDOSPERMO DE <i>B. distachyon</i>	- 53 -
3.4.1 Extracción de proteínas totales del endospermo de <i>B. distachyon</i>	- 53 -
3.4.2 Extracción diferencial de gluteninas	- 54 -
3.5 PREPARACIÓN DE CROMOSOMAS	- 58 -
3.6 EXTRACCIÓN DEL ADN	- 60 -
3.7 MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN DEL ADN	- 60 -
3.7.1 Obtención de Inter-microsatélites (ISSRs)	- 60 -
3.7.2 Amplificación de microsatélites (SSR).....	- 62 -
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	- 64 -
4. RESULTADOS.....	- 65 -
4. RESULTADOS.....	- 67 -
4.1 NÚMERO Y CARACTERÍSTICAS DE LOS CROMOSOMAS DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS	- 67 -
4.1.1 Descripción de los cromosomas de <i>B. distachyon</i> de 2n=10	- 68 -
4.1.2 Descripción de los cromosomas de <i>B. distachyon</i> de 2n=20	- 69 -
4.1.3 Descripción de los cromosomas de <i>B. distachyon</i> de 2n=30	- 69 -
4.1.4 Resultados de la hibridación in situ (FISH)	- 69 -
4.1.5 Resultados de GISH.....	- 71 -
4.2 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN CARACTERES MORFOLÓGICOS-	72 -
4.3 ESTUDIO DE LA RESPUESTA AL CULTIVO <i>in vitro</i> DE EMBRIONES INMADUROS DE <i>B. distachyon</i>	- 75 -
4.3.1 Resultados del ensayo preliminar	- 75 -
4.3.2 Resultados del segundo ensayo.....	- 81 -
4.4 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD INTER E INTRA-POBLACIONAL PARA PROTEÍNAS DE RESERVA DEL ENDOSPERMO TOTALES Y DE TIPO GLUTENINAS DE <i>B. distachyon</i>	95

4.4.1 Estudio de las proteínas totales	95
4.4.2 Estudio de la diversidad genética para gluteninas	100
4.4.3 Estudio de la variabilidad inter-poblacional	104
4.4.4 Estudio de la variabilidad intra-poblacional	106
4.5 ANÁLISIS DE VARIABILIDAD MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES DE ADN GENÓMICO	108
4.5.1 Estudio de microsatélites (SSR).....	108
4.5.2. Estudio de Inter-microsatélites (ISSR)	117
4.6 EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN <i>B. distachyon</i>	124
5. <i>DISCUSIÓN</i>	- 127 -
5.1 CITOTIPOS CROMOSÓMICOS DE <i>Brachypodium distachyon</i> Y SU ORIGEN EVOLUTIVO	- 129 -
5.2 EL CULTIVO <i>in vitro</i> DE <i>Brachypodium distachyon</i> : UN POTENCIAL APLICADO.-	132 -
5.3 DIVERSIDAD GENÉTICA EN <i>Brachypodium distachyon</i>	- 138 -
5.3.1 Estudio de la variabilidad genética en <i>B. distachyon</i>	- 138 -
5.3.2 Utilidad de los marcadores bioquímicos y moleculares en el análisis de la diversidad-	141 -
5.4 INFLUENCIA DE FACTORES ECO-GEOGRÁFICOS EN LA DIVERSIDAD	- 147 -
5.5 EVALUACIÓN DE LA COLECCIÓN DE <i>Brachypodium distachyon</i> COMO FUENTE PARA LA DOMESTICACIÓN Y LA OBTENCIÓN DE LÍNEAS Y VARIEDADES ÚTILES PARA LA PROTECCIÓN DE SUELOS DEGRADADOS.....	- 153 -
6. <i>CONCLUSIONES</i>	- 157 -
7. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	- 163 -

Lista de figuras

- ❖ **Figura 1.1:** Distribución geográfica del género *Brachypodium* (Tateoka, 1968)..... - 7 -
- ❖ **Figura 1.2:** Relaciones filogenéticas entre *B. distachyon* y los cereales de mayor importancia económica (Opanowicz y col., 2008). - 14 -
- ❖ **Figura 1.3:** Regiones inter-micro satélites ISSR. - 26 -
- ❖ **Figura 1.4:** Proceso de la embriogénesis en el caso de las plantas Monocotiledóneas- 29 -
- ❖ **Figura 1. 5:** Proceso del cultivo in vitro de gametófitos de meristemos y de embriones inmaduros - 29 -

- ❖ **Figura 3.1:** Distribución geográfica de las 23 poblaciones silvestres de *B. distachyon* recolectadas en España - 44 -
- ❖ **Figura 3.2 :** Material vegetal en el invernadero (Febrero 2008)..... - 44 -
- ❖ **Figura 3.3:** Las diferentes etapas del proceso de cultivo in vitro de embriones inmaduros de *B. distachyon*. - 46 -
- ❖ **Figura 3.4:** A la izda., el aparataje y productos para la preparación de geles de poliacrilamida. A la dcha. cubeta de electroforesis montada..... - 57 -

- ❖ **Figura 4. 1:** Metafases mitóticas de *B. distachyon*, a) Bd701 ($2n= 10$); b) Bd115 ($2n= 20$) y c) Bd361 ($2n=30$) - 68 -
- ❖ **Figura 4.2:** a) Cariotipo de *B. distachyon* ($2n=10$); b) Hibridación in situ con las sondas de genes ribosomales 5SrDNA y 45SrDNA - 69 -
- ❖ **Figura 4.3:** Resultados FISH utilizando las sondas pTa794 (verde) y pTa71 (rojo) para detectar los genes ribosomales 5SrDNA y 45SrDNA, respectivamente en tres poblaciones con distintos números cromosómicos. a-b) BR1200 ($2n=10$), c-f) BR115 ($2n= 20$) y g-h) BR146 ($2n=30$). Para ayudar a identificar los cromosomas portadores de estos genes en cromosomas teñidos con DAPI se indican con flechas de los mismos colores (a, c y g). e). Un detalle de los cromosomas satelizados portadores de los genes ribosomas de 45SrDNA en la población BR115. En el centro de la figura se representan los cromosomas portadores de los genes ribosomales. Las flechas indican sus relaciones, como confirman los resultados de GISH. - 70 -
- ❖ **Figura 4.4:** Resultados de GISH con ADN genómico aislado de poblaciones de diferentes números de cromosomas $2n=10, 20$ y 30 . a-c) ADN genómico de la población BR3113 ($2n=10$) marcado con digoxigenina (detección verde) en preparaciones de

Brachypodium con 10, 20 y 30 cromosomas respectivamente. d-f) Hibridación con ADN genómico de la población BR129 (2n=20) marcado con biotina (detección rojo sobre fondo DAPI azul) en preparaciones de *Brachypodium* con 10, 20 y 30 cromosomas respectivamente. g-h) ADN genómico de la población BR3107 (2n=30) marcado con biotina (detección rosa/rojo) en preparaciones de las poblaciones de *Brachypodium* indicadas con niveles de ploidia de 10, 20 y 30..... - 71 -

❖ **Figura 4.5:** Confirmación que los citotipos 2n=30 de *B. distachyon* tienen un origen alopoloide. a) Hibridación *in situ* con la sonda pTa71 rDNA (señal rojo) y pTa794 5SrDNA (señal verde en una metafase de la población Bd146 (2n=30). b) La misma metafase tras rehibridación con el ADN genómico de la línea Bd3113 (2n=10) (verde) y la población Bd129 (2n=20) (rojo). Scale bar = 10 μ m. - 72 -

❖ **Figura 4.6:** Histogramas correspondientes a las medias de algunos caracteres agromorfológicos del conjunto de las plantas analizadas para cada población y observados a lo largo del ciclo y mantenidas en condiciones de invernadero. Las plantas se agrupan por número cromosómico. Rojo = 2n=10; Morado = 2n=20; Verde = 2n=30. - 74 -

❖ **Figura 4.7:** Detalles morfológicos de plantas de *B. distachyon*. A) De la izda. a dcha.: Bd238 (2n=30), Bd114 (2n=20) y Bd160 (2n=10). Se aprecia la menor talla de las plantas de 2n=10 que las de número cromosómico superior. Sin embargo no se aprecian diferencias en la altura del tallo principal entre las plantas de 2n=20 y 2n=30. B) Forma de espiga en los tres citotipos. De izda. a dcha. Bd486, Bd114 y Bd160 de 2n=30, 20 y 10, respectivamente. C) Grano de formas de 2n=10, 2n=20 y 2n=30, de arriba abajo (cuadrícula 1 mm.)..... - 75 -

❖ **Figura 4.8:** Diferentes tipos de callos desarrollados a partir de embriones inmaduros de *B. distachyon* sobre medios MS y MSm. - 76 -

❖ **Figura 4.9:** Regeneración de brotes verdes en medios MS y MSm, a partir de embriones inmaduros procedentes de las poblaciones Bd485 y Bd341 respectivamente de *B. distachyon* - 79 -

❖ **Figura 4.10:** Respuesta a la inducción de callos embriogénicos sobre medios BR1 y BR2 de los embriones inmaduros procedentes de Bd114 (2n=20), Bd115 (2n=20) y Bd341 (2n=30). - 82 -

❖ **Figura 4.11:** Respuesta a la inducción de callos embriogénicos sobre medios BR3 y BR4 de embriones inmaduros procedentes de Bd114 (2n=20)..... - 82 -

❖ **Figura 4.12 :** Respuesta del cultivo *in vitro* sobre medios BR5, BR6 y BR8 de las poblaciones Bd238 (2n=30) y Bd115(2n=20)..... - 83 -

❖ Figura 4.13: Resultados de la regeneración de brotes verdes a partir de callos compactos de las poblaciones Bd238, Bd341, Bd115 y Bd114, obtenidos en los medios de inducción BR1, BR2 y BR3.	- 91 -
❖ Figura 4.14: Electroforesis bifásica de las proteínas de reserva del endospermo de cada población. Los números de la cabecera corresponden a las denominaciones de las poblaciones (CS = <i>T. aes.</i> 'Chinese Spring'; 3107 = 'Ibros'; 3113 = 'Zulema')	96
❖ Figura 4.15: Dendograma obtenido tras el análisis de las proteínas totales de reserva en las poblaciones y líneas de <i>B. distachyon</i> estudiadas.....	100
❖ Figura 4.16: SDS-PAGE de glutenina, los números de cabecera corresponden a las denominaciones de la poblaciones (CS = <i>T.aestivum</i> 'Chinse Spring'; M= Marcador de peso molecular) los números escritos en rojo corresponden a las bandas de gluteninas identificados en cada gel mezcla.	101
❖ Figura 4.17: a) Bandas específicas (1; 9 A y 15) de las formas de $2n=10$; b) bandas específicas a poblaciones con $2n=20$ y ausentes en diploides : CS: "Chinse Spring"	104
❖ Figura 4.18: Dendograma obtenido tras el análisis de las gluteninas de reserva del endospermo (gluteninas) en las 23 poblaciones silvestres de <i>B. distachyon</i> y las dos líneas comerciales.	105
❖ Figura 4.19: Dendograma representando las distancias genéticas entre 94 patrones diferentes de gluteninas	107
❖ Figura 4.20: Picos amplificados con sus tamaños en distintas poblaciones de <i>B. distachyon</i>	109
❖ Figura 4.21: Dendograma representando las distancias genéticas entre 23 poblaciones silvestres de <i>B. distachyon</i> , dos líneas comerciales y BD21.....	112
❖ Figura 4.22: Dendograma representando las distancias genéticas entre 240 plantas pertenecientes a las 23 líneas de <i>B. distachyon</i> y las dos variedades comerciales 'Ibros' y 'Zulema'	114
❖ Figura 4.23: Separación de los productos de amplificación de diferentes sistemas ISSR en poblaciones de <i>B. distachyon</i> ($n=10, 20$ y 30). M= marcador de peso a) amplificación de los DNA genómicos de las muestras de las poblaciones Bd114 y Bd115 con el ISSR 17; b) amplificación de los DNA genómicos de las muestras de accesiones Bd409 y Bd485 con el ISSR 11 y c) amplificación de los DNA genómicos de los individuos procedentes de las poblaciones Bd160 y Bd162 con el SSR6	118

- ❖ **Figura 4.24:** Dendrograma representando las distancias genéticas entre 23 poblaciones silvestres de *B. distachyon*, dos líneas comerciales y BD21 tras el análisis de los 16 sistemas ISSR.....119
- ❖ **Figura 4.25:** Dendrograma representando las distancias genéticas entre 240 plantas pertenecientes a las 23 líneas de *B. distachyon* y las dos variedades comerciales ‘Ibros’ y ‘Zulema’121
- ❖ **Figura 4.26:** Dendrograma global representando las distancias genéticas entre las 25 poblaciones ensayadas y sumando todos los resultados proporcionados por los tres tipos de marcadores: Gluteninas, SSRs y ISSR. Poblaciones $2n=20$125

- ❖ **Figura 5. 1:** Distribución de las poblaciones en función de los dos ejes principales de un análisis de correspondencias en el que se contemplan 11 factores eco-geográficos y climáticos y en nº de cromosomas. (Rojo = $n=10$; Morado = $2n=20$; Verde = $2n=30$) - 149 -
- ❖ **Figura 5.2:** Distribución de las poblaciones en función de los tres ejes principales de un análisis de correspondencias en el que se contemplan 11 factores eco-geográficos y climáticos y el nº de cromosoma..... - 150 -
- ❖ **Figura 5. 3:** Distribución de las 25 poblaciones de *B. distachyon* en función de los tres ejes principales de un análisis de correspondencias en el que se contemplan 6 factores eco-geográficos y climáticos, la diversidad en gluteninas y microsatélites y el nº de cromosomas. - 152 -

Lista de tablas

❖ Tabla 3. 1: Datos geográficos, origen y principales parámetros climáticos del lugar de procedencia de las 23 poblaciones silvestres y de las dos variedades comerciales (Bd3107 = 'Zulema', y Bd3113 = 'Ibros') de <i>B. distachyon</i>	- 45 -
❖ Tabla 3. 2: Composición de Macro y Micro-elementos utilizados en la preparación de los medios de cultivo (Murashige y Skoog, 1962)	- 47 -
❖ Tabla 3. 3: Composición de la solución stock FeNa-EDTA 10-4 M.....	- 47 -
❖ Tabla 3. 4: Composición de las soluciones stock de vitaminas	- 48 -
❖ Tabla 3. 5: Composición de los medios MS y MSm de inducción.....	- 48 -
❖ Tabla 3. 6: Composición de los medios BR1 y BR2 de inducción de callos embriogénicos	- 49 -
❖ Tabla 3. 7: Composición del medio BR3 de inducción de callos embriogénicos ...	- 49 -
❖ Tabla 3. 8: Composición de los medios BR4 y BR5 de inducción de callos embriogénicos	- 50 -
❖ Tabla 3. 9: Composición del medio BR6 de inducción de callos embriogénicos. ...	- 50 -
❖ Tabla 3. 10: Composición de los medios BR7 y BR8 de inducción de callos embriogénicos.....	- 50 -
❖ Tabla 3. 11: Composición del medios BR9 de inducción de callos embriogénicos	- 51 -
❖ Tabla 3. 12: Composición del medios BR de germinación de callos.....	- 52 -
❖ Tabla 3. 13: Composición del medio G1	- 52 -
❖ Tabla 3. 14: Composición del medio de crecimiento de plántulas.	- 53 -
❖ Tabla 3. 15: Componentes de la solución stock madre.....	- 54 -
❖ Tabla 3. 16: Componentes de la solución de extracción	- 54 -
❖ Tabla 3. 17: Componentes del gel separador	- 56 -
❖ Tabla 3. 18: Componentes del gel concentrador	- 57 -
❖ Tabla 3. 19: Componentes de la solución de tinción	- 58 -
❖ Tabla 3. 20: Programas de amplificación de ISSR por PCR.....	- 61 -
❖ Tabla 3. 21: Secuencias de los cebadores utilizados	- 61 -
❖ Tabla 3. 22: Programas de amplificación de SSR por PCR	- 63 -
❖ Tabla 3. 23: Secuencias de sistemas SSR amplificados por PCR.....	- 63 -

❖ Tabla 4.1: Número de cromosomas y tipos de imágenes utilizadas en el estudio de los citotipos de las poblaciones estudiadas.	- 68 -
❖ Tabla 4.2: Caracteres agro-morfológicos de las poblaciones, basados en el comportamiento en invernadero. Los datos se refieren a 15 plantas de cada población o línea analizada. E = porte erecto, SE = porte semi-erecto; P = porte postrado; SP = porte	- 73 -
❖ Tabla 4.3: Respuesta al cultivo in vitro de embriones inmaduros de <i>B. distachyon</i> (fase de inducción + fase de regeneración en dos medios de cultivo MS y MSm (Em= número de embriones puestos en cultivo, Ec= número de callos a partir de embriones sembrados, Egp/Ec= número de brotes verdes producidos a partir de callos compactos/total de callos embriogénicos, Sgp/Sc= número de brotes verdes producidos a partir de callos fofos/total de callos fofos, Gp/Tc= número total de brotes verdes/total de callos, Ap/Tc= número total de brotes albinos/ total de callos y por último Gp/E= número total de brotes verdes/total de embriones inmaduros cultivados).	- 77 -
❖ Tabla 4.4: Influencia del medio de cultivo utilizado (MS y MSm) en la inducción de callos y la regeneración de plantas en las poblaciones de <i>B. distachyon</i> para el conjunto de materiales estudiados y agrupados en función de su constitución cromosómica.....	- 79 -
❖ Tabla 4.5: Correlaciones basadas en el coeficiente de Pearson calculado con respecto a la fase de inducción y de regeneración de las 23 poblaciones de <i>Brachypodium</i> y las dos líneas comerciales (*, ***= significativa $p < 0.05$ y $p < 0.001$ respectivamente.....	- 80 -
❖ Tabla 4.6: Resultados obtenidos para cada una de las poblaciones en función de la réplica y del medio de cultivo de inducción de callos empleado. A partir de los datos se han calculado las siguientes variables: TC= n° de callos totales/n° total de embriones; CC= n° de callos compactos/n° total de callos; SC= n° de callos fofos/n° total de callos..	- 84 -
❖ Tabla 4. 7: ANOVA de las tres variables analizadas (TC, CC y SC).	- 89 -
❖ Tabla 4.8: Resultados del cálculo de LSD (diferencia mínima significativa) para las variables TC, CC y SC. Las poblaciones y medios que tienen la misma letra no muestran diferencias estadísticamente significativas.....	- 89 -
❖ Tabla 4.9: Resultados del segundo ensayo de cultivo in vitro realizado con las seis poblaciones de <i>B. distachyon</i> seleccionadas.	93
❖ Tabla 4. 10: ANOVA de las variables analizadas.....	94
❖ Tabla 4. 11: Resultados del cálculo de LSD (diferencia mínima significativa) de las variables TSV, TSVC, SCC, SSC y R	95

❖ Tabla 4.12: Los patrones de presencia-ausencia de las 23 proteínas separadas en electroforesis en el conjunto de las 24 poblaciones y las dos líneas comerciales. La última columna se refiere la frecuencia de cada banda en el conjunto de las poblaciones y la última fila el número de bandas máximo que aparece en cada material	99
❖ Tabla 4.13: Frecuencias de las 22 proteínas LMW-GS estudiadas en las 23 poblaciones silvestres de <i>B. distachyon</i> con tres niveles de ploidia ($2n=10, 20$ o 30)	103
❖ Tabla 4. 14: Número de fragmentos y rango de tamaños de los productos de amplificación con los distintos cebadores SSR.....	108
❖ Tabla 4. 15: Fragmentos comunes a los tres citotipos.....	109
❖ Tabla 4.16: Matriz de presencia-ausencia de fragmentos amplificados por PCR de SSR. Se han representado en colores los picos comunes y específicos de cada nivel cromosómico.	110
❖ Tabla 4. 17: Número de fragmentos y rango de R_f^* en la amplificación con cebadores ISSR.....	117
❖ Tabla 4. 18: fragmentos compartidos entre los tres citotipos ($2n=10, 20$ y 30).....	118
❖ Tabla 5.1: Influencia de 11 variables eco-geográficas y climáticas y el número de cromosomas ($2n$) en la distribución de 25 poblaciones de <i>Brachypodium distachyon</i> . Los valores registrados corresponden a la contribución de cada variable en los 3 primeros ejes del análisis de correspondencias. Estos ejes acumulan el 85,15% de la varianza. (Alt = altitud geográfica; Lat = latitud geográfica; Long = longitud geográfica; Pv = pluviosidad media anual; P = precipitación en verano.; T = temperatura media anual; M = máxima temperatura del mes más frío; It = índice de termicidad = $T + m + M/10$, siendo m la temperatura mínima del mes más frío; Fdf = número de días libres de heladas al año; Im3 = Índice de Mediterraneidad.	- 148 -
❖ Tabla 5.2: Correlación entre los índices de heterogeneidad de gluteninas y microsatélites, el número de cromosomas y 7 de las variables climáticas y eco-geográficas de los lugares de procedencia de las 25 poblaciones de <i>Brachypodium distachyon</i> analizadas.	- 150 -
❖ Tabla 5.3: Influencia de 6 variables eco-geográficas y climáticas el número de cromosomas ($2n$) y la variabilidad en gluteninas y proteínas en la distribución de 25 poblaciones de <i>B. distachyon</i>	- 151 -

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La denominación del género *Brachypodium* P. Beauv, (1812) proviene de las palabras griegas “*brachys*” que significa corto y “*podion*” que significa poco alimento. Pertenece a la familia *Poaceae* (Gramíneas) en las que se incluyen las especies cultivadas de mayor importancia mundial en términos de superficie de cultivo, producción y distribución geográfica. Entre ellas se encuentran los cultivos extensivos más importantes para la alimentación del hombre (producción del pan, pastas, galletas) y del ganado (producción de piensos) como son, el trigo (*Triticum sp.*), la cebada (*Hordeum vulgare* L.), la avena (*Avena sp.*), el centeno (*Secale cereale* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.), el maíz (*Zea mays* L.), el triticale (*xTriticosecale* Witmack) etc. La familia *Poaceae* está ampliamente representada en numerosos hábitats del mundo y cuenta con formas tanto perennes como anuales. Las formas perennes son muy abundantes y colonizan las montañas y las regiones de elevadas altitudes, mientras que las anuales son más frecuentes en el clima Mediterráneo caracterizado para un verano seco y caluroso y un invierno suave. En esta familia se encuentran incluidas plantas herbáceas, algunas leñosas raras e incluso arborescentes.

Las gramíneas se caracterizan por la abundancia de plantas rizomatosas, estoloníferas o cespitosas, con reproducción autógena, alógama e incluso apomíctica. Los géneros que constituyen esta familia comprenden formas diploides y poliploides, con ciclos de desarrollo anual, bianual o perenne. La arquitectura primaria de la planta está caracterizada por una ramificación vegetativa densa, jugando un papel muy importante en el proceso de acumulación de biomasa, necesaria para la producción de un número considerable de inflorescencias con abundante producción de semillas (Zhao y col., 2006). El aspecto de ramificación vegetativa es muy variable, por eso este carácter puede ser una fuente de variabilidad para separar tanto especies como géneros (Clayton y Renvoize, 1986). Los tallos son normalmente cilíndricos huecos internamente y sus nudos son duros o sólidos. A veces, en la base de cada internudo hay un meristemo que da lugar en algunos casos a un internudo sólido.

Cabe destacar el interés ecológico de esta familia como plantas colonizadoras de suelos alterados y deteriorados a los que protegen de la erosión. Así, las *Poaceae* constituyen el grupo vegetal por excelencia que actualmente se está utilizando para luchar contra la degradación de terrenos en vista de su capacidad de regeneración y su fácil implantación en suelos pobres y escasos, por formar una cubierta vegetal densa con un sistema radicular fuerte que fija el suelo.

1.2 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Brachypodium*

La taxonomía del género *Brachypodium* es muy compleja y está basada principalmente en caracteres morfológicos y eco-geográficos. La semejanza entre varias especies, la existencia de numerosos ecotipos y la gran variabilidad intra-poblacional de sus taxones, hacen difícil su identificación y clasificación.

La clasificación del género *Brachypodium* ha sido muy debatida desde el descubrimiento del grupo por Palisot de Beauvois en 1812 hasta la actualidad. Inicialmente se incluyeron 22 especies, pero posteriormente este número ha ido cambiando.

En diferentes revisiones, *Brachypodium* ha sido incluido dentro de varias tribus, junto a *Festuca*, *Poa* y *Bromus* en *Brachypodieae* (Bluff, Nees y Schauer, 1836; Harz, 1880) o *Bromeae*, junto a *Triticum*, *Secale*, *Elymus*, *Agropyron* y otros géneros en *Triticeae* (Dumortier, 1824), o aislada en *Brachypodieae* (Jacques-Felix, 1962). Para muchos autores *Brachypodium* comparte muchos caracteres con el género *Bromus*, como es el caso de la forma de la semilla, la ramificación vegetativa y el porte de la planta. Por otro lado, la morfología del grano de *Brachypodium* es muy parecida a las especies de la tribu *Triticeae*.

En revisiones más recientes, se subraya que el género *Brachypodium* contiene entre 12 y 20 especies distribuidas por todo el mundo. Takeota (1968), consideró que el género *Brachypodium* se diversificó en el terciario y que en la actualidad presenta una distribución muy amplia y considerablemente disjunta con un número de especies comprendido entre 14 y 18. Las últimas revisiones debidas a Khan (1984) y Schippmann (1991), proponen la existencia de 19 especies de las que la mayoría proceden de las zonas meridionales de Europa y Asia, muy extendidas por la cuenca mediterránea, una procede de las Islas Canarias, dos del Sur de África y dos del continente Americano.

Más recientemente, Watson y Dallwitz (1992), han citado dos subfamilias de la familia *Poaceae*: *Poodae* y *Triticodae*, la última engloba solamente las tribus *Triticeae* (28 géneros), *Bromeae* (2 géneros) y *Brachypodieae* (1 género), donde se enmarcaría el género *Brachypodium*. Esta clasificación es más objetiva dado que está basada en caracteres morfológicos, bioquímicos, citológicos y moleculares.

1.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS DEL GÉNERO *Brachypodium*

Una característica de las plantas del género *Brachypodium* es su aspecto cespitoso debido a que son plantas bajas, densas y muy frondosas. Garvin (2007), hizo un estudio de las etapas del desarrollo de una colección de especies de *Brachypodium* europeas y americanas e indicó que las plantas diploides tienen un porte erecto y son más pequeñas que las plantas poliploides, que se caracterizan por un porte postrado y muy denso.

La inflorescencia de casi todas las especies del género *Brachypodium* se caracteriza por una arquitectura sencilla en racimo; las espiguillas son individuales, pedunculadas y emergen de forma progresiva de la vaina; las espigas son poco densas con un crecimiento tal que las primeras espiguillas emergidas son las primeras que alcanzan la madurez. Se ha indicado que en las especies perennes de este género, el periodo de floración se extiende a lo largo de varias semanas e incluso varios meses. Sin embargo, hay poca diferencia en la época de floración en las especies diploides de *Brachypodium* (Khan y Stace, 1999). Generalmente, la antesis de las plantas ocurre en los días siguientes a la emergencia de las espiguillas de la hoja bandera y se extiende a lo largo de 4 días en la especie *B. distachyon* y hasta 3 o 4 semanas en el caso de las especies perennes: *B. sylvaticum*, *B. glaucovirens*, *B. pinnatum* o *B. phoenicoides*. Según Khan y Stace (1999), la antesis de todas las especies del género *Brachypodium* se produce por la mañana. En primer lugar, emerge un estigma acompañado con dos anteras, después, emerge un segundo estigma junto con la tercera antera. Todo este proceso finaliza en 30 minutos. Unos 30 minutos después de la emergencia de las espiguillas, se produce la dehiscencia de las anteras. En las especies europeas perennes, las flores son casmógamas caracterizadas por anteras cortas de menos de 3 mm de longitud mientras que, las especies americanas como *B. mexicanum* y las especies anuales europeas como *B. distachyon* son estrictamente cleistógamas con un escaso porcentaje de alogamia. La dehiscencia de las anteras ocurre antes de la apertura de la flor y el polen germina en la superficie de los estigmas jóvenes. Dos horas después de la antesis se produce la apertura de las flores (Khan y Stace, 1999).

Vogel y Bragg (2009), observaron que las formas diploides de *B. distachyon* son fundamentalmente autógamias, con una tasa muy baja de polinización cruzada. Este resultado se basa en el estudio del flujo de polen entre plantas transgénicas y no transgénicas en condiciones de invernadero, observándose que en una población de 1000 individuos no se registró ningún caso de fecundación cruzada. En un estudio, en una colección de formas diploides de *B. distachyon*, procedentes de Turquía, Vogel y col. (2009), observaron que en

condiciones de invernadero o cámaras de cultivo las flores no se abren. Por otra parte, observaron que cuando las plantas se cultivaban en ambiente húmedo se producía la apertura de un número mínimo de flores, por lo que concluyeron que *B. distachyon* es una especie autógama.

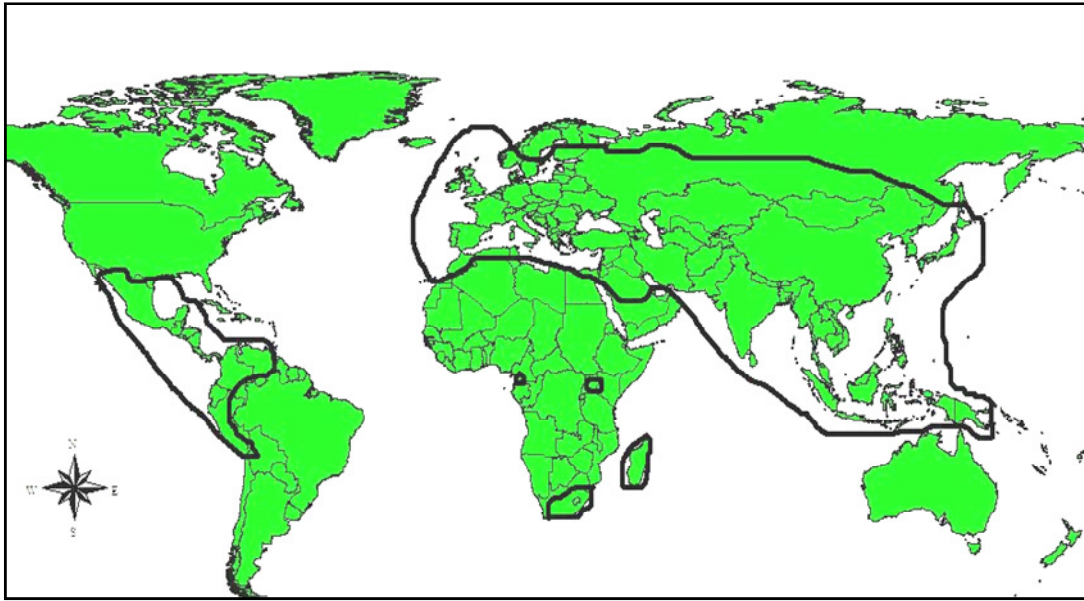
Filiz y col. (2009), en un detallado estudio de la morfología de las formas diploides de *B. distachyon*, cultivadas en condiciones de invernadero, señalan el interés de las siguientes características, que son las que presentan mayor diversidad: altura del tallo, porte de la planta, peso y la longitud del grano, tiempo transcurrido desde la siembra hasta la aparición del primer grano y la producción de granos por planta. Los autores confirmaron que en una muestra de 500 plantas hubo una gran diversidad genética en la altura del tallo principal (21 a 52 cm) y en la producción granos por planta (4 a 793 granos).

De acuerdo con Draper y col. (2001), las formas diploides tienen requerimientos de vernalización para alcanzar la floración. Según Vogel y Bragg (2009), las formas de *B. distachyon* recolectadas en climas fríos del norte de Turquía, requieren un periodo bastante largo de vernalización (entre 8 y 12 semanas) para inducir la floración. Sin embargo, las poblaciones recolectadas en climas cálidos y en particular aquellas procedentes de Iraq no son muy exigentes y el tratamiento con frío se puede reducir a 2 o 3 semanas. Recientemente Schwartz y col. (2010), han demostrado la existencia de un alto nivel de diversidad genética en los requerimientos de vernalización en diferentes formas de *B. distachyon* recolectadas en zonas geográficas distintas, que se clasificaría en formas de primavera, que necesitan días largos para florecer y de invierno, con floración más precoz en días más cortos.

1.4 DISTRIBUCIÓN Y HÁBITATS ECO GEOGRÁFICOS DEL GÉNERO

Brachypodium

Como se señaló anteriormente, las especies del género *Brachypodium* están ampliamente extendidas por Europa, Asia, África y América tanto en el norte como en el sur. En la Figura 1.1 se muestra el área de distribución mundial del género.



❖ *Figura 1. 1: Distribución geográfica del género Brachypodium (Tateoka, 1968)*

Algunas especies ocupan hábitats restringidos o constituyen endemismos muy localizados, mientras que otras se extienden por amplias zonas de varios continentes. Saint Yves (1934), estudió las especies del género que se encuentran en las zonas mediterráneas y propuso la existencia de 18 especies. En una revisión posterior, Tateoka (1968), propuso que más de la mitad de las especies tuvieron su origen en las zonas mediterráneas cálidas, a partir de las cuales se han extendido hacia el este de Asia y hacia las montañas tropicales de África. Según este trabajo, el género estaría repartido de la siguiente manera:

♣ *En Europa y zonas mediterráneas*

B. sylvaticum y *B. pinnatum*, muy extendidas por Europa y Noroeste de África; *B. distachyon*, *B. phoenicoids* y *B. ramosum*, abundantes en el Noroeste de África y en el sur de Europa. Además, se destacan dos especies endémicas: *B. boissieri* situada en Sierra Nevada (España) y *B. serpentini* que coloniza exclusivamente las tierras de Albania. En las regiones mediterráneas se encuentran también dos especies endémicas, *B. rupestre* y *B. caespitosum*, que actualmente se consideran la misma especie.

♣ *En Asia*

B. pinnatum, *B. sylvaticum* y *B. distachyon*, la última de las cuales está muy adaptada al clima mediterráneo habiéndose extendido hacia el Noroeste de India. Del mismo modo, *B. sylvaticum* que tiene como origen el territorio europeo se propaga hasta el Japón, las montañas de Ceylan y Malasia. Algunas variedades de *B. sylvaticum* eran conocidas como las variedades ‘Gracile’ y ‘Keng’ procedentes de China, se consideran originales de Asia.

♣ En el sur de África

B. flerum coloniza las montañas de Camerún y *B. bolusii* es exclusiva del sur de África. Cabe destacar que todas las especies Africanas son morfológicamente muy similares entre sí y muy parecidas a las especies asiáticas.

♣ En América

Según el estudio de Tateoka (1968), *B. mexicanum* y *B. pringlei* son abundantes en el continente Americano y se localizan, principalmente, en las montañas de México, en Venezuela, en Bolivia y en las montañas del centro de América. Esas especies eran claramente distintas en su morfología de las demás teniendo hojas lineales y ciclos biológicos perennes.

Además de las especies mencionadas, hay otras que aparecen geográficamente aisladas: *B. sanctum* que se encuentra en las montañas de Grecia y Bulgaria, *B. arbuscula* localizada en las Islas Canarias y *B. longisetum* que se haya en Nueva Guinea.

1.5 CITOLOGÍA DEL GENERO *Brachypodium*

El género *Brachypodium* está muy relacionado con los géneros *Bromus*, *Agropyron* y *Festuca*, con los que comparte muchos caracteres morfológicos y citológicos. Sin embargo, las especies que constituyen el género *Brachypodium* tienen unos cromosomas relativamente pequeños en comparación con los habituales de las Gramíneas, y también presentan un menor rango de variación en los niveles de ploidía. El número básico más bajo de cromosomas de las especies de *Brachypodium* es de $n = 5$. Robertson (1981), determinó el número de cromosomas de una colección de especies Europeas de *Brachypodium* y señaló que poseen formas que sugieren series poliploides. Así, en *B. distachyon* de $2n=10, 20$ y 30 , y *B. sylvaticum*, $2n = 28, 42$ y 56 . En estas especies no se aprecian diferencias morfológicas entre las plantas de diferente número de cromosomas por lo que la única forma de distinguirlas es mediante estudio cariológico.

Según Kozuharov y col. (1974), las especies *B. distachyon*, *B. glaucovirens*, *B. pinnatum* y tienen como números de cromosomas $2n=10, 28$ y 14 y, respectivamente. Mehra y col. (1968), han citado una amplia variación en el número de cromosomas de especies de *Brachypodium* del Norte de la India ($n=7, 9$ y 21). Las especies con números cromosómicos de $n=7$ y 21 se distinguen del resto por una inflorescencia en panículo muy particular que no es característica del género *Bracyhypodium*. Además, sus cromosomas son morfológicamente

distintos de los observados en restantes especies del género y más parecidos a los del trigo. En cuanto a las especies *B. distachyon*, las formas de $2n = 10$ y $2n = 30$, son las más frecuentes en el territorio Europeo, lo que coincide con el informe de Talavera (1978), que mencionó la escasez de la forma tetraploide ($2n = 20$) en esas zonas.

Se considera que la especie *B. phoenicoides* está muy relacionada con *B. pinnatum* cuyo número de cromosomas es igual a $2n=14$. St. Yves (1934), distinguió entre las dos especies por la anatomía epidérmica de la hoja bandera. En general, en climas mediterráneos secos es muy difícil distinguir entre las especies basándose en caracteres morfológicos dado que los fenómenos de aclimatación y de adaptación de las especies a dichas condiciones afectan mucho la morfología de la planta.

Según Tateoka (1968), la adaptación de algunas especies de *Brachypodium* de un origen geográfico a otro ha venido acompañada por una variación del número de cromosomas. De este modo, el número de cromosomas de *B. sylvaticum* es de $2n=28$ en sus hábitats asiáticos y $2n=14$ en la región mediterránea. *B. retusum* se caracteriza por unos números de cromosomas $2n=18$ y $2n=36$, lo que podría ser indicativo de una autoploidía de la segunda respecto a la primera de estas formas (Larsen, 1963). Natarjan (1878), encontró en Francia formas con *B. retusum* que se habrían originado por un retro-cruzamiento entre formas diploides y tetraploides.

Cabe destacar que *B. boissieri* tiene un número de cromosomas $n=9$ pero comparte muchos caracteres con *B. retusum* y se pueden distinguir a través de la morfología de la hoja. La especie *B. arbuscula* endémica de las Islas Canarias tiene un número de cromosomas $2n=18$.

La dispersión de los números cromosómicos y la aparente participación de fenómenos de ploidía en el género han suscitado un cierto debate sobre el origen de los distintos citotipos del género *Brachypodium*, que requieren una clasificación.

Draper y col. (2001), fue el primero en describir los cromosomas de varios ecotipos de *B. distachyon*. Los ecotipos ABR1 y ABR2, ampliamente utilizados en estudios genómicos, muestran un número de cromosoma de $2n=10$. Este autor ha concluido que todos los ecotipos poseen unos cariotipos morfológicamente similares compuestos por cinco cromosomas de tamaño diferente y con un mismo tamaño del genoma (175 Mbp). La clasificación de los cinco cromosomas del cariotipo se basó en la longitud del brazo corto de cada uno de acuerdo con las normas convencionales. El primer cromosoma es de mayor tamaño y es

submetacéntrico. El segundo, es submetacéntrico, más pequeño, y con un brazo corto del mismo tamaño que los brazos del cromosoma 3, que es el único cromosoma metacéntrico. El cromosoma 4 es muy parecido al 3 pero un poco más corto. Finalmente, el cromosoma cinco es submetacéntrico pero de menor tamaño que el resto.

Hasterok y col. (2006 a y b), describieron por primera vez la cito-taxonomía de varios ecotipos de *B. distachyon*, con diferente número de cromosomas y presuntamente diferentes niveles de ploidía. En principio, los autores concluyeron que la evolución de la especie ocurrió mediante una duplicación simple del número de cromosomas. Sin embargo, más adelante y con el uso de las técnicas de hibridación *in situ* (FISH) se descubrió la complejidad de su origen evolutivo. Este trabajo demuestra básicamente que las especies diploides de *B. distachyon* comparten el mismo cariotipo ($2n=10$) descrito por Draper y col. (2001), mientras que las de 20 cromosomas serían auto-tetraploides. Posteriormente, tras la aplicación de una serie de análisis moleculares y citogenéticos en la línea ABR114 ($2n=20$) se constató que esta población podría ser una forma diploide cuya composición de genoma es muy parecida al de *B. sylvaticum*. Sin embargo, al examinar la morfología de las dos especies se veían distintas en tamaño, porte, tipo de floración, etc. Además, *Brachypodium sylvaticum* es una especie perenne y las diferencias con *B. distachyon* son incompatibles con la idea de su equiparación a las formas de $2n=20$ de esta especie.

Los mismos autores propusieron que el ecotipo ABR113 es una forma alotetraploide resultante de la hibridación natural y duplicación cromosómica posterior de dos progenitores diploides, con cariotipos de $2n=10$ y $2n=20$. La confirmación de esta hipótesis fue posible mediante la aplicación de la técnica de FISH, que permitió la identificación de 5 cromosomas grandes y 10 pequeños en el cariotipo de las formas de $n=15$ (Hasterok y col., 2006 a y b).

Dada la variación de números cromosómicos y el interés de las plantas de *Brachypodium distachyon* parece importante estudiar la situación de las poblaciones silvestres de esta especie en lo que concierne al número de cromosomas y el carácter diploide o poliploide de las mismas en la Península Ibérica, así como su relación con la diversidad genética y los factores eco-geográficos que determinan su distribución geográfica.

1.6 *Brachypodium distachyon*: COMO ESPECIE MODELO GENÓMICO

Una especie vegetal modelo debe tener un conjunto de características que faciliten el estudio de otras más complejas, más o menos próximas, basándose en la sintenia, la colinealidad y la semejanza entre sus genomas. Por lo tanto, la utilidad de una especie vegetal modelo depende de sus características biológicas, físicas y morfológicas, que se resumen en:

- ♣ ciclo de vida corto (4 a 6 meses), lo que permitiría obtener más de una generación en un año,
- ♣ sistema de reproducción autógamo, lo que facilitaría la producción de líneas puras y un mejor seguimiento en campo bajo condiciones adecuadas de floración.
- ♣ porte pequeño, lo que permitiría disponer del mayor número de ejemplares en espacios reducidos (invernadero, cámaras) y sistemas más sencillos de riego y cuidados durante su crecimiento.
- ♣ facilidad de identificación en las diferentes etapas del desarrollo biológico de la planta (el espigado, la antesis, la maduración...).

En los últimos años han surgido algunas especies que se han utilizado como modelo para estudios de organización genómica estructural y funcional de especies cultivadas más complejas y de gran importancia económica. Son los casos del arroz *Oryza sativa* y la pequeña crucífera *Arabidopsis thaliana*, cuyos genomas han sido ya secuenciados y cuyo análisis está permitiendo importantes avances en el conocimiento de la función y regulación de numerosos genes.

Además, una especie modelo debe manifestar una buena respuesta a diferentes técnicas de mejora convencional y biotecnológica. Además, los estudios hechos en el laboratorio deben estar correlacionados con la respuesta en campo, es decir que es deseable que la interacción 'genotipo-ambiente' sea baja.

Arabidopsis tiene todas las características de una planta modelo muy útil. Es de tamaño muy pequeño, crece rápidamente y no es exigente en vernalización, su ciclo biológico es relativamente corto (alcanza el estadio de madurez fisiológica en 6 semanas), se caracteriza por un genoma diploide muy pequeño (7 parejas de cromosomas que contienen 120,5 Mb de ADN), se autofecunda fácilmente y además presenta una buena respuesta a la transformación genética. Sin embargo, se trata de una dicotiledónea lo que dificulta la identificación de genes

ortólogos entre esta especie y los cereales. Debido a ello, se ha tratado de buscar otras especies más próximas a los cereales.

La propuesta del arroz como modelo se justifica por tratarse de un cereal de interés económico, que es además la principal fuente de alimentación en amplias regiones del mundo. Esta planta se caracteriza por su tamaño pequeño, ciclo corto, modo de reproducción autógena y la posesión de un genoma diploide muy pequeño (12 parejas de cromosomas que se reparten los 450 Mb de ADN). Sin embargo, tiene otras características no tan favorables, por tratarse de una planta tropical, lo que dificulta su uso como modelo de cultivo de la mayoría de los cereales.

Draper y col. (2001), propusieron *B. distachyon* como nueva planta modelo para estudiar el genoma funcional en la familia de *Poaceae*, por su mayor proximidad a los cereales de invierno que *Arabidopsis thaliana* u *Oryza sativa*. El mismo autor ha desarrollado diversos estudios sobre la morfología de la planta, y sus posibilidades de cultivo *in vitro* y transformación genética. Bahar y col. (2008), repitieron el mismo estudio haciendo una revisión detallada de todos los trabajos hechos sobre esta planta basándose en las ventajas de *Brachypodium* como planta muy próxima a los trigos y a la cebada que son la base de la alimentación humana. La especie *B. distachyon* tiene el mismo orden de genes que las especies de *Triticeae*, pero un tamaño de genoma algo menor que el del arroz. Además posee poco ADN repetitivo, lo que podría facilitar los estudios moleculares y genéticos que se desearan extrapolar a especies con genomas más complejos, como puede ser el trigo, que tiene un genoma de unas 15.000 Mb de ADN.

1.7 *B. distachyon* UN PUENTE ENTRE EL ARROZ Y LA TRIBU *Triticeae*

Bossolini y col. (2007), analizó 371 Kb del genoma de *Brachypodium sylvaticum* y comparó las secuencias ortólogas con el arroz y el trigo. Las conclusiones obtenidas del trabajo indican una gran conservación y macro-colinearidad entre las tres especies. Sin embargo, hay una menor micro-colinearidad y conservación como consecuencia de la abundancia de inversiones que caracterizaban el genoma del arroz. *Brachypodium* aparece más relacionada con los trigos pudiéndose identificar fácilmente genes parálogos entre las dos especies. En el mismo estudio, se analizaron detalladamente 47 genes de arroz y sus homólogos en *Brachypodium*, llegándose a la conclusión de que el nivel de conservación de ciertas secuencias codificantes en ambos genomas es muy alto. Solamente cuatro de los 47 genes estudiados del arroz no están

conservados en *Brachypodium*. En el resto de los casos, los genes codifican proteínas iguales en estructura y en longitud de secuencia a las identificadas en el genoma de *Oryza sativa*.

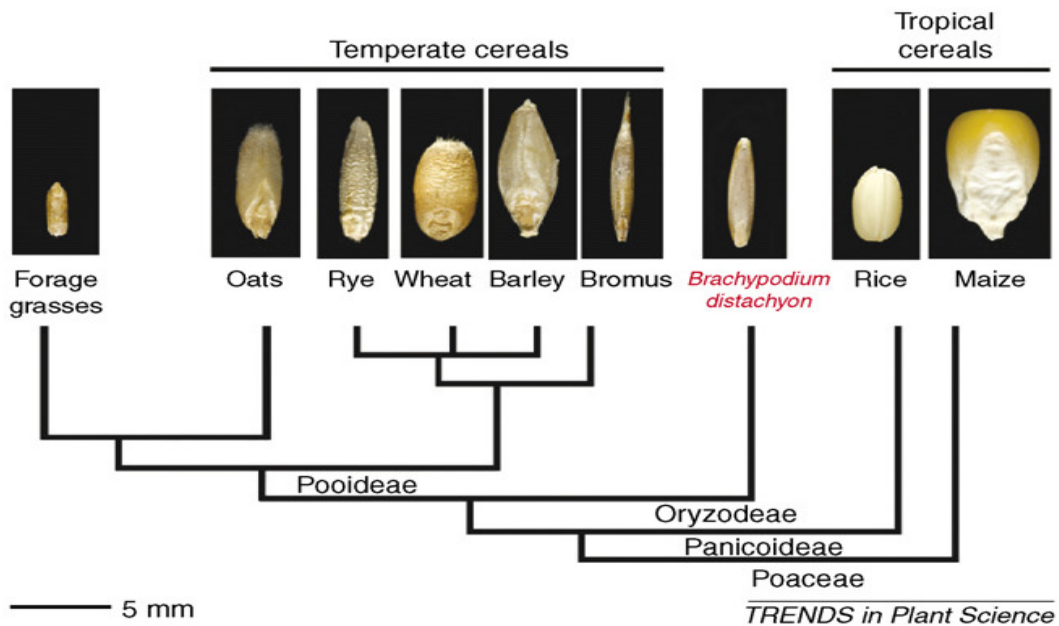
La secuenciación de 371 Kb de ADN del genoma de *B. sylvaticum* ha permitido determinar que esta especie posee una densidad de genes muy parecida a la que presenta el arroz (un gen cada 6 Kb). Según este trabajo es posible que el resto del genoma no secuenciado abarque una gran proporción de ADN repetitivo con un gen cada 20 Kb (Bossolini y col., 2007). Esta frecuencia sería similar a la que presenta el genoma de las *Triticeae* (Wicker y col., 2001; San Miguel y col., 2002). También se ha observado una colinearidad perfecta entre diferentes marcadores moleculares del arroz y *Brachypodium*. En base a las inversiones detectadas entre arroz y *Brachypodium*, este último estaría más relacionado con especies de la tribu *Triticeae*. (Griffiths y col., 2006; Hasterok y col., 2006).

Según Kellogg (2001), *Brachypodium* y *Oryza sativa* divergieron hace 50 millones de años. Ambos tienen un genoma compacto y representan diversos linajes en la trayectoria evolutiva de las especies de gramíneas.

Kumar y col. (2009), realizaron un análisis comparativo de 3.818 secuencias EST de *Brachypodium* (ESTb) y 3.792 EST de trigo duro (ESTw) observando que 449 ESTb tienen secuencias ortólogas en 1.154 ESTw. Además, 743 ESTb eran también ortólogas de secuencias específicas del genoma del arroz, distribuidas en el conjunto de sus 12 cromosomas. De igual manera 183 ESTb tienen secuencias ortólogas tanto en el genoma del trigo como del arroz. Los mismos autores han identificado 17 SSRs conservados en las tres especies (*Brachypodium*, trigo y arroz).

Recientemente, Opanowicz y col. (2011), han realizado un detallado estudio sobre el desarrollo del endospermo de los granos de *B. distachyon* demostrando que se puede distinguir la capa de aleurona del resto de las capas que forman la semilla, como es el caso de la mayoría de los trigos, lo que sugiere que esta característica podría ser específica de ciertas subfamilias de la familia de *Triticeae*. Otras características del endospermo central de las semillas de *Brachypodium*, la epidermis nucelar y la composición de las membranas celulares son más parecidas a las de la cebada y la avena que a las del trigo. Por lo tanto, aunque el desarrollo del endospermo es muy similar al de los cereales de climas templados se aprecia la existencia de diferencias significativas que pueden reflejar una posición filogenética intermedia entre la tribu de *Triticeae* y el arroz.

La Figura 1.2, publicada por Opanowicz y col. (2008), muestra que las semillas de cereales de climas templados (avena, centeno, trigo, cebada y *Bromus*) son largas y se distinguen perfectamente de las del maíz y arroz, más grandes y redondeadas, que cuentan además con un contenido bastante alto en proteínas y almidón. *B. distachyon* se sitúa en una posición intermedia entre los cereales de climas templados y los climas tropicales.



❖ *Figura 1. 2: Relaciones filogenéticas entre B. distachyon y los cereales de mayor importancia económica (Opanowicz y col., 2008).*

1.8 LA COMPOSICIÓN DEL GENOMA DE *B. distachyon*

La inclusión de *B. distachyon* en la lista de especies modelo para el análisis genómico en plantas superiores es muy reciente y aún no se dispone de mucha información acerca de la composición y la caracterización de su genoma. Naxin y col. (2008), han mencionado que la especie *B. distachyon* tiene uno de los genomas más pequeños de las especies vegetales superiores (~350 Mb y 0,25 a 0.30 pg de ADN por cromosoma) con tan solo un 18,3% de ADN repetitivo del que el 11% es compartido con otras especies de cereales y el 7,3% restante, específico de *B. distachyon*. Con anterioridad, Catalán y col. (1995), habían estimado en un 15% la proporción de ADN repetitivo en *Brachypodium*. De este modo, la cantidad de ADN repetitivo en *Brachypodium* es intermedia entre la que posee *Arabidopsis thaliana* (10%) y el arroz *Oryza sativa* (35%). El ADN repetitivo de *B. distachyon* es inferior al de *B. sylvaticum*, que de acuerdo con el trabajo ya citado de Bossolini y col. (2007) posee un 29% de ADN

repetitivo. La mayor proporción de secuencias repetidas estaría correlacionada con el mayor tamaño del genoma de *B. sylvaticum* que alcanza las 470 Mb de ADN. Ese resultado, apoya la correlación directa entre el tamaño del genoma y la abundancia de secuencias repetitivas señalado por otros autores (Bennett y Leitch, 2005; Vogel y col., 2006 a)

Naxin y col. (2008), analizaron el 10,9% del genoma de *Brachypodium* basándose en el análisis de las secuencias terminales (BES) de los clones de 64.696 cromosomas artificiales de bacterias (BAC). Estas secuencias terminales representan una muestra del genoma que permite estimar el espacio íntergénico, el tamaño del genoma (Hong y col., 2006), la distribución de los secuencias repetitivas e incluso los elementos transponibles (TE) y microsatélites (SSR) que posee la especie de que se trate. El estudio del ADN repetitivo contenido en las secuencias BES de *Brachypodium* indicó que aproximadamente el 11% del genoma está constituido por secuencias repetidas y que la mayoría de los elementos repetitivos son LTR de retrotransposones. En otras especies de gramíneas de mayor tamaño de genoma, como el trigo y la cebada, son más comunes los retrotransposones tipo *Bare-1*.

De acuerdo con Kalendar y Schulman (2006), y Bahar y col. (2008), que han investigado la presencia, diversidad y distribución de las clases principales de elementos transponibles presentes en el genoma de *B. distachyon*, a diferencia de la elevada frecuencia de los retrotransposones en los cereales de gran tamaño de genoma, esa frecuencia es muy reducida en el compacto genoma de *B. distachyon*, tanto en las zonas inter- como intragénicas.

Según Vitte y Bennetzen (2006), los elementos transponibles juegan un papel muy importante en la dinámica evolutiva de los genomas, ya que estos elementos pueden activar o reprimir la expresión de genes, conduciendo en algunos casos a la producción de proteínas truncadas o al silenciamiento total de genes.

Tras un estudio comparativo del genoma de *Brachypodium* y del arroz se ha estimado que aproximadamente el 15% de las secuencias analizadas en *Brachypodium* no codifican proteínas (Bossolini y col., 2007). En una revisión de Ye Xing y Tao (2008), se ha estimado un número próximo a 35.000 genes en el genoma de *Brachypodium* con una elevada densidad de 1 gen cada 8 a 10 kb.

1.9 USO ECOLÓGICO DEL GÉNERO *Brachypodium*

La erosión del suelo es el problema medioambiental más grave que presenta la agricultura española. En España hay muchos factores que agudizan el problema como son: el clima de tipo mediterráneo, con la alternancia de períodos de gran sequía y de fuertes lluvias, cuya intensidad excede a la velocidad de infiltración, especialmente en zonas de suelos arcillosos y en pendiente. Otros problemas los constituye la escasa cobertura del suelo por la labranza y el manejo inadecuado de las prácticas de cultivo. De este modo, por ejemplo en determinadas zonas de la provincia de Córdoba, las pérdidas de suelo en los últimos años son superiores a 80 Tm/Ha (Soler y col., 2004).

Ante esta situación Castro y Pastor (1994, 1996), han demostrado que la forma más eficaz para luchar contra la erosión es la utilización de «cubiertas vegetales vivas», ya que las plantas sujetan el terreno con su entramado de raíces, amortiguan el golpeteo de la lluvia en el suelo con sus hojas y mejoran la infiltración del agua, impidiendo que se pierda por escorrentía. Además, mejoran las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y amortiguan la acción erosiva del viento y los contrastes de temperaturas.

Por todo ello, la implantación de vegetación a ser posible autóctona, en terrenos degradados debe ser prioritaria y rápida. Soler y col. (2004), propusieron la utilización de «cubiertas vegetales de gramíneas espontáneas» como plantas para combatir los factores erosivos en los suelos de cultivos leñosos, señalando entre ellas la especie *B. distachyon* para proteger las zonas abrigadas, las vertientes meridionales, y los suelos pobres, calizos y ácidos. Esta especie tiene muchas propiedades interesantes como son la amplia cobertura del suelo a partir del segundo año de plantación, baja exigencia en agua y abono, la aportación de muchos residuos protectores del suelo durante el verano y el control de las malas hierbas. Algunos trabajos han mencionado que se puede mezclar especies del género *Brachypodium* con semillas de *Lolium multiflorum* y *Medicago sativa* para hacer unas cubiertas más densas.

En este sentido San Miguel (2008), cita cuatro especies de *Brachypodium* entre las vivaces espontáneas de los pastos naturales españoles de interés en revegetación, caracterizadas por poseer semillas de tamaño pequeño, rendimientos aceptables aunque de mediocre calidad por su dureza y sus altos contenidos en fibra. Debido al tamaño de sus semillas, *B. distachyon* se implanta con facilidad y, a pesar de su comportamiento de herbácea vivaz y su condición de caméfitos, resisten razonablemente bien al pastoreo. *B. retusum* es más resistente a la sequía y puede ofrecer más interés para zonas secas y semiáridas. Algunas casas comerciales han

empezado a recolectar semilla de esta especie para restauración de taludes y minas a cielo abierto. Del mismo modo, *B. phoenicoides* también característica de climas mediterráneos o de transición, aunque generalmente ligada a zonas con frío moderado y estacional, puede ser interesante para revegetación de terrenos degradados en zonas con precipitaciones algo más elevadas que las correspondientes a *B. retusum*. Finalmente, *B. pinnatum* es relativamente similar a la anterior, aunque más productiva y de mayor calidad nutritiva. Sin embargo, es más exigente en humedad, y tolera sólo sequías de pequeña intensidad. De forma natural se sitúa en el entorno de bosques caducifolios.

De acuerdo con lo indicado y dado el interés aplicado que tienen las formas de *B. distachyon* para la obtención de líneas útiles para la protección de suelos dedicados a diversos cultivos en España, es importante conocer el material vegetal y en particular la diversidad de tipos cromosómicos y genéticos que ofrecen las poblaciones autóctonas de esta especie.

1.10 RECURSOS GENÉTICOS

La conservación y la utilización de los recursos genéticos es de importancia estratégica para la humanidad y trata de paliar la pérdida de diversidad genética o “erosión genética”, que presentan numerosas especies cultivadas y silvestres, como consecuencia de los cambios agrícolas y sociales orientados a obtener variedades de gran producción y al aumento de las áreas de cultivo.

Desde el inicio de la agricultura, las especies vegetales cultivadas han estado sometidas a una interacción muy activa con el medio ambiente, lo cual ha generado un gran número de genotipos adaptados a diferentes condiciones locales ampliando la diversidad genética. Sin embargo, en las últimas décadas esta diversidad genética se ha visto seriamente reducida por las exigencias del mercado y la sobreexplotación de los suelos cultivados, especialmente destinados a un número cada vez más reducido de variedades seleccionadas. Ante esta situación, uno de los desafíos actuales es buscar la manera de incentivar la conservación y el uso racional de los recursos genéticos, incluyendo las especies silvestres. Resulta importante la recolección de germoplasma en los límites de la distribución geográfica de las especies vegetales. Con el fin de evaluar la variación genética y su aplicación para diversos fines de mejora y biotecnología, Consuelo Soler y sus colaboradores, han recolectado numerosas muestras y han creado una colección de poblaciones naturales de gramíneas silvestres fruto de múltiples expediciones por la España peninsular y los archipiélagos balear y canario desde finales de los años ochenta. En esta colección se incluyen cientos de poblaciones de los géneros

Aegilops, *Brachypodium*, *Elymus*, *Elytrigia*, *Festuca*, *Hordeum*, *Thynopyrum* y otros (Jouve y Soler, 2010).

El interés que ha despertado el género *Brachypodium*, ha determinado la búsqueda y conservación de los recursos genéticos de las especies de éste género (Garvin y col., 2008). De este modo, se han creado varias colecciones de germoplasma, como la conservada en el National Plant Germplasm System, dependiente del USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos), que cuenta con unas 30 entradas de *Brachypodium* con sus datos de pasaporte en una base pública de datos (<http://www.ars-grin.gov/npgs/>). Se ha utilizado la técnica de citometría de flujo para conocer el número de cromosomas de las entradas almacenadas en el NPGS. Esta colección mantiene tan solo 14 líneas europeas de $2n=10$, lo que es claramente insuficiente respecto a la variabilidad genética de este género en dicho continente. Las diferentes entradas han mostrado diferencias significativas en cinco caracteres morfológicos: la fecha de la antesis, la altura de la planta, el aspecto de la hoja bandera, el tamaño del grano y los requisitos en vernalización.

Otra colección de importancia es la mantenida en la Universidad británica de Aberystwyth (<http://www.aber.ac.uk//plantpathol/germplasm.htm>), en la que los diferentes ecotipos de *Brachypodium* han sido identificados por el prefijo “ABR” y en la que cada entrada se indica el número de cromosomas y sitio de recolección. El Missouri Botanical Garden (Saint Louis, Missouri) y el Jepson Herbarium (Universidad de Berkeley, California) son probablemente los organismos mundiales que mantienen un mayor número de colecciones de *Brachypodium* nativas de Norte de América.

A estas colecciones públicas se unen algunas privadas. De este modo, la compañía Brachyomics Ltd., fundada por la Universidad de Wales, cuenta con una colección de cincuenta entradas de *B. distachyon*, de las que al menos 10 tienen $2n=10$ cromosomas.

Generalmente, en los bancos de germoplasma las líneas almacenadas deberían ser homogéneas y homocigotas para responder a las normas establecidas. De acuerdo con Brown y col. (1978), *Brachypodium* es de reproducción autógama y por tanto con tendencia a la homogeneidad debida a la autofecundación. Sin embargo, las entradas recolectadas y conservadas en las diferentes colecciones mencionadas han mostrado diferentes grados de diversidad genética. Ante esa situación en algunos de estos centros se está utilizando el método tradicional de mejora para obtener líneas puras, denominado “single seed descent” (SSD) (Vogel y col., 2006 a; Garvin, 2007). De este modo, a partir de la colección del National Plant Germplasm System se han desarrollado 28 líneas mediante SSD, que han sido denominadas

con el prefijo “Bd”. Para las especies modelo es muy deseable tener un número considerable de colecciones diversas cuyos ecotipos representen lo mejor posible la variación fenotípica y molecular. La variabilidad genética es muy importante para desarrollar tanto programas de mejora como para estudios genéticos más básicos. Garvin y col. (2008), han propuesto el desarrollo de muchas líneas puras por autofecundación a partir de cada entrada para aumentar la variabilidad disponible para los diferentes usos que se deseen de las especies del género *Brachypodium*.

1.11 PROTEÍNAS DE RESERVA DEL ENDOSPERMO DE SEMILLAS DE CEREALES

El endospermo de los cereales es el principal componente de la semilla ya que representa aproximadamente entre el 80-90% de su peso seco. Almidón y proteínas son las dos macromoléculas más importantes del endospermo. Entre los cereales cultivados, el contenido de proteína varía según la especie y el modo de cultivo. Los valores más altos se dan en trigo y avena (10-17%) y los más bajos en maíz y arroz (6%). La concentración de proteínas en los cereales es apreciablemente menor que en las leguminosas ya que en éstas los órganos de reserva o cotiledones son capaces de almacenar hasta un 40% de su peso seco en proteínas.

Las proteínas del endospermo fueron estudiadas desde comienzos del siglo pasado por Osborne (1924), quién estableció los fundamentos de las clasificaciones actuales. Se distinguen cuatro tipos en base a la solubilidad relativa de las proteínas en diferentes solventes: Albúminas, solubles en agua; globulinas, en solución salina; prolaminas, en alcohol; y gluteninas, en soluciones ácidas o alcalinas. En la mayoría de los cereales las prolaminas y gluteninas están codificadas por varios genes relacionados conformando familias génicas. Durante la evolución de estos genes se han detectado duplicaciones, translocaciones, inserciones de elementos móviles, además de reordenaciones cromosómicas.

La calidad industrial de los cereales como es el caso del trigo, está determinada por la cantidad y la composición de las proteínas del gluten. El gluten es una mezcla compleja de proteínas clasificadas en dos grupos principales conocidos como gluteninas y gliadinas. La semejanza entre estas proteínas sugiere que evolutivamente se han originado por duplicación génica y posterior divergencia a partir de genes ancestrales (Shewry y col., 1995). Estas proteínas difieren notablemente en su estructura y propiedades, de forma que las gluteninas se asocian con la elasticidad del gluten y las gliadinas con su plasticidad (Shewry y col., 1999). Las gluteninas están constituidas por largas cadenas de polipéptidos (subunidades) unidas por

puentes disulfuro. Estas subunidades se clasifican según su movilidad en electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en gluteninas de alto peso y bajo peso molecular (HMW-Gs y LMW-Gs, respectivamente) (Payne, 1987). Las gliadinas exhiben la mayor diversidad alélica y se las clasifica en cuatro grupos (α , β , γ , δ) según su movilidad en electroforesis ácida (A-PAGE) (Benmoussa y col., 2000).

Existen diversos métodos analíticos para el estudio de las proteínas de reserva tales como: electroforesis, cromatografía y análisis de aminoácidos. A su vez, la electroforesis se puede llevar a cabo en geles de almidón de una dimensión o en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia o no de SDS (Dodecil Sulfato Sódico) y también se pueden hacer electroforesis bidimensional en este mismo tipo de gel.

La técnica más empleada en estudios de diversidad ha sido la electroforesis vertical en geles poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) por presentar una buena resolución de las proteínas y una escasa complicación técnica.

El uso de las proteínas de reserva en estudios de sistemática y diversidad genética se basa en la variabilidad de los genes que codifican para estas proteínas, que se manifiesta tanto a nivel de especie como de poblaciones e individuos.

El número de genes que controlan estas proteínas es reducido y varía según la especie (Gepts, 1990). Diversos estudios genéticos han demostrado que los patrones de bandas de las proteínas de reserva se heredan como características discretas y de forma codominante, observándose en algunos casos un efecto materno (Leonard y col., 1988) con una baja influencia ambiental, aunque se han encontrado algunas excepciones (Gayler y Sykes, 1985). Este tipo de análisis, es incluso más sencillo e informativo que el de las isoenzimas, tienen un gran interés para el conocimiento de la diversidad genética de las poblaciones silvestres (Soler y col., 1993, 1997; Jouve y Soler, 2010).

El polimorfismo de las proteínas de reserva de las semillas ha sido utilizado para identificar y distinguir genotipos cultivados y afines silvestres en numerosas especies, tales como: judías (*Phaseolus vulgaris*) (Gepts y Bliss, 1986), trigo (Meachman y col., 1978; Nieto Taladriz y col., 1997, 1998, 2000; Nieto López y col., 2003), cebada (*Hordeum vulgare*) (Nevo y col., 1983; Bernardo y col., 1996; De Bustos, 1999), y maíz (*Zea mays*) (Wilson, 1985). En algunas especies, como es el caso de las judías, esta técnica fue tan eficaz que mediante el estudio de un locus fue posible determinar por primera vez la organización de la diversidad genética de la especie (Gepts y Bliss, 1985), situación que ha sido comprobada más tarde con el

uso de isoenzimas y Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) (Becerra y Gepts, 1994).

Las proteínas de endospermo son igualmente una buena fuente de información para conocer la diversidad existente en colecciones de germoplasma de formas primitivas y poblaciones de gramíneas silvestres (Rodríguez de Quijano y col. 1997, 1998, 2001; Ruiz y col., 2002; Aguiriano y col., 2006)

Respecto al género *Brachypodium*, son muy pocos los estudios realizados sobre proteínas de reserva hasta el momento, en parte debido a las dificultades que plantea el pequeño tamaño de sus semillas y las deficiencias de material adecuado. Los estudios realizados hasta el momento han versado especialmente en el estudio de las proteínas con el fin de clarificar las relaciones filogenéticas entre las distintas especies del género (Khan y col., 1992). En este sentido, Khan y col. (1992), han tratado de estimar la afinidad existente entre ocho especies, (*B. sylvaticum*, *B. glaucovirens*, *B. pinnatum*, *B. rupestre*, *B. phoenicoides*, *B. retusum*, *B. mexicanum* y *B. distachyon*), aplicando para ello un índice de semejanza descrito por Sokal y Sneath (1963), basado en la identificación de las bandas comunes en los perfiles electroforéticos de las proteínas de todas ellas. Entre las principales conclusiones se destaca la proximidad de las especies europeas entre sí (*B. sylvaticum*, *B. glaucovirens*, *B. pinnatum*, *B. rupestre*, *B. phoenicoides* y *B. retusum*), así como entre de las dos especies perennes (*B. sylvaticum* y *B. glaucovirens*). Se señala también la elevada afinidad entre *B. distachyon* y *B. mexicanum*, de hábitats muy distantes. La especie *B. distachyon* tuvo un índice de afinidad muy variable con el resto de las especies, yendo desde un 68,3% con *B. sylvaticum* hasta 85,7% con *B. mexicanum*.

Debbie y col. (2008), llevaron a cabo un análisis de las proteínas del endospermo de una forma de *Brachypodium* (Bd-21) de $2n=10$ cromosomas mediante SDS-PAGE y espectrometría total. Observaron 7 proteínas cuyo peso molecular osciló entre 20 y 57 kDa. De entre las proteínas, las dos de mayor peso molecular presentaban una gran homología en su secuencia peptídica. Tras la correspondiente búsqueda en las bases de datos se demostró que estas secuencias coinciden parcialmente con la *Globulina-1 (Glb1)* del maíz. *Glb1* codifica una globulina 7S, que forma la mayor parte de proteínas almacenadas en el embrión y en la capa de aleuronas de los granos del maíz (Kriz y Schwartz, 1986; Belanger y Kriz, 1989) y está codificada por un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (Schwartz, 1979). Del resto de las proteínas de *B. distachyon*, las denominadas 3 y 5 son similares a la globulina 12S del endospermo de las semillas de avena (Brinegar y Peterson, 1982; Chesnut y col., 1989). Otra

de las proteínas genera dos tipos diferentes de péptido cuyas secuencias se han identificado en el arroz aunque la proteína codificada es desconocida. Las dos restantes muestran semejanzas con glutelinas del arroz (Yamagata y col., 1982; Higuchi y Fukazawa, 1987; Okita y col., 1989). En otro análisis, se han identificado las proteínas de reserva en otras tres líneas de $2n=30$ cromosomas de *B. distachyon*, demostrando su afinidad con globulinas de maíz y avena (Vogel y col., 2006; Debbie y col., 2008). Los estudios de las secuencias a partir de clones de ADNc y el análisis de las mismas utilizando una base de datos “GenBank” (TBLASTN, Altschul y col., 1990), ha permitido confirmar la naturaleza bioquímica de las proteínas del endospermo relacionada con las globulinas del maíz (Debbie y col., 2008). Los mismos autores han confirmado que la proteína (BD.GOL1) sintetizada por el gen *Bd.gol1* es similar a la globulina 7S encontrada en el endospermo del grano del maíz y su secuencia es similar a la de la globulina 7S de la cebada. La secuencia de la proteína BD.GOL1 comparte 57 aminoácidos con la globulina 7S del maíz y 22 residuos son similares a los derivados del gen que codifica las globulinas 7S de la cebada. También se han identificado otros genes de globulinas a partir de los clones de ADNc de *B. distachyon*. En definitiva, seis de las siete proteínas identificadas en *Brachypodium* pertenecen a la familia de las globulinas y se han clasificado en dos grupos: el primero contiene las globulinas 7S (vicillin-like) y el segundo está representado por las globulinas 12S (legumin-like). Debbie y col. (2008), han propuesto que la combinación de los datos proporcionados por el estudio de los genes que codifican las proteínas en *Brachypodium* y los aspectos morfológicos de la planta demuestran que *Brachypodium* está muy relacionado con la avena y con las *Triticeae* (Kellogg, 2001). Los dos tipos de proteínas, globulinas y prolaminas forman la mayor parte de las proteínas de reserva en *Brachypodium* y en *Avena*.

En correspondencia con los estudios anteriores, Larré y col. (2010), han demostrado que el endospermo de *B. distachyon* carece de albuminas y que las globulinas y prolaminas son las proteínas de reserva más abundantes. Según los mismos autores las globulinas están principalmente representadas por el tipo 11S cuyas propiedades de solubilidad son muy parecidas a aquellas encontradas en la harina de arroz, aunque hay que señalar que en este estudio sólo se ha utilizado la línea Bd21 de *Brachypodium*, por lo que es difícil extraer conclusiones generales.

Wang y col. (2010), han utilizado la técnica de SDS-PAGE para estudiar el tipo de proteínas almacenadas en semillas pertenecientes a 13 entradas de *B. distachyon*. Esta técnica demuestra que el endospermo de las muestras analizadas tiene un porcentaje considerable de proteínas de bajo peso molecular tipo globulinas (LMW-Gs). Sin embargo, el método MALDI-

TOF-MS identificó algunas globulinas de alto peso molecular (HMW-Gs) cuya expresión es bastante baja pero que muestran mucha semejanza con las observadas en la harina del trigo. Con esta técnica, que tiene una sensibilidad muy alta, se observaron varias proteínas de bajo peso molecular muy semejantes a las observadas en el perfil electroforético de las proteínas del endospermo del trigo hexaploide 'Chinese Spring'. Los autores han identificado 18 bandas en los geles de gluteninas correspondientes a diez proteínas, de las que ocho han sido identificados como subunidades de gluteninas de alto peso molecular. Este resultado ha sido confirmado con la técnica MALDI-TOF-MS que identificó una HMW-G en la línea Bd21, cuyo peso molecular se estima en 70.182.88 Da.

A la vista de todos estos estudios, interesa conocer el tipo y la diversidad de las proteínas del endospermo en las muestras de $2n=10$, 20 y 30 cromosomas de las poblaciones recolectadas en España.

1.12 MARCADORES MOLECULARES PARA ESTUDIAR LA VARIABILIDAD GENÉTICA

El polimorfismo basado en proteínas ha sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas, pero el desarrollo de las tecnologías del ADN ofrece una serie de marcadores, como son los basados en la hibridación de ácidos nucleicos, varios de los cuales han sido utilizados para evaluar la diversidad en poblaciones silvestres de especies de la Península Ibérica (De Bustos y col., 1998, 1999; Monte y col., 1999, 2002; Gomez de Nova y col., 2001, 2006). Destacan entre estos marcadores los RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) y los que se basan en la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), que permiten indagar un tipo de diversidad ajena a las regiones codificantes, y al menos teóricamente neutra frente a la selección natural. De entre los múltiples sistemas de marcadores moleculares desarrollados destacan, por su utilidad en las pruebas de identidad, todos los que tienen que ver con las repeticiones en número variable de secuencias en tándem (VNTR). En lo que sigue se hará referencia a dos sistemas basados en los llamados microsatélites (SSR).

1.12.1 Los microsatélites (SSR)

Los microsatélites (SSR) son sistemas repetitivos, muy polimórficos en cuanto al número de veces que se repite en tándem una secuencia corta (1-5 nucleótidos) y de los que existe una gran cantidad de tipos dispersos por todo del genoma, que se diferencian en el motivo de repetición. Los diferentes alelos de un mismo locus difieren en el número de veces de la

repetición en tándem, y por tanto en la longitud total de la secuencia repetida, lo que permite abordar su estudio con PCR, amplificando la región completa a partir de cebadores externos que complementan con regiones de los flancos, aguas arriba y aguas abajo, del microsatélite. Los microsatélites son muy abundantes en plantas (Condit y Hubbell, 1991). La amplificación de los fragmentos producidos con este tipo de marcadores moleculares se analiza en geles de agarosa tras la tinción con bromuro de etidio o con secuenciadores capilares utilizando cebadores marcadores con un fluorocromo.

Los microsatélites son muy útiles en estudios genéticos ya que combinan varias ventajas como su codominancia, multialelismo y su alta heterocigosidad, permitiendo una discriminación precisa, incluso entre individuos estrechamente emparentados. Otras ventajas añadidas la suponen, el requerimiento de cantidades mínimas de ADN para proceder a su estudio, la alta reproducibilidad y la posibilidad de su automatización empleando marcajes fluorescentes y analizadores genéticos.

En general, la amplificación de los microsatélites ha demostrado que éstos son más variables que las proteínas de las semillas, isoenzimas, RFLPs, AFLPs y RAPDs. Entre sus desventajas se cuenta el tiempo requerido y el coste derivado del diseño y síntesis de cada cebador, aunque debido a la conservación de las regiones de ADN en que se localizan es posible la utilización de cebadores comunes procedentes de especies no muy alejadas filogenéticamente (Roa y col., 2000; Guo y col., 2006; Saha y col., 2006; Barbará y col., 2007; Heesacker y col., 2008 y Raji y col., 2009)

Numerosos trabajos han demostrado la utilidad de los microsatélites para los estudios de diversidad e identidad en cereales (Donini y Bryan, 1998; Virk y col., 1999 y Zhang y col., 2002). En este contexto, Chen Guo-yue y col. (2007), han utilizado los microsatélites para estudiar la variabilidad genética en formas sintéticas, artificiales y anfiploides de trigo (*Triticum durum*) y concluyeron que esos marcadores son altamente polimórficos llegando a detectar 326 alelos en 46 loci, con una media de 6,65 alelos por locus.

Los microsatélites también son útiles para la identificación de cultivares y para la caracterización indirecta de alelos de genes de interés estrechamente ligados a los microsatélites. De este modo, Mireya y col. (2000), mediante el análisis de microsatélites asociados a un gen de glutenina de bajo peso molecular y a un pseudo- gen δ -gliadina llegaron a caracterizar 39 genotipos de trigo harinero. En el mismo trabajo se detectaron ocho alelos estrechamente ligados a las variantes de un locus de LMW-G y nueve a un gen de δ -gliadina, incluido un alelo nulo.

1.12.2 Los microsatélites en el genoma de *B. distachyon*

Dada la presencia de numerosos loci y la diversidad que presentan los microsatélites, se ha analizado su presencia en el género *Brachypodium*. Naxin y col. (2008), identificaron un total de 10.144 sistemas de SSRs en clones correspondientes a un total de 38,2 Mb de BES (BACs end sequences) procedentes del genoma de *Brachypodium*. De estos SSRs, 12,7%, 44,6% y 42,6% se refieren a motivos de repetición de dos, tres y cuatro nucleótidos, respectivamente. La frecuencia de microsatélites (SSRs) en BES de *Brachypodium* se estima en un SSR cada 3.9 Kb de ADN secuenciado.

La comparación de la distribución de los SSRs en diferentes especies de plantas (84,6 Mb en arroz, 27,5 Mb en *Arabidopsis thaliana* y 38,2 Mb en maíz), revela que los genomas pequeños tienen una frecuencia más alta de sistemas SSRs. Aunque se ha relacionado este hecho con el bajo número de copias de secuencias repetidas de ADN del genoma de *Brachypodium*, para Morgante y col. (2002), la frecuencia de SSRs está negativamente correlacionada con la proporción de ADN repetitivo y particularmente con secuencias LTR procedentes de retrotransposones, mucho más abundantes en especies de tamaños de genoma grandes.

Los motivos AG/CT son los más abundantes en los genomas de *Brachypodium* y de *Arabidopsis thaliana*, presentando respectivamente 55,2 y 52,5 % del conjunto de los loci SSRs. Para las repeticiones compuestas por tres nucleótidos, la frecuencia de la pareja GC supera el 60% en el genoma de *Brachypodium* (67,4%) y del arroz (65,0%). Según Morgante y col. (2002), los SSRs son muy abundantes en las regiones próximas a genes y todos los genomas de plantas monocotiledóneas son ricos en repeticiones constituidas de la pareja CG.

Naxin y col. (2008), han utilizado más de 480 sistemas SSRs para analizar el polimorfismo de seis poblaciones de *B. distachyon*. De ellos, 46 resultaron consistentes y muy útiles para el mapeo genético del género. Por otra parte, Vogel y col. (2009), han desarrollado 398 SSR a partir de BES y secuencias EST, que han sido utilizados para analizar una colección de 84 líneas puras obtenidas a partir de ocho poblaciones procedentes de Turquía.

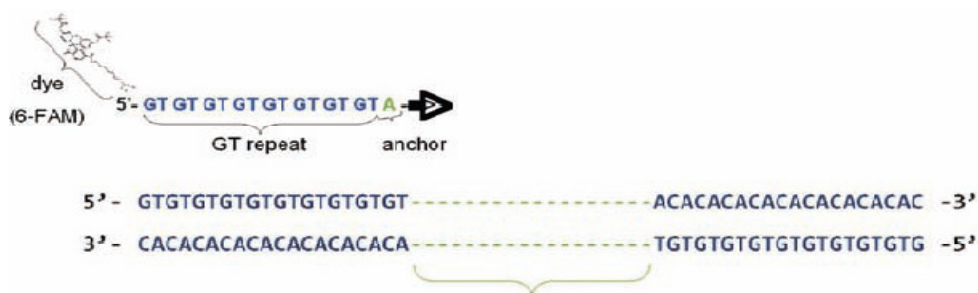
De igual manera, se estudiaron 187 líneas de $2n=10$ cromosomas procedentes de 56 poblaciones turcas de *B. distachyon*, para lo que se utilizó un conjunto de 43 SSR. En todos estos casos, los microsatélites han mostrado un nivel considerable de diversidad genética tanto entre las poblaciones como entre las muestras de plantas de cada localidad.

1.12.3 Los intermicrosatélites (Inter Simple Sequence Repeats: ISSRs)

Los intermicrosatélites constituyen un nuevo tipo de marcador desarrollado a partir de los microsatélites. Se trata de analizar los productos de la reacción de PCR obtenidos tras la amplificación utilizando un único cebador compuesto por la repetición unas pocas veces de motivos de 2, 3, 4 o 5 nucleótidos (Zietkiewicz y col., 1994). Los fragmentos amplificados estarán situados entre dos secuencias microsatélites orientadas inversamente y el polimorfismo detectado se deberá a la diferencia en el tamaño de la secuencia de nucleótidos que separan ambos microsatélites (Figura 1.3). Al igual que los microsatélites, la amplificación de los fragmentos producidos con los intermicrosatélites se analiza en geles de agarosa tras la tinción con bromuro de etidio. La reproducibilidad de este sistema es muy alta y supera a la proporcionada por los RAPDs que también se basan, en general, en el uso de un único cebador.

Los ISSRs han sido utilizados para identificar cultivares de maíz (Kantety y col., 1995; Pejic y col., 1998), trigo duro (Nagaoka y Ogiyara, 1997), arroz (Matos y col., 2001) y cebada (Fernández y col., 2002). Los resultados de la aplicación de esta técnica demuestran la elevada conservación de ciertas secuencias repetidas dentro del mismo género, lo que facilita la utilización de los mismos sistemas en especies relacionadas (Fernández y col., 2002).

Brantestam y col. (2004), aplicaron los intermicrosatélites al estudio de la diversidad genética en cultivares bálticos y nórdicos de cebada, usando cuatro sistemas (UBC-888, UBC-889, UBC-890 y UBC-891). Se obtuvieron 47 bandas polimórficas, con un rango de 9 a 14 por sistema. A continuación se calculó la diversidad genética utilizando diversos índices de variación alélica (Hutchinson, 1970; King y Schaal, 1989). Los ISSRs mostraron una amplia diversidad entre las cebadas de dos y de seis carreras, algo que trabajos anteriores desarrollados con isoenzimas no fueron capaces de demostrar (Brantestam y col., 2004).



❖ *Figura 1. 3: Regiones inter-micro satélites ISSR.*

Terzopoulos y Bebeli (2008), han estudiado la diversidad genética que encierran 20 poblaciones locales griegas de una colección de haba *Vicia faba*, anteriormente, descrita por Terzopoulos y col. (2003). Previamente se había hecho una clasificación basada en 15 caracteres morfológicos y siete agronómicos. El objetivo del experimento fue determinar el grado de concordancia entre los datos morfológicos y la clasificación basada en el estudio de los ISSRs. En un ensayo preliminar se evaluaron once cebadores ISSRs, seis de los cuales no dieron resultados importantes y uno resultó monomórfico. Los cuatro restantes dieron un número elevado de bandas (entre 34 y 55) y unos porcentajes altísimos de polimorfismo (del 97 al 100%). El análisis permitió conocer que la mayor parte de la variabilidad genética observada es intra-poblacional. Terzopoulos y Bebeli. (2008), usando los inter-microsatélites como marcadores moleculares han demostrado que las poblaciones de *Vicia faba L.* se podrían agrupar en dos subgrupos más homogéneos (M1 y M2) siendo la distancia genética entre las poblaciones de cada subgrupo superior a la observada entre los individuos de la misma población.

Una aplicación similar es la desarrollada por Sofalian y col. (2008), para estimar la diversidad genética en un conjunto de 39 trigos panaderos, de los que 36 eran variedades locales y 6 formas cultivadas procedentes del Noroeste de Irán. Los resultados de este estudio indicaron la existencia de un alto nivel de polimorfismo así como la eficacia de los ISSR para determinar la variabilidad genética intra-específica en trigo y su eficiencia para separar los cultivares según su procedencia.

Más recientemente, Emel (2010), ha utilizado doce ISSR para estudiar la variabilidad genética que encierra una colección de 11 triticales hexaploides y ha demostrado la utilidad de este tipo de marcadores para determinar las distancias génicas entre los genotipos analizados y su interés para el conocimiento de las relaciones genéticas en este tipo de colecciones.

De todo lo indicado se colige el interés de la aplicación de diversos sistemas de análisis de la diversidad para caracterizar la variación genética que encierran las poblaciones silvestres. La aplicación de sistemas diferentes permite además evaluar de forma comparada su propia eficacia.

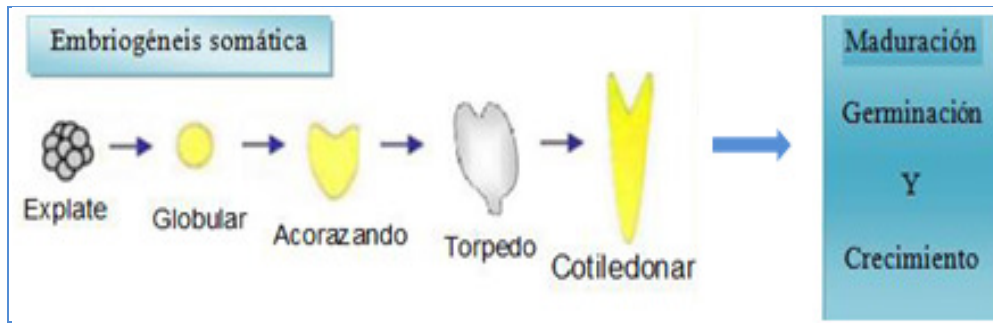
1.13 EMBRIOGENESIS SOMATICA

1.13.1 La embriogénesis somática en las gramíneas

En 1902, Haberlandt propuso que las células vegetales son totipotentes, es decir que a partir de una célula se puede regenerar una planta completa. Esta hipótesis no pudo ser demostrada hasta varias décadas después, cuando Reinert y col. (1958), y Steward y col. (1958), consiguieron obtener embriones somáticos, es decir embriones adventicios originados a partir de tejidos aislados. Más tarde se demostró que estos embriones se formaban a partir de células únicas, demostrándose de este modo la totipotencialidad de las células vegetales (Bucks-Husemann y col., 1970 y Reinert y col., 1973).

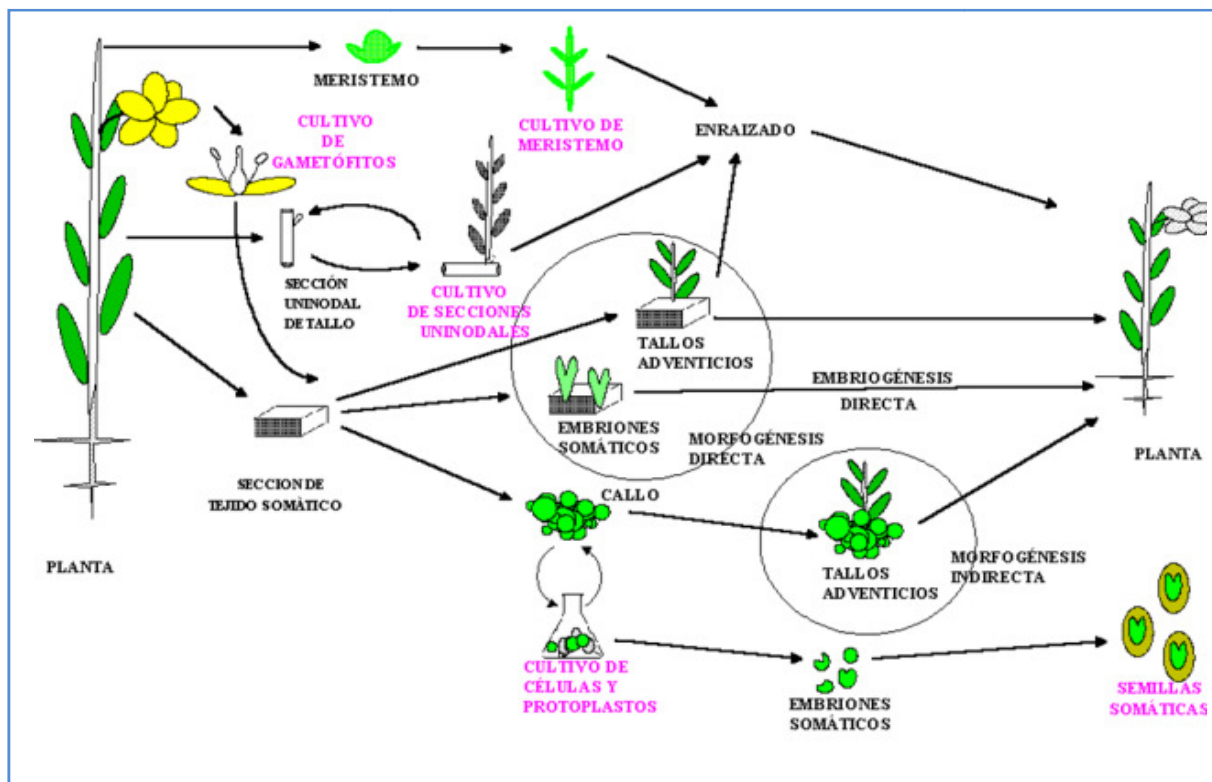
Se definen los embriones somáticos, asexuales o adventicios a los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat y col., 1979). Se trata de estructuras bipolares con un eje radical-apical, que no poseen conexión vascular con el tejido materno y que son capaces de crecer y formar plantas normales.

Según Sung y col. (1984), el desarrollo de los embriones somáticos consiste en un proceso por el que las células vegetales ya diferenciadas, se desdiferencian, para a continuación iniciar una proliferación y posterior rediferenciación. De esta forma se origina una masa amorfa de células parenquimáticas laxamente dispuestas y provistas de una pared muy delgada. Estas células se modifican, alcanzando una elevada relación citoplasma: núcleo y un elevado potencial embriogénico. Estas células embriogénicas presentan características comunes, típicas de las células en proceso de división rápida: tamaño reducido, contenido citoplasmático denso, vacuolas pequeñas y gran cantidad de gránulos de almidón. Su histoquímica y ultraestructura sugieren una intensa actividad metabólica con una elevada síntesis de ARN y de proteínas. Cada embrión en desarrollo pasa a través de los estadios secuenciales característicos de los embriones cigóticos (fases globular, corazón y torpedo). En la Figura 1.4 se detallan todas las etapas del desarrollo de la embriogénesis en especies monocotiledóneas.



❖ *Figura 1. 4: Proceso de la embriogénesis en el caso de las plantas Monocotiledóneas*

En la Figura 1.5 se muestra un esquema general del ciclo de cultivo *in vitro* de meristemas, de gametofitos, de embriones inmaduros.



❖ *Figura 1. 5: Proceso del cultivo in vitro de gametófitos de meristemas y de embriones inmaduros*

La embriogénesis somática tiene una importancia enorme en la mejora genética de cereales porque puede ser utilizada tanto para el desarrollo de sistemas de selección *in vitro* de plantas resistentes a diferentes tipos de estreses (bióticos y abióticos), como para la obtención de plantas transgénicas. En gramíneas, se han desarrollado diferentes medios de cultivo con el fin de inducir la embriogénesis somática a partir de embriones inmaduros, con respuestas muy

variables (González y col., 2001; Kilinic y col., 2004; Sener y col., 2008). Por ello, cuando se pretende inducir embriogénesis somática en una nueva especie es necesario ensayar diferentes medios y variables, con el fin de obtener la respuesta deseada, en un rango lo más amplio posible de genotipos de la especie en cuestión (Cutanda, 2007).

La inducción de callos y la regeneración de plantas en gramíneas es más difícil que en las especies dicotiledóneas (Şener y col., 2008). El éxito de la embriogénesis somática en cereales puede depender de diversos factores, de los que los más importantes se indican a continuación.

1.13.2 Factores que afectan a la embriogénesis somática en cereales

a) Explante: Se puede inducir la formación de callos mediante el cultivo *in vitro* de cualquier tejido vegetal. Sin embargo, hay pocos explantes que permitan obtener callos embriogénicos. Normalmente, como explantes con capacidad embriogénica se han usado los cotiledones, hipocotíleos y embriones inmaduros, siendo estos últimos los más empleados en el caso de cereales (Vasil y col., 1980; Barceló y Lazzeri, 1995; Rasco Gaunt y Barceló, 1999; Oldach y col., 2001 y Munazir y col., 2010).

b) Medio de cultivo: Generalmente se ha usado el medio desarrollado por Murashige y Skoog (1962) o modificaciones del mismo (Evans y col., 1981). La elevada concentración de sales de este medio parece ser muy beneficiosa para el crecimiento de los embriones somáticos (Ammirato, 1983).

- ♣ La sacarosa es la principal fuente de carbono en el medio y se usa en concentraciones entre el 2 y el 12%. Se puede utilizar también otros azúcares tal como la maltosa (Brian y col., 1990; Karsai y col., 1994; Norgaard, 1997)
- ♣ El nitrógeno: suministrado como nitrato o ion amonio, es esencial (Reinert, 1967) sin embargo el nitrógeno orgánico es generalmente, provisto por la glutamina y la alanina (Kato y col., 1966; Wetherell y col., 1976)
- ♣ El hierro: es también beneficioso en el medio (Havranek y col., 1979) y en ausencia de este elemento, los embriones somáticos globulares no son capaces de desarrollarse hasta la madurez.
- ♣ El carbón activo: se ha usado para superar problemas específicos de oxidación. La adición de esta sustancia a los cultivos embriogénicos promueve su desarrollo cuando este ha sido inhibido, ya que al parecer absorbe del medio los compuestos fenólicos (Fridborg y col., 1978).

- ♣ Phytigel: compuesto inerte utilizado para solidificar el medio.

c) Reguladores de crecimiento: De acuerdo con Evans y col., (1981) la mayoría de los sistemas embriogénicos requieren de una concentración alta de una auxina en el medio para la inducción de los embriones somáticos. En el caso de las gramíneas, la auxina más utilizada es el 2,4-D. Otras auxinas sintéticas tales como el picloran, el 2, 4,5-T, el ácido 2-benzothiazol acético y el ácido paraclorofenoxiacético también han resultado ser bastante efectivas en algunos casos (Kilinic y col., 2004; Sener y col., 2008). Se han usado inhibidores del crecimiento tales como el ácido abscísico (ABA), el cual reprime la embriogénesis somática y reduce la frecuencia de anomalías de desarrollo como son la formación secundaria de embriones a partir de embriones somáticos y la germinación precoz (Ammirato, 1973; 1974). Las auxinas Dicamba, Picloran y 2,4-D son las más citadas en la bibliografía como hormonas vegetales estimulantes de la embriogénesis somática en varias especies y en particular en los cereales como el trigo y la cebada (He y Lazzeri, 2001).

d) Condiciones ambientales: En contraste con la cantidad de información que se ha divulgado sobre la optimización de los medios de cultivo y del uso de sustancias de crecimiento, se ha hecho poco énfasis en los parámetros físicos que influyen en el crecimiento y el desarrollo *in vitro*. Así, la oscuridad es necesaria para el desarrollo y la maduración normal de los embriones y los pretratamientos con frío se han usado rutinariamente para estimular la embriogénesis somática a partir de anteras cultivadas (Hanzel y col., 1985; Carman y col., 1988).

1.13.3 El cultivo *in vitro* de embriones inmaduros en cereales bajo diferentes concentraciones de hormonas de crecimiento

Varios autores han demostrado que la inducción de la embriogénesis somática y la regeneración de brotes verdes son dos procesos que requieren la presencia de factores de crecimiento en el medio de cultivo, en concentraciones concretas que varían según la especie y el genotipo. En este sentido, Nevena y col., (2006) han analizado la respuesta al cultivo *in vitro* de 96 cultivares de trigo empleando un medio suplementado con 2 mg/l de 2,4-D y han observado que todos los genotipos respondieron adecuadamente a la fase de inducción de la embriogénesis somática con unos porcentajes que van de 36,7% al 100%. Sin embargo, en la fase de regeneración se observaron diferencias notables de tal manera que la tasa de producción

de brotes verdes varió en un rango de 0 a 97,9%. Se explica la gran diferencia de respuesta entre unos genotipos y otros, por la importancia de la interacción entre el fondo genético propio de cada cultivar y los componentes del medio de regeneración. En ciertos casos el genotipo muestra una alta capacidad embriogénica, pero al pasar los callos al medio de regeneración esa capacidad se pierde, debido a que los embriones no son capaces de recibir adecuadamente las señales procedentes del nuevo medio de regeneración para emitir brotes, mientras que otros conserven su potencial y muestran una alta productividad de plántulas.

Según los trabajos de Rashid y col. (2009), la respuesta al cultivo *in vitro* de 4 variedades comerciales de trigo Pakistani varió en función de la concentración del 2,4-D añadida al medio. Así, en las variedades 'Inqilab-91', 'Chakwal-97' y 'Manthar' mostraron tasas de callos embriogénicos de 83,25, 77,75 y 95.2%, respectivamente, cuando se emplearon medios que contenían 2,4-D a una concentración de 3 mg/l. Sin embargo, la variedad 'Tatara' produjo un número máximo de callos del 97,18%, con una concentración de 2.4 D más baja (2mg/l).

Serhantová y col. (2004), analizaron la respuesta al cultivo *in vitro* en 12 cultivares de cebada, junto con la variedad 'Golden Promise', conocida por su alta eficacia de regeneración de plántulas a partir de callos embriogénicos. Emplearon medios suplementados con tres auxinas el 2,4-D, Dicamba y Picloran. Los resultados demuestran que la respuesta es mejor cuando se trata de embriones sembrados en medios preparados con 2,4-D. Sin embargo, el resultado no fue significativamente diferente en los medios suplementados con Dicamba y Picloran.

1.13.4 *Brachypodium distachyon* y la respuesta al cultivo *in vitro*

Draper y col. (2001), han experimentado la respuesta al cultivo de tejidos de dos muestras de *B. distachyon* de $2n=10$ cromosomas, partiendo de embriones inmaduros y utilizando diferentes medios de cultivo, de los que se emplean habitualmente en trigo o cebada. Se tuvieron en cuenta diferentes parámetros relacionados con la fisiología de la plantas. Así, se observó que los embriones maduraban de forma escalonada a lo largo de una misma espiga, por ello a la hora de la puesta en cultivo de los embriones, éstos se clasificaron en 5 clases según el tamaño. Se sembraron en dos medios de cultivo, el primero basado en el medio LS 2.5 (Linsmaier y Skoog, 1962) y el segundo basado en el N6 2.5 (Babla y col., 1995).

Tras quince días de incubación, se observó la presencia de una masa de células en la superficie de los escutelos, que terminaron dando lugar a la formación de callos embriogénicos.

También observaron que la mejor respuesta se obtenía con embriones de un tamaño comprendido entre los 0,3 y los 0,7 mm. El medio LS ofreció unas tasas de inducción de embriogénesis somática más alta (45%), que el medio N6 (7%), siendo también en el que se observó la aparición de un mayor número de plántulas albinas.

Vogel y col. (2006), obtuvieron resultados similares y determinaron que el tamaño óptimo de los embriones es el de 0,7 mm. Con respecto al medio de cultivo, el que mejor resultado ofreció es el basado en LS, con un contenido de sacarosa del 3% y 2,4 D a una concentración de 2,5 mg/l, gelificado con phytigel al 0,2 %. Los embriones incubados a 28°C dieron lugar a la formación de callos que fragmentaron en piezas de 2 a 3 mm, que tras su trasplante a un medio de regeneración llegaron a dar entre 15 y 20 brotes, dependiendo del tipo de material de partida.

Por otro lado, Christiansen (2005), seleccionó 4 poblaciones de *B. distachyon* basándose en la precocidad del espigado y el nivel de ploidía. En este trabajo se observó que las entradas BDR017 y BDR030, ambas con $2n=20$, daban una alta tasa de inducción de callos embriogénicos (91%). Sin embargo, tan sólo regeneraron el 30% de los mismos. Por el contrario, los genotipos BDR001 y BDR018, con un número cromosómico de $2n=10$, mostraron unas tasas de inducción de callos más bajas (30%) pero su tasa de germinación llegó al 100%. En este mismo contexto, Vogel y Hill (2008), pusieron en cultivo embriones inmaduros de la línea Bd21-3 sobre medio LS suplementado con 2.5 mg/l de 2.4-D y concluyeron que tras 3 a 4 semanas de incubación de las placas a 28°C y en oscuridad, los embriones somáticos formados ocuparon más del 50% del volumen total del callo. Los mismos autores destacaron la importancia del tamaño del embrión y el estadio de madurez de la espiga en el éxito de la fase de inducción de la embriogénesis somática.

Finalmente, Vogel y Bragg (2009), han propuesto que un medio basado en LS, con un 3% de sacarosa y 2,5 mg/l de 2.4-D., es el óptimo para la inducción de la embriogénesis somática en tres líneas de $2n=10$ cromosomas de *B. distachyon* (B200, B373 y B377). Sin embargo, según los mismos autores, la regeneración de brotes verdes de *Brachypodium* no requiere un medio específico porque han observado callos embriogénicos emitiendo brotes en distintos medios.

A pesar de todos los estudios llevados a cabo hasta el momento se echa en falta un análisis generalizado y en las mismas condiciones de la respuesta al cultivo in vitro, en diferentes medios de embriogénesis y regeneración, y su evaluación en una colección de

1. Introducción

muestras de *Brachypodium distachyon* de los tres niveles cromosómicos que caracterizan a la especie ($2n=10$, 20 y 30).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se aborda un estudio de la diversidad existente en una colección de 23 poblaciones naturales de *Brachypodium distachyon* recogidas en diversas regiones de la Península Ibérica, como base para su aplicación en estudios biotecnológicos y para su utilización como material de base para la obtención de cubiertas vegetales.

Este propósito general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis de los citotipos cromosómicos de las diferentes poblaciones de *Brachypodium distachyon* representadas en la colección y del origen evolutivo de los mismos.
2. Análisis de la variación del comportamiento de los diferentes tipos de *Brachypodium distachyon* en cultivo *in vitro* y de su potencial para aplicaciones biotecnológicas.
3. Análisis de la diversidad genética existente en la colección de *Brachypodium distachyon* a los niveles intra- e interpoblacional, mediante el estudio de proteínas del endospermo, microsatélites e intermicrosatélites.
4. Análisis de la utilidad de los diversos tipos de caracteres y marcadores para la evaluación de la diversidad.
5. Estudio de la influencia de los factores eco-geográficos en la diversidad de las poblaciones de *Brachypodium distachyon* estudiadas.
6. Evaluación de la colección de *Brachypodium distachyon* estudiada como fuente para la obtención de líneas y variedades útiles para la protección de suelos degradados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

La Península Ibérica es considerablemente rica en especies de gramíneas silvestres, entre las que se encuentran numerosas *Poaceas*. *Brachypodium distachyon* se encuentra preferentemente en el sur de Europa y el norte de África, en lugares secos, en regiones de clima mediterráneo, siendo la única planta anual del género *Brachypodium*, ya que el resto de las especies de este género que se encuentran en los hábitas españoles son perennes.

El material objeto de este estudio está constituido por 23 poblaciones silvestres de *Brachypodium distachyon*, recolectadas por el grupo que dirige la Dra. Soler en varias expediciones a lo largo de varios años y en distintas localidades de la Península ibérica. Este material está incluido dentro de una amplia colección de especies de gramíneas silvestres españolas que se conserva en la Unidad de Mejora Genética Vegetal del INIA (Departamento de Medio Ambiente, finca La Canaleja, Alcalá de Henares). Para la recolección de las muestras de población se llevó a cabo una planificación previa de las expediciones, con el fin de definir los límites geográficos de distribución del género, mediante la revisión bibliográfica sobre la especie y los herbarios de varios jardines Botánicos. Las fechas de las expediciones se determinaron en función de la maduración del material, dependiente de las condiciones climáticas de las diferentes zonas de muestreo. En la Figura 3.1 se señala la procedencia de las muestras. La mayoría provienen del interior y zona occidental de Andalucía (Jaén, Granada, Córdoba, Sevilla y Huelva), la costa mediterránea (Tarragona, Valencia, Alicante, Málaga y Almería) y el centro peninsular (Albacete, Jaén, Cuenca y Guadalajara).

Al estudio se añadieron dos líneas comerciales obtenidas por domesticación por la Dra. Consuelo Soler y sus colaboradores a partir de poblaciones naturales recogidas en España, fruto de colaboración del INIA, el IZAPA y la empresa Agrosa. Estas líneas son el producto de una selección masal conducente a una homogeneidad en el porte, precocidad, producción y buenos resultados en varios ensayos en diferentes localidades. Las líneas mencionadas se denominan 'Bd3107' y 'Bd3113', y tras su registro y aprobación definitiva por la Oficina de Variedades Europeas han sido comercializadas por la empresa Agrosa Semillas S.A., con la denominación de 'Ibros' y 'Zulema', respectivamente. Estas líneas han sido utilizadas como plantas control en todas las fases del trabajo. A esas líneas se añadió para alguno de los análisis la variedad diploide 'Bd-21' cuyo genoma está secuenciado y públicamente disponible.

♣ Recolección del material

Para la recolección del material vegetal en el campo se tuvieron en cuenta las pautas propuestas por Hawkes, (1980) para plantas silvestres que se reproducen por semillas. Para una mejor conservación de la estructura natural de la población, el muestreo se realizó al azar, recogiendo múltiples espigas de modo que la distancia entre plantas fuera no inferior a 1 metro.

De todas las poblaciones se registraron las variables eco-geográficas: altitud, longitud y latitud, lo que permite localizar de manera precisa el hábitat de cada población (Tabla 3.1). Del mismo modo se han registrado las variables climáticas, correspondientes a la estación climatológica más próxima al punto de recogida. Los datos registrados sobre la procedencia de las muestras son los siguientes:

- T = temperatura media anual
- M = temperatura media de las máximas del mes más frío del año
- m = temperatura media de las mínimas del mes más frío del año
- It = Índice de termicidad de Rivas-Martínez; $It = (T + m + M) / 10$
- Dlh = días libres de heladas
- P = precipitación anual en mm. (Rivas-Martínez, 1990)
- Pv = precipitación en verano, en mm.
- $Im3$ = $ETP \text{ Jun.} + \text{Jul.} + \text{Ago.} / P \text{ jun.} + \text{Jul.} + \text{ago.} > 2,5$ (ETP,

evapotranspiración potencial mensual de Thornwaite)

3.2 DATOS MORFOLÓGICOS

Se ha llevado a cabo una caracterización agro-morfológica de las plantas de *B. distachyon* en condiciones controladas de invernadero y jaulón en el Campus de la Universidad de Alcalá (Figura 3.2). En diciembre de 2007 se sembraron 15 semillas individuales de cada población de *B. distachyon* y las dos variedades comerciales 'Ibros' y 'Zulema'. Los granos se pusieron a germinar en un papel humedecido en una estufa a 25°C. Las semillas germinadas se transfirieron a jiffis y se mantuvieron en el invernadero hasta la aparición de tres o cuatro hojas, luego se pasaron a macetas de 10 cm de diámetro conteniendo 1/3 arena, 1/3 arcilla y 1/3 abono. A finales de Marzo, todas las plantas se trasladaron a un jaulón exterior en condiciones naturales de temperatura y pluviometría. A lo largo de todo el ciclo vegetativo se fueron tomando datos del crecimiento de la planta. Cuando las plantas alcanzaron su estadio de madurez fisiológica

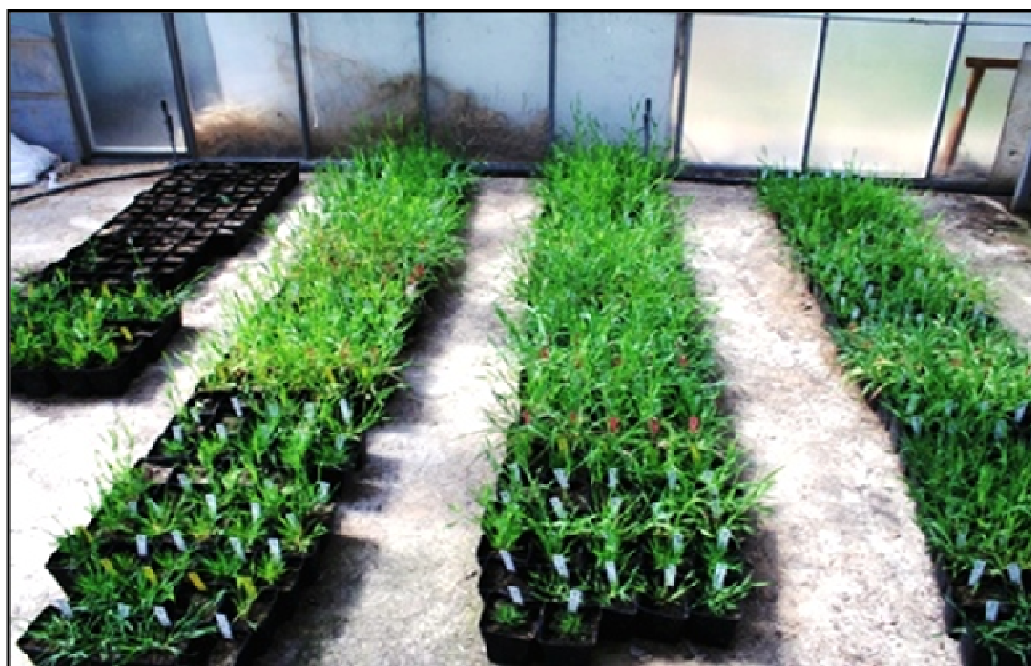
(Abril-Mayo de 2008) todas las espigas se embolsaron con bolsas de celofán para evitar la fecundación cruzada así como la pérdida de semillas.

Los datos morfológicos tomados a lo largo del ciclo vegetativo de la planta son los siguientes:

- *Fecha de espigado (días)*: Fecha en la que la espiga emerge a la mitad de la vaina.
- *Fecha de antesis (días)*: Se registró cuando se observó la aparición de las primeras anteras fuera de la espiga.
- *Fecha de madurez fisiológica (días)*: Fecha en que experimenta el cambio de color de la espiga (cuando la mitad de las espigas de una planta manifestaron cambio de color del verde oscuro al amarillento).
- *El porte de la planta*: Tomado cuando las plantas alcanzaron su madurez (E= Erecto, P= Postrado, SE= Semi-erecto y SP= Semi-postrado)
- *Número de tallos/planta*: Este parámetro se tomó a la maduración completa de la planta
- *Longitud del tallo Principal (cm)*: Tomado en la maduración y en el tallo más largo de la planta.



❖ *Figura 3. 1: Distribución geográfica de las 23 poblaciones silvestres de B. distachyon recolectadas en España*



❖ *Figura 3. 2 : Material vegetal en el invernadero (Febrero 2008)*

❖ *Tabla 3. 1: Datos geográficos, origen y principales parámetros climáticos del lugar de procedencia de las 23 poblaciones silvestres y de las dos variedades comerciales (Bd3107 = 'Zulema', y Bd3113 = 'Ibros') de B. distachyon.*

Material	Localización geográfica: longitud/latitud	Localidad (provincia)	Alt. (m.)	T	It	Pv	Im3
Bd160	38° 57' 00"/2° 31' 59"	Bonillo (Albacete)	1035	12	190	62	62
Bd162	35° 56' 00"/2° 53' 00"	Segóbriga (Cuenca)	830	137	222	105	36
Bd169	37° 43' 00"/2° 59' 00"	Sierra de Cazorla (Jaén)	905	176	344	44	115
Bd700	40° 55' 34"/2°55' 29"	Jadraque (Guadalajara)	701	106	152	88	4
Bd701	40° 37' 47"/3° 09' 59"	Guadalajara (Guadalajara)	900	136	237	51	78
Bd900	40° 36' 36"/3° 03' 16"	Lupiana (Guadalajara)	700	136	237	51	78
Bd1200	41° 04' 10"/2° 38' 32"	Sigüenza (Guadalajara)	1200	106	152	88	4
Bd3113	35° 56' 00"/2° 53' 00"	Segóbriga (Cuenca)	830	137	222	105	36
Bd114	37° 59' 00"/3° 28' 00"	Baeza (Jaén)	661	151	290	31	139
Bd115	38° 40' 00"/2° 29' 00"	Alcaráz (Albacete)	949	126	214	60	61
Bd129	37° 20' 00"/3° 47' 00"	Moclín (Granada)	1084	151	284	17	144
Bd485	38° 44' 18"/0° 13' 56"	Cabo de la Nao (Alicante)	42	181	407	37	118
Bd146	38° 08' 00"/4° 54' 00"	Villaharta (Córdoba)	759	175	541	23	223
Bd176	37° 35' 00"/4° 35' 00"	Córdoba (Córdoba)	445	179	361	18	174
Bd217	37° 27' 28"/2° 14' 57"	Oria (Almería)	829	127	203	52	7
Bd220	36° 51' 34"/2° 37' 46"	Enix (Almería)	540	177	383	20	234
Bd238	36° 48' 25"/4° 54' 11"	Casarabonela (Málaga)	575	171	353	29	155
Bd250	37° 26' 55"/2° 09' 13"	Albox (Almería)	636	169	344	21	205
Bd260	36° 58' 26"/4° 40' 35"	Abdalajis (Málaga)	528	167	347	23	193
Bd341	38° 00' 49"/6° 31' 06"	Cañaverale de León (Huelva)	546	148	282	45	91
Bd343	37° 52' 50"/6° 08' 54"	Arroyo de la Cala (Sevilla)	365	134	231	30	122
Bd361	38° 12' 37"/4° 01' 48"	Nuestra Sra. De la Cabeza (Córdoba)	651	176	362	25	192
Bd409	39° 14' 56"/1° 03' 59"	Cofrentes (Valecia)	452	165	301	76	63
Bd486	41° 10' 40"/-1° 28' 28"	Roda de Bará (Tarragona)	23	158	336	79	47
Bd3107	37° 35' 00"/4° 35' 00"	Córdoba (Córdoba)	445	179	361	18	174

3.3 CULTIVO *in vitro* DE EMBRIONES INMADUROS

Uno de los aspectos de mayor interés de *Brachypodium* como especie modelo es la posibilidad de su utilización en experimentos de transformación. Por ello es importante analizar la diversidad genética de las poblaciones, respecto a la capacidad potencial de regenerar plantas fértiles mediante el cultivo *in vitro* de diferentes tipos de explantes.

El cultivo *in vitro* permite obtener plantas en un medio nutritivo artificial bajo condiciones asépticas de laboratorio a partir de segmentos muy pequeños de la planta (explantes). Los medios nutritivos artificiales están constituidos a base de sales inorgánicas,

moléculas orgánicas como vitaminas, glutamina, una fuente de carbono como es la sacarosa, glucosa o maltosa, reguladores de crecimiento o fitohormonas y un agente gelificante inerte como es el agar o el phytigel. En una primera aproximación, se planteó un estudio que nos permitiría valorar globalmente la diversidad genética que abarca la colección. En el estudio básico se ensayaron dos medios de cultivo: MS y MSm (Murashige y Skoog, 1962. El primer medio lleva sacarosa como fuente de carbono y el segundo maltosa, los demás componentes fueron iguales. En la Figura 3.3 se resume todo el proceso del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de *B. distachyon*

A la luz de los resultados obtenidos en el primer estudio, se eligieron 6 poblaciones (Bd114, Bd115, Bd160, Bd3113, Bd238 y Bd341) para ensayar nueve medios de inducción de callos que se diferenciaron en el tipo y concentración de la hormona.



❖ Figura 3. 3: Las diferentes etapas del proceso de cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de *B. distachyon*.

3.3.1. Obtención de embriones cigóticos inmaduros de *B. distachyon*

De las plantas de cada población se tomaron embriones cigóticos a partir de granos en formación con una edad entre 15-25 días después la antesis. Se procedió a la desinfección de los granos con una solución 1:5 Domestos™ manteniéndose en esta solución con agitación

suave durante 20 minutos. Luego se enjuagaron 5 o 6 veces con agua destilada estéril en una campana de flujo laminar. Las semillas desinfectadas se diseccionaron con pinzas estériles bajo observación con lupa estereoscópica. De cada semilla se extrajo el embrión junto al escutelo colocándose el embrión en contacto con el medio de cultivo. El tamaño medio del embrión varió entre 0.3 y 0.7mm.

3.3.2. Composición de los medios de cultivo

Todos los medios de inducción de callos, tuvieron como composición mineral la descrita por Murashige y Skoog (1962). Además contuvieron Fe-EDTA y diferentes compuestos orgánicos según se detalla en las Tablas 3.2, 3.3 y 3.4 siendo las principales diferencias entre ellos las que se refieren a la fuente de carbono (sacarosa o maltosa) y el tipo y concentración de hormonas (2,4-D; Dicamba o Piclorán).

La composición y la preparación de los medios se detallan en las Tablas 3.2 a 3.5.

❖ *Tabla 3. 2: Composición de Macro y Micro-elementos utilizados en la preparación de los medios de cultivo (Murashige y Skoog, 1962)*

a)			b)		
Macro-elementos	MS m (g/l)	MS (g/l)	Micro-elementos	MSm (g/l)	MS (g/l)
KH_2PO_4	3,4	3,4	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2,23	2,23
KNO_3	38	38	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,86	0,86
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,4	7,4	H_3BO_3	0,62	0,62
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	8	8	KI	0,083	0,083
NH_4NO_3	33	33	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0025	0,0025
			$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,025	0,025
			$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,0025	0,0025
➤ Todos los componentes se disuelven en H ₂ O ultra pura					

❖ *Tabla 3. 3: Composición de la solución stock FeNa-EDTA 10-4 M*

Componentes	[C] final(mg/l)
Na_2EDTA	37,25
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,85
➤ Todas los componentes se disuelven en 100 H ₂ O ultra pura	

❖ *Tabla 3. 4: Composición de las soluciones stock de vitaminas*

Componentes	MSm (mg/l)	MS (mg/l)
<i>Glicina*</i>	2	2
<i>Ácido nicotínico*</i>	0,5	0,5
<i>Piridoxina *</i>	0,5	0,5
<i>Tiamina HCl*</i>	0,1	0,1
<i>Inositol*</i>	100	100
➤ Todos los componentes se disuelven en H ₂ O ultra-pura		
* Todos los productos son de la casa comercial SIGMA		

❖ *Tabla 3. 5: Composición de los medios MS y MSm de inducción de callos embriogénicos*

Componentes	MSm (ml/l)	MS (ml/l)
<i>Macro-elementos</i>	50	50
<i>Micro-elementos</i>	10	10
<i>Fe-EDTA 10-4M 40x</i>	5	5
<i>Vitaminas</i>	2	2
<i>Glutamina</i>	0,5g	0,5g
<i>Sacarosa</i>	-	30g
<i>2,4-D (4,5 M)</i>	1	1
<i>Maltosa</i>	30g	-
<i>Phytigel</i>	3g	3g
<i>pH</i>	5,8	5,8
➤ Todos los componentes se disuelven en H ₂ O ultrapura y esterilización en autoclave El 2,4D se preparó disolviendo 100mg de la hormona en 25ml de alcohol y 75ml de H ₂ O destilada y esterilizada.		

3.3.3.2 SEGUNDO ENSAYO

Se han empleado nueve medios de inducción de callos. La composición y la preparación de los medios se detallan en las Tablas 3.6 a 3.10

- Sales MS: Producto de Duchefa: M 0221
- Vitaminas MS: Producto de Duchefa: M 0409 (Solución madre: 2,062 g/20 ml H₂O)
- 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético): Producto Duchefa: D: 0911. (Solución madre: 50 mg+12.5 ml etanol+37.5ml H₂O)
- Dicamba: Producto Duchefa: D0920 (Solución madre: 50 mg+12.5 ml etanol+37.5ml H₂O)
- Piclorán: Producto Duchefa: P 0914 (Solución madre: 50 mg+ 50 ml NaOH (1M)).
- B.A.B: Solución madre: 50 mg + 100 ml de NaOH (1M)

3. Materiales y Métodos

- A.N.A ($2 \cdot 10^{-4}$): (Ácido-Naftalen-Acético): Solución madre: 20 mg+100 ml NaOH (1M).

❖ *Tabla 3. 6: Composición de los medios BR1 y BR2 de inducción de callos embriogénicos*

a)			b)		
<i>Medio BR1</i>	<i>200 ml</i>	<i>1000 ml</i>	<i>Medio BR2</i>	<i>200 ml</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Sales Ms</i>	0,861g	4,304g	<i>Sales Ms</i>	0,861g	4,304g
<i>Fe-EDTA</i>	1	5	<i>Fe-EDTA</i>	1	5
<i>Vitaminas MS</i>	0,2	1	<i>Vitaminas MS</i>	0,2	1
<i>2,4-D</i>	0,2	1	<i>2,4-D</i>	0,4	2
<i>Glutamina</i>	0,1g	0,5 g	<i>Glutamina</i>	0,1g	0,5 g
<i>Maltosa</i>	6g	30 g	<i>Maltosa</i>	6g	30 g
<i>H₂O</i>	200	1000	<i>H₂O</i>	200	1000
<i>p H</i>	5,8	5,8	<i>p H</i>	5,8	5,8
<i>Phytigel</i>	0,6 g	3 g	<i>Phytigel</i>	0,6 g	3 g

❖ *Tabla 3. 7: Composición del medio BR3 de inducción de callos embriogénicos*

<i>Medio BR3</i>	<i>200 ml</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Sales Ms</i>	0,861g	4,304g
<i>Fe-EDTA</i>	1	5
<i>Vitaminas MS</i>	0,2	1
<i>2,4-D</i>	0,8	4
<i>Glutamina</i>	0,1g	0,5 g
<i>Maltosa</i>	6g	30 g
<i>H₂O</i>	200	1000
<i>p H</i>	5,8	5,8
<i>Phytigel</i>	0,6 g	3 g

3. Materiales y Métodos

❖ *Tabla 3. 8: Composición de los medios BR4 y BR5 de inducción de callos embriogénicos*

a)			b)		
<i>Medio BR4</i>	<i>200 ml</i>	<i>1000 ml</i>	<i>Medio BR5</i>	<i>200 ml</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Sales Ms</i>	0,861g	4,304g	<i>Sales Ms</i>	0,861g	4,304g
<i>Fe-EDTA</i>	1	5	<i>Fe-EDTA</i>	1	5
<i>Vitaminas MS</i>	0,2	1	<i>Vitaminas MS</i>	0,2	1
<i>Dicamba</i>	0,2	1	<i>Dicamba</i>	0,4	2
<i>Glutamina</i>	0,1g	0,5 g	<i>Glutamina</i>	0,1g	0,5 g
<i>Maltosa</i>	6g	30 g	<i>Maltosa</i>	6g	30 g
<i>H2O</i>	200	1000	<i>H2O</i>	200	1000
<i>p H</i>	5,8	5,8	<i>p H</i>	5,8	5,8
<i>Phytigel</i>	0,6 g	3 g	<i>Phytigel</i>	0,6 g	3 g

❖ *Tabla 3. 9: Composición del medio BR6 de inducción de callos embriogénicos.*

<i>Medio BR6</i>	<i>200 ml</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Sales Ms</i>	0,861g	4,304g
<i>Fe-EDTA</i>	1	5
<i>Vitaminas MS</i>	0,2	1
<i>Dicamba</i>	0,8	4
<i>Glutamina</i>	0,1g	0,5 g
<i>Maltosa</i>	6g	30 g
<i>H2O</i>	200	1000
<i>p H</i>	5,8	5,8
<i>Phytigel</i>	0,6 g	3 g

❖ *Tabla 3. 10: Composición de los medios BR7 y BR8 de inducción de callos embriogénicos*

a)			b)		
<i>Medio BR7</i>	<i>200 ml</i>	<i>1000 ml</i>	<i>Medio BR8</i>	<i>200 ml</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Sales Ms</i>	0,861g	4,304g	<i>Sales Ms</i>	0,861g	4,304g
<i>Fe-EDTA</i>	1	5	<i>Fe-EDTA</i>	1	5
<i>Vitaminas MS</i>	0,2	1	<i>Vitaminas MS</i>	0,2	1
<i>Piclorán</i>	0,2	1	<i>Piclorán</i>	0,4	2
<i>Glutamina</i>	0,1g	0,5 g	<i>Glutamina</i>	0,1g	0,5 g
<i>Maltosa</i>	6g	30 g	<i>Maltosa</i>	6g	30 g
<i>H2O</i>	200	1000	<i>H2O</i>	200	1000
<i>p H</i>	5,8	5,8	<i>p H</i>	5,8	5,8
<i>Phytigel</i>	0,6 g	3 g	<i>Phytigel</i>	0,6 g	3 g

❖ *Tabla 3. 11: Composición del medios BR9 de inducción de callos embriogénicos*

<i>Medio BR9</i>	<i>200 ml</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Sales Ms</i>	0,861g	4,304g
<i>Fe-EDTA</i>	1	5
<i>Vitaminas MS</i>	0,2	1
<i>Piclorán</i>	0,4	4
<i>Glutamina</i>	0,1g	0,5 g
<i>Maltosa</i>	6g	30 g
<i>H2O</i>	200	1000
<i>p H</i>	5,8	5,8
<i>Phytigel</i>	0,6 g	3 g

3.3.3 Siembra de los embriones inmaduros en medios de cultivo

En el primer ensayo se realizaron tres réplicas de 20 embriones en cada uno de los dos medio de inducción de callos. En el segundo ensayo se hicieron 4 réplicas y el número total de embriones sembrados fue de 60 a 80, en cada uno de los 9 medios de inducción de callos. Las placas, con los diferentes medios de cultivo en las que se sembraron los embriones fueron precintadas y se mantuvieron en oscuridad en una estufa a 25°C durante 4 o 5 semanas.

A lo largo de este período se controló la posible contaminación, de modo que en el caso de placas contaminadas se rescataron los embriones alejados del punto de contaminación y se sembraron en una nueva placa. Así mismo, se eliminaron los coleoptilos de aquellos embriones que comenzaron a germinar en el medio de cultivo.

3.3.4 Regeneración de Callos

Los callos formados se trasplantaron a un medio de regeneración, transcurridas 5 semanas del cultivo de embriones inmaduros en estufa a 25°C en oscuridad. En el ensayo preliminar se utilizó el medio **RB** (Tabla 3.12) y en el segundo experimento el **G1** (Tabla 3.13). El resultado se clasificó como callos “embriogénicos” [E], “fofos” [F], “necróticos” [N], “blandos-embriogénicos”, [F+E], “necróticos-embriogénicos” [N+E] y “sin callos” [S.C]. Las placas se colocaron en una cámara de cultivo a 22°C, con un régimen de 14 horas de luz y 10 de oscuridad, durante 4 semanas.

Durante esa etapa de cultivo, se contabilizó el número de brotes verdes albinos/callos obtenidos a partir de los distintos tipos de callos.

❖ *Tabla 3. 12: Composición del medios BR de germinación de callos*

<i>Componentes</i>	<i>Cantidades (ml/l)</i>
<i>Macro. MS</i>	50
<i>Micro.MS</i>	10
<i>Fe-EDTA</i>	50
<i>Vitaminas MS</i>	2
<i>Glutaminas</i>	0,5 g
<i>Maltosa</i>	30 g
<i>B.A.P</i>	0,5
<i>H₂O</i>	1000
<i>p H</i>	5,8
<i>Phytigel</i>	3 g

❖ *Tabla 3. 13: Composición del medio G1*

<i>Medio G1</i>	<i>200 ml</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Sales MS</i>	0,861g	4,304 g
<i>Fe-EDTA</i>	1	5
<i>Vitaminas MS</i>	0,2	1
<i>B.A.P</i>	0,1	0,5
<i>Glutaminas</i>	0,1 g	0,5g
<i>Maltosa</i>	6 g	30 g
<i>H₂O</i>	200	1000
<i>p H</i>	5,8	5,8
<i>Phytigel</i>	0,6 g	3g

3.3.5 Obtención de plántulas

Algunas de las plantas obtenidas a partir de los distintos tipos de callos, se pasaron a tubos con medio de crecimiento con el fin de obtener plantas adultas y fértiles de *B. distachyon*. En la Tabla 3.14 se detallan todos los componentes del medio de cultivo. Cuando las plántulas crecieron y enraizaron, se trasplantaron a jiffis con tierra y se mantuvieron en la cámara de cultivo en las mismas condiciones de cultivo. Una vez que las plántulas se habían instalado en tierra, aproximadamente 45 días después de su trasplante, se extrajeron del jiffi y se trasplantaron de nuevo a macetas de 10 cm de diámetro y se mantuvieron en el invernadero con un fotoperiodo de 16 horas de luz para estimular el espigado.

❖ *Tabla 3. 14: Composición del medio de crecimiento de plántulas.*

<i>Medio</i>	<i>200 ml</i>	<i>1000 ml</i>
<i>Sales MS</i>	0,861g	4,304 g
<i>Fe-EDTA</i>	1	5
<i>Vitaminas MS</i>	0,2	1
<i>ANA</i>	0,2	1
<i>Glutamina</i>	0,1 g	0,5 g
<i>Maltosa</i>	6 g	30 g
<i>H₂O</i>	200	1000
<i>p H</i>	5,8	5,8
<i>Phytigel</i>	0,6g	3 g

3.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL ENDOSPERMO DE *B. distachyon*

3.4.1 Extracción de proteínas totales del endospermo de *B. distachyon*

El estudio de proteínas totales de reserva del endospermo de semillas de *B. distachyon* se realizó según el método descrito por Singh y Shephred, (1991) y se resume en los siguientes pasos.

3.4.1.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La preparación de las muestras es de la máxima importancia para asegurar la extracción de todo el contenido proteico de las semillas. De cada una de las poblaciones se pesaron 10 semillas, dado que el peso medio/semilla fue de 2 a 8 mg, no se pudieron triturar las semillas en un mortero para extraer la harina del endospermo. Para la extracción se empleó nitrógeno líquido para facilitar la rotura de las semillas y poder pulverizarlas tras su aplastamiento en el mortero. La harina de cada población se colocó en un tubo Eppendorf rotulado con la referencia de la población de procedencia. Tras ello, se añadió el tampón de extracción (10µl/mg) cuya composición está indicada en las Tablas 3.15 y 3.16. Las muestras se dejaron un día entero agitando de vez en cuando.

Hay que señalar que las etapas de preparación de los geles de poliacrilamida, la carga de las muestras, la tinción y la conservación de geles, son idénticas que las utilizadas en la extracción diferencial de gluteninas.

♣ Preparación de la solución stock de extracción

❖ *Tabla 3. 15: Componentes de la solución stock madre*

<i>Soluciones</i>	<i>Cantidades</i>
<i>Tris HCL 1M p H=6,8</i>	6,25 ml
<i>Dodecil Sulfato Sódico (SDS)</i>	2 g
<i>Azul de Bromofenol</i>	10 mg
<i>Glicerol</i>	10 ml
<i>Agua</i>	12,05 ml

♣ Preparación del tampón de extracción

❖ *Tabla 3. 16: Componentes de la solución de extracción*

<i>Soluciones</i>	<i>Cantidades (ml)</i>
<i>Solución stock</i>	4,47
<i>Dithiothetiol</i>	0,016g
<i>Agua</i>	10,53

3.4.2 Extracción diferencial de gluteninas

En un estudio preliminar se intentó estudiar las proteínas totales de reserva del endospermo de semillas de *B. distahyon* pero la resolución alcanzada mediante SDS-PAGE no fue la óptima para llevar a cabo un estudio de variabilidad. Por ello, se procedió a un estudio de proteínas de reserva del grano centrado en las gluteninas, utilizando el método de extracción diferencial descrito en los siguientes apartados.

3.4.2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

De cada población se analizaron entre 10 y 12 plantas individuales. Para ello, y con el fin de disponer de suficiente cantidad de harina para la extracción de gluteninas, se partió de 10 semillas procedentes de la misma planta. Debido a la gran dureza de los granos, tras su congelación se trituraron en nitrógeno líquido. La harina obtenida de cada una de las plantas se colocó en un tubo Eppendorf rotulado con el nombre de la población y el número de la planta y la harina se dejó secar durante 24 horas en una estufa a 37°C.

3.4.2.2 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DIFERENCIAL

♣ Soluciones

- A: Propanol-1 50% (v/v).
- B: 50 ml Propanol-1 50% (v/v).
0.8 ml Tris-Hcl 1 M pH= 8.0.
- C: SDS 2 % (p/v).
Glicerol 40% (v/v).
Azul de Bromofenol 0.02% (p/v).
Tris-Hcl 1 M pH=8,0.

♣ Etapas de la extracción

- 1- Para la extracción de gluteninas se partió de 20 mg de harina de endospermo a la que se le añadieron 0,2 ml de solución A y se incubaron las muestras a 65°C en agitación durante 1 hora.
- 2- Se centrifugaron a 10.000 rpm durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante y se guardó el precipitado.
- 3- El precipitado se lavó 2 veces con 0.2 ml de solución A tras agitar en vortex, y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min.
- 4- Al precipitado resultante se le agregó 20 µl de solución B + dithio-threitol al 1% (1 ml solución B + 0,01g DTT), se agitó en vortex y incubó 30 min a 65°C en agitación.
- 5- Se añadieron 20 µl de solución B + 4-vinylpiridina al 1.4 % (1 ml solución B + 14µl VP), se agitó en vortex y se incubó 15 min a 65°C en agitación.
- 6- Se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 min.
- 7- Se recogió el sobrenadante y añadió la misma cantidad de la solución C (normalmente entre 20 y 40 µl).

3.4.2.3 PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS)

Para la separación de las gluteninas, se han utilizado geles bifásicos con un primer gel concentrador o 'stacking' con una concentración de acrilamida del 3% y un gel separador con una concentración de acrilamida del 12%, según se detalla en las Tablas 3.17 y 3.18.

♣ Soluciones stock

- **A:** Solución de Acrilamida al 40%
- **B:** Solución de Bis-acrilamida al 2%
- **C:** Solución de Dodecil Sulfato Sódico (SDS) al 10%
- **D:** Solución de Peroxidisulfato de amonio (APS) al 1%.
- **E:** Tampón gel separador, Tris-HCL 1M p H= 8.8
- **F:** Tampón del gel 'stacking', Tris-HCL 1M p H= 6.8
- **G:** Tampón de cubeta, Glicina 1.41%, Tris 0.3% y SDS 0.1% p H=8.3
- **H:** TEMED

♣ Gel separador

❖ *Tabla 3. 17: Componentes del gel separador*

<i>Soluciones</i>	<i>12%</i>	
	1 gel	2 geles
<i>A</i>	6	12
<i>B</i>	1,3	2,6
<i>C</i>	0,2	0,4
<i>D</i>	0,8	1,6
<i>E</i>	7,5	15
<i>H</i>	16μl	32μl
<i>H₂O</i>	4,2	8,4
➤ Todas las cantidades reseñadas están en ml		

❖ Gel concentrador

❖ *Tabla 3. 18: Componentes del gel concentrador*

<i>Soluciones</i>	<i>3%</i>	
	<i>1 gel</i>	<i>2 geles</i>
<i>A</i>	0,54	1,08
<i>B</i>	0,18	0,36
<i>C</i>	0,055	0,11
<i>D</i>	0,21	0,42
<i>F</i>	0,68	1,36
<i>H</i>	8,8μl	17,6μl
<i>H₂O</i>	3,34	6,68

➤ Todas las cantidades reseñadas están en ml



❖ *Figura 3. 4: A la izda., el aparataje y productos para la preparación de geles de poliacrilamida. A la dcha. cubeta de electroforesis montada*

3.4.2.4 CARGA DE LOS GELES

Para desnaturalizar las proteínas y permitir que se recubrieran de SDS, las muestras se calentaron en un baño a 100°C durante 10 minutos, antes de cargar los geles de poliacrilamida. A continuación se centrifugaron durante 5 minutos a 13.000 rpm y con una jeringuilla HAMILTON se cargaron entre 10 y 15 μl de sobrenadante en cada uno de los pocillos del gel concentrador. En todos los geles se incluyó además una muestra de gluteninas de la variedad ‘Chinese Spring’ de trigo blando como patrón, así como un marcador de peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo a un amperaje constante de 20 mA hasta que el azul de bromofenol (marcador de migración) alcanzó el límite inferior del gel concentrador. Luego se subió el amperaje a 40 mA. La duración total de la electroforesis fue de 4 o 5 horas.

3.4.2.5 TINCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS GELES

La electroforesis finalizó cuando el azul de bromofenol alcanzó el límite inferior del gel separador. Entonces, se separó cuidadosamente el gel de los cristales y con una espátula se cortó el gel concentrador, dejando el punto de inserción de las muestras como referencia para calcular los parámetros de estudio del gel. Los geles se sumergieron en una solución de ácido tricloroacético al 15% durante 30 minutos para fijar las proteínas.

Para la tinción de geles de proteínas se preparó una solución stock compuesta por 0.25 g de Coomassie Blue G y 0.75 g de Coomassie Blue R disueltos en 100 ml de alcohol de 96°. En el momento de la tinción se preparó la solución de coloración cuyos los componentes se detallan en la tabla 3.19.

❖ *Tabla 3. 19: Componentes de la solución de tinción*

<i>Soluciones</i>	<i>Cantidades</i>
<i>Ac. Tricloroacético</i>	55g
<i>Ac. Acético</i>	65 ml
<i>Etanol</i>	180 ml
<i>Solución Stock de tinte</i>	25 ml
<i>H₂O</i>	Hasta 1000ml

Los geles se mantuvieron entre 12 y 16 horas en el tinte en agitación para lograr una coloración homogénea. Tras la tinción, se retiró el tinte y se lavaron los geles con agua destilada, cambiándola varias veces durante al menos 6 horas, hasta que se visualizaron bandas azules y nítidas. Los geles se colocaron en un transiluminador y se fotografiaron digitalmente. Para la conservación de los geles se sumergieron en una solución de glicerol al 10% durante 30 minutos y se colocaron entre papel celofán sobre un cristal, dejándolos secarse a temperatura ambiente.

3.5 PREPARACIÓN DE CROMOSOMAS

Se estimuló la germinación las semillas de cuyas raíces se deseaba extraer muestras de células en mitosis para contar los cromosomas. Para ello, se colocaron las semillas en placas Petri sobre papel humedecido durante 24 horas en oscuridad a 25°C, para a continuación pasarlas durante 2-3 días a 4°C. Pasado este tiempo se transfirieron de nuevo a 25°C para estimular la actividad meristemática radicular y sincronizar el mayor número de células en metafase mitótica. Las raíces obtenidas se sumergieron en tubos Ependorff con agua sobre hielo picado

durante 24 horas, antes de fijarlas en etanol/ácido acético 3:1. Antes de proceder al aplastamiento del meristemo, para la obtención de las preparaciones cromosómicas libres de citoplasma y residuos celulares, se hizo un tratamiento enzimático con una mezcla de celulasa y peptinasa, siguiendo la metodología desarrollada por Schwarzacher y col., (1989). Los meristemos digeridos se colocaron en portaobjetos sobre una gota de ácido acético al 45%. A continuación se procedió a aplastar el material colocando sobre éste un cubreobjetos mediante una firme presión. Se comprobó la presencia de buenas metafases con ayuda de un microscopio de contraste de fases. Las preparaciones elegidas se congelaron con anhídrido carbónico antes de teñirlas con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para su posterior análisis en un microscopio (Zeiss Axiophot) acoplado con sistema de epifluorescencia.

♣ Hibridación FISH, GISH, sondas y marcaje

Las sondas de ADN ribosomal utilizadas fueron: pTa71, plásmido de 9 kb obtenido de *Triticum aestivum* conteniendo la secuencia de los genes ribosomales de 18S-5, 8S-25S rDNA (45S rDNA) y los espaciadores intergénicos (Gerlach y Bedbrook, 1979) y el plásmido pTa794, conteniendo un inserto de 410pb, también aislada del trigo, correspondiente a la secuencia del gen 5S rDNA y espaciadores intergénicos (Gerlach y Dyer, 1980).

Con el fin de caracterizar el tipo de ADN presente en los citotipos con número de cromosomas $2n=30$ se utilizó la técnica GISH (hibridación *in situ* genómica). Para ello se utilizó el ADN genómico de poblaciones con $2n=10$ y $2n=20$. Las sondas fueron marcadas con digoxigenina o biotina por 'Nick translation' utilizando los kits de la marca comercial Roche (pTa71 y ADN genómico) o por PCR (pTa794). La detección de la digoxigenina y la biotina se llevó a cabo usando el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con FITC (verde) y streptavidin conjugado con Cy3 (rojo), respectivamente.

Las preparaciones, la desnaturalización de las sondas, la hibridación *in situ*, los lavados post-hibridación y la detección fueron realizados según el protocolo descrito por Cuadrado y col., (2004). Las preparaciones se examinaron utilizando un microscopio Zeiss Axiophot de Epifluorescencia. Las imágenes se capturaron mediante una cámara CCD (Nikon DS). La composición y optimación de las imágenes se llevó a cabo utilizando el programa Adobe Photoshop.

3.6 EXTRACCIÓN DEL ADN

Se partió de hojas jóvenes que fueron pulverizadas en morteros para romper las paredes celulares, congelando previamente el material con nitrógeno líquido. De cada población se extrajo el ADN de 10 plantas individuales. Para ello se utilizó el kit “Kit DNeasy® Plant Mini Kit (250)” de la casa comercial Qiagen.

Una vez extraído el ADN se valoró su concentración y pureza mediante un ‘nanodrop’. El ADN extraído se ajustó a una concentración de 20 ng/μl para su uso posterior. Las muestras de ADN se conservaron a -20°C.

3.7 MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN DEL ADN

3.7.1 Obtención de Inter-microsatélites (ISSRs)

Se han llevado a cabo reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction) en 240 muestras de plantas individuales. La mezcla de cada reacción contuvo los siguientes componentes: 10 ng de ADN genómico, 1,5 μl de tampón de reacción 10x (100 mM Tris-HCl pH= 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ y 0.01% gelatina), 0,6 μl dNTP (2.5 mM), 0,2 μl de cebador (10 mM) y 0,3 μl de Taq polimerasa (5 unidades/ μl, Sigma) en un volumen final de 15 μl.

Se ensayaron 24 cebadores y de ellos se seleccionaron los 16 que mostraron un patrón de amplificación más claro y reproducible.

Se han utilizado 3 programas de PCR diferentes según el cebador empleado en cada caso. La Tabla 3.20 detalla las condiciones de PCR utilizadas.

❖ *Tabla 3. 20: Programas de amplificación de ISSR por PCR*

<i>Cebadores</i>	<i>Programas PCRs</i>
	94°C----5'
ISSR8-ISSR9-ISSR10-ISSR11	94°C----30''
ISSR14-ISSR15	52°C----45''
ISSR19-ISSR21-ISSR22	72°C----2'
	72°C----7'
	4°C-----∞
	94°C----5'
	94°C----30''
ISSR1-ISSR12-ISSR13	55°C----45''
ISSR16-ISSR17-ISSR20	72°C----2'
	72°C----7'
	4°C-----∞
ISSR6	94°C----5'
	94°C----30''
	50°C----45''
	72°C----2'
	72°C----7'
	4°C-----∞

En la tabla siguiente se registran las secuencias de los cebadores utilizados.

❖ *Tabla 3. 21: Secuencias de los cebadores utilizados*

<i>Cebadores</i>	<i>Secuencias (5' → 3')</i>
ISSR1	AGAGAGAGAGAGAGAGAG G
ISSR6	TCTCTCTCTCTCTCTC G
ISSR 8	AGAGAGAGAGAGAGA GYC
ISSR 9	GAGAGAGAGAGAGAG AA
ISSR10	ACAACAACACACACA CYT
ISSR 11	GAGAGAGAGAGAGAG AYG
ISSR 12	ACACACACACACACA CYT
ISSR 13	CTCTCTCTCTCTCTC TRC
ISSR 14	CACACACACACA GT
ISSR 15	CACACACACACA AG
ISSR 16	GAGGAGGAG GC
ISSR17	GTGGTGGTG GC
ISSR19	CACACACACACAC ARC
ISSR 20	ATGATGATGATGATGATG
ISSR21	AGAAGAAGAGAGAGA GYT
ISSR22	CCTCCTCCTCCTCCT G
	➤ Y=C,T; R=A,G

♣ Electroforesis en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal a temperatura ambiente. Para ello, se mezclaron las reacciones de PCR con el tampón de carga (0,10% azul de Bromofenol, 0,25% xileno-cianol, 30% glicerol) y se depositaron para la separación de los fragmentos en los geles de agarosa al 1% (p/v) utilizando un tampón de electroforesis TAE 1x (20 mM Tris acetato y 0,5 mM EDTA p H= 8,0) a un voltaje de 100 V/cm. Una vez finalizada la electroforesis, se mantuvieron los geles en una solución de tinción compuesta de 12,5 µl de bromuro de etidio, diluidos en 250 ml de TAE 10x durante al menos 20 minutos. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador '1kb plus DNA ladder'. Tras la tinción, los geles se colocaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con el captador de imágenes "Alpha Imagen® EC".

♣ Estudio de los geles de Inter-microsatélites

Una vez fotografiados los geles se analizaron con el programa AlphaView S.A, para poder estimar el tamaño de los fragmentos amplificados.

3.7.2 Amplificación de microsatélites (SSR)

Con el fin de amplificar regiones microstélites (SSR) se ensayaron inicialmente 34 parejas de cebadores, de las que se seleccionaron las 11 que dieron resultados reproducibles e informativos. La longitud de los cebadores varió entre 19 y 39 bases. Todos los cebadores "forward" llevaban en el extremo 5' una secuencia de nucleótidos correspondiente a un fragmento del fago M13. En las reacciones se incluyó un tercer cebador complementario a la secuencia de la cola de M13 de los cebadores "forward". Este tercer cebador se marcó con un fluorocromo en su extremo 5', lo que permitía la detección del tamaño de los fragmentos amplificados. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 15 µl [ADN genómico: 20 ng, 1,5 µl de tampón de reacción 10x (100 mM Tris-HCL p H= 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ y 0,01% gelatina), 0,6 µl dNTP (2,5mM) (1,25 µl diluidos en 50 µl de H₂O ultra-pura destilada), 0,2 µl de cada cebador (10mM) y 0,3 µl de Taq polimerasa (5 U/ µl, Sigma)].

Los cebadores de SSR seleccionados se amplificaron siguiendo dos programas de PCR como indica la Tabla 3.22. Las secuencias de todos los sistemas utilizados se describen en la Tabla 3.23

❖ *Tabla 3. 22: Programas de amplificación de SSR por PCR*

<i>Cebadores</i>	<i>Programas PCRs</i>
<i>Bra 17-Bra20-Bra21- Bra32</i>	94°C----5
	94°C----20''
	58°C----1'
	72°C----10
	94°C----20''
	56°C----1'
	72°C----30''
	72°C----10''
	4°C----∞
<i>Bra 3-Bra5-Bra7- Bra8- Bra13- Bra16- Bra18- Bra19</i>	94°C----5
	94°C----20''
	59°C----1'
	72°C----10
	94°C----20''
	56°C----1'
	72°C----30''
	72°C----10''
	4°C----∞

❖ *Tabla 3. 23: Secuencias de sistemas SSR amplificados por PCR*

<i>Oligonucleótidos</i>	<i>Secuencias (5' → 3')</i>
Bra 3F	TGTA AACG GCCAGTCCAGTAAGTGCACACATGTTA
Bra 3R	CCTTGTACTTGTGCTTATGGT
Bra 5F	TGTA AACG AC GGCAGTTACGTGTCAGTTTAGCACCTT
Bra 5R	AGGAGGCCACATCCTACCT
Bra 7F	TGTA AACG AC GGCAGTTTTATGGGTTTCACCTCTAGC
Bra 7R	GTTTGAAGGAGAGGAATAAG
Bra 8F	TGTA AACG AC GGCAGTGTGTCAGTATGAGTTTCCTCGTG
Bra 8R	CTGACTGAAAGCTCAAGTTGT
Bra 13F	TGTA AACG AC GGCAGTAAACGRACAACCCAACAAC
Bra 13R	CTTAATTAATCTGCGGTTGC
Bra 16F	TGTA AACG AC GGCAGTCGCGTATCTAGATGGTTTTT
Bra 16R	GTTTCCCACTAGAACAAAGGT
Bra 17F	TGTA AACG AC GGCAGTAGTTGGCGGTCTACATCTATT
Bra 17R	ACTAAAGACCACTCACGTTTG
Bra 18F	TGTA AACG AC GGCAGTGAAGAAAGGAAGAAGAGATGC
Bra 18R	AATTCCTCCATTCACATCG
Bra 19F	TGTA AACG AC GGCAGTGTGCTTGAGCCTCATCTTTTAGT
Bra 19R	GAAAGATTTACAGCCCCTAAC
Bra 20F	TGTA AACG AC GGCAGTGTGGAACAAGAGATGTATGGA
Bra 20R	CCCTGTTGACTAAAAACCTT
Bra 21F	TGTA AACG AC GGCAGTTTTTATACAAGGGGCAAGAG
Bra 21R	CCAATTAATTCCTTCCTTC
Bra 32F	TGTA AACG AC GGCAGTCCCAATTACTTTCCCGTAGC
Bra 32R	GCCGGATTTAGAGAACAAC

➤ F: Forward; R: Reverse

♣ Estudio de los microsatélites

Una vez finalizada la PCR, se analizaron los productos de amplificación mediante un secuenciador capilar ABI 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems. Para el estudio de los fragmentos amplificados, se utilizó el programa “Peak Scanner Software v 1.0” que permite la alineación de picos y su estandarización según un marcador de peso molecular: “GS500 (-250) LIZ”.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se han utilizado los programas StatGraphics, versión 7.0 y el programa NTSYS (Sneath y Skal, 1973).

4. RESULTADOS

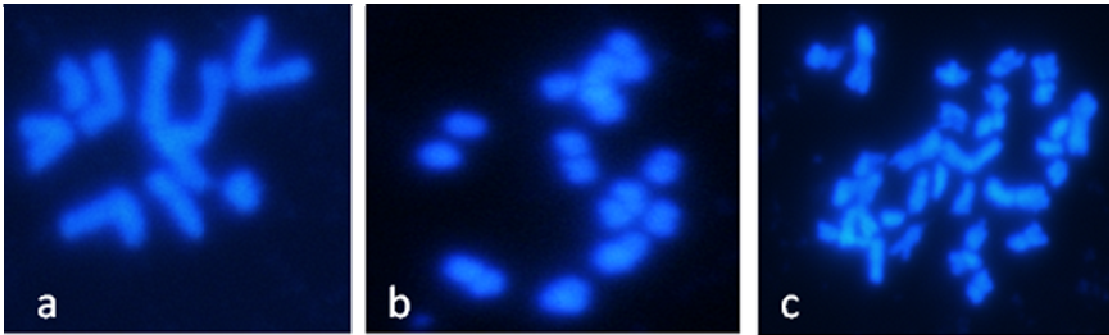
4. RESULTADOS

En este apartado se presentan los resultados de los diferentes análisis realizados en las poblaciones de *Brachypodium distachyon*, de acuerdo con los objetivos de este trabajo. En la exposición de los resultados se seguirá el esquema siguiente:

- ♣ 4.1 Estudio citogenético del material estudiado, en cuanto al número, morfología y estructura cromosómica mediante tinción DAPI e hibridación *in situ* (FISH y GISH).
- ♣ 4.2 Estudio de la diversidad genética de algunos caracteres morfológicos y sus posibles relaciones con los niveles de ploidia de las poblaciones.
- ♣ 4.3 Evaluación de la respuesta al cultivo *in vitro* (inducción de callos y regeneración de plantas), a partir de embriones cigóticos inmaduros en función de la población y medios de cultivo empleados.
- ♣ 4.4 Análisis de diversidad intra e inter-poblacional de proteínas totales de reserva del endospermo y de gluteninas.
- ♣ 4.5 Análisis de diversidad intra e inter-poblacional de marcadores moleculares de tipo inter-microsatélites (ISSR) y microsatélites (SSR).

4.1 NÚMERO Y CARACTERÍSTICAS DE LOS CROMOSOMAS DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

Las muestras de *Brachypodium distachyon* analizadas mostraron tres citotipos diferentes de 10, 20 y 30 cromosomas. En la Figura 4.1 se muestran tres metafases mitóticas correspondientes a las dotaciones cromosómicas encontradas en las poblaciones. En la Tabla 4.1 se registra el número de cromosomas de cada población.



❖ Figura 4. 1: Metafasas mitóticas de *B. distachyon*, a) *Bd701* ($2n=10$); b) *Bd115* ($2n=20$) y c) *Bd361* ($2n=30$)

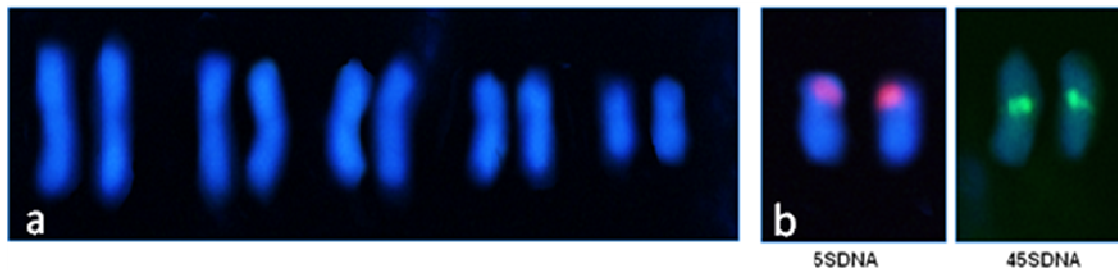
❖ Tabla 4. 1 Número de cromosomas y tipos de imágenes utilizadas en el estudio de los citotipos de las poblaciones estudiadas.

Material	2n=	Imágenes	Material	2n=	Imágenes
Bd160	10	–	Bd146	30	DAPI
Bd162	10	FISH	Bd176	30	DAPI
Bd169	10	DAPI	Bd217	30	DAPI
Bd700	10	FISH	Bd220	30	FISH
Bd701	10	FISH	Bd238	30	DAPI
Bd900	10	DAPI	Bd250	30	DAPI
Bd1200	10	FISH	Bd260	30	DAPI
Bd3113	10	DAPI	Bd341	30	FISH
Bd114	20	DAPI	Bd343	30	FISH
Bd115	20	DAPI	Bd361	30	–
Bd129	20	DAPI	Bd409	30	FISH/DAPI
Bd485	20	DAPI	Bd486	30	–
			Bd3107	30	–

4.1.1 Descripción de los cromosomas de *B. distachyon* de $2n=10$

El complemento cromosómico de *Brachypodium distachyon* de $2n=10$ está constituido por 5 pares de cromosomas numerados del 1 al 5, de mayor a menor, como se indica en la Figura 4.2. El cromosoma uno es sub-metacéntrico y es el de mayor tamaño, el cromosoma dos es morfológicamente similar aunque algo menor que el primero. Los cromosomas tres y cuatro son algo menores. El brazo corto de los cromosomas dos y tres son muy similares pero el cromosoma tres es más pequeño que el dos siendo el único cromosoma metacéntrico de todo el cariotipo. El cromosoma cuatro es de menor tamaño que el tres aunque tiene una morfología muy parecida. Finalmente el cromosoma cinco es submetacéntrico, es el más pequeño de todo el complemento cromosómico y tiene un locus ADN_r45S en una posición próxima al

centrómero en el brazo corto y una región ADNr5S en posición subterminal en el mismo brazo (Figura 4.2 b).



❖ Figura 4. 2: a) Cariotipo de *B. distachyon* ($2n=10$); b) Hibridación *in situ* con las sondas de genes ribosomales 5SrDNA y 45SrDNA

4.1.2 Descripción de los cromosomas de *B. distachyon* de $2n=20$

Las formas de $2n=20$, constan de un juego básico de 10 cromosomas de aproximadamente la mitad del tamaño medio de los cromosomas del citotipo de $2n=10$. Debido a su pequeño tamaño y semejanza entre ellos no es posible una descripción ni identificación individual.

4.1.3 Descripción de los cromosomas de *B. distachyon* de $2n=30$

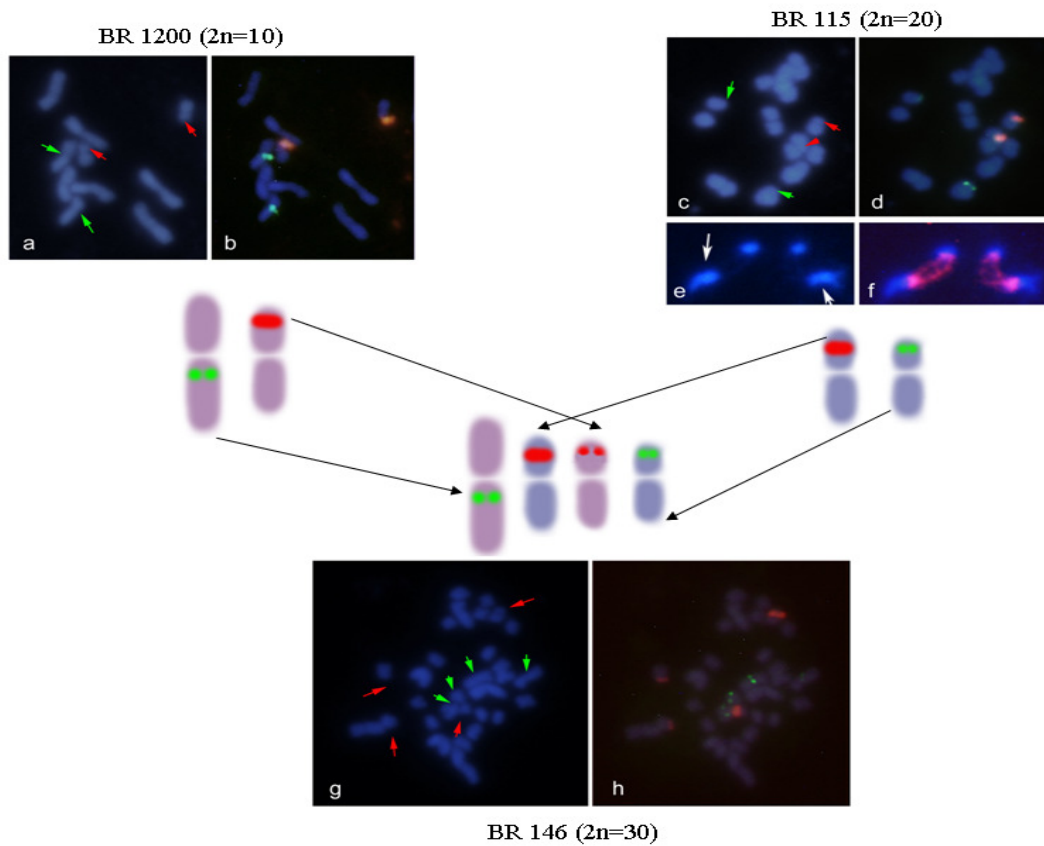
Por el número y tamaño de los cromosomas, las formas de $2n=30$ poseen un juego básico que combina los de los citotipos de $2n=10$ y $2n=20$. Para comprobar el posible origen por alopoloidía de estas formas se procedió a la utilización de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) e hibridación *in situ* genómica (GISH).

4.1.4 Resultados de la hibridación *in situ* (FISH)

La utilización de sondas de ADN ribosomal 5S y 45S, confirma el carácter aditivo del citotipo de $2n=30$, respecto a los de $2n=10$ y $2n=20$. Las sondas específicas de ambos tipos de loci únicos en cada forma de $2n=10$ y $2n=20$ cromosomas, revelan su presencia en las mismas posiciones y tipos de cromosomas en las formas de $2n=30$.

La Figura 4.3 indica al origen de las formas $2n=30$, con la contribución aditiva de las formas $2n=10$ y $2n=20$ de *B. distachyon*. Se muestra la combinación de los cromosomas portadores de los loci de ADNr de las formas de menor número de cromosomas en las de $2n=30$, por medio de la hibridación *in situ* (FISH) con las sondas pTa71 y pTa794. La aplicación de FISH muestra 4 señales en ocho cromosomas diferentes, además en el caso de las señales pTa71, dos son fuertes y dos son débiles y están situadas en la región distal de los pares de cromosomas pequeños. El locus del gen 5S ADNr (señal fuerte) fue encontrado en una

región próxima en el cromosoma metacéntrico, mientras que el más débil fue visualizado en la región distal del par de cromosomas pequeños. Tras rehibridar la preparación con el ADN genómico del citotipo $2n=10$, se distinguieron claramente dos grupos de cromosomas según sus patrones de fluorescencia (Figura 4.5b) y se observaron 20 cromosomas pequeños que han mostrado señales de fluorescencia exclusivamente alrededor de los centrómeros y diez cromosomas de diversos tamaños mostraron un patrón de señales dispersos a lo largo de la longitud de sus brazos. La combinación de las imágenes de metafases y de la rehibridación distingue claramente dos grupos de cromosomas, 10 grandes de morfología diferente y 20 más pequeños. Esto se confirma igualmente mediante la utilización de GISH con el ADN genómico de la población Bd3113 ($2n=10$), como se detalla en el apartado siguiente.

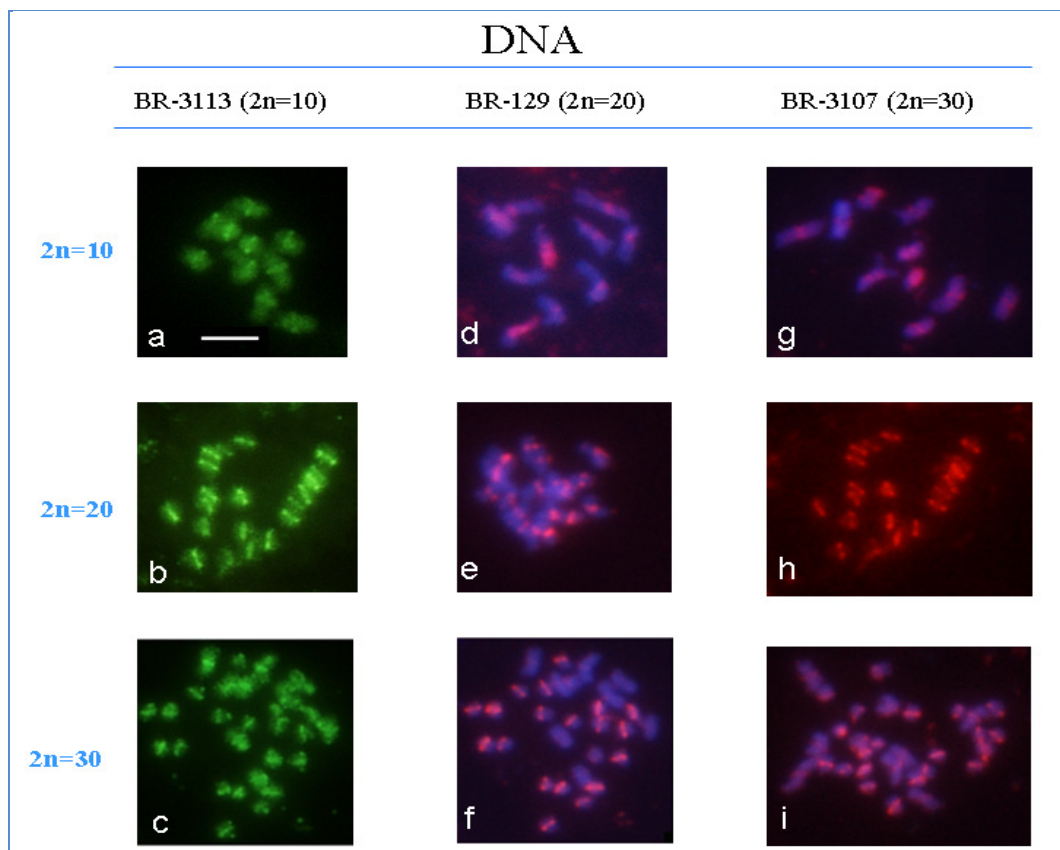


❖ *Figura 4. 3: Resultados FISH utilizando las sondas pTa794 (verde) y pTa71 (rojo) para detectar los genes ribosomales 5SrDNA y 45SrDNA, respectivamente en tres poblaciones con distintos números cromosómicos. a-b) BR1200 ($2n=10$), c-f) BR115 ($2n= 20$) y g-h) BR146 ($2n=30$). Para ayudar a identificar los cromosomas portadores de estos genes en cromosomas teñidos con DAPI se indican con flechas de los mismos colores (a, c y g). e) Un detalle de los cromosomas satelizados portadores de los genes ribosomas de 45SrDNA en la población BR115. En el centro de la figura se representan los cromosomas portadores de los genes ribosomales. Las flechas indican sus relaciones, como confirman los resultados de GISH.*

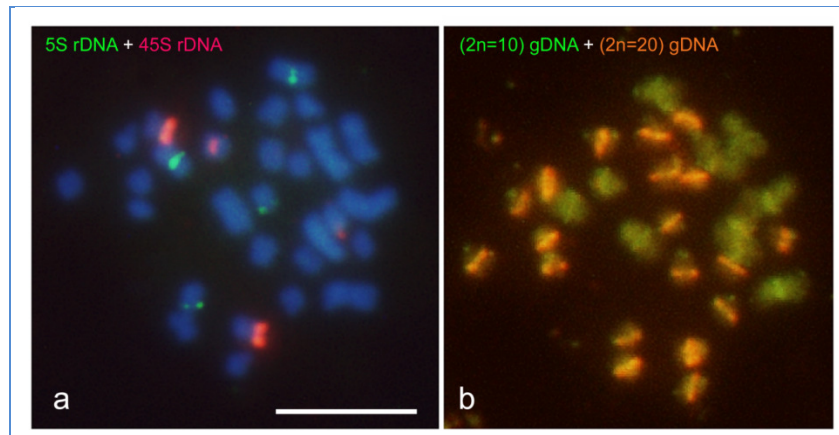
4.1.5 Resultados de GISH

Con el fin de confirmar la procedencia de los dos juegos de cromosomas reunidos en las formas de $2n=30$, se llevó a cabo la hibridación *in situ* con ADN genómico total de las formas de $2n=10$ y $2n=20$, sobre cromosomas de muestras de los tres niveles cromosómicos. Una muestra de los resultados se representa en las Figuras 4.4 y 4.5.

Tal como observamos en la Figura 4.5, la utilización de diferentes fluorocromos para el marcado de los ADN genómicos procedentes de plantas de los citotipos de $2n=10$ y $2n=20$, para la hibridación de los cromosomas de las formas de $2n=30$, revela dos juegos cromosómicos, uno de 10 cromosomas, marcado en verde (FITC) y otro de 20 marcado en rojo (Cy3).



❖ *Figura 4. 4: Resultados de GISH con ADN genómico aislado de poblaciones de diferentes números de cromosomas $2n=10$, 20 y 30 . a-c) ADN genómico de la población BR3113 ($2n=10$) marcado con digoxigenina (detección verde) en preparaciones de *Brachypodium* con 10 , 20 y 30 cromosomas respectivamente. d-f) Hibridación con ADN genómico de la población BR129 ($2n=20$) marcado con biotina (detección rojo sobre fondo DAPI azul) en preparaciones de *Brachypodium* con 10 , 20 y 30 cromosomas respectivamente. g-h) ADN genómico de la población BR3107 ($2n=30$) marcado con biotina (detección rosa/rojo) en preparaciones de las poblaciones de *Brachypodium* indicadas con niveles de ploidia de 10 , 20 y 30 .*



❖ *Figura 4. 5: Confirmación que los citotipos $2n=30$ de *B. distachyon* tienen un origen aloploide. a) Hibridación in situ con la sonda pTa71 rDNA (señal rojo) y pTa794 5SrDNA (señal verde en una metafase de la población Bd146 ($2n=30$). b) La misma metafase tras re-hibridación con el ADN genómico de la línea Bd3113 ($2n=10$) (verde) y la población Bd129 ($2n=20$) (rojo). Scale bar = 10 μ m.*

4.2 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN CARACTERES MORFOLÓGICOS

Se llevó a cabo un estudio de las características morfológicas y otras relacionadas con el ciclo biológico de una muestra de 15 plantas de cada población silvestre y de las dos líneas comerciales 'Ibros' y 'Zulema'. Se trata de un análisis mínimo cuyo fin es el de contribuir al conocimiento del comportamiento bajo condiciones controladas de un material heterogéneo en cuanto a su procedencia eco-geográfica, tipos de hábitats y número de cromosomas. El estudio se hizo en condiciones de crecimiento inicial en invernadero y final en el exterior, durante la campaña 2007-2008.

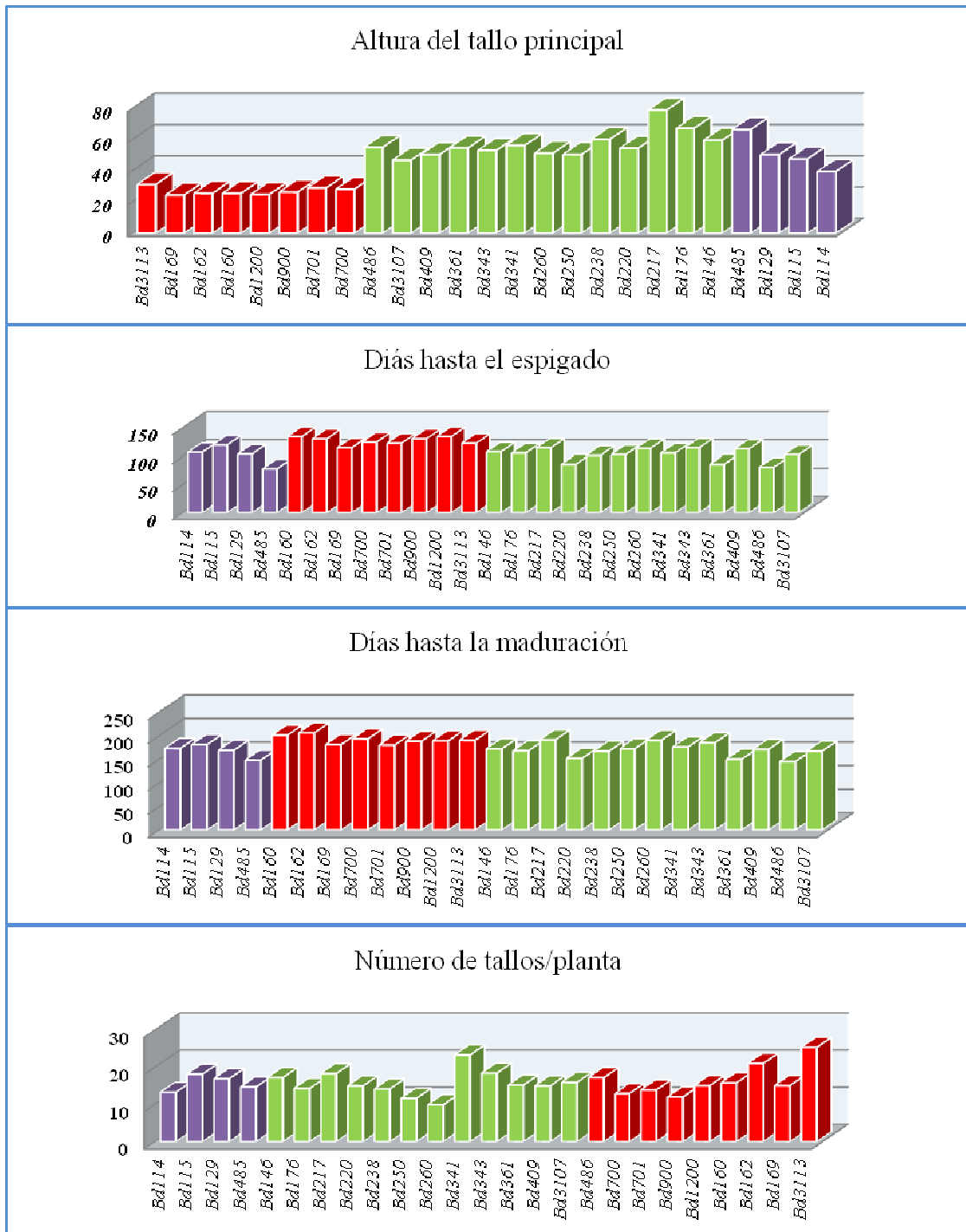
Los resultados se registran en la Tabla 4.2. Como resultados más relevantes se puede significar que las plantas de $2n=10$ cromosomas presentaron preferentemente porte erecto, menor talla que las de mayor número de cromosomas, medida por la altura del tallo principal, y tuvieron un ciclo más lento, especialmente hasta el espigado. Las muestras de $2n=20$ presentaron en líneas generales una talla intermedia entre las de menor y mayor número de cromosomas, no distinguiéndose en el resto de los caracteres de las de 30 cromosomas. En líneas generales, se encuentran diferencias apreciables en el porte, talla de las plantas y duración del ciclo entre las de $2n=10$ y las de números cromosómicos superiores, que no se diferencian entre sí.

En la Figura 4.6 se representan mediante histogramas los valores medios de algunos caracteres morfológicos tomados de las plantas desarrolladas en condiciones de invernadero.

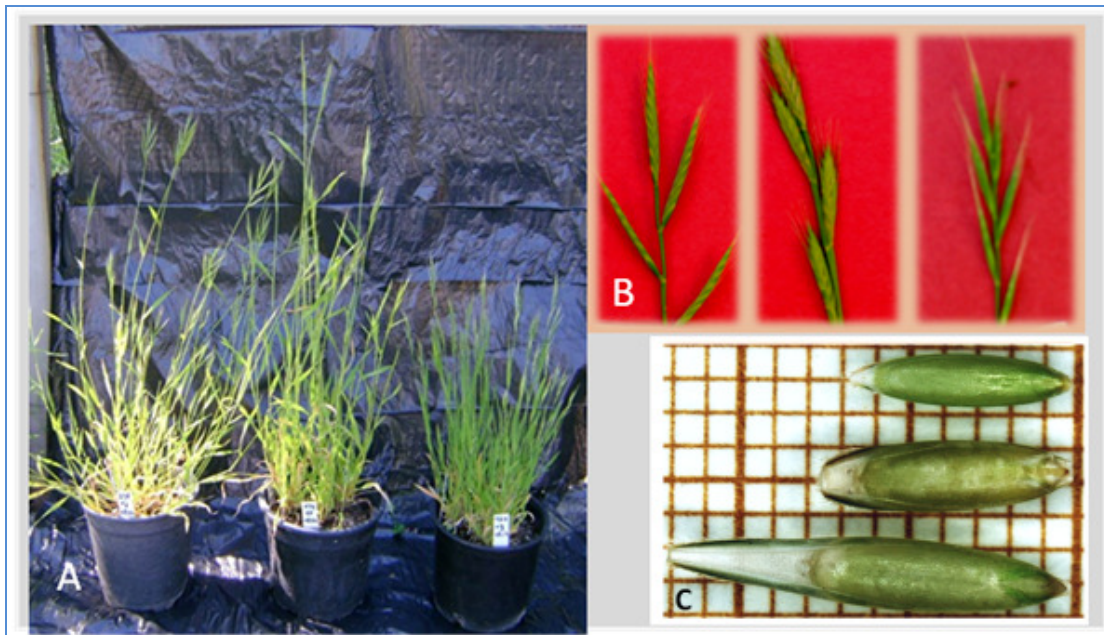
En la Figura 4.7 se muestran algunos detalles de la morfología de las plantas.

❖ *Tabla 4.2: Caracteres agro-morfológicos de las poblaciones, basados en el comportamiento en invernadero. Los datos se refieren a 15 plantas de cada población o línea analizada. E = porte erecto, SE = porte semi-erecto; P = porte postrado; SP = porte semi-postrado.*

<i>Poblaciones</i>	<i>2n =</i>	<i>Porte</i>	<i>Núm. de tallos por planta</i>	<i>Altura del tallo principal</i>	<i>Fecha spigado (días)</i>	<i>Fecha antesis (días)</i>	<i>Fecha madurez (días)</i>
Bd114	20	E	13,25±1,17	39,47±1,62	106	136	173
Bd115	20	E	18,15±1,80	47,54±0,87	119	147	181
Bd129	20	E	16,93±1,63	50,32±0,52	103	130	169
Bd146	30	SP	18,4±0,55	59,6±0,8	107	135	172
Bd160	10	E	17,2±0,62	25,48±0,91	134	165	201
Bd162	10	E	14,28±0,62	25,56±0,64	130	167	206
Bd169	10	E	18,3±0,96	24,46±0,80	114	144	181
Bd176	30	SP	15,2±0,73	67,15±1,68	105	133	168
Bd217	30	P	15±1,03	78,86±0,97	114	145	191
Bd220	30	P	15,92±1,03	54,37±1,03	86	116	152
Bd238	30	P	17,21±0,73	60,12±1,30	101	130	167
Bd250	30	P	12,93±0,85	50,42±1,73	102	135	172
Bd260	30	SP	13,87±0,92	51,22±1,43	113	148	190
Bd341	30	E	12±0,90	56,19±1,72	105	135	176
Bd343	30	E	15,07±0,72	53±1,55	114	140	185
Bd361	30	SE	15,8±0,68	54,55±1,75	86	113	150
Bd409	30	SE	21±0,93	50,34±0,82	112	136	171
Bd485	20	P	14,71±0,68	66,39±1,34	78	108	148
Bd486	30	SE	15,07±0,82	54,99±1,51	81	109	145
Bd700	10	E	15±0,74	28,18±1,18	124	154	193
Bd701	10	E	14,15±0,50	28,98±0,80	122	122	160
Bd900	10	E	11,64±0,74	26,29±1,04	130	158	180
Bd1200	10	E	9,91±0,36	24,82±0,69	134	156	188
Bd3107	30	SE	25,33±0,66	46,84±1,14	102	151	189
Bd3113	10	E	23,3±0,64	31,2±1,27	122	152	190



❖ *Figura 4.6: Histogramas correspondientes a las medias de algunos caracteres agromorfológicos del conjunto de las plantas analizadas para cada población y observados a lo largo del ciclo y mantenidas en condiciones de invernadero. Las plantas se agrupan por número cromosómico. Rojo = 2n=10; Morado = 2n=20; Verde = 2n=30.*



❖ *Figura 4. 7: Detalles morfológicos de plantas de B. distachyon. A) De la izda. a dcha.: Bd238 (2n=30), Bd114 (2n=20) y Bd160 (2n=10). Se aprecia la menor talla de las plantas de 2n=10 que las de número cromosómico superior. Sin embargo no se aprecian diferencias en la altura del tallo principal entre las plantas de 2n=20 y 2n=30. B) Forma de espiga en los tres citotipos. De izda. a dcha. Bd486, Bd114 y Bd160 de 2n=30, 20 y 10, respectivamente. C) Grano de formas de 2n=10, 2n=20 y 2n=30, de arriba abajo (cuadrícula 1 mm.).*

4.3 ESTUDIO DE LA RESPUESTA AL CULTIVO *in vitro* DE EMBRIONES INMADUROS DE *B. distachyon*

4.3.1 Resultados del ensayo preliminar

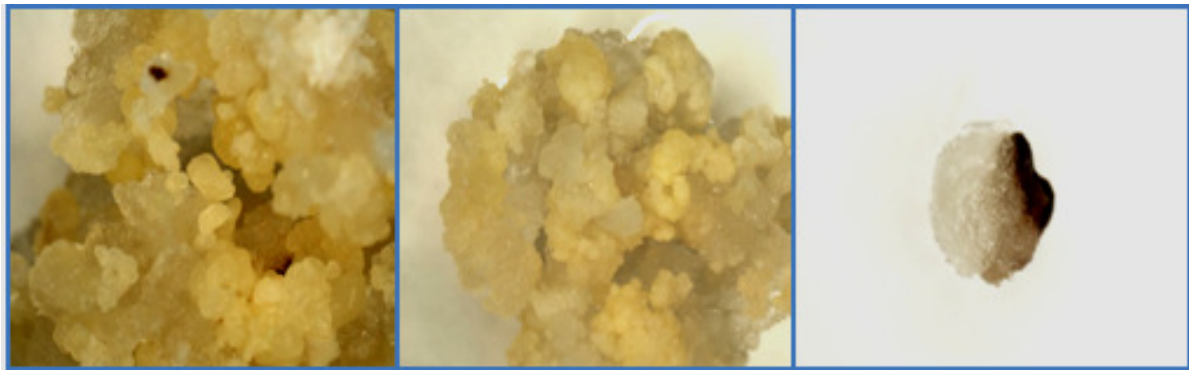
4.3.1.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA AL CULTIVO *in vitro* EN MEDIO MS y MSm

B. distachyon es una especie modelo para estudios de genómica estructural y funcional de cereales de climas templados, por lo que es necesario disponer de procedimientos adecuados y eficaces de regeneración de plantas a partir del cultivo *in vitro* de diferentes explantes. Dada la diversidad cromosómica encontrada en el material estudiado, se ha llevado a cabo la puesta a punto y la evaluación de la respuesta al cultivo *in vitro* de una selección de plantas pertenecientes a las poblaciones estudiadas.

En una primera aproximación se analizaron las fases del proceso del cultivo *in vitro* en todas las poblaciones silvestres y las dos variedades comerciales, fijando la atención en: **a)** la inducción de callos a partir de embriones cigóticos inmaduros y **b)** la regeneración de plantas a partir de los callos embriogénicos.

a) Primera etapa: inducción de callos

A lo largo del ensayo se analizaron aproximadamente 4.000 embriones inmaduros procedentes de las 23 poblaciones silvestres de *B. distachyon* y de las variedades comerciales ‘Ibros’ y ‘Zulema’. Se utilizaron dos medios de inducción de callos, MS y MSm, descritos en el apartado de Material y Métodos. Como respuesta, se obtuvieron dos tipos de callos fácilmente distinguibles por su morfología. El primer tipo se trata de callos compactos y embriogénicos caracterizados por su aspecto amarillento y con un gran número de embriones somáticos en su superficie. El segundo tipo presentó un aspecto “fofo”, muy blando. En algunos casos se obtuvieron los dos tipos de callos a partir de un mismo embrión inmaduro. En la Figura 4.8 se muestran fotografías de cada uno de los tipos de callos obtenidos en los medios MS y MSm.



❖ *Figura 4. 8: Diferentes tipos de callos desarrollados a partir de embriones inmaduros de B. distachyon sobre medios MS y MSm.*

Los callos empezaron a desarrollarse a partir de la primera semana de puesta en cultivo de los embriones inmaduros. En la Tabla 4.3 se resumen los resultados de la fase de inducción de callos en los medios MS y MSm. En el estudio se han tenido en cuenta dos variables: *TC*= número total de callos/número de embriones cultivados y *CC*= número de callos compactos/total de callos producidos. Cabe señalar que los embriones de la población Bd129 ($2n=20$) no produjeron ningún callo en ninguno de los dos medios de inducción utilizados.

- ❖ *Tabla 4.3: Respuesta al cultivo in vitro de embriones inmaduros de B. distachyon (fase de inducción + fase de regeneración) en dos medios de cultivo MS y MSm (Emb= número de embriones puestos en cultivo, TC= número total de callos a partir de embriones sembrados, CC= número total de callos compactos/total callos, SCC= número de brotes verdes producidos a partir de callos compactos/total de callos embriogénicos, SSC= número de brotes verdes producidos a partir de callos fofos/total de callos fofos, TSVC= número total de brotes verdes/total de callos, Ap/Tc= número total de brotes albinos/ total de callos y por último R= número total de brotes verdes/total de embriones inmaduros cultivados).*

Medios	Medio de inducción MS								Medio de inducción MSm							
	Material	Emb	TC	CC	SCC	TSVC	R	SSC	Ap/Tc	Emb	TC	CC	SCC	TSVC	R	SSC
Bd160	60	0,98	0,00	---	1,06	1,05	1,06	0,00	60	0,63	0,00	--	0,31	0,20	1,06	0,00
Bd162	120	0,85	0,27	2,51	1,60	1,30	1,25	0,07	60	0,31	0,21	0,00	0,00	0,00	1,25	0,00
Bd169	160	0,58	0,34	1,80	0,69	0,31	0,10	0,013	60	0,98	0,25	0,26	0,61	0,60	0,10	0,16
Bd700	60	0,98	0,05	0,00	0,18	0,18	0,19	0,00	60	0,06	0,00	---	0,25	0,01	0,19	0,00
Bd701	60	0,66	0,32	1,23	0,40	0,26	0,00	0,00	60	0,83	0,24	2,08	0,78	0,65	0,00	0,02
Bd900	60	1,00	0,10	0,00	0,05	0,05	0,05	0,00	60	0,45	0,22	0,00	0,29	0,13	0,05	0,00
Bd1200	60	0,83	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	60	0,70	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
'Zulema'	60	0,71	0,39	0,70	1,09	0,78	1,34	0,00	60	0,86	0,23	6,16	1,67	1,45	1,34	0,00
Bd114	60	0,81	0,91	0,26	0,23	0,18	0,00	0,04	60	0,21	1,00	0,38	0,38	0,08	0,00	0,00
Bd115	60	0,78	0,55	0,88	0,59	0,46	0,23	0,21	60	1,00	0,71	0,48	0,35	0,35	0,23	0,10
Bd129	60	0,00	---	---	---	---	---	---	60	0,00	---	---	---	---	---	---
Bd485	60	0,08	1,00	0,20	0,20	0,01	0,00	0,40	60	0,00	---	---	---	---	---	---
Bd146	60	0,78	0,23	1,27	0,57	0,45	0,36	0,00	140	0,45	0,27	3,06	0,94	0,39	0,36	0,01
Bd176	80	0,97	0,18	2,33	0,45	0,37	0,03	0,03	60	0,63	0,43	2,53	1,16	0,58	0,03	0,06
Bd217	60	0,56	0,32	0,63	0,91	0,51	1,04	0,00	60	0,18	0,36	2,50	0,90	0,16	1,04	0,00
Bd220	60	0,90	0,35	3,73	1,42	1,28	0,17	0,22	60	1,00	0,55	1,48	0,81	0,81	0,17	0,03
Bd238	60	0,88	0,32	3,17	1,37	1,21	0,52	0,03	60	0,31	0,42	3,12	1,94	0,61	0,52	0,00
Bd250	60	0,81	0,48	0,50	0,48	0,40	0,48	0,00	60	0,76	0,69	6,16	4,26	1,85	0,48	0,07
Bd260	60	0,78	0,34	2,31	1,19	0,93	0,61	0,00	60	0,73	0,18	0,87	0,75	0,55	0,61	0,00
Bd341	60	0,45	0,58	8,21	4,79	1,91	0,00	0,00	60	1,00	0,36	9,95	4,03	4,03	0,00	0,08
Bd343	60	0,88	0,72	0,12	0,09	0,05	0,00	0,00	60	0,96	0,56	0,48	0,29	0,28	0,00	0,01
Bd361	60	0,00	---	---	---	---	---	---	60	0,65	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bd409	60	0,96	0,68	0,77	0,79	0,76	0,83	0,00	60	0,30	0,83	5,53	4,66	1,40	0,83	0,00
Bd486	60	0,00	---	---	---	---	---	---	60	1,00	0,25	3,06	0,95	0,95	0,00	0,73
'Ibros'	60	0,98	0,23	2,35	0,69	0,68	0,17	0,00	60	0,63	0,36	3,00	1,10	0,70	0,17	0,02

Las poblaciones Bd361 y Bd486 no formaron callos a partir de los embriones sembrados en el medio MS. Del mismo modo, la población Bd485 no dio callos a partir de los embriones sembrados en el medio MSm. Por el contrario, las poblaciones Bd115, Bd146, Bd169, Bd220, Bd341, Bd343 y Bd486 han desarrollado callos a partir de prácticamente el 100% de los embriones inmaduros. Otras poblaciones como Bd114, Bd115, Bd341, Bd343, Bd409 y la variedad 'Zulema' mostraron el mismo comportamiento en medio MS.

b) Segunda etapa: regeneración de plántulas

Tras la fase de inducción y transcurridas cuatro semanas desde la puesta en cultivo de los embriones inmaduros, los callos obtenidos se pasaron al medio de regeneración (RB). A partir de los dos tipos de callos, se desarrollaron brotes verdes y algunos albinos. Después de cuatro o cinco semanas en el medio RB, se contabilizaron los brotes producidos, verdes y albinos, a partir de cada uno de los callos. Partiendo de los datos de conteo de los brotes, se han calculado las siguientes variables: $SCC = \text{número de brotes verdes producidos a partir de callos compactos} / \text{total de callos embriogénicos}$, $SSC = \text{número de brotes verdes producidos a partir de callos fofos} / \text{número total de callos fofos}$, $TSVC = \text{número total de brotes verdes} / \text{número total de callos}$, $Ap/Tc = \text{número total de brotes albinos} / \text{total de callos}$ y por último $R = \text{número total de brotes verdes} / \text{número total de embriones inmaduros cultivados}$ (Tabla 4.3).

El número máximo de brotes verdes procedentes de callos compactos, SCC, se obtuvo en las muestras de la población Bd341, de $2n=30$, alcanzando un valor de 8,21 en los callos procedentes del medio MS y de 9,95 a partir de los callos obtenidos en el medio MSm, aún cuando los resultados no habían sido tan destacados en la fase de inducción de callos. Por otro lado, en las poblaciones Bd700, Bd900 y Bd1200, todas ellas de $2n=10$, no se desarrollaron brotes verdes a partir de callos compactos.

La producción de brotes verdes a partir de callos fofos (SSC) alcanzó los valores más altos en los callos originados a partir de embriones inmaduros de las poblaciones Bd160, Bd162 y de la variedad 'Zulema', todas ellas de $2n=10$.

La variable SCC refleja el potencial que tienen los callos embriogénicos para regenerar plantas verdes. Se observan diferencias entre los callos procedentes del medio MS y del medio MSm. En el primer caso, la población Bd341, de $2n=30$, es la que alcanzó los valores más altos (4,79) y en los callos procedentes del medio MSm fueron las poblaciones Bd409, Bd250 y Bd341, todas de $2n=30$, las que mostraron los valores más altos: 4,66; 4,26 y 4,03, respectivamente.

La variable R se puede considerar como una estimación del "esfuerzo" que hay que realizar hasta conseguir regenerar una planta verde a partir del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros, y permite ordenar las distintas poblaciones y líneas según su potencial. En este sentido, vuelve a ser la población Bd341 la que muestra valores más altos, en especial cuando se utiliza como medio de inducción de callos el medio MSm, con un valor para R de 4,03. Sin embargo, en el medio de inducción MS este valor resultó ser algo menor de la mitad.

Finalmente, la regeneración de plantas albinas ha sido muy baja tanto en los callos obtenidos en el medio MS como en el medio MSm. En la Figura 4.9, se muestran algunos ejemplos de regeneración de plantas a partir de diferentes tipos de callos.



❖ *Figura 4. 9: Regeneración de brotes verdes en medios MS y MSm, a partir de embriones inmaduros procedentes de las poblaciones Bd485 y Bd341 respectivamente de B. distachyon*

c) Estudio de la influencia del número de cromosomas y correlaciones entre las variables calculadas

Se ha calculado la media y la desviación típica de cada una de las variables analizadas en función del medio de inducción de callos, teniendo en cuenta el conjunto de datos de todos los materiales estudiados agrupando las poblaciones de acuerdo con el número de cromosomas. Los resultados se registran en la Tabla 4.4. Para comparar las medias en función del medio de inducción de callos se ha utilizado la prueba de ‘t de Student’, para cada una de las variables y agrupaciones de los materiales, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los casos.

❖ *Tabla 4. 4: Influencia del medio de cultivo utilizado (MS y MSm) en la inducción de callos y la regeneración de plantas en las poblaciones de B. distachyon para el conjunto de materiales estudiados y agrupados en función de su constitución cromosómica.*

<i>Material analizado</i>	<i>Variables</i>													
	<i>TC</i>		<i>CC</i>		<i>SCC</i>		<i>TSVC</i>		<i>R</i>		<i>SSC</i>		<i>Ap/Tc</i>	
	<i>MS</i>	<i>MSm</i>	<i>MS</i>	<i>MSm</i>	<i>MS</i>	<i>MSm</i>	<i>MS</i>	<i>MSm</i>	<i>MS</i>	<i>MSm</i>	<i>MS</i>	<i>MSm</i>	<i>MS</i>	<i>MSm</i>
Todas las poblaciones	0,72	0,61	0,38	0,36	1,57	2,44	0,86	1,15	0,60	0,69	0,39	0,25	0,04	0,06
+ 'Ibros' y 'Zulema'	(0,30)	(0,32)	(0,27)	(0,26)	(1,88)	(2,64)	(0,99)	(1,35)	(0,51)	(0,88)	(0,45)	(0,30)	(0,10)	(0,15)
'Zulema'+Poblaciones	0,83	0,61	0,20	0,15	0,89	1,42	0,64	0,49	0,49	0,38	0,51	0,30	0,01	0,02
2n=10	(0,16)	(0,31)	(0,15)	(0,11)	(1,00)	(2,46)	(0,58)	(0,55)	0,49)	(0,50)	(0,60)	(0,23)	(0,02)	(0,06)
Poblaciones	0,56	0,41	0,82	0,86	0,45	0,44	0,35	0,36	0,22	0,21	0,08	0	0,22	0,05
2n=20	(0,42)	(0,52)	(0,24)	(0,19)	(0,37)	(0,08)	(0,22)	(0,02)	(0,22)	(0,19)	(0,14)	0	(0,18)	(0,07)
'Ibros'+ Poblaciones	0,69	0,66	0,41	0,41	2,31	3,21	1,16	1,68	0,78	0,95	0,38	0,26	0,03	0,08
2n=30	(0,34)	(0,28)	(0,19)	(0,20)	(2,28)	(2,69)	(1,27)	(1,58)	(0,53)	(1,05)	(0,35)	(0,34)	(0,06)	(0,19)

En la Tabla 4.5 se registran los resultados de un análisis de correlación entre las variables que caracterizaron las fases de inducción de callos y de regeneración. Se obtuvieron

correlaciones positivas y significativas entre las siguientes variables TSVC y SCC, TSVC y SSC, TSVC y R y R y SCC.

- ❖ *Tabla 4. 5: Correlaciones basadas en el coeficiente de Pearson calculado con respecto a la fase de inducción y de regeneración de las 23 poblaciones de Brachypodium y las dos líneas comerciales (*, ***= significativa $p<0.05$ y $p<0.001$ respectivamente)*

Variables	Variables					
	TC	CC	SCC	TSVC	R	SSC
CC	0,229					
SCC	0,144	0,098				
TSVC	0,115	0,221	0,949 ***			
R	0,2434	0,219	0,944 ***	0,982 ***		
SSC	-0,171	0,015	0,339	0,503 *	0,435 *	
Ap/Tc	-0,124	-0,011	0,168	0,045	0,008	-0,091

4.3.1.2 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN MEDIO DE CULTIVO-POBLACIÓN

El factor más importante en la respuesta al cultivo *in vitro* es el genotípico. No obstante, el éxito de la respuesta al cultivo *in vitro* también puede depender de las condiciones del cultivo y particularmente de los componentes del medio donde se desarrollan las diferentes fases de esta técnica.

Así, los embriones inmaduros de la población Bd486 produjeron callos (embriogénicos + fofos) en el 100% de los casos cuando se utiliza el medio de inducción MSm, mientras que en el medio MS no se obtuvo ningún callo. Sin embargo, en el caso de la población Bd220 se obtuvieron respuestas similares de formación de callos, independiente del medio de inducción empleado. Por otra parte, los embriones de la población Bd129 no dieron lugar a ningún callo por lo que debe tratarse de una población recalcitrante al cultivo *in vitro*, al menos en las condiciones y medios utilizados en el presente estudio.

Aunque los dos medios de cultivo (MS y MSm) son muy similares y tan sólo se diferencian en la fuente de carbono, se ha observado que existe una influencia de los mismos tanto en la respuesta de los embriones inmaduros para la formación de callos, como en la capacidad de estos para regenerar plantas, por lo que no es posible elegir un único medio de aplicación que sea válido para toda la colección.

A partir de los resultados de este primer experimento, se planteó realizar otro ensayo, seleccionándose de cada uno de los niveles cromosómicos dos poblaciones e incrementándose hasta 9 el número de medios de cultivo para la inducción de callos, diferenciando entre ellos el regulador de crecimiento empleado (2,4-D, Dicamba, Piclorán) y su concentración.

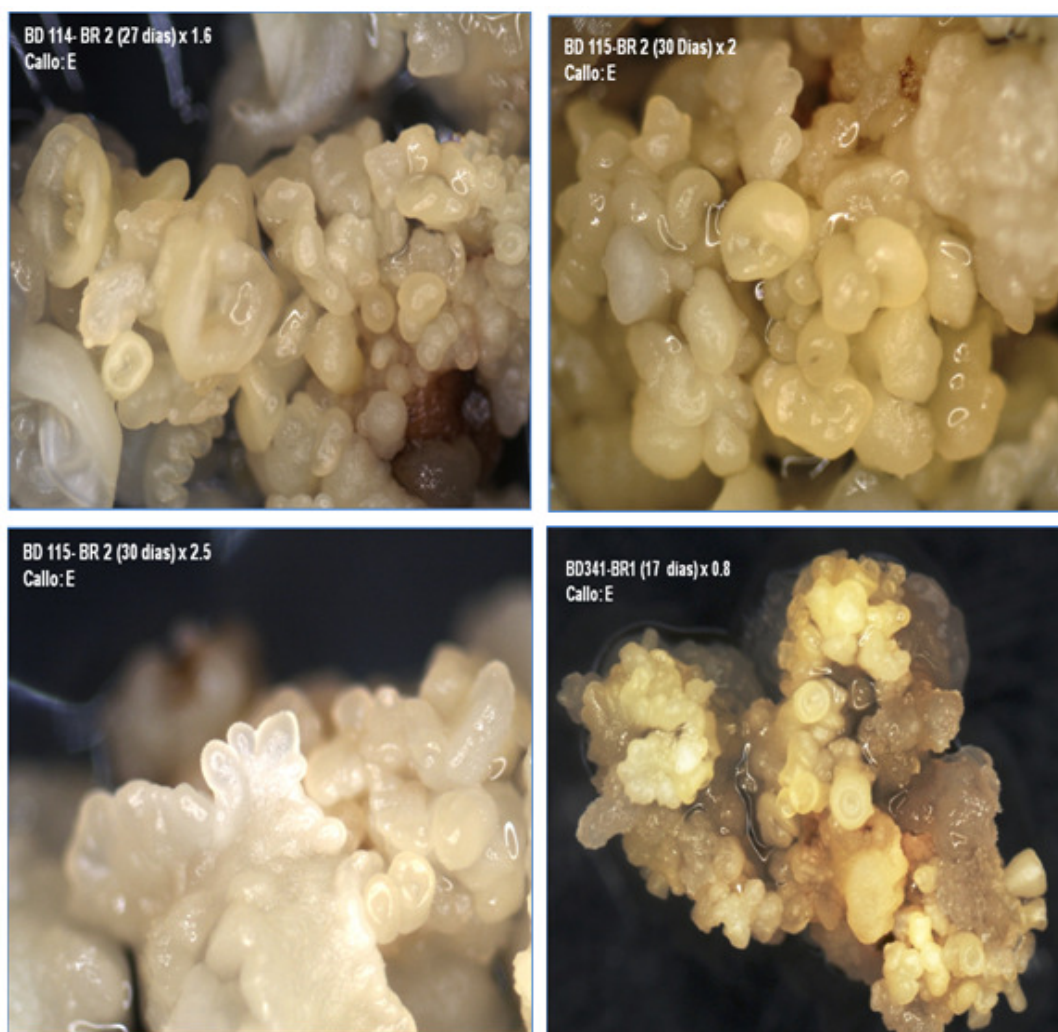
4.3.2 Resultados del segundo ensayo

Para este nuevo experimento se seleccionaron las siguientes poblaciones: Bd160 y 'Zulema' ($2n=10$); Bd114 y Bd115 ($2n=20$); Bd238 y Bd341 ($2n=30$) y el estudio se dirigió al análisis de la formación de callos embriogénicos y la regeneración de brotes verdes, en función de los diferentes niveles cromosómicos y medios de cultivo empleados.

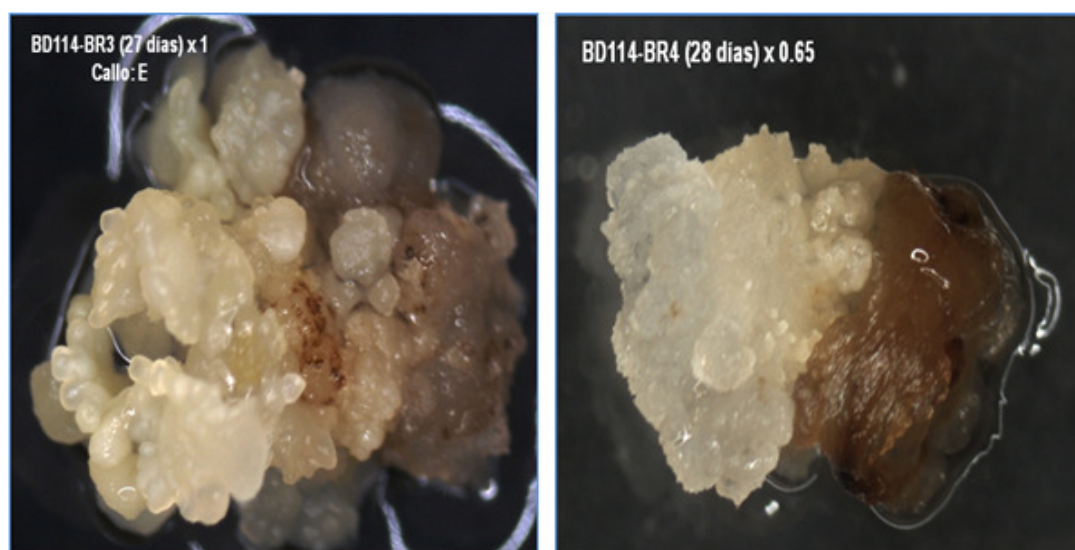
4.3.2.1 INDUCCIÓN DE CALLOS

Los medios de cultivo usados se diferenciaron en el tipo y concentración de hormona incorporada al medio (ver apartado de Materiales y Métodos). El número total de embriones puestos en cultivo en los diferentes medios ha sido de 4.320.

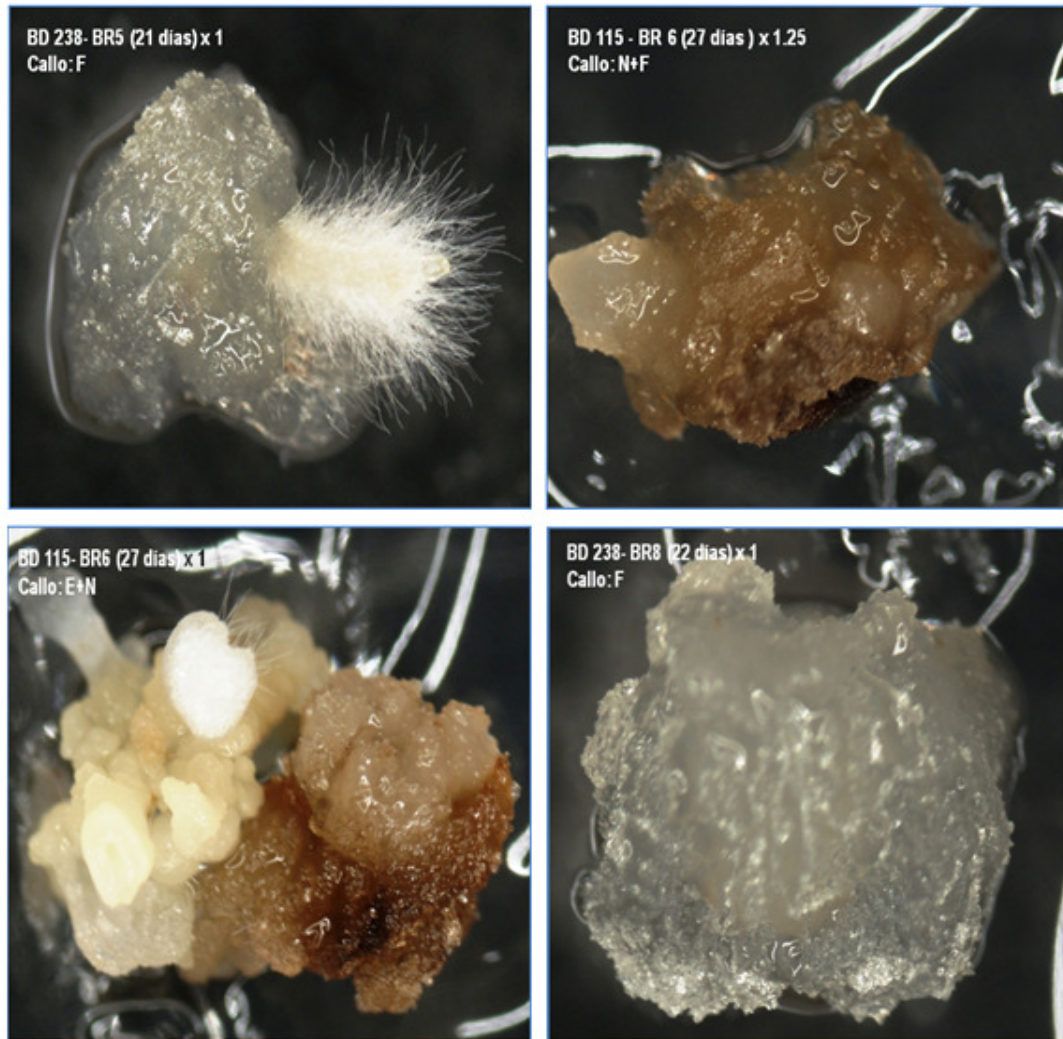
Se sembraron 80 embriones distribuidos en cuatro replicas a razón de 20 embriones/replica, en cada uno de los nueve medios de inducción de callos. Después de un mes de cultivo se observaron diferentes tipos de callos: compactos o embriogénicos, "fofos", necróticos y en algunos casos varios tipos en un mismo embrión. En las Figuras 4.10 a 4.12 se muestran algunos ejemplos de los diferentes tipos encontrados.



❖ *Figura 4. 10: Respuesta a la inducción de callos embriogénicos sobre medios BR1y BR2 de los embriones inmaduros procedentes de Bd114 (2n=20), Bd115 (2n=20) y Bd341 (2n=30).*



❖ *Figura 4. 11: Respuesta a la inducción de callos embriogénicos sobre medios BR3 y BR4 de embriones inmaduros procedentes de Bd114 (2n=20)*



❖ *Figura 4. 12 : Respuesta del cultivo in vitro sobre medios BR5, BR6 y BR8 de las poblaciones Bd238 (2n=30) y Bd115(2n=20)*

En la Tabla 4.6 se presentan los resultados de la respuesta a la formación de los callos a partir de los embriones de cada una de las poblaciones, en función de la réplica y del medio de cultivo de inducción de callos empleado.

4. Resultados

- ❖ *Tabla 4. 6: Resultados obtenidos para cada una de las poblaciones en función de la réplica y del medio de cultivo de inducción de callos empleado. A partir de los datos se han calculado las siguientes variables: TC= n° de callos totales/n° total de embriones; CC= n° de callos compactos/ n° total de callos; SC= n° de callos fofos/ n° total de callos.*

Población	Medio de inducción	Replica	N° de embriones	N° total de callos	N° de callos embriogénicos	N° de callos fofos	TC	CC	SC
<i>Bd160</i>	BR1	1	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR1	2	20	14	0	14	0,70	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR1	3	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR1	4	20	14	0	14	0,70	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR2	1	19	19	1	18	1,00	0,05	0,95
<i>Bd160</i>	BR2	2	10	8	0	8	0,80	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR2	3	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR2	4	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR3	1	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR3	2	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR3	3	20	10	0	10	0,50	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR3	4	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR4	1	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR4	2	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR4	3	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR4	4	20	17	0	17	0,85	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR5	1	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR5	2	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR5	3	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR5	4	20	17	0	17	0,85	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR6	1	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR6	2	18	18	0	18	1,00	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR6	3	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR6	4	20	18	0	18	0,90	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR7	1	20	17	0	17	0,85	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR7	2	19	16	0	16	0,84	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR7	3	20	16	0	16	0,80	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR7	4	20	5	0	5	0,25	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR8	1	19	18	0	18	0,95	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR8	2	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR8	3	20	16	0	16	0,80	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR8	4	20	10	0	10	0,50	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR9	1	19	16	0	16	0,84	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR9	2	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR9	3	19	17	0	17	0,89	0,00	1,00
<i>Bd160</i>	BR9	4	20	4	0	4	0,20	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR1	1	20	18	1	18	0,90	0,05	1,00
<i>Bd3113</i>	BR1	2	20	18	0	18	0,90	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR1	3	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR1	4	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR2	1	20	19	1	18	0,95	0,05	0,95

4. Resultados

<i>Bd3113</i>	BR2	2	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR2	3	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR2	4	20	18	0	18	0,90	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR3	1	20	19	2	17	0,95	0,11	0,90
<i>Bd3113</i>	BR3	2	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR3	3	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR3	4	20	19	1	18	0,95	0,05	0,95
<i>Bd3113</i>	BR4	1	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR4	2	20	15	0	15	0,75	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR4	3	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR4	4	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR5	1	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR5	2	20	17	0	17	0,85	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR5	3	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR5	4	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR6	1	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR6	2	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR6	3	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR6	4	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR7	1	19	13	0	13	0,68	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR7	2	20	15	0	15	0,75	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR7	3	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR7	4	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR8	1	16	13	0	13	0,81	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR8	2	18	17	0	17	0,94	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR8	3	20	9	0	9	0,45	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR8	4	20	19	0	19	0,95	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR9	1	20	17	0	17	0,85	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR9	2	20	15	0	15	0,75	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR9	3	19	15	0	15	0,79	0,00	1,00
<i>Bd3113</i>	BR9	4	20	18	0	18	0,90	0,00	1,00
<i>Bd114</i>	BR1	1	20	9	8	1	0,45	0,89	0,11
<i>Bd114</i>	BR1	2	20	17	6	11	0,85	0,35	0,65
<i>Bd114</i>	BR1	3	21	20	12	8	0,95	0,60	0,40
<i>Bd114</i>	BR1	4	9	8	1	7	0,89	0,12	0,87
<i>Bd114</i>	BR2	1	20	19	9	10	0,95	0,47	0,53
<i>Bd114</i>	BR2	2	19	19	15	4	1,00	0,79	0,21
<i>Bd114</i>	BR2	3	20	19	12	7	0,95	0,63	0,37
<i>Bd114</i>	BR2	4	9	8	5	3	0,89	0,62	0,37
<i>Bd114</i>	BR3	1	20	18	8	10	0,90	0,44	0,56
<i>Bd114</i>	BR3	2	19	19	15	4	1,00	0,79	0,21
<i>Bd114</i>	BR3	3	20	18	14	4	0,90	0,78	0,22
<i>Bd114</i>	BR3	4	16	12	1	11	0,75	0,08	0,92
<i>Bd114</i>	BR4	1	20	11	0	11	0,55	0,00	1,00
<i>Bd114</i>	BR4	2	19	5	5	0	0,26	1,00	0,00
<i>Bd114</i>	BR4	3	17	0	0	0	0,00	0,00	0,00
<i>Bd114</i>	BR4	4	8	1	0	1	0,12	0,00	1,00
<i>Bd114</i>	BR5	1	20	11	11	0	0,55	1,00	0,00
<i>Bd114</i>	BR5	2	19	6	6	0	0,32	1,00	0,00

4. Resultados

<i>Bd114</i>	BR5	3	20	10	8	2	0,50	0,80	0,20
<i>Bd114</i>	BR5	4	20	8	8	0	0,40	1,00	0,00
<i>Bd114</i>	BR6	1	19	13	9	4	0,68	0,69	0,31
<i>Bd114</i>	BR6	2	19	13	9	4	0,68	0,69	0,31
<i>Bd114</i>	BR6	3	20	2	2	0	0,10	1,00	0,00
<i>Bd114</i>	BR6	4	19	4	2	2	0,21	0,50	0,50
<i>Bd114</i>	BR7	1	20	0	0	0	0,00	0,00	0,00
<i>Bd114</i>	BR7	2	20	0	0	0	0,00	0,00	0,00
<i>Bd114</i>	BR7	3	20	1	0	1	0,05	0,00	1,00
<i>Bd114</i>	BR7	4	20	5	0	5	0,25	0,00	1,00
<i>Bd114</i>	BR8	1	20	4	0	4	0,20	0,00	1,00
<i>Bd114</i>	BR8	2	20	4	0	4	0,20	0,00	1,00
<i>Bd114</i>	BR8	3	20	10	2	8	0,50	0,20	0,80
<i>Bd114</i>	BR8	4	25	7	2	5	0,28	0,29	0,71
<i>Bd114</i>	BR9	1	18	7	5	2	0,39	0,71	0,29
<i>Bd114</i>	BR9	2	19	5	5	0	0,26	1,00	0,00
<i>Bd114</i>	BR9	3	18	18	14	4	1,00	0,78	0,22
<i>Bd114</i>	BR9	4	20	7	3	4	0,35	0,43	0,57
<i>Bd115</i>	BR1	1	22	19	17	2	0,86	0,89	0,10
<i>Bd115</i>	BR1	2	20	20	17	3	1,00	0,85	0,15
<i>Bd115</i>	BR1	3	20	20	17	3	1,00	0,85	0,15
<i>Bd115</i>	BR1	4	14	5	4	1	0,36	0,80	0,20
<i>Bd115</i>	BR2	1	20	16	13	3	0,80	0,81	0,19
<i>Bd115</i>	BR2	2	18	15	10	5	0,83	0,67	0,33
<i>Bd115</i>	BR2	3	20	15	11	4	0,75	0,73	0,27
<i>Bd115</i>	BR2	4	15	10	6	4	0,67	0,60	0,40
<i>Bd115</i>	BR3	1	20	19	17	2	0,95	0,89	0,10
<i>Bd115</i>	BR3	2	20	19	8	11	0,95	0,42	0,58
<i>Bd115</i>	BR3	3	20	20	12	8	1,00	0,60	0,40
<i>Bd115</i>	BR3	4	20	14	8	6	0,70	0,57	0,43
<i>Bd115</i>	BR4	1	10	0	0	0	0,00	0,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR4	2	16	0	0	0	0,00	0,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR4	3	18	8	1	7	0,44	0,12	0,88
<i>Bd115</i>	BR4	4	20	11	1	0	0,55	0,10	0,00
<i>Bd115</i>	BR5	1	20	3	3	0	0,15	1,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR5	2	20	10	4	6	0,50	0,40	0,60
<i>Bd115</i>	BR5	3	20	6	6	0	0,30	1,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR5	4	10	7	0	7	0,70	0,00	1,00
<i>Bd115</i>	BR6	1	20	7	7	0	0,35	1,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR6	2	20	5	5	0	0,25	1,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR6	3	20	3	3	0	0,15	1,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR6	4	10	7	0	7	0,70	0,00	1,00
<i>Bd115</i>	BR7	1	20	0	0	0	0,00	0,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR7	2	20	0	0	0	0,00	0,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR7	3	20	0	0	0	0,00	0,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR7	4	10	7	0	7	0,70	0,00	1,00
<i>Bd115</i>	BR8	1	10	5	5	0	0,50	1,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR8	2	18	0	0	0	0,00	0,00	0,00
<i>Bd115</i>	BR8	3	16	4	2	2	0,25	0,50	0,50

4. Resultados

<i>Bd115</i>	BR8	4	19	8	1	7	0,42	0,12	0,88
<i>Bd115</i>	BR9	1	17	9	2	7	0,53	0,22	0,78
<i>Bd115</i>	BR9	2	15	9	0	9	0,60	0,00	1,00
<i>Bd115</i>	BR9	3	17	12	3	9	0,71	0,25	0,75
<i>Bd115</i>	BR9	4	18	7	0	7	0,39	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR1	1	15	13	6	7	0,87	0,46	0,54
<i>Bd238</i>	BR1	2	9	9	3	6	1,000	0,33	0,67
<i>Bd238</i>	BR1	3	18	17	11	6	0,94	0,65	0,35
<i>Bd238</i>	BR1	4	20	18	8	10	0,90	0,44	0,56
<i>Bd238</i>	BR2	1	20	19	14	5	0,95	0,74	0,26
<i>Bd238</i>	BR2	2	19	19	18	1	1,00	0,95	0,05
<i>Bd238</i>	BR2	3	20	20	19	1	1,00	0,95	0,05
<i>Bd238</i>	BR2	4	19	19	10	9	1,00	0,53	0,48
<i>Bd238</i>	BR3	1	20	20	18	2	1,00	0,90	0,10
<i>Bd238</i>	BR3	2	20	18	13	5	0,90	0,72	0,30
<i>Bd238</i>	BR3	3	20	19	17	2	0,95	0,89	0,10
<i>Bd238</i>	BR3	4	18	18	7	11	1,00	0,39	0,61
<i>Bd238</i>	BR4	1	18	18	0	18	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR4	2	19	19	0	19	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR4	3	18	18	0	18	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR4	4	20	10	0	10	0,50	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR5	1	19	19	0	19	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR5	2	29	29	0	29	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR5	3	19	9	0	9	0,47	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR5	4	18	18	0	18	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR6	1	18	18	0	18	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR6	2	19	19	1	18	1,00	0,05	0,95
<i>Bd238</i>	BR6	3	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR6	4	18	15	1	14	0,83	0,07	0,93
<i>Bd238</i>	BR7	1	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR7	2	20	20	0	20	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR7	3	20	14	0	14	0,70	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR7	4	20	17	0	17	0,85	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR8	1	19	19	0	19	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR8	2	17	17	0	17	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR8	3	18	18	0	18	1,00	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR8	4	19	9	0	9	0,47	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR9	1	18	8	1	7	0,44	0,12	0,87
<i>Bd238</i>	BR9	2	16	6	0	6	0,40	0,00	1,00
<i>Bd238</i>	BR9	3	18	18	1	17	1,00	0,06	0,94
<i>Bd238</i>	BR9	4	19	18	0	18	0,95	0,00	1,00
<i>Bd341</i>	BR1	1	19	19	13	6	1,00	0,68	0,32
<i>Bd341</i>	BR1	2	20	20	11	9	1,00	0,55	0,45
<i>Bd341</i>	BR1	3	20	20	13	7	1,00	0,65	0,35
<i>Bd341</i>	BR1	4	10	10	5	5	1,00	0,50	0,50
<i>Bd341</i>	BR2	1	20	20	17	3	1,00	0,85	0,15
<i>Bd341</i>	BR2	2	20	20	17	3	1,00	0,85	0,15
<i>Bd341</i>	BR2	3	20	20	14	6	1,00	0,70	0,30
<i>Bd341</i>	BR2	4	7	7	0	7	1,00	0,00	1,00

<i>Bd34I</i>	BR3	1	20	19	17	2	0,95	0,90	0,10
<i>Bd34I</i>	BR3	2	20	20	19	1	1,00	0,95	0,05
<i>Bd34I</i>	BR3	3	20	17	15	2	0,85	0,88	0,12
<i>Bd34I</i>	BR3	4	7	7	7	0	1,00	1,00	0,00
<i>Bd34I</i>	BR4	1	20	19	2	17	0,95	0,10	0,90
<i>Bd34I</i>	BR4	2	12	12	2	10	1,00	0,17	0,83
<i>Bd34I</i>	BR4	3	21	21	7	14	1,00	0,33	0,67
<i>Bd34I</i>	BR4	4	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
<i>Bd34I</i>	BR5	1	20	20	2	18	1,00	0,10	0,90
<i>Bd34I</i>	BR5	2	20	18	3	15	0,90	0,17	0,83
<i>Bd34I</i>	BR5	3	19	11	5	6	0,58	0,45	0,54
<i>Bd34I</i>	BR5	4	17	17	0	17	1,00	0,00	1,00
<i>Bd34I</i>	BR6	1	20	20	9	11	1,00	0,45	0,55
<i>Bd34I</i>	BR6	2	20	20	13	7	1,00	0,65	0,35
<i>Bd34I</i>	BR6	3	20	19	8	11	0,95	0,42	0,58
<i>Bd34I</i>	BR6	4	9	9	2	7	1,00	0,22	0,78
<i>Bd34I</i>	BR7	1	20	18	0	18	0,90	0,00	1,00
<i>Bd34I</i>	BR7	2	20	14	0	14	0,70	0,00	1,00
<i>Bd34I</i>	BR7	3	18	16	14	2	0,89	0,87	0,12
<i>Bd34I</i>	BR7	4	10	9	0	9	0,90	0,00	1,00
<i>Bd34I</i>	BR8	1	18	17	2	15	0,94	0,12	0,88
<i>Bd34I</i>	BR8	2	19	17	2	15	0,89	0,12	0,88
<i>Bd34I</i>	BR8	3	20	19	3	16	0,95	0,16	0,84
<i>Bd34I</i>	BR8	4	4	4	0	4	1,00	0,00	1,00
<i>Bd34I</i>	BR9	1	19	16	0	16	0,84	0,00	1,00
<i>Bd34I</i>	BR9	2	20	18	1	17	0,90	0,06	0,94
<i>Bd34I</i>	BR9	3	20	13	0	13	0,65	0,00	1,00
<i>Bd34I</i>	BR9	4	10	7	0	7	0,70	0,00	1,00

Se ha llevado a cabo un análisis de varianza de dos vías para cada una de las tres variables. TC, CC y SC. Previo a este análisis estadístico, se llevó a cabo la transformación de los valores de las variables en el $\text{arc sen}\sqrt{x}$, con el fin de normalizar la distribución. En la Tabla 4.7 se muestran los resultados del análisis de varianza en función de la población, medio de inducción de callos y la interacción entre ellos. Se puede observar que en todos los casos las diferencias fueron altamente significativas.

❖ *Tabla 4. 7: ANOVA de las tres variables analizadas (TC, CC y SC).*

<i>Variables</i>	<i>Fuente Variación</i>	<i>g.l</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Media de Cuadrados</i>	<i>Coefficiente-F</i>
TC	Población (G)	5	46802,4	9360,47	35,16***
	Medio (M)	8	21677,9	2709,73	10,18***
	G x M	40	19913	497,826	1,87***
	Residuos	162	43129,3	266,23	–
	Total	215	131523	–	–
CC	Población (G)	5	63824,5	12764,9	47,95***
	Medio (M)	8	37106,3	4638,29	17,42***
	G x M	40	48010,9	1200,27	4,51***
	Residuos	162	43125,7	266,208	–
	Total	215	192067,4	–	–
SC	Población (G)	5	106453	21290,6	53,86***
	Medio (M)	8	16332,6	2041,57	5,16***
	G x M	40	45325	1133,13	2,87***
	Residuos	162	64037	395,29	–
	Total	215	232147,6	–	–
***= significativa p<0,001					

A continuación se realizó un test de LSD (Mínima Diferencia Significativa) con el fin de comparar las medias de cada una de las poblaciones y medios de inducción de callos empleados. Los resultados se muestran en la Tabla 4.8

❖ *Tabla 4. 8: Resultados del cálculo de LSD (diferencia mínima significativa) para las variables TC, CC y SC. Las poblaciones y medios que tienen la misma letra no muestran diferencias estadísticamente significativas.*

a)

<i>Población</i>	<i>Variables</i>		
	<i>TC</i>	<i>CC</i>	<i>SC</i>
Bd160	b	a	d
'Zulema'	b	a	d
Bd114	a	b	a
Bd115	a	c	a
Bd238	b	c	c
Bd341	b	c	b

b)

<i>Medio</i>	<i>Variables</i>		
	<i>TC</i>	<i>CC</i>	<i>SC</i>
BR1	cd	d	ab
BR2	d	d	ab
BR3	d	d	a
BR4	ab	a	abc
BR5	bc	bcd	abc
BR6	bcd	cd	abc
BR7	a	a	bc
BR8	ab	ab	c
BR9	ab	abc	c

Los resultados del presente análisis muestran la existencia de un amplio rango de variación para la variable TC entre las muestras de las seis poblaciones utilizadas. Así, las de

2n=20 cromosomas (Bd114 y Bd115) son los que dieron los valores más bajos y se comportaron de manera diferente al resto de las poblaciones, que no mostraron diferencias significativas entre ellas.

Los callos embriogénicos son los que presentan un mayor interés por ser los que generalmente presentan una mayor capacidad para regenerar plántulas. Por ello se ha realizado un estudio de la producción de los callos embriogénicos y también de los callos fofos en las seis poblaciones utilizadas. El análisis de varianza mostró diferencias significativas en todos los casos y el test de LSD para la variable CC indica la existencia de diferencias entre las muestras procedentes de las poblaciones de distintos niveles cromosómicos. Las de Bd160 y 'Zulema', con 2n=10, son los que presentaron una respuesta más baja mientras que las correspondientes a Bd238 y Bd341 con 2n=30 y Bd115 (2n=20) presentaron la respuesta más alta. Respecto a la variable SC, las muestras de 2n=10 cromosomas son los que dieron valores más altos, estadísticamente diferentes a los restantes y en especial a los que tiene 2n=20 que son los que mostraron los valores más bajos.

El análisis de varianza y el test de LSD, de las variables TC y CC en función del medio de inducción de callos, indican que los medios BR1, BR2 y BR3 que están suplementados con tres concentraciones diferentes del 2,4-D (1mg/l, 2mg/l, y 4mg/l, respectivamente) y el medio BR6 conteniendo Dicamba (4mg/l) fueron los que en mayor medida favorecieron la formación de callos totales y en particular de callos compactos, mientras que en los medios BR7, BR8 y BR9 preparados con Piclorán (1mg/l, 2mg/l y 4mg/l, respectivamente) es en los que se observaron los valores más bajos para estas variables.

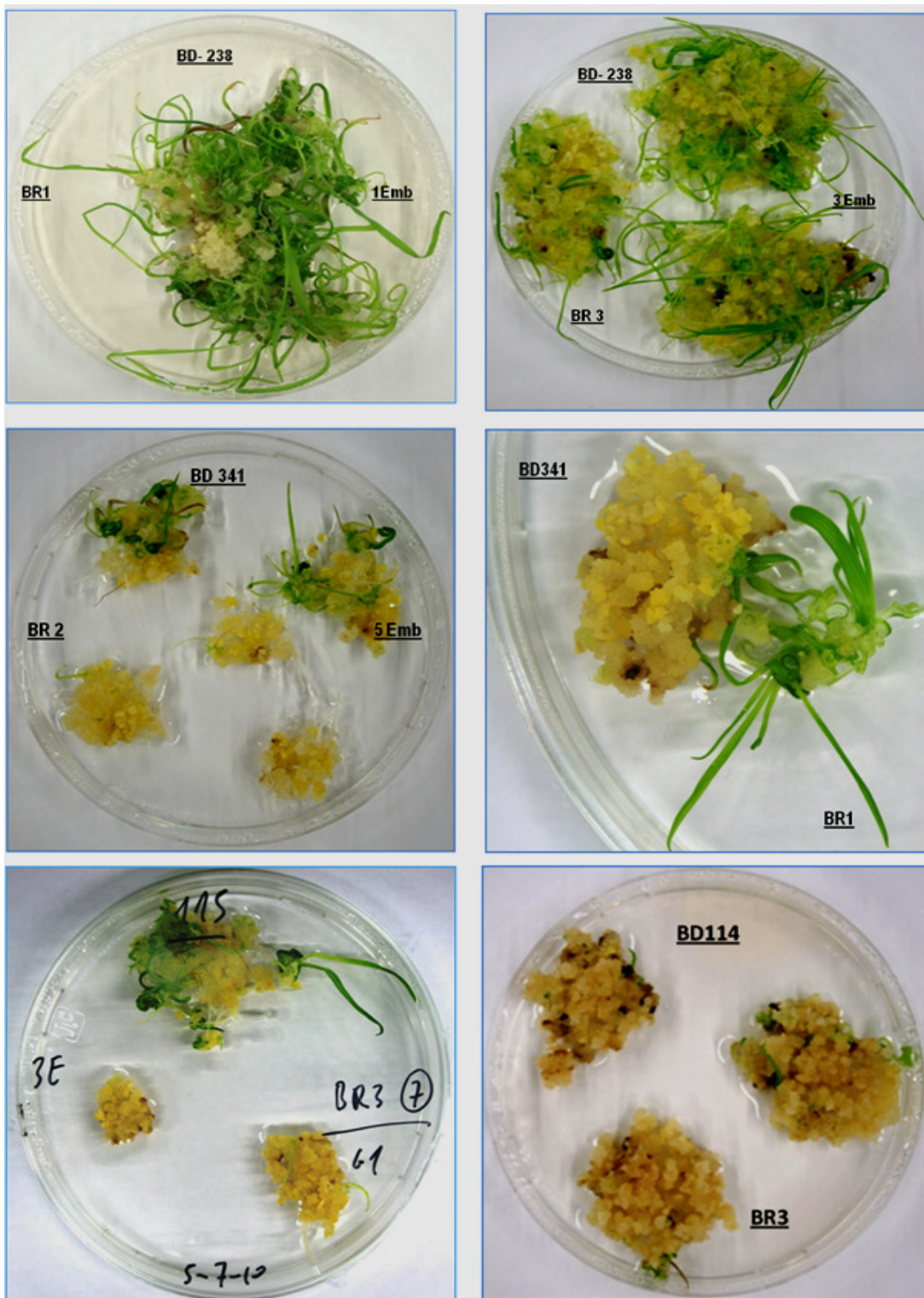
Respecto a la variable SC, la diferencia entre los nueve medios no es tan clara, aunque en general los medios suplementados con Piclorán indujeron una mayor proporción de callos fofos.

Finalmente, la existencia de interacción significativa entre las muestras de las poblaciones y los medios de inducción de callo, para las tres variables analizadas, indica que no se puede seleccionar un medio único para el conjunto de los materiales ya que cada uno de ellos responde de manera diferencial al proceso de inducción de callos.

4.3.2.2 REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE LOS CALLOS

La obtención de plantas verdes a partir de los callos, es una de las etapas más críticas en el proceso de cultivo *in vitro* vegetal. Los callos obtenidos en cada uno de los nueve medios de inducción (BR1 a BR9) se distribuyeron en cuatro réplicas y fueron sembrados en el medio de

germinación G1. En la Figura 4.13 se muestran imágenes de plántulas obtenidas a partir de diferentes poblaciones.



❖ *Figura 4. 13: Resultados de la regeneración de brotes verdes a partir de callos compactos de las poblaciones Bd238, Bd341, Bd115 y Bd114, obtenidos en los medios de inducción BR1, BR2 y BR3.*

Tras un mes de cultivo en una cámara a 22°C con fotoperiodo de 14 horas de luz, se contabilizaron el número de brotes verdes y de brotes albinos regenerados. En la Tabla 4.9 se recogen los valores obtenidos. Se calcularon las siguientes variables:

- **TSC**= número de brotes totales (verdes + albinas)/número total de callos.
- **TSVC**= número de brotes verdes/número total callos.
- **SCC**=número de brotes verdes a partir de callos compactos/número total callos compactos.
- **SSC**=número de brotes verdes a partir de callos fofos/número total callos fofos.
- **R**= Respuesta al cultivo= número total brotes verdes/número total embriones inmaduros

❖ *Tabla 4. 9: Resultados del segundo ensayo de cultivo in vitro realizado con las seis poblaciones de B. distachyon seleccionadas.*

<i>Población</i>	<i>Replica</i>	<i>n°</i>	<i>Total callos</i>	<i>N° CC</i>	<i>N° CS</i>	<i>N° TV</i>	<i>N° TA</i>	<i>N° TV/CC</i>	<i>N° TV/SC</i>	<i>TV+TA</i>	<i>TSC</i>	<i>TSVC</i>	<i>SCC</i>	<i>SSC</i>	<i>R</i>
<i>Bd160</i>	1	158	119	0	127	2	0	0	2	2	0,02	0,02	0,00	0,02	0,01
<i>Bd160</i>	2	154	133	1	132	1	0	0	1	1	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01
<i>Bd160</i>	3	239	173	0	173	3	0	0	3	3	0,02	0,02	0,00	0,02	0,01
<i>Bd160</i>	4	153	167	0	157	4	0	0	4	4	0,02	0,024	0,00	0,02	0,03
<i>Bd3113</i>	1	155	146	1	145	5	0	4	1	5	0,03	0,03	4,00	0,01	0,03
<i>Bd3113</i>	2	160	156	2	154	20	2	16	4	22	0,14	0,13	8,00	0,03	0,12
<i>Bd3113</i>	3	199	168	1	167	7	0	1	6	7	0,04	0,04	1,00	0,03	0,03
<i>Bd3113</i>	4	193	156	2	154	15	2	0	15	17	0,11	0,10	0,00	0,09	0,08
<i>Bd114</i>	1	144	75	45	30	4	28	4	0	32	0,43	0,05	0,09	0,00	0,03
<i>Bd114</i>	2	151	104	60	44	68	37	65	3	105	1,01	0,65	1,08	0,07	0,45
<i>Bd114</i>	3	187	113	68	44	34	44	34	0	78	0,69	0,30	0,50	0,00	0,18
<i>Bd114</i>	4	195	80	51	29	25	14	25	0	39	0,49	0,31	0,49	0,00	0,13
<i>Bd115</i>	1	137	84	48	36	21	65	20	1	86	1,00	0,25	0,42	0,03	0,15
<i>Bd115</i>	2	149	113	61	52	124	67	124	0	191	1,69	1,10	2,03	0,00	0,83
<i>Bd115</i>	3	184	117	73	44	91	67	91	0	158	1,35	0,78	1,25	0,00	0,49
<i>Bd115</i>	4	176	79	29	50	18	16	18	0	34	0,43	0,23	0,63	0,00	0,10
<i>Bd238</i>	1	143	129	14	115	196	6	183	3	202	1,57	1,52	13,07	0,03	1,37
<i>Bd238</i>	2	158	149	61	88	594	85	592	2	679	4,56	3,99	9,70	0,02	3,76
<i>Bd238</i>	3	186	180	42	137	447	42	428	19	489	2,72	2,48	10,19	0,14	2,40
<i>Bd238</i>	4	195	175	28	147	301	10	301	0	311	1,78	1,72	10,75	0,00	1,54
<i>Bd341</i>	1	129	120	27	93	28	12	15	13	40	0,33	0,23	0,56	0,14	0,22
<i>Bd341</i>	2	138	138	73	65	148	54	140	8	202	1,46	1,07	1,92	0,12	1,07
<i>Bd341</i>	3	175	166	72	94	85	68	74	11	153	0,93	0,51	1,03	0,12	0,49
<i>Bd341</i>	4	159	144	36	108	45	37	40	5	82	0,57	0,31	1,11	0,05	0,28

4.3.2.3. ANÁLISIS DE VARIANZA Y CLASIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES

Con el fin de llevar a cabo un análisis de varianza en función de la procedencia de las muestras de población, para cada una de las variables, se han normalizado las distribuciones de las variables transformándolas en:

- *TSC*: $\text{arc sen}\sqrt{x}/10$
- *TSVC*: $\text{arc sen}\sqrt{x}/10$
- *SCC*: $\text{arc sen}\sqrt{x}/100$
- *SSC*: $\text{arc sen}\sqrt{x}/10$
- *R*: $\text{arc sen}\sqrt{x}/10$

En la tabla 4.10 se muestran los resultados del análisis de la varianza de las cinco variables estudiadas.

❖ *Tabla 4. 10: ANOVA de las variables analizadas*

<i>Variables</i>	<i>Fuente de Variación</i>	<i>g.l</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Media de Cuadrados</i>	<i>Coficiente-F</i>
<i>TSC</i>	Entre poblaciones	5	2084,35	416,869	17,61***
	Dentro población	18	425,987	23,6659	–
	Total	23	2510,337	–	–
<i>TSVC</i>	Entre poblaciones	5	1787,27	357,454	17,29***
	Dentro población	18	372,089	10,6716	–
	Total	23	2159,36	–	–
<i>SCC</i>	Entre poblaciones	5	853,622	170,724	16,57***
	Dentro población	18	185,48	10,3044	–
	Total	23	1039,1	–	–
<i>SSC</i>	Entre poblaciones	5	689,915	137,983	3,87 (ns)
	Dentro población	18	641,182	35,6212	–
	Total	23	1331,1	–	–
<i>R</i>	Entre poblaciones	5	1701,76	340,352	17,07***
	Dentro población	18	358,946	19,9414	–
	Total	23	2060,71	–	–

***= significativa $p < 0,001$; (ns)= no significativa

En todos los casos se han observado diferencias estadísticamente significativas, excepto para la variable SSC. La falta de significación para los brotes verdes derivados de callos fofos, probablemente se debe al pequeño número de callos fofos que regeneraron plantas, con una notable variación entre las distintas poblaciones y con desviaciones típicas muy grandes, que hacen que las comparaciones resulten no significativas.

Se ha aplicado un test de LSD para las cuatro variables restantes con el fin de agrupar las poblaciones que presentan una respuesta similar. Los resultados se detallan en la Tabla 4.11.

❖ *Tabla 4. 11: Resultados del cálculo de LSD (diferencia mínima significativa) de las variables TSV, TSVC, SCC, SSC y R*

<i>Población</i>	<i>Variables</i>				
	<i>TSC</i>	<i>TSVC</i>	<i>SCC</i>	<i>SSC</i>	<i>R</i>
<i>Bd160</i>	a	a	a	a	a
<i>'Zulema'</i>	a	ab	b	ab	ab
<i>Bd114</i>	b	bc	ab	a	abc
<i>Bd115</i>	b	c	b	a	bc
<i>Bd238</i>	c	d	c	ab	d
<i>Bd341</i>	b	c	b	b	c

En general se observa que, para las cuatro variables TSC, TSVC, SCC y R las poblaciones con $2n=30$, Bd238 y Bd341 son las que muestran mayores valores, mientras que las poblaciones con $2n=10$, Bd160 y 'Zulema' son las que presentan valores más bajos.

La variable R puede considerarse como una estimación global de la capacidad de una población dada para regenerar plantas a partir del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros. Observando los resultados obtenidos en el test de LSD (Tabla 11), se puede establecer una clasificación de las seis poblaciones ensayadas, siendo la Bd238 la que muestra un valor más elevado, al alcanzar las 2,21 plantas regeneradas por embrión inmaduro cultivado *in vitro*. Este valor es casi cinco veces superior al del siguiente material que es Bd341 que es de 0,47. Las poblaciones que peor aptitud mostraron al cultivo *in vitro* fueron las dos de $2n=10$ y la Bd114 de $2n=20$ cromosomas.

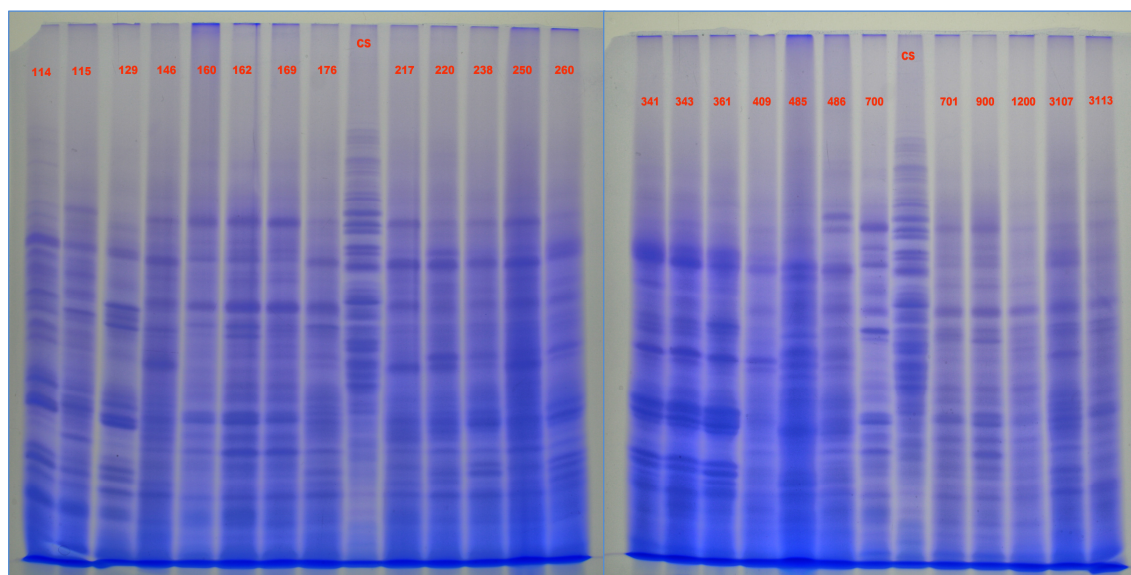
4.4 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD INTER E INTRA-POBLACIONAL PARA PROTEÍNAS DE RESERVA DEL ENDOSPERMO TOTALES Y DE TIPO GLUTENINAS DE *B. distachyon*

4.4.1 Estudio de las proteínas totales

La extracción de proteínas de reserva del endospermo, de acuerdo con el método de Singh y Shephred, (1991) ha permitido llevar a cabo una aproximación al estudio de la diversidad de una colección de 23 las poblaciones de *B. distachyon*, junto con muestras de las dos líneas comerciales.

En la Figura 4.14 vemos el resultado de la separación de las proteínas de un conjunto de plantas de cada una de las 23 poblaciones analizadas (Bd114 a Bd1200). A modo de control, se

incluye en cada gel una muestra de proteínas del trigo ‘Chinese Spring’ (CS) y las dos poblaciones comercializadas ‘Ibros’ (3107) y ‘Zulema’ (3113).



❖ *Figura 4. 14: Electroforesis bifásica de las proteínas de reserva del endospermo de cada población. Los números de la cabecera corresponden a las denominaciones de las poblaciones (CS = *T. aestivum* ‘Chinese Spring’; 3107 = ‘Ibros’; 3113 = ‘Zulema’)*

La comparación de los perfiles electroforéticos y el cálculo del Rf (factor de recorrido) de cada proteína permite determinar las que son comunes y diferentes en el conjunto de las poblaciones. Se han detectado un total de 23 bandas de proteínas variables. El total de patrones electroforéticos diferentes observados fue de 24, es decir, prácticamente cada población presentó un perfil electroforético de proteínas diferente, con la única excepción de las poblaciones Bd341 y Bd343 que mostraron el mismo patrón de bandas. El número de bandas analizadas por población varió desde 12 (poblaciones Bd409 y Bd485) hasta 18 (poblaciones Bd169, Bd176 y la línea ‘Zulema’)

Tras la determinación del número de bandas comunes y propias de cada población, se hizo una matriz de presencia-ausencia de las proteínas y se procedió al análisis de similitud entre las poblaciones. Para ello, se ha calculado el coeficiente de correlación de Pearson.

En la Tabla 4.12 se registran los patrones electroforéticos de las poblaciones de acuerdo con la presencia o ausencia de cada una de las 23 proteínas observadas. Al observar estos resultados se aprecia que las proteínas ‘2’ y ‘201’ son alternativas mutuamente excluyentes, por lo que se podrían considerar productos de alelos de un mismo gen.

Algunas proteínas como la ‘1’ (frec. 0,04) están presentes en una única población, otras como la ‘19’ (frec. 0,96), o la ‘9’ (frec. 0,92) están solo ausentes en una ó dos poblaciones. En

general, cada población presenta un perfil y las proteínas se presentan o están ausentes de forma variable en cada población.

El hecho de la ausencia de una proteína muy común para la especie, o el caso opuesto la presencia de una proteína ausente en la mayoría de las poblaciones de la especie, confiere a estas proteínas un especial valor discriminatorio. En general se aprecia una elevada diversidad de la presencia-ausencia de la mayoría de las proteínas entre las distintas poblaciones.

La matriz de presencia ausencia de las proteínas se ha utilizado para hacer un análisis de correlación entre las poblaciones de *B. distachyon*. El coeficiente de correlación se ha utilizado para hacer una agrupación de las diferentes accesiones utilizando el método UPGMA. En la Figura 4.15 se registra el dendograma correspondiente a la agrupación de las poblaciones de acuerdo con los índices de correlación del conjunto de proteínas totales del endospermo.

La agrupación de las distintas poblaciones muestra la distribución en cinco grupos. Se aprecia que hay dos grandes grupos que presentan una correlación por debajo de 0, lo que significa que en sus perfiles existen múltiples proteínas con tendencias opuestas. El grupo constituido por las poblaciones Bd115, Bd160, Bd162, Bd160, Bd701, Bd700, Bd900 y Bd1200 (parte inferior del dendograma) constituye un grupo de poblaciones recolectadas preferentemente en zonas elevadas del centro peninsular (Guadalajara, Cuenca, Albacete y Jaén).

El primer grupo lo constituyeron las poblaciones Bd114, Bd176 y Bd485 recolectadas en Jaén, Córdoba y Alicante, que aparentemente no tienen relación de carácter geográfico, pero cuyos perfiles electroforéticos han presentado similitud entre sí y se apartan del resto de poblaciones. Las tres poblaciones han presentado un perfil coincidente de presencia o ausencia para 9 proteínas (201, 3, 4, 15, 17, 18, 20, 21 y 22), algunas de las cuales (201 y 4) estuvieron presentes en estas poblaciones siendo raras en el resto.

Otro grupo diferenciado es el constituido por las poblaciones Bd129, Bd341, Bd343, Bd361 y Bd409. De este las poblaciones Bd341 y Bd343 han mostrado el mismo perfil electroforético y máxima correlación, con una sola diferencia con respecto a la Bd361. Las poblaciones Bd341 y Bd343 tienen un origen geográfico próximo (Huelva y Sevilla, respectivamente). El conjunto de las tres poblaciones (Bd341, Bd343 y Bd361) es el que ha presentado un índice de correlación entre sí más alto de toda la colección. A estas tres poblaciones se unió la Bd409 con un coeficiente de correlación cercano a 0,65. La Bd361, procede de Córdoba y la Bd409 de Valencia, sin aparente relación eco-geográfica.

El tercer grupo es amplio, presentó tres grupos distintos e incluye las líneas comerciales ('Ibros' y 'Zulema') previamente seleccionadas y domesticadas. El primer subgrupo está formado por las poblaciones Bd146, Bd250 y 'Zulema', que compartieron un total de 14

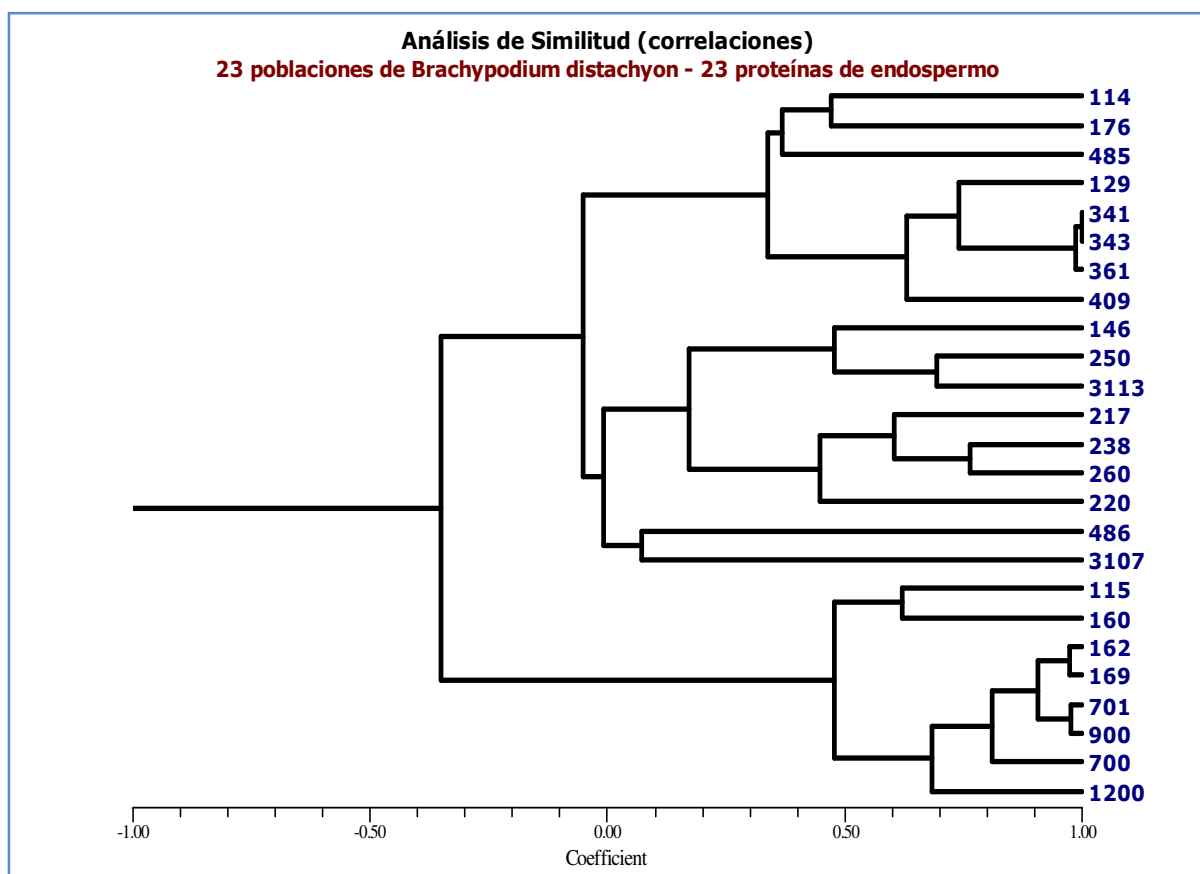
proteínas pero se distinguieron entre ellas por un número de proteínas adicionales que varió en 2 en el caso de la población Bd250 hasta 5 por 'Zulema', que presentó un perfil rico en proteínas con un total de 18. Las dos primeras poblaciones proceden de altitud y ambientes bioclimáticos muy similares (meso-mediterráneo inferior). El segundo subgrupo la componen cuatro poblaciones de origen mediterráneo próximo, las Bd217 y Bd220 de Almería, y las Bd238y Bd260 de Málaga. Todas compartieron un número alto de proteínas y coinciden en el horizonte bioclimático y parecida altitud de la procedencia de las muestras. Unido a las anteriores poblaciones pero con un coeficiente de correlación muy bajo quedó la población Bd486, de una procedencia alejada a todas las anteriores, ya que fue recogida en Tarragona a un nivel próximo al nivel del mar. Cabe destacar que la población Bd486 posee 17 proteínas, entre las cuales se incluye una proteína, inexistente en las restantes poblaciones de la colección analizada.

Con coeficiente de correlación negativo, respecto al resto del agrupamiento, aparece otro grupo que formaron un conjunto de poblaciones que se distribuyeron en dos sub-clústeres más pequeños. En primer lugar, las poblaciones Bd115 y Bd160, ambas de Albacete con un coeficiente de correlación próximo a 0,65. El grupo restante está constituido por las poblaciones Bd160, Bd169, Bd700, Bd701, Bd900 y Bd1200, todas procedentes de áreas geográficamente próximas y factores eco-geográficos, climáticos y edafológicos muy próximos de las regiones de Guadalajara, Cuenca y Jaén. De ellas, las cuatro poblaciones de distintas localizaciones de Guadalajara han mostrado un perfil electroforético de proteínas muy semejante, careciendo excepcionalmente todas ellas de la proteína 22, que está presente en las poblaciones Bd162 y Bd169. El bloque constituido por la proteínas 4, 5, 7, 8 y 9 apareció en común en las seis poblaciones del grupo.

❖ *Tabla 4. 12: Los patrones de presencia-ausencia de las 23 proteínas separadas en electroforesis en el conjunto de las 24 poblaciones y las dos líneas comerciales. La última columna se refiere la frecuencia de cada banda en el conjunto de las poblaciones y la última fila el número de bandas máximo que aparece en cada material*

Prot	Bd114	Bd115	Bd129	Bd146	Bd160	Bd162	Bd169	Bd176	Bd217	Bd220	Bd238	Bd250	Bd260	Bd341	Bd343	Bd361	Bd409	Bd485	Bd486	Bd700	Bd701	Bd900	Bd1200	Ibros	Zulema	Frec
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,04
2	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0,64
201	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0,36
3	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0,68
4	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0,28
5	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0,54
7	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0,82
8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0,64
9	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,92
10	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0,84
11	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0,88
12	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0,76
13	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,84
14	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0,56
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0,88
16	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0,56
17	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0,52
18	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0,84
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0,96
20	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0,48
2001	0	1	1	11	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0,68
21	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,84
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0,76
N°	13	16	13	16	14	18	18	18	15	15	14	15	16	15	15	16	12	12	17	14	17	16	15	17	18	

Una observación global de la agrupación del conjunto de las poblaciones ofrece una distribución de las mismas que refleja su origen geográfico. Los dos primeros grupos (poblaciones Bd114, Bd176, Bd485, Bd129, Bd341, Bd343, Bd361 y Bd409) son los de origen más disperso, con poblaciones de Andalucía y Levante. El tercer grupo (Bd146, Bd250, Bd217, Bd238, Bd260 y Bd220) lo constituye un conjunto de poblaciones de las provincias de Córdoba, Málaga y Almería. El quinto grupo lo constituyen poblaciones del interior peninsular y zonas elevadas (Bd160, Bd169, Bd700, Bd701, Bd900 y Bd1200).



❖ *Figura 4. 15: Dendograma obtenido tras el análisis de las proteínas totales de reserva en las poblaciones y líneas de B. distachyon estudiadas*

4.4.2 Estudio de la diversidad genética para gluteninas

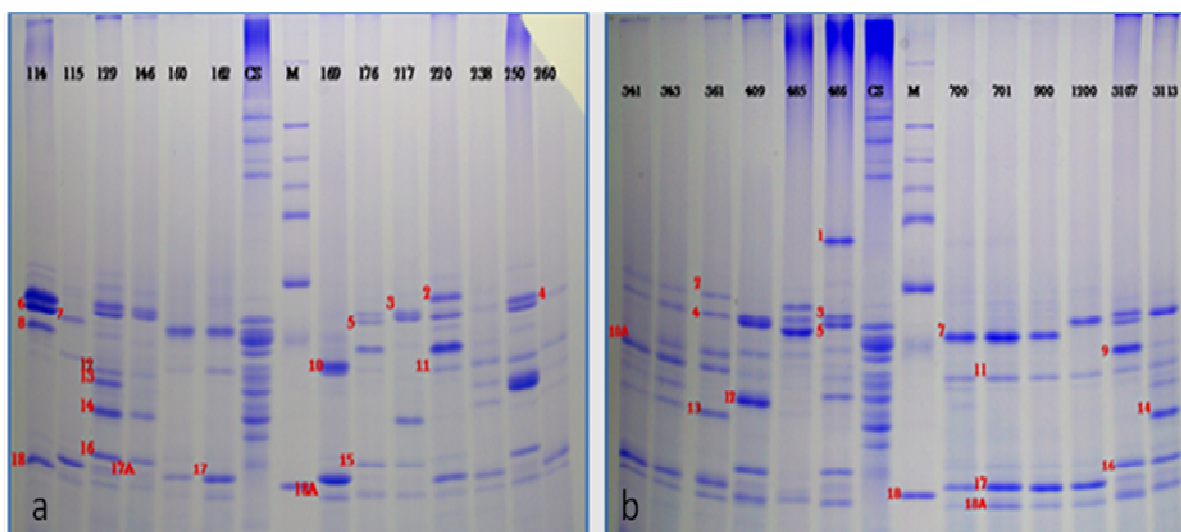
Tal como se ha descrito en el apartado anterior, los perfiles electroforéticos obtenidos al emplear el método de SDS-PAGE, fueron muy complejos debido al gran número de proteínas extraídas con pesos moleculares relativamente similares, por lo que se decidió llevar a cabo un estudio de la fracción correspondiente a las gluteninas, para lo que se recurrió a una extracción diferencial de las mismas, tal y como se indicó en el apartado de Materiales y Métodos.

En total se han analizado las gluteninas de 289 plantas pertenecientes a 23 poblaciones españolas de *B. distachyon*, añadiéndose muestras de las dos líneas comerciales ‘Ibros’ y ‘Zulema’.

La separación de las gluteninas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) permitió identificar 22 bandas de gluteninas polimórficas que fueron denominadas, de la de mayor a la de menor peso molecular, como: 1-2-3-4-5-6-7-8-9-9A-10-10A-11-12-13-14-15-16-17-17A-18-18A (Figura 4.16). Con el fin de facilitar el análisis y comparación de los distintos geles, en todos ellos se incluyó como referencia una muestra de gluteninas de la variedad ‘Chinese Spring’ de *Triticum aestivum* reservando un carril para la separación de marcadores de peso molecular, lo que permitió conocer los pesos moleculares de las gluteninas de *Brachypodium*, tras la aplicación del software Alpa ViewS.A.

El rango de pesos moleculares de las proteínas varió entre los 22,14 KD y los 89,2 KD que se correspondieron con las bandas 18A y 1 respectivamente. Este rango de pesos moleculares está dentro del rango de las gluteninas de bajo peso molecular LMW-GS del trigo.

- ❖ *Figura 4. 16: SDS-PAGE de glutenina, los números de cabecera corresponden a las denominaciones de la poblaciones (CS = T.aestivum ‘Chinse Spring’; M= Marcador de peso molecular) los números escritos en rojo corresponden a las bandas de gluteninas identificados en cada gel mezcla.*



4.4.2.1 Índice de heterogeneidad y frecuencia de gluteninas

Se han analizado los perfiles electroforéticos encontrados en cada una de las plantas de las poblaciones y variedades comerciales empleadas. En cada una de ellas se determinó la presencia de las diferentes gluteninas, en función de su peso molecular y se estimó el valor de **Rf** (movilidad electroforética relativa). A partir de este análisis se elaboró una matriz de presencia-ausencia en el conjunto de plantas analizadas lo que permitió determinar la frecuencia de cada banda en cada una de las poblaciones analizadas.

En general se observa que las poblaciones con $2n=10$, son las que muestran un menor número de patrones electroforéticos (entre 1 y 3), seguidas de las poblaciones con $2n=20$ (entre 2 y 4) y de las poblaciones con $2n=30$ (entre 2 y 9). El estudio de cada patrón permitió determinar que el número de proteínas/patrón varía desde 5 en el caso de poblaciones Bd160, y Bd1200, de $2n=10$, hasta 17, en el caso de la población Bd220, de $2n=30$.

Los resultados globales del análisis de las gluteninas se registran en la Tabla 4.13. Se ha estimado el índice de heterogeneidad (Het. Index), calculado como la frecuencia media del conjunto de gluteninas en el conjunto de plantas analizadas de cada población. Este parámetro permite conocer la diversidad genética que encierran las diferentes poblaciones y el conjunto del material vegetal estudiado para este tipo de caracteres. El índice de heterogeneidad varió de 0,16 (Bd115) hasta 0,43 (Bd250). De acuerdo con este parámetro, es de destacar que las formas de $2n=10$ son las que mostraron menor diversidad (entre 0,18 y 0,23), mientras que las poblaciones con $2n=30$ son las que presentaron los índices más altos (0,33 a 0,43).

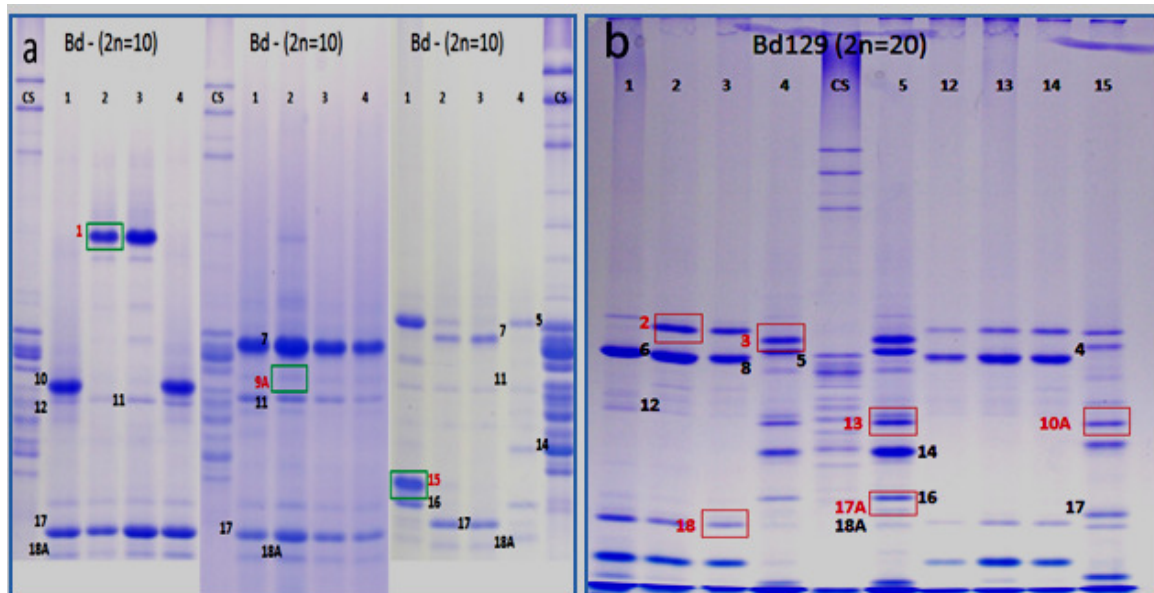
Las poblaciones con $2n=20$ mostraron valores intermedios (0,16 a 0,31). Se constata un orden creciente de diversidad dentro del conjunto de las poblaciones al aumentar el número de cromosomas.

❖ Tabla 4. 13: Frecuencias de las 22 proteínas LMW-GS estudiadas en las 23 poblaciones silvestres de *B. distachyon* con tres niveles de ploidia (2n=10, 20 o 30)

Proteínas	2n =	1	2	3	4	5	6	7	8	9	9A	10	10A	11	12	13	14	15	16	17	17A	18	18A	Het. Índice
<i>Peso. mol KDa</i>		82.6	68.5	62.4	61.7	59.4	58.7	56.0	51.6	49.6	48.3	46.9	46.0	45.6	40.6	35.5	32.5	21.6	19.9	16.0	14.3	13.2	11.2	
<i>Bd 114</i>	20	0	0	1	0	0,08	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0,08	0	0,08	0	0	1	0	0,24
<i>Bd 115</i>	20	0	0	0,25	0,08	0,08	0,25	0,67	0,25	0	0	0	0	0,75	0,25	0	0	0	0	0,75	0	0,25	0	0,16
<i>Bd 129</i>	20	0	0,67	0,22	0,11	0,22	0,66	0	0,33	0	0	0	0,33	0	0,89	0,33	0,33	0	0,22	0,11	0,22	0,78	0,22	0,26
<i>Bd 146</i>	30	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0,08	1	0	1	0	1	0	1	0,37
<i>Bd 160</i>	10	0,33	0	0	0	0	0	0,25	0,42	0,25	0	0	0	0,75	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,19
<i>Bd 162</i>	10	0	0	0	0,08	0,08	0	0,75	0,17	0,83	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,22
<i>Bd 169</i>	10	0,42	0	0	0	0	0,58	0	0	0,58	0	0,42	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,23
<i>Bd 176</i>	30	0	0	1	0,58	0,42	0	0	0,17	1	0	0	0	1	0,92	0	0	0,33	1	0	0,75	0,17	0,83	0,37
<i>Bd 217</i>	30	0	0	0,83	0	0,83	0	0,17	0,83	0,08	0	0	0	0,17	0,83	0,08	0,75	0	0,75	0,17	0,83	0,08	0,92	0,33
<i>Bd 220</i>	30	0	0,17	0,67	0,25	0,75	0,67	0,08	0,5	0,5	0	0	0	0,83	0,58	0,42	0,5	0	0,67	0,08	0,92	0,58	0,75	0,40
<i>Bd238</i>	30	0	0	1	0	0,67	0,17	0	0,75	0	0	0	0	0,92	0,5	0,58	0	0,83	0,83	0,67	0,67	0	1	0,39
<i>Bd 250</i>	30	0	0	0,5	0,17	1	0	0	1	0,42	0	0	0	1	0,83	0,58	0,5	0,17	0,83	0,17	0,83	0,17	0,83	0,43
<i>Bd 260</i>	30	0	0,33	0	0,42	0,58	0	0	0,33	1	0	0	1	0	1	0	0,33	0,08	0,66	1	0	1	0	0,35
<i>Bd341</i>	30	0	1	0,66	0,42	0	0	0	0	1	0	0	1	0,92	1	1	0	0,08	0	1	0	1	0	0,41
<i>Bd 343</i>	30	0	0,42	0	1	0	0,58	0,58	0	0,42	0	0	1	0,92	0,83	0,25	0	0	0,58	0,42	0,58	1	0	0,41
<i>Bd 361</i>	30	0	0,92	0,08	0,92	0,08	0	0	0	0,5	0	0	0,92	0,08	0,5	0,92	0,08	0	0,08	0,92	0	0,92	0	0,31
<i>Bd 409</i>	30	0	0	0,08	0,92	0,42	0,5	0,25	0,25	1	0,17	0	0,25	1	1	0,5	0	0,17	0,75	0	0,75	1	0	0,41
<i>Bd 485</i>	20	0	0,33	0	0,92	0,66	0	1	1	0,83	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,31
<i>Bd 486</i>	30	0,75	0	0,75	0,25	0,75	0	0,25	0,75	0,25	0	0	0,66	0,75	0,75	0	0	0	0,75	0	0,75	1	0	0,38
<i>Bd 700</i>	10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,23
<i>Bd 701</i>	10	0	0	0	0	0	0	0,09	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,18
<i>Bd 900</i>	10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,23
<i>Bd 1200</i>	10	0	0	0	0	0,33	0	0,67	0	0,33	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,20

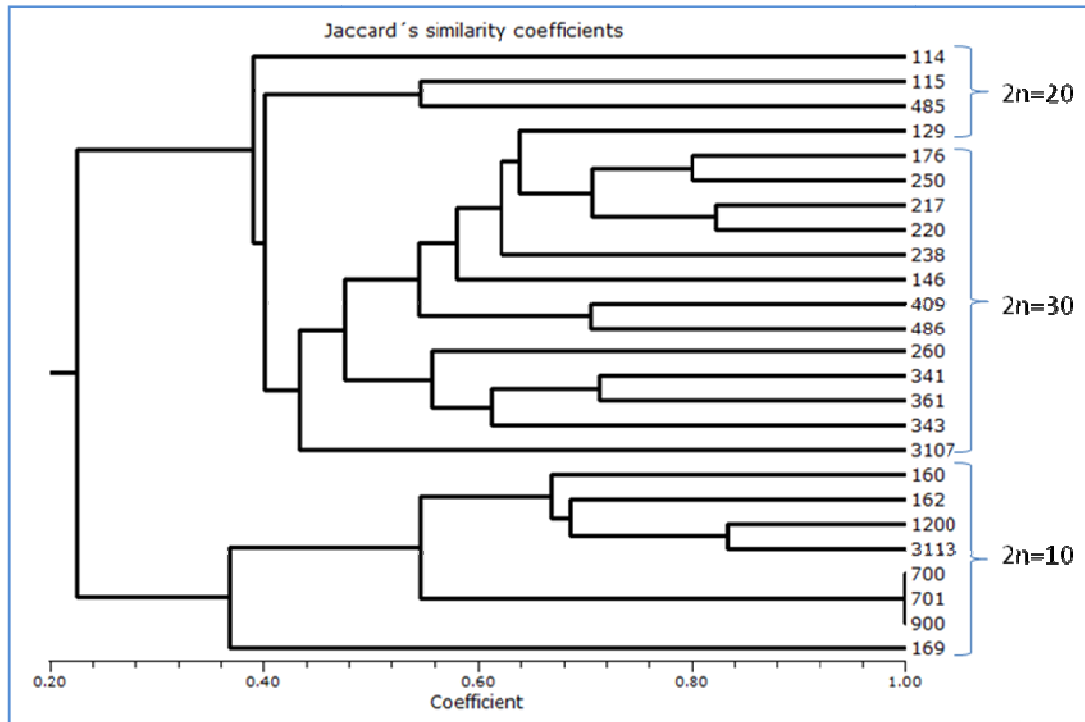
Respecto a las proteínas presentes en los diferentes materiales, algunas fueron específicas de las poblaciones con un determinado número cromosómico (Figura 4.17). Así, la glutenina 10 se encontró sólo en la población Bd169 ($2n=10$). De igual manera, las gluteninas denominadas 1, 9A y 15 se observaron solo en los perfiles de las formas de $2n=10$ y $2n=30$ y estuvieron ausentes en las plantas de $2n=20$. Otras seis proteínas, las denominadas 2, 3, 10A, 13, 17A y 18, se detectaron en las poblaciones de $2n=20$ pero estaban ausentes en las de $2n=10$ (Figura 4.17 b). El resto de gluteninas se encontraron en los tres citotipos $2n=10$, $2n=20$ y $2n=30$.

- ❖ *Figura 4. 17: a) Bandas específicas (1; 9 A y 15) de las formas de $2n=10$; b) bandas específicas a poblaciones con $2n=20$ y ausentes en diploides : CS: “Chinse Spring”*



4.4.3 Estudio de la variabilidad inter-poblacional

Con el fin de evaluar el grado de diversidad entre las diferentes poblaciones, se han estimado las distancias genéticas mediante el cálculo del coeficiente de similitud de Jaccard, utilizando la matriz de presencia-ausencia de cada una de las 22 gluteninas analizadas. En esta matriz se incluía los datos del total de proteínas presentes en el conjunto de las plantas analizadas de cada una de las poblaciones y variedades analizadas. A continuación se aplicó el método UPGMA para el agrupamiento de las poblaciones. En la Figura 4.18 se muestra el dendrograma obtenido.



❖ *Figura 4. 18: Dendrograma obtenido tras el análisis de las gluteninas de reserva del endospermo (gluteninas) en las 23 poblaciones silvestres de B. distachyon y las dos líneas comerciales.*

A un nivel de similaridad próximo a 0,22 se separaron dos grupos. El primero constituido por las poblaciones de $2n=10$, en el que se pueden distinguir tres subgrupos. Una primera rama separa la población Bd169 procedente de Jaén del resto, el siguiente subgrupo incluye las poblaciones procedentes de la zona de Guadalajara (Bd700, Bd701, Bd900) que compartieron el 100% de las bandas identificadas en sus perfiles electroforéticos y fueron las únicas que presentaron patrones de bandas idénticos, mientras que el tercer subgrupo, está compuesto por las poblaciones Bd160 (Albacete), Bd162 (Cuenca), Bd1200 (Guadalajara) y la variedad 'Zulema', todas procedentes del interior de la Península.

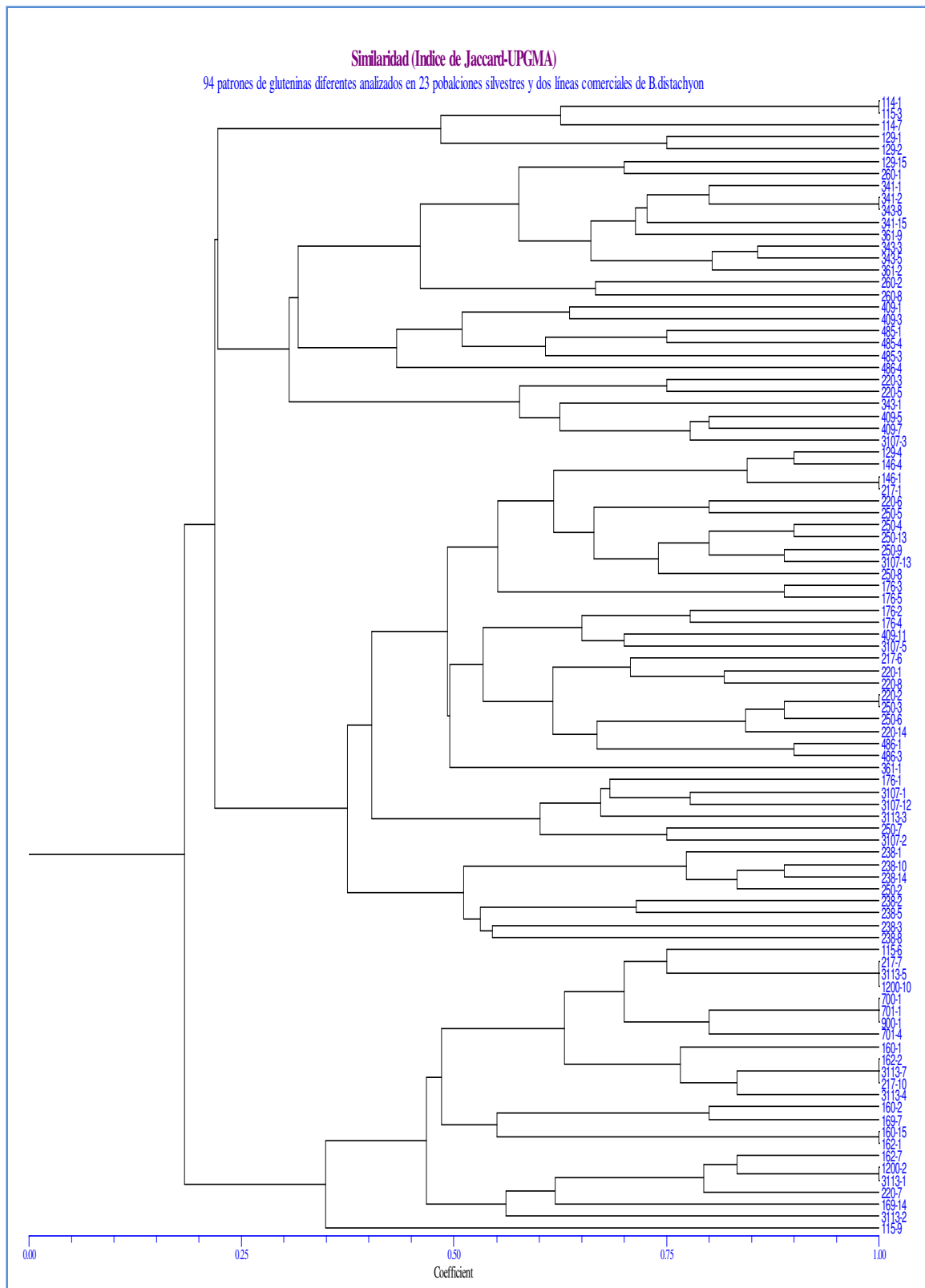
La segunda rama del dendrograma contiene las poblaciones con $2n=20$ y $2n=30$, claramente diferenciadas. En un grupo se incluyen las poblaciones (Bd260, Bd341, Bd361 y Bd343) de Andalucía (Málaga, Huelva, Córdoba y Sevilla, respectivamente). En este subgrupo se incluyen también las poblaciones de la costa mediterránea: Almería (Bd220, Bd217 y Bd250), Bd409 de Valencia y Bd486 procedente de Tarragona.

La tercera rama del dendrograma incluye las poblaciones con $2n=20$ e incluye las poblaciones Bd114, Bd115, Bd129 y Bd485 de orígenes geográficos más dispersos.

4.4.4 Estudio de la variabilidad intra-poblacional

Para estudiar la diversidad intra-poblacional se han tenido en cuenta los diferentes patrones electroforéticos observados en cada una de las poblaciones analizadas. Estos patrones están referidos a la presencia-ausencia de las 22 gluteninas consideradas en el presente estudio. En el conjunto de las 289 plantas estudiadas, se han identificado 94 patrones. Del mismo modo que en el análisis de distancias entre poblaciones, hemos analizado la diversidad intra-poblaciones. Con este fin se ha utilizado la matriz de presencia-ausencia para calcular el coeficiente de Jaccard y se ha aplicado el método UPGMA al conjunto de las 289 plantas analizadas. En la Figura 4.19 se muestra el dendrograma obtenido, donde se observa que la separación no es tan clara como cuando se analiza la variabilidad inter-poblacional aunque, en la mayoría de los casos, las plantas pertenecientes a la misma población aparecen preferentemente agrupadas, lo que refleja un grado mayor o menor de homogeneidad dentro de cada población.

Hay casos en los que en un mismo grupo del dendrograma aparecen plantas con distintos números cromosómicos. Así, en una primera rama del dendrograma aparecen patrones de poblaciones de $2n=10$, recolectadas en el centro peninsular, junto con patrones de plantas de poblaciones con $2n=30$ como es el caso de Bd217 y Bd220. En una segunda rama se incluyen patrones de poblaciones con $2n=30$ como son Bd238, Bd486, Bd220, Bd409, Bd250, Bd146 y Bd176, en este grupo también se incluye un patrón aparecido en una planta de la población Bd129 que tiene $2n=20$. La tercera rama del clúster está compuesta por una mezcla de poblaciones de $2n=30$ (Bd409, BdBd341, Bd260) y $2n=20$ (Bd114, Bd115, Bd129) cuyos individuos se agruparon juntos dentro de unos subgrupos más pequeños.



❖ *Figura 4. 19: Dendrograma representando las distancias genéticas entre 94 patrones diferentes de gluteninas*

4.5 ANÁLISIS DE VARIABILIDAD MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES DE ADN GENÓMICO

4.5.1 Estudio de microsatélites (SSR)

4.5.1.1 GRADO DE POLIMORFISMO GENERADO

A partir del ADN genómico de plantas de las poblaciones silvestres y las dos líneas comerciales de *Brachypodium*, se ha llevado a cabo un análisis de secuencias de tipo microsatélites. De las 34 combinaciones de cebadores empleados para amplificar las posibles regiones que contendrían este tipo de secuencias, solamente 11 dieron lugar a productos de amplificaciones reproducibles y analizables.

En total se obtuvieron unos 156 fragmentos con una media de 14,18 fragmentos polimórficos por sistema SSR, con un rango comprendido entre los 4 obtenidos con el juego de cebadores SSR8 y los 27 de los juegos de cebadores SSR32 y SSR5. En la Tabla 4.14 se muestran el número de fragmentos amplificados así como el intervalo de tamaños de las regiones amplificadas de los mismos para los 11 sistemas de cebadores empleados.

❖ *Tabla 4. 14: Número de fragmentos y rango de tamaños de los productos de amplificación con los distintos cebadores SSR*

Cebadores	Nº Fragmentos	Tamaño (pb)	
		Min	Max
SSR-3	14	220	504
SSR-16	9	140	261
SSR-8	4	250	395
SSR-13	9	120	135
SSR-32	27	135	335
SSR-21	12	161	361
SSR-17	25	181	425
SSR-19	10	111	213
SSR-20	11	147	492
SSR-5	27	218	560
SSR-18	8	58	185
Total	156		
Media	14,18		

Del total de fragmentos estudiados, sólo el 15% fue compartido por el conjunto de poblaciones analizadas. El número de fragmentos analizados en función del número de cromosomas fue el siguiente: 44 (28,20%) correspondieron a los presentes en muestras de poblaciones de 2n=10, 87 fragmentos (55,77%) estuvieron presentes en el conjunto de

muestras de poblaciones con $2n=20$ y el 62,82% se amplificaron en las poblaciones con $2n=30$. Algunos fragmentos fueron específicos de las poblaciones de cada nivel cromosómico. Así, seis fragmentos (3,85%) fueron específicos de las poblaciones de $2n=10$, 43 fragmentos (27,56%) se amplificaron sólo en muestras de plantas con $2n=20$ y 29 fragmentos (18,58%) estuvieron presentes sólo en las poblaciones con $2n=30$. En la Tabla 4.15 se indican los fragmentos compartidos entre los diferentes citotipos y en la Tabla 4.16 se señala la presencia o ausencia de cada uno de los fragmentos amplificados por el total de los sistemas SSR en las plantas de $2n=10$, $2n=20$ y $2n=30$ cromosomas.

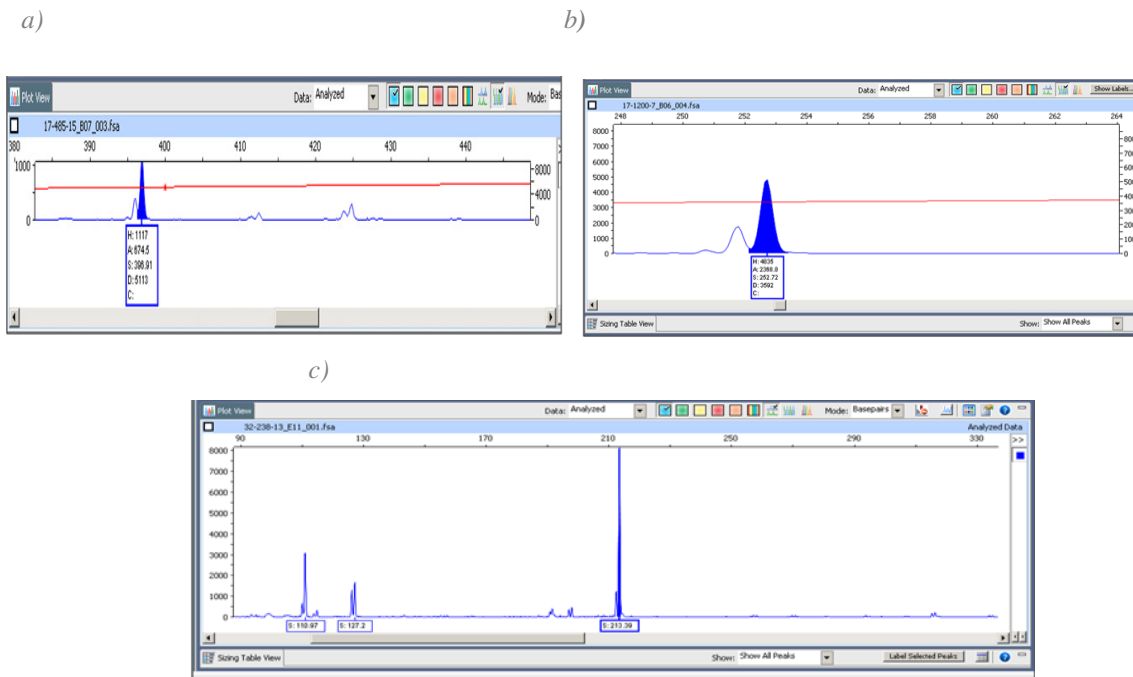
❖ *Tabla 4. 15: Fragmentos comunes a los tres citotipos*

<i>Citotipos</i>	<i>2n=20</i>	<i>2n=30</i>
2n=10	24 (15,38%)	34 (21,79%)
2n=30	48 (30,77%)	–

El sistema SSR8, solo amplificó en las plantas con $2n=30$. En la Figura 4.20 se muestran algunos ejemplos de electroforenogramas.

❖ *Figura 4. 20: Picos amplificados con sus tamaños en distintas poblaciones de B. distachyon*

- a) amplificación del DNA genómico de la muestra 15 de la población Bd485 con el SSR 17,*
- b) amplificación del DNA genómico de i individuo 7 de la población Bd1200 con el SSR 17 y*
- c) amplificación del DNA genómico de la muestra 13 de la población BdD238 con el SSR 13.*



4. Resultados

❖ *Tabla 4. 16: Matriz de presencia-ausencia de fragmentos amplificados por PCR de SSR. Se han representado en colores los picos comunes y específicos de cada nivel cromosómico.*

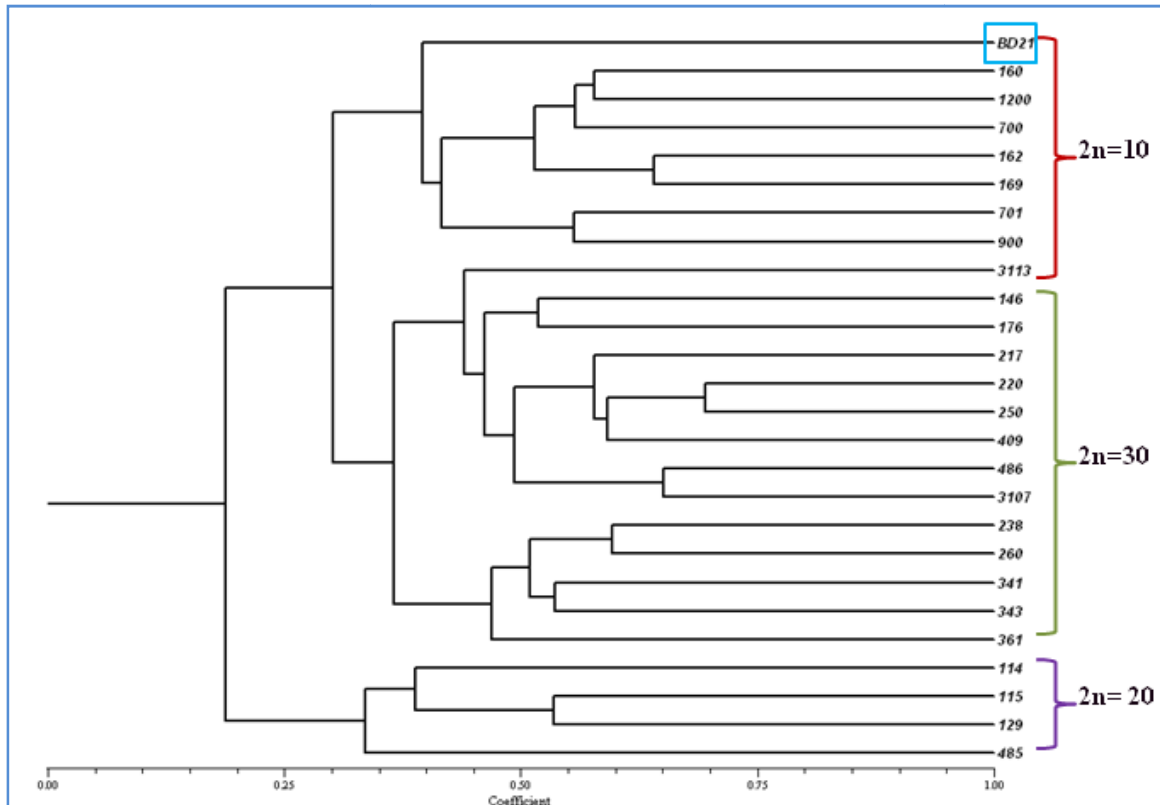
<i>Picos / n</i>	20	10	30	<i>Picos/n</i>	20	10	30	<i>Picos/n</i>	20	10	30	<i>Picos/n</i>	20	10	30
ssr3-1	0	1	1	ssr21-1	0	1	0	ssr20-1	0	0	1	ssr32-1	0	1	1
ssr3-2	1	1	1	ssr21-2	0	0	1	ssr20-2	1	0	0	ssr32-2	0	0	1
ssr3-3	1	1	1	ssr21-3	1	0	0	ssr20-3	0	0	1	ssr32-3	0	0	1
ssr3-4	0	0	1	ssr21-4	1	1	1	ssr20-4	1	1	1	ssr32-4	0	0	1
ssr3-5	0	1	1	ssr21-5	0	0	1	ssr20-5	1	1	1	ssr32-5	0	0	1
ssr3-6	1	0	1	ssr21-6	1	0	0	ssr20-6	1	0	1	ssr32-6	1	0	1
ssr3-7	1	0	1	ssr21-7	1	0	0	ssr20-7	1	1	1	ssr32-7	0	0	1
ssr3-8	1	1	1	ssr21-8	1	0	0	ssr20-8	1	0	1	ssr32-8	1	0	0
ssr3-9	1	0	1	ssr21-9	1	0	0	ssr20-9	1	0	1	ssr32-9	1	0	1
ssr3-10	0	1	1	ssr21-10	1	0	0	ssr20-10	0	0	1	ssr32-10	0	0	1
ssr3-11	0	0	1	ssr21-11	1	0	1	ssr20-11	1	0	1	ssr32-11	1	1	1
ssr3-12	0	1	1	ssr21-12	1	0	0	ssr5-1	0	0	1	ssr32-12	1	0	1
ssr3-13	1	1	1	ssr17-1	1	0	0	ssr5-2	1	0	0	ssr32-13	0	0	1
ssr3-14	1	0	1	ssr17-2	1	0	0	ssr5-3	0	0	1	ssr32-14	0	0	1
ssr16-1	1	0	0	ssr17-3	1	0	0	ssr5-4	1	0	1	ssr32-15	1	0	0
ssr16-2	0	0	1	ssr17-4	1	0	0	ssr5-5	1	0	1	ssr32-16	0	0	1
ssr16-3	1	1	1	ssr17-5	1	1	1	ssr5-6	0	0	1	ssr32-17	1	0	0
ssr16-4	1	1	1	ssr17-6	1	1	1	ssr5-7	0	0	1	ssr32-18	0	0	1
ssr16-5	1	1	1	ssr17-7	0	1	1	ssr5-8	1	1	1	ssr32-19	1	0	0
ssr16-6	1	0	0	ssr17-8	0	1	1	ssr5-9	1	0	1	ssr32-20	0	0	1
ssr16-7	0	0	1	ssr17-9	1	0	0	ssr5-10	0	1	0	ssr32-21	0	0	1
ssr16-8	1	0	0	ssr17-10	1	0	0	ssr5-11	1	1	1	ssr32-22	1	0	1
ssr16-9	1	0	0	ssr17-11	1	0	0	ssr5-12	0	0	1	ssr32-23	0	0	1
ssr8-1	0	0	1	ssr17-12	1	0	0	ssr5-13	1	1	1	ssr32-24	1	0	1
ssr8-2	0	0	1	ssr17-13	1	0	0	ssr5-14	0	0	1	ssr32-25	1	0	0
ssr8-3	0	0	1	ssr17-14	1	0	0	ssr5-15	0	1	1	ssr32-26	0	0	1
ssr8-4	0	0	1	ssr17-15	1	0	0	ssr5-16	0	0	1	ssr32-27	1	0	0
ssr13-1	1	0	0	ssr17-16	1	0	0	ssr5-17	0	0	1	ssr19-1	0	1	0
ssr13-2	1	0	0	ssr17-17	1	0	0	ssr5-18	0	0	1	ssr19-2	0	1	0
ssr13-3	1	0	1	ssr17-18	1	0	0	ssr5-19	0	1	1	ssr19-3	0	1	0
ssr13-4	1	0	1	ssr17-19	1	0	0	ssr5-20	0	0	1	ssr19-4	0	1	0
ssr13-5	1	0	1	ssr17-20	1	0	0	ssr5-21	0	0	1	ssr19-5	1	0	1
ssr13-6	1	0	1	ssr17-21	1	0	0	ssr5-22	0	0	1	ssr19-6	1	1	1
ssr13-7	0	1	1	ssr17-22	1	0	0	ssr5-23	1	0	1	ssr19-7	1	1	1
ssr13-8	1	1	1	ssr17-23	1	0	0	ssr5-24	1	1	1	ssr19-8	1	1	1
ssr13-9	0	1	1	ssr17-24	1	0	0	ssr5-25	0	0	1	ssr19-9	1	1	1
ssr5-27	1	1	1	ssr17-25	1	0	0	ssr5-26	1	0	1	ssr19-10	0	1	0

- Picos comunes a todas las poblaciones.*
- Picos específicos a poblaciones con 2n=20.*
- Picos específicos a poblaciones con 2n=30.*
- Picos específicos a poblaciones con 2n=10.*

4.5.1.2 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD INTER-POBLACIONAL

A partir de los datos del análisis de los diferentes SSR se ha realizado un análisis de la variabilidad inter-poblacional. Para ello, se ha considerado el total de picos obtenidos en el conjunto de plantas estudiadas en cada línea o población. En este análisis se ha añadido la población Bd-21, por su elección para el estudio de la secuencia genómica y su utilidad en estudios de *Brachypodium*. Con los datos obtenidos se elaboró una matriz de presencia-ausencia de cada uno de los fragmentos amplificados y se calculó el índice de Jaccard, aplicándose a continuación el método de agrupamiento UPGMA. El dendrograma obtenido se muestra en la Figura 4.21. Se observan tres grupos principales que coinciden con los niveles cromosómicos de las poblaciones o líneas. Así, en una primer rama del dendrograma se incluyen las poblaciones con $2n=10$ cromosomas, que incluye la población Bd-21. La línea comercial 'Zulema', a pesar de poseer 10 cromosomas, no cae en este grupo sino en el segundo del dendrograma donde se reúnen las poblaciones con $2n=30$. La tercera rama del dendrograma incluye las cuatro poblaciones con $2n=20$ que constituyen un grupo claramente diferenciado del resto de materiales estudiados.

❖ *Figura 4. 21: Dendrograma representando las distancias genéticas entre 23 poblaciones silvestres de B. distachyon, dos líneas comerciales y BD21*



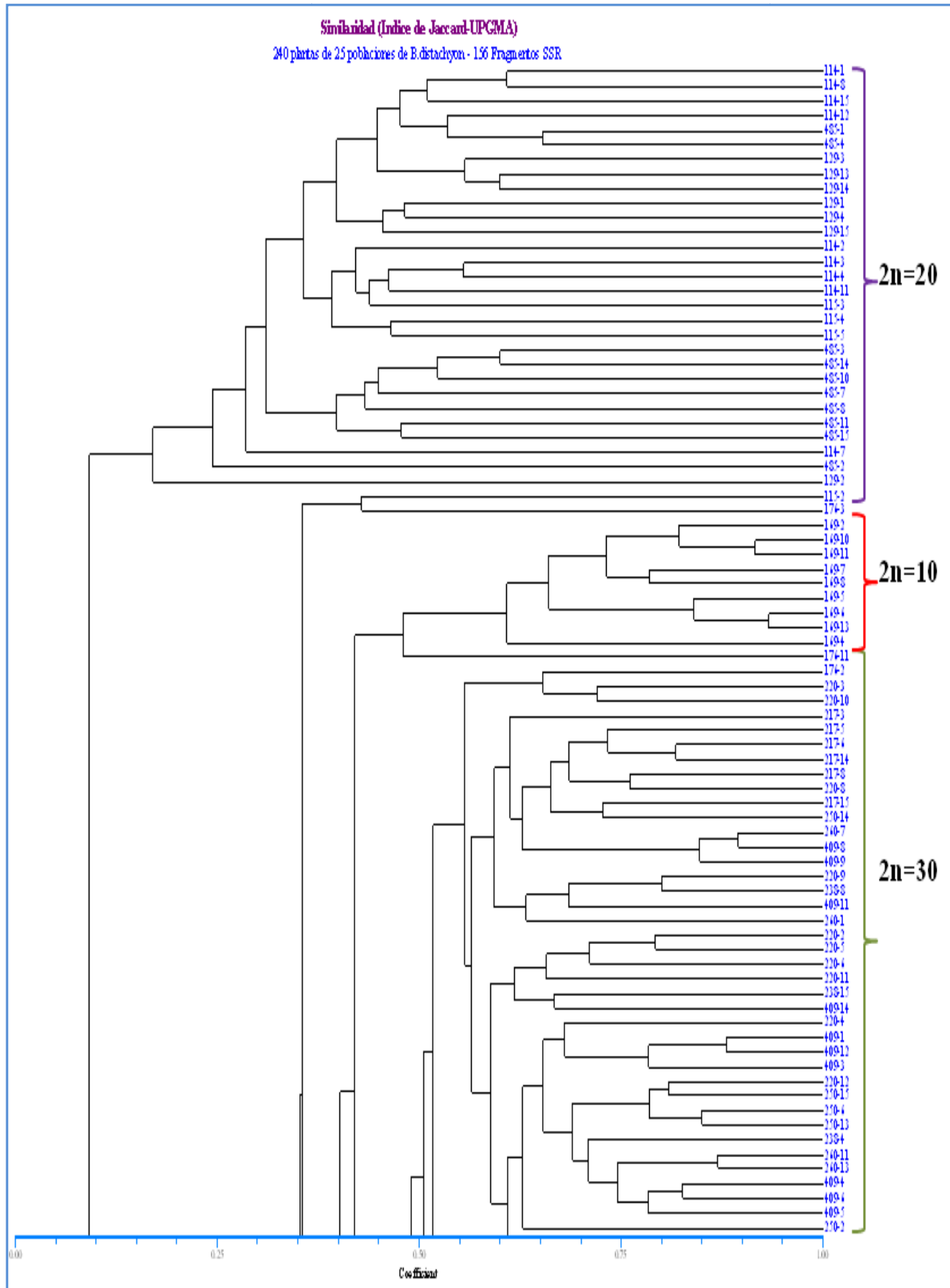
4.5.1.3 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD INTRA-POBLACIONAL

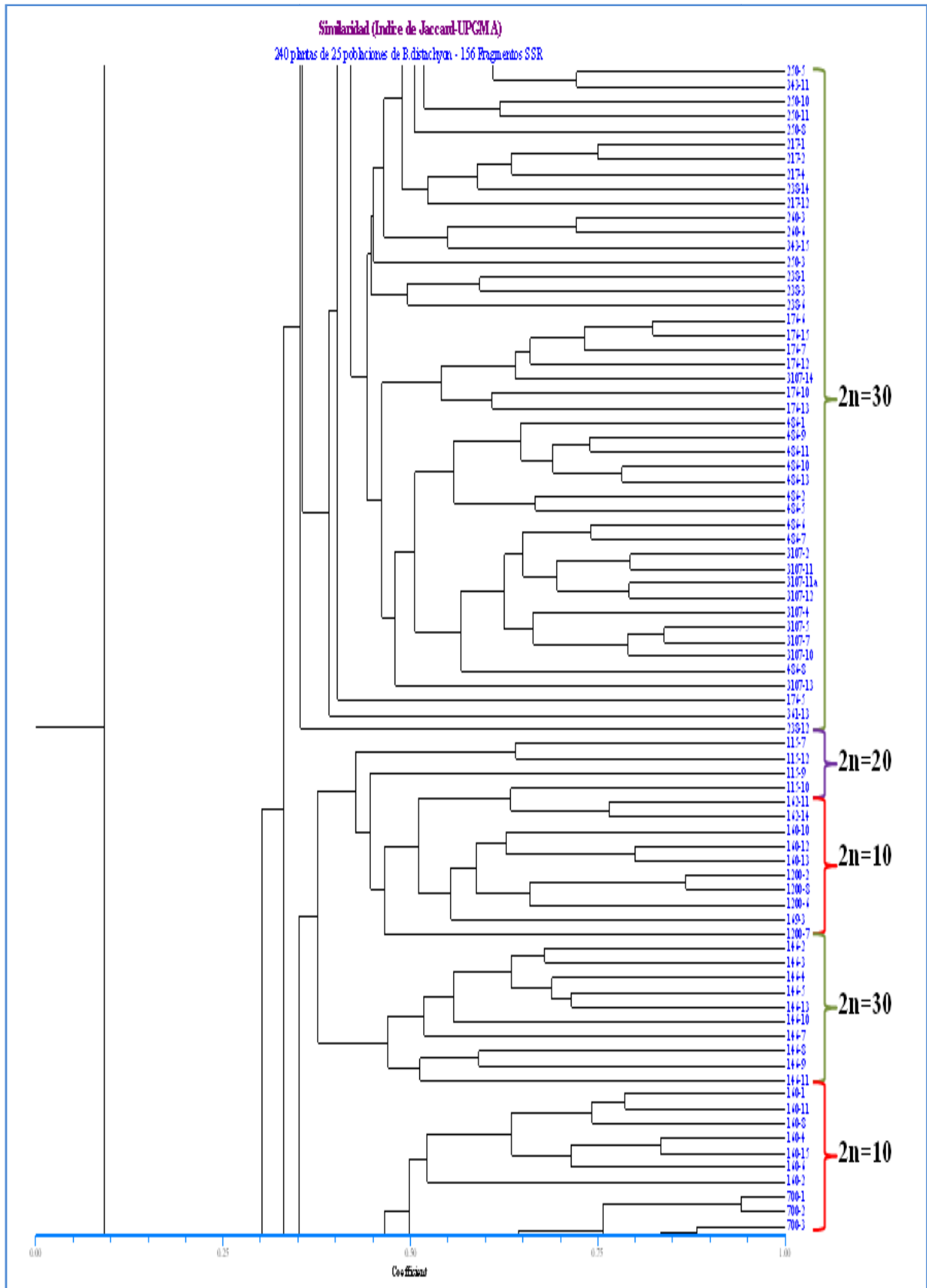
Con el fin de profundizar en el análisis de diversidad de las secuencias de tipo SSR, se ha realizado un estudio en el que integra a las 240 plantas analizadas del conjunto de poblaciones y líneas estudiadas. Para ello se elaboró una matriz de presencia-ausencia de cada uno de los 156 picos amplificados en cada una de las plantas estudiadas. A partir de esta matriz se aplicó el índice de Jaccard y se utilizó el método UPGMA para el agrupamiento posterior. El dendrograma obtenido se muestra en la Figura 4.22

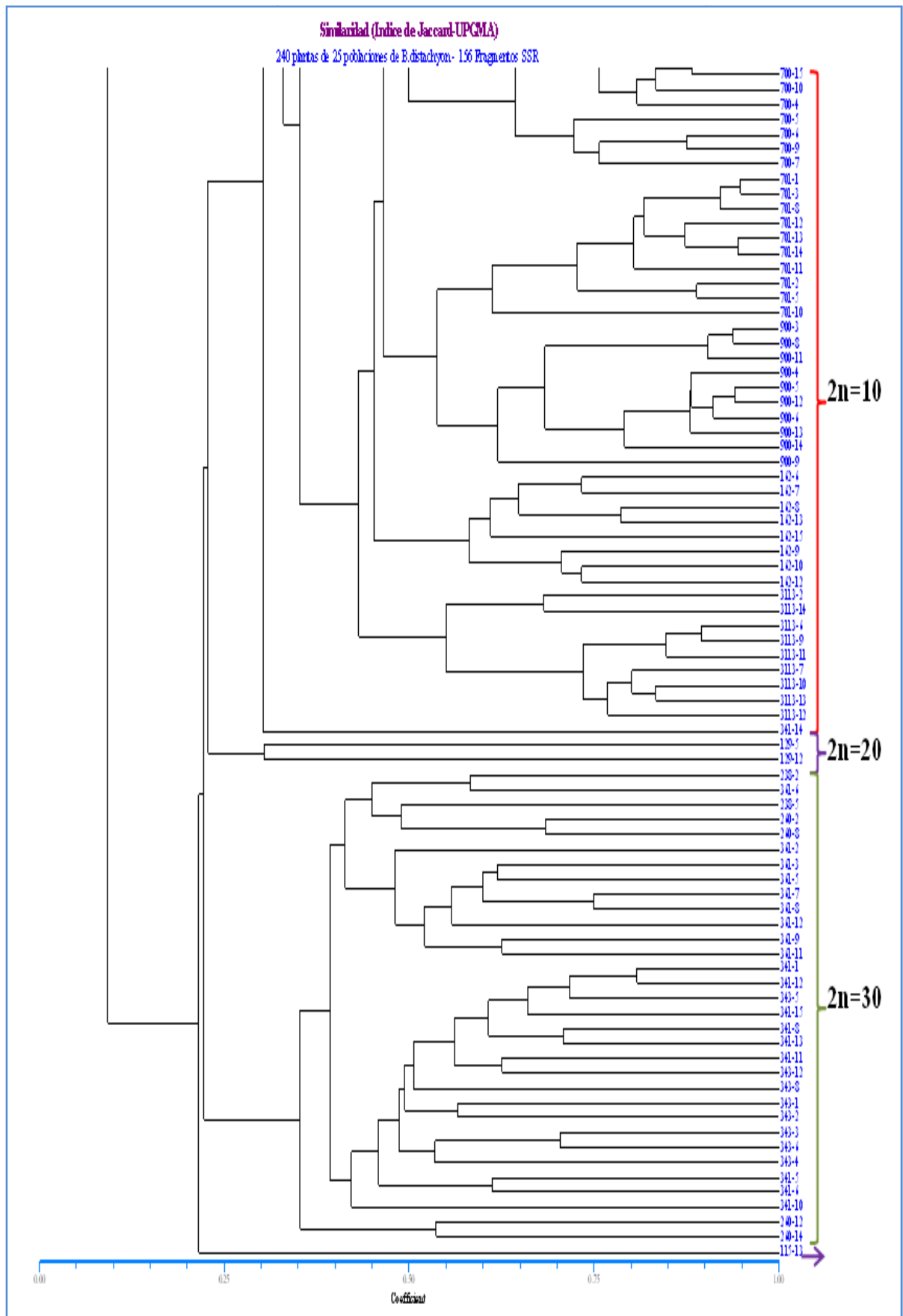
El dendrograma resulta más complejo que el que corresponde al estudio inter-poblacional. No obstante, en la mayoría de los casos las plantas pertenecientes a una misma población se agruparon próximas entre sí, con la excepción de las plantas de las poblaciones Bd115 y Bd129, que se distribuyeron en varios grupos del dendrograma. Hay que señalar que estas poblaciones son las que mostraron un mayor grado de variabilidad de las 23 analizadas. También se puede apreciar que las poblaciones con números cromosómicos iguales tienden a agruparse en la misma rama del árbol. De este modo, se observa una agrupación claramente

diferenciada de las poblaciones de 20 cromosomas, que incluye algunas plantas de las poblaciones Bd115 y Bd129. También se pueden distinguir otros dos grupos que incluirían respectivamente a las poblaciones con $2n=10$ y con $2n=30$, excepción hecha de las plantas de la población Bd146 que aunque presenta 30 cromosomas aparecen más próximas a plantas de las poblaciones con $2n=10$.

❖ *Figura 4. 22: Dendograma representando las distancias genéticas entre 240 plantas pertenecientes a las 23 líneas de B. distachyon y las dos variedades comerciales 'Ibros' y 'Zulema'*







4.5.2. Estudio de Inter-microsatélites (ISSR)

4.5.2.1 GRADO DE POLIMORFISMO GENERADO

Con el fin de añadir nuevos datos al estudio de la diversidad de las poblaciones de *B. distachyon* se ha empleado un segundo tipo de marcador molecular que se corresponde con secuencias de tipo inter-microsatélite (ISSR). Para ello, se ensayaron inicialmente 32 cebadores de los que finalmente se eligieron 16 al ser los que permitían obtener fragmentos reproducibles y fácilmente analizables.

El conjunto de fragmentos polimórficos ha sido de 580, con una media de 36,25 productos de amplificación generados por cada cebador y con un rango que varió entre 28 producidos por el cebador ISSR1 y 49 de los cebadores ISSR10 e ISSR21. De este modo, los inter-microsatélites se pueden considerar sistemas más informativos que los microsatélites para la aplicación que se pretende en este trabajo. En la Tabla 4.17 se muestra el número de fragmentos polimórficos así como el rango de los Rf obtenidos para cada uno de los cebadores empleados en la obtención de los ISSR.

❖ *Tabla 4. 17: Número de fragmentos y rango de Rf* en la amplificación con cebadores ISSR*

<i>ISSR</i>	<i>Nº Bandas</i>	<i>Rf* min</i>	<i>Rf* máx</i>
14	43	0,49	0,94
15	43	0,54	0,94
17	38	0,49	0,95
20	30	0,52	0,88
9	33	0,5	0,94
19	31	0,58	0,92
22	38	0,39	0,85
8	31	0,55	0,93
12	33	0,55	0,92
16	28	0,54	0,95
1	28	0,51	0,79
10	49	0,39	0,96
11	44	0,51	0,9
21	49	0,44	0,96
6	30	0,46	0,83
13	32	0,53	0,92

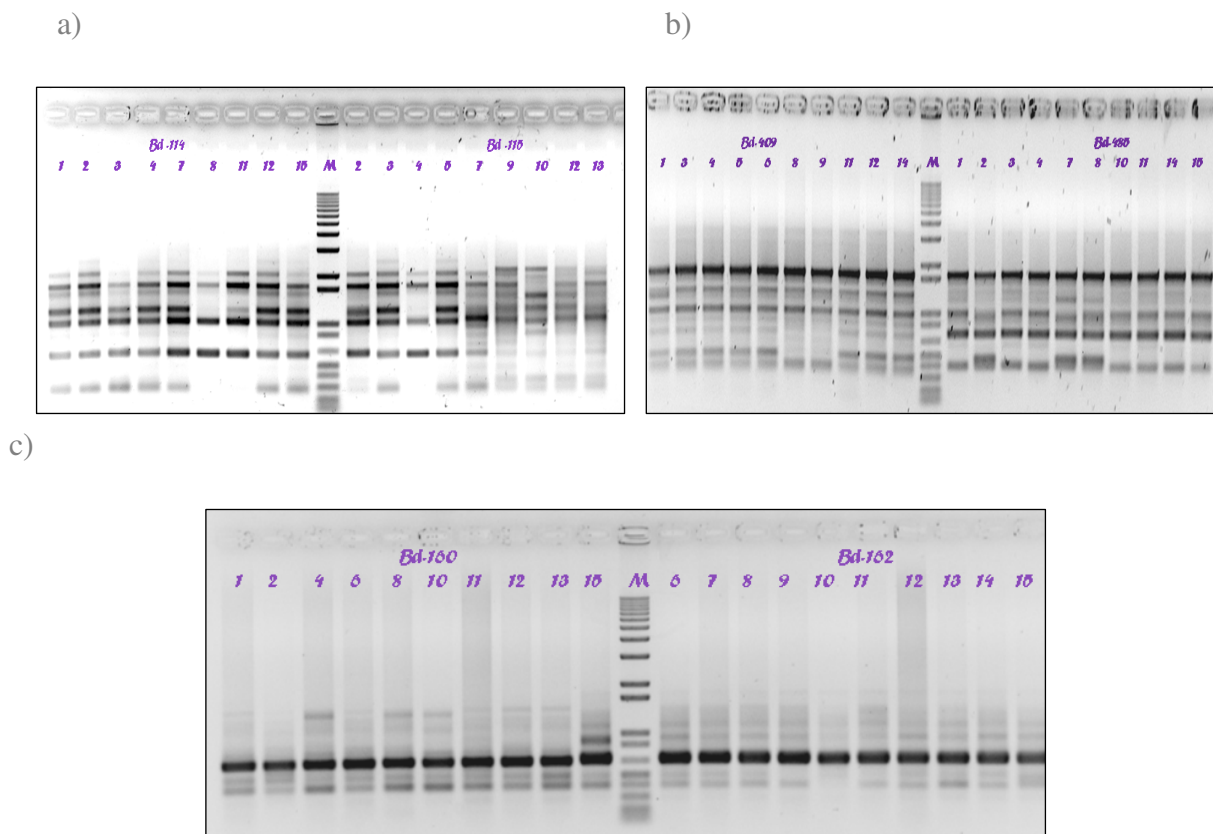
Los tamaños de los fragmentos estuvieron comprendidos entre las 250 pb y las 4.000 pb. En la Figura 4.23 se muestran algunos ejemplos de ISSRs obtenidos en diversas poblaciones con distintos cebadores tras la separación en geles de agarosa. Del total de los fragmentos muchos estuvieron presentes en común en muestras de distinto número de cromosomas. Respecto al total, las muestras de poblaciones con 2n=10 mostraron 362 (62,41%), 314 (54,14%) estuvieron presentes en plantas de poblaciones con 2n=20 y 471

(81%) en las muestras de poblaciones con $2n=30$, que son las que mostraron el mayor número de productos de amplificación

Algunos de los fragmentos sólo se observaron en poblaciones con determinados números cromosómicos. Así, las poblaciones con $2n=10$ y $2n=20$ presentaron respectivamente, un 5 y un 4% de bandas específicas, mientras que las poblaciones con $2n=30$ presentaron un porcentaje más alto que alcanzó el 15% de banda presentes únicamente en este tipo de material. En la Tabla 4.18 se indican los fragmentos compartidos por plantas pertenecientes a los tres citotipos.

❖ *Tabla 4. 18: fragmentos compartidos entre los tres citotipos ($2n=10, 20$ y 30)*

Citotipos	$2n=20$	$2n=30$
$2n=10$	200 (34,48%).	299 (51,55%).
$2n=30$	246 (42,50%).	–

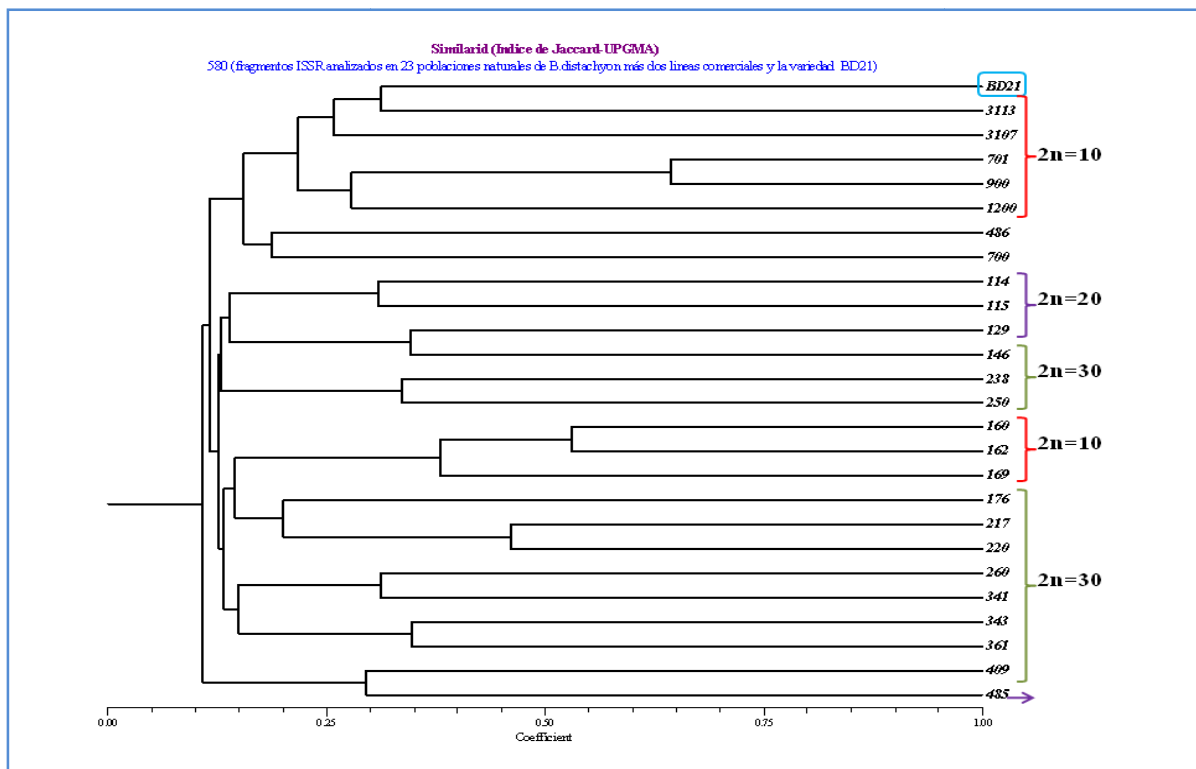


❖ *Figura 4. 23: Separación de los productos de amplificación de diferentes sistemas ISSR en poblaciones de *B. distachyon* ($n=10, 20$ y 30). M= marcador de peso a) amplificación de los DNA genómicos de las muestras de las poblaciones *Bd114* y *Bd115* con el ISSR 17; b) amplificación de los DNA genómicos de las muestras de accesiones *Bd409* y *Bd485* con el ISSR 11 y c) amplificación de los DNA genómicos de los individuos procedentes de las poblaciones *Bd160* y *Bd162* con el SSR6*

4.5.2.2 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD INTER-POBLACIONAL

Con los datos de los fragmentos tipo ISSR producidos en cada una de las poblaciones y líneas de *Brachypodium* y la línea Bd-21 se elaboró una matriz de presencia-ausencia. Como en los casos anteriores, se ha procedido a un análisis de distancias para evaluar la diversidad partiendo de los datos de esta matriz. Se ha estimado el índice de Jaccard y se ha aplicado el método UPGMA para el agrupamiento de las poblaciones y líneas. A partir de este análisis se obtuvo el dendrograma que se muestra en la Figura 4.24. En general se sigue manteniendo el agrupamiento de las poblaciones en función del número cromosómico, aunque los grupos no están tan bien delimitados como en el caso de los SSR. Así, tres poblaciones con $2n=10$ (Bd160, Bd162 y Bd169) se separan del grupo principal de poblaciones con este número cromosómico, estando más próximas al grupo de poblaciones con $2n=30$. También se observa que la población Bd485 que tiene $2n=20$, no se agrupa con las otras tres poblaciones de igual número cromosómico y lo mismo sucede con las poblaciones Bd700 y Bd486 que teniendo distintos números cromosómicos aparecen más próximas entre sí que con sus grupos cromosómicos respectivos.

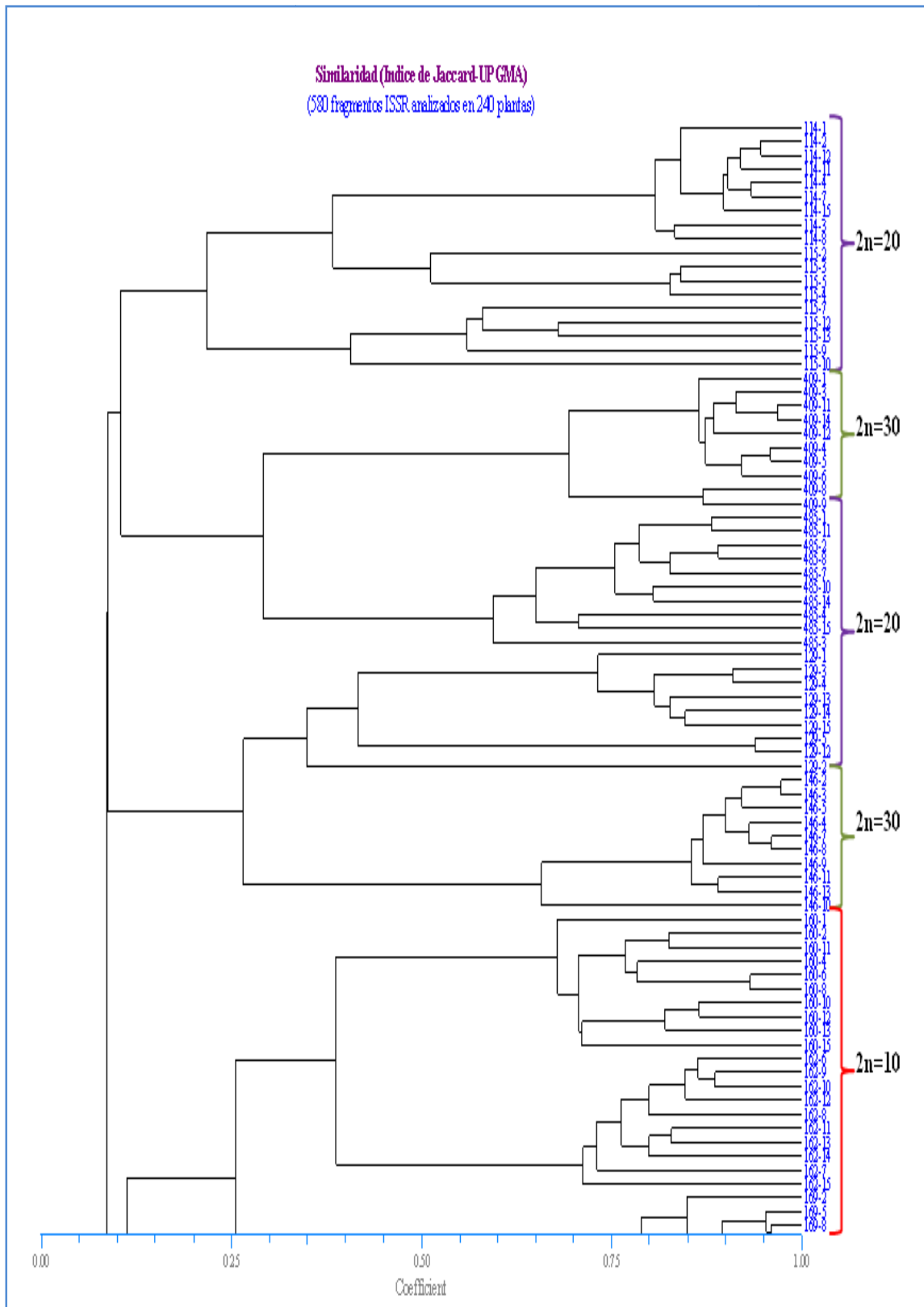
❖ *Figura 4. 24: Dendrograma representando las distancias genéticas entre 23 poblaciones silvestres de B. distachyon, dos líneas comerciales y BD21 tras el análisis de los 16 sistemas ISSR*

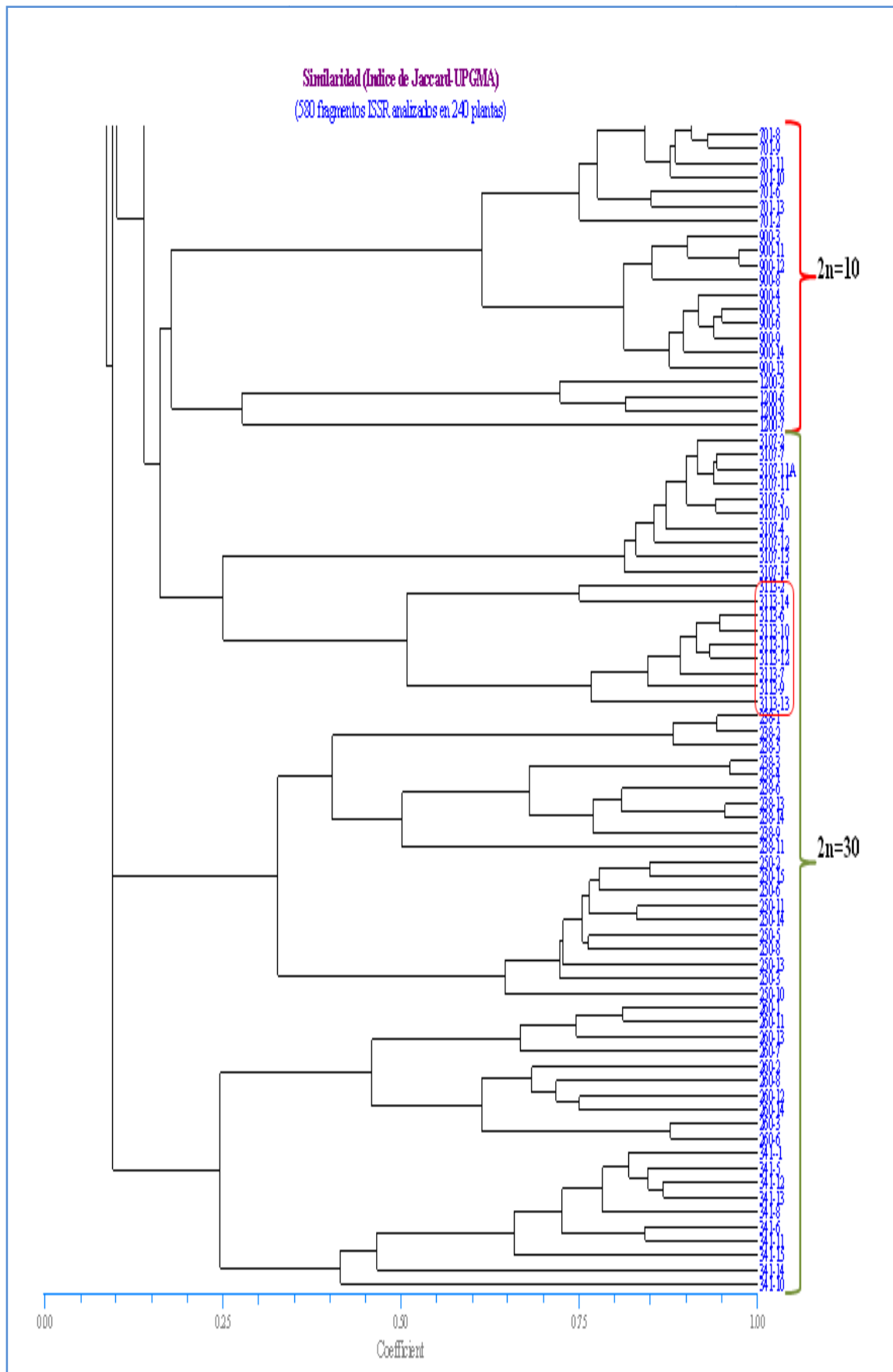


4.5.1.3 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD INTRA-POBLACIONAL

Del mismo modo, con los datos de los fragmentos de ISSR producidos en cada una de las plantas de las 23 poblaciones silvestres y de las dos líneas comerciales se ha elaborado una matriz de presencia-ausencia. A partir de esta matriz se aplicó el índice de Jaccard y el método UPGMA de agrupamiento obteniéndose el dendrograma de la Figura 4.25. Se pone de manifiesto la enorme diversidad intra-poblacional observada. De hecho de las 240 plantas analizadas sólo dos, pertenecientes a la población Bd486, mostraron el mismo patrón para todos los fragmentos de ISSR estudiados, el resto de plantas mostraron patrones únicos y distintos entre sí. En el agrupamiento se pone de manifiesto la mayor proximidad de las plantas pertenecientes a la misma población. Al igual que en el estudio anterior de variabilidad inter-poblacional, se puede observar cierto solapamiento en los agrupamientos entre plantas procedentes de poblaciones con distintos números cromosómicos.

❖ *Figura 4. 25: Dendograma representando las distancias genéticas entre 240 plantas pertenecientes a las 23 líneas de B. distachyon y las dos variedades comerciales 'Ibros' y 'Zulema'*



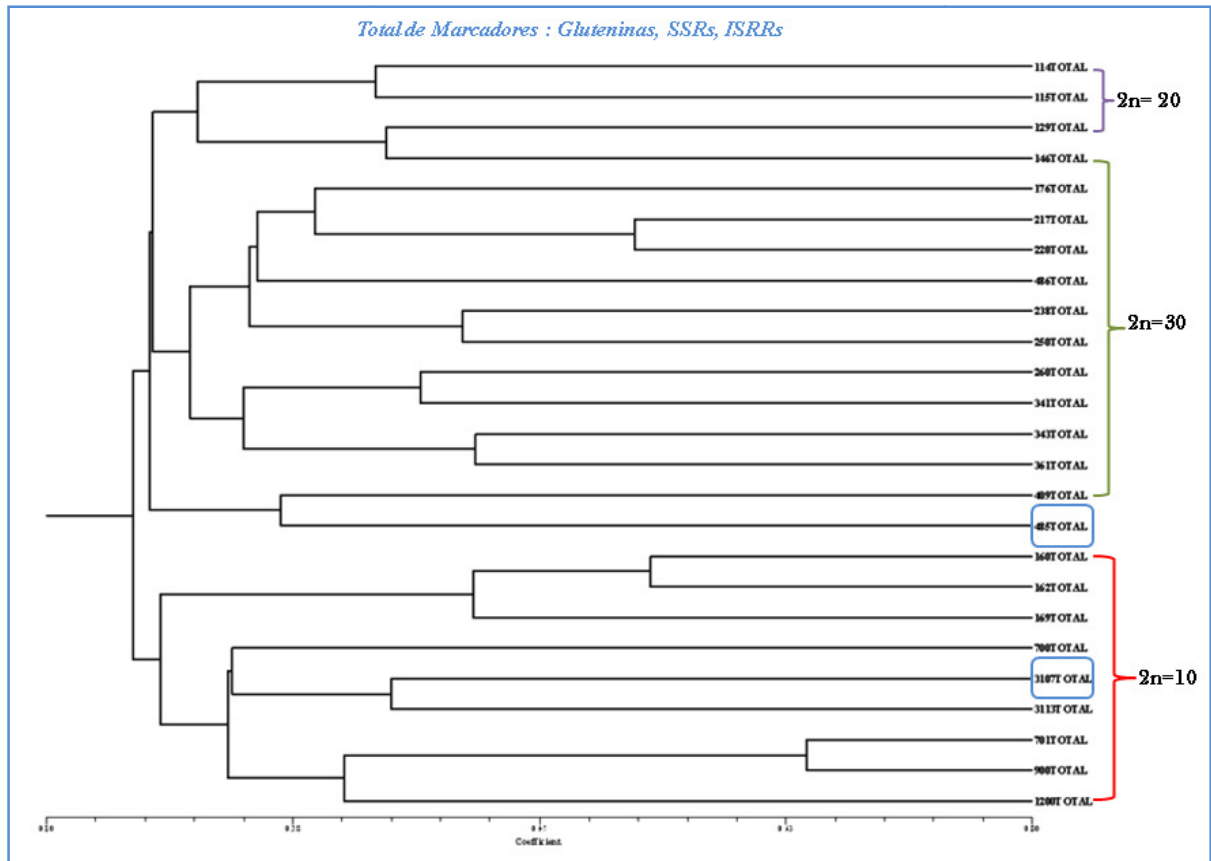


4.6 EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN *B. Distachyon*

Con el fin de evaluar la diversidad genética global y abundar en el conocimiento de la organización genética y la relación existente entre las poblaciones de la colección disponible, se ha llevado a cabo un análisis conjunto teniendo en cuenta los diversos caracteres observados. De acuerdo con esto, se agruparon todos los datos de presencia-ausencia de los tres marcadores utilizados en el estudio: Microsatélites, Inter-microsatélites y gluteninas, independientemente de su diferente naturaleza bioquímica y molecular. Como se había realizado en los estudios de cada tipo de marcadores, a partir de la matriz de datos conjunta se aplicó un análisis de las distancias entre las poblaciones, mediante la estimación del índice de Jaccard y se aplicó un análisis de agrupamiento UPGMA, que generó un dendrograma global, que se muestra en la Figura 4.26. La nueva distribución separa las poblaciones en dos grupos mayoritarios, cada uno compuesto por unos subgrupos más pequeños correlacionados en ciertas medidas con el nivel de ploidía de las poblaciones y las proximidades geográficas de procedencia.

El análisis conjunto agrupa y separa por grupos, las formas de igual número de cromosomas. El primer grupo lo constituyeron las poblaciones de $2n=10$. Las muestras recolectadas en Guadalajara (Bd1200, Bd900 y Bd701) se agruparon con coeficientes de semejanza bastante altos que van de 0,32 a 0,64. Las poblaciones de Albacete (Bd160), Cuenca (Bd162) y Jaén (Bd169) se agruparon con índices de similaridad algo más bajos (0,42 a 0,52). Cabe señalar que en este grupo se intercala la variedad comercial 'Ibros' ($2n=30$).

El segundo grupo abarca el resto del material y reúne en dos subgrupos diferenciados a las poblaciones de $2n=30$ y $2n=20$. En la parte superior del dendrograma aparecen las muestras de 20 cromosomas (Bd114, Bd115 y Bd129) con índices de similitud de 0,35, mientras que las de $2n=30$, constituyen el resto de la agrupación, presentan un índice de Jaccard más variable y corresponden básicamente a poblaciones recolectadas en Andalucía y la costa mediterránea.



❖ *Figura 4. 26: Dendrograma global representando las distancias genéticas entre las 25 poblaciones ensayadas y sumando todos los resultados proporcionados por los tres tipos de marcadores: Gluteninas, SSRs y ISSR. Poblaciones 2n=20.*

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSION

En este trabajo se ha tratado de conocer la diversidad y características de una muestra de poblaciones silvestres de la especie *Brachypodium distachyon* recolectadas en la Península Ibérica. Esta especie está considerada como un buen modelo para estudios de genómica funcional y aplicaciones biotecnológicas de interés en la mejora de los cereales de climas templados. Además, en la vertiente aplicada interesa como fuente de obtención de variedades útiles para la protección de suelos, especialmente en relación con cultivos leñosos.

En este apartado, se revisarán los principales resultados obtenidos en este trabajo a la luz de los conocimientos previos de otros autores. Los apartados que siguen se han ordenado en función de los objetivos planteados.

5.1 CITOTIPOS CROMOSÓMICOS DE *Brachypodium distachyon* Y SU ORIGEN EVOLUTIVO

La importancia de estudiar *B. distachyon* como especie modelo de cereales acentúa la necesidad de conocer su posición filogenética, origen evolutivo y su estructura genética. Al tratarse de una especie con diferentes números de cromosomas y previsiblemente diferentes niveles de ploidía, resulta imprescindible establecer el número cromosómico de las poblaciones de esta especie y analizar la posibilidad de que la hibridación haya jugado un papel importante en su evolución.

El material vegetal objetivo del presente estudio está compuesto por 23 poblaciones silvestres de *B. distachyon* y 2 líneas domesticadas y comercializadas ‘Ibros’ y ‘Zulema’ utilizadas como controles en las diferentes etapas del estudio. Tras el conteo de los cromosomas, se observó que las poblaciones recolectadas se distribuirían en tres grupos, de acuerdo con el número de cromosomas: 10, 20 y 30 (Hammami y col., 2011).

Al analizar la morfología y el tamaño de los cromosomas de cada población tras tinción con DAPI, se observa que las poblaciones con $2n=10$ presentan un cariotipo compuesto por 5 pares de cromosomas morfológicamente distinguibles como aparecen en la Figura 4.2, que coincide con el primer cariotipo de esta especie descrito por Draper y col. (2001). El cariotipo de las cuatro poblaciones con $2n=20$ cromosomas, observado en las formas estudiadas en este trabajo, es muy simétrico y constituido por 10 pares de cromosomas metacéntricos más pequeños que los cromosomas de las poblaciones con $2n=10$. Por otro lado, el análisis

cariológico de las poblaciones con $2n=30$ cromosomas revelaron la presencia de 3 pares de cromosomas fácilmente distinguibles por su mayor tamaño de los restantes, además de otros 2 algo más pequeños y 10 pares de tamaños semejantes y ligeramente más cortos que los anteriores. A la vista de estos resultados, y dada la diferencia morfológica en tamaño de los cromosomas de las poblaciones de $2n=10$ y $2n=20$ cromosomas se descarta la posibilidad de un origen por auto-poliploidía, como había sido sugerido por otros autores (Robertson, 1981; Bennet y Leitch, 1995).

Para analizar en detalle los cariotipos de las distintas poblaciones y poder establecer las relaciones filogenéticas que podrían existir entre los diferentes ecotipos, se utilizaron dos técnicas de hibridación *in situ*. FISH, utilizando las secuencias ribosomales, y GISH, con ADN genómico de poblaciones con distintos números cromosómicos.

Los resultados de FISH aplicando las sondas pTa794 y pTa71, que permiten la identificación de los genes ribosomales ADNr 5S y ADNr 45S en las distintas poblaciones de *B. distachyon*, revelan que los cromosomas portadores de estos loci, son morfológicamente distintos y diferenciables entre las formas con 10 y 20 cromosomas y que las de $2n=30$, presentan la adición cromosómica de estos loci, respecto a las de niveles cromosómicos inferiores. Así, la aplicación de FISH en el caso de las señales pTa71 demuestra que dos señales son fuertes, y se localizan en una región proximal en el cromosoma metacéntrico, y dos son débiles, y están situadas en la región distal de los pares de cromosomas pequeños, siendo estas señales correspondientes en intensidad y posición a las que se presentan las formas de $2n=10$ y $2n=20$.

De la misma forma, los resultados de GISH con el ADN genómico de poblaciones con $2n=20$ (ADNg20) en poblaciones con $2n=10$ revelan señales de hibridación solo en las regiones pericentroméricas, mientras que la hibridación de las preparaciones de poblaciones con $2n=10$ con su propio ADN genómico, revela señales más concentradas en las regiones pericentroméricas y también de forma dispersa por toda la longitud de los cromosomas. Del mismo modo, la hibridación con ADN genómico de las formas con $2n=10$ (ADNg10) en preparaciones de formas con $2n=20$, demuestra señales débiles en las regiones pericentroméricas. Sobre la base de estos resultados y, de acuerdo con el trabajo de Hasterok y col. (2006), es lógico pensar que las formas de $2n=20$ cromosomas podrían representar un citotipo diploide con composición genómica diferente a la de las poblaciones $2n=10$, y que las formas con $2n=30$, serían el producto de la hibridación y duplicación cromosómica de formas

de $2n=10$ y $2n=20$. Estos resultados contradicen las ideas previas sobre el origen autotetraploide de las formas con 20 cromosomas (Hasterok y col., 2004).

Además, el análisis GISH con ADN_{g10} y ADN_{g20} en las poblaciones con 30 cromosomas revela la presencia de 5 pares de cromosomas más grandes, similares a los observados en las poblaciones con $2n=10$, y 10 pares de cromosomas pequeños idénticos a los encontrados en los citotipos de 20 cromosomas, como se muestra en la Figura 4.5, corroborando el origen alopoloide de las poblaciones con $2n=30$ a partir de formas de *B. distachyon* con 10 y 20 cromosomas. Los resultados presentes apoyan por tanto, las conclusiones obtenidas por Hasterok y col. (2006 a y b), quienes sugirieron que la línea ABR113 ($2n=30$) representaría una forma alopoloide resultando de una hibridación espontánea de dos progenitores diploides de $2n=10$ y $2n=20$. Si bien estos autores proponen a *B. distachyon* con $2n=10$ y a *B. sylvaticum* con $2n=20$ como posibles progenitores.

La hipótesis de alopoloidía ha sido también sugerida por Wolny y Hasterok (2009), en relación con otras especies de *Brachypodium*, quienes propusieron que *B. pinnatum* ($2n=28$) sería el resultado de la duplicación cromosómica del híbrido inter-específico entre *B. distachyon* ($2n=10$) y *B. pinnatum* ($2n=18$). Los mismos autores sugieren que *B. distachyon* ($2n=10$) podría ser un ancestro común a otras especies con números superiores a 20 cromosomas como *B. phoenicoides* y *B. retusum*. El origen y relación con especies y ecotipos con $2n=18$ o 20 está todavía por dilucidar, habiéndose sugerido la posible incidencia de fenómenos de aneuploidía. Recientemente, Wolny y col. (2010), han sugerido que *B. distachyon* se separó del resto del género al principio de su evolución. Además, la secuenciación de su genoma revela una extensa sintenia con el genoma del arroz *Oryza sativa*, una gramínea tropical con un número de cromosomas igual a 12, lo que apoya la idea de que *B. distachyon* con $2n=10$ representa una forma diploide básica.

Los datos sobre la estructura genómica de estos materiales, independientemente de cómo unos citotipos deriven de otros, plantean la necesidad de una revisión taxonómica del género *Brachypodium*, siendo previsible que las poblaciones con distinto número de cromosomas y diferente composición genómica, se trate en realidad de diferentes especies.

5.2 EL CULTIVO *in vitro* DE *Brachypodium distachyon*: UN POTENCIAL APLICADO

Una especie vegetal modelo debe reunir una serie de características, entre ellas poseer una buena respuesta al cultivo *in vitro*, ya que muchas de las aplicaciones a desarrollar y de los estudios básicos que se deseen hacer, requieren la posibilidad de regenerar plantas adultas y fértiles a partir de células o tejidos. Este es el caso de las técnicas de transformación genética con genes de interés y que en cualquiera de sus aproximaciones (biolística, utilización de *Agrobacterium tumefaciens*, etc) requiere siempre del cultivo *in vitro*.

El cultivo *in vitro* a partir de embriones inmaduros para obtener callos embriogénicos capaces de regenerar plantas es el método que mejores resultados ha dado en cereales (Ahloowalia, 1982; González y col., 2001; Rikiishi y col., 2003; Halámkova y col., 2004; Li y col., 2006; Chauhan y col., 2007). En *B. distachyon* se han obtenido callos embriogénicos y regeneración de plantas con anterioridad al presente trabajo, si bien en un reducido número de genotipos, no habiéndose llevado a cabo una comparación de resultados entre formas con diferente número de cromosomas (Bablak y col., 1995; Christiansen y col., 2005; Bahar y col., 2008). En el presente estudio se han llevado a cabo dos ensayos de cultivo *in vitro* en un amplio número de muestras de poblaciones pertenecientes a los tres citotipos existentes.

El objetivo del primer ensayo ha sido el estudio de la respuesta al cultivo *in vitro* en muestras de poblaciones españolas de *B. distachyon*, utilizando dos medios de cultivo de inducción de callos, MS y MSm. El ensayo suponía una aproximación con el fin de evaluar la capacidad de formación de callos embriogénicos y de regeneración plantas verdes. La heterogeneidad intra-poblacional observada tras el estudio de los marcadores moleculares y bioquímicos, indica una previsible heterogeneidad también en la respuesta al cultivo *in vitro*. El ensayo se ha llevado a cabo en embriones inmaduros procedentes de una amplia muestra de plantas de cada población. Los resultados obtenidos persiguen conocer de forma comparada la respuesta interpoblacional, dejando de momento un análisis de las diferencias que pudieran darse también entre plantas de la misma población.

En esta primera estimación de la diversidad genética se han utilizado 4.000 embriones cigóticos inmaduros. Básicamente, los resultados demuestran la existencia de una elevada variabilidad en la respuesta entre las diferentes muestras procedentes de las poblaciones en los dos medios de inducción de callos empleados. Existe además una notable

interacción entre las muestras ensayadas y el medio de cultivo, lo que no permite elegir un único medio de aplicación válido para todos los genotipos analizados. Así, las muestras de la población Bd486 producen callos (embriogénicos + fofos) en el 100% de los embriones puestos en cultivo en el medio suplementado con maltosa (MSm), mientras que en el medio MS, preparado con sacarosa, no se obtuvo ningún callo. Por el contrario, las muestras ensayadas procedentes de otras poblaciones dieron resultados similares en los dos medios de inducción, como es el caso de la población Bd220. Cabe destacar que las muestras de la población Bd129 resultaron recalcitrantes al cultivo *in vitro* sin que ninguno de los embriones cigóticos inmaduros puestos en cultivo originase callos. Esta respuesta diferencial al cultivo *in vitro* dependiente de la procedencia de la muestra había sido ya observada en otras especies, como la cebada (Rikiishi y col., 2003; Halámková y col., 2004), el trigo blando (Delaporte y col., 2001; Mzouri y Amssa, 2002; Zale y col., 2004), o el trigo duro (Bommineni y Jauhar0, 1996; González y col., 2001). Estos resultados apoyan la existencia de una base genética en la respuesta al cultivo *in vitro*.

Los dos medios de cultivo empleados se diferencian en la fuente de carbono sacarosa en el medio MS y maltosa en medio MSm. En trabajos previos en otras especies vegetales se había observado que la maltosa permite obtener una mejor respuesta al cultivo *in vitro*, probablemente debido a que hay una menor acumulación de glucosa, resultante de la hidrólisis de la sacarosa, que incrementaría la presión osmótica del cultivo (Roberts-Oehlschlager y col., 1990). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio con las muestras de *B. distachyon* no permiten concluir que el medio MSm sea superior al medio MS, ya que la interacción con el genotipo es tal, que es más importante este factor que la composición del medio de cultivo.

Con respecto a la capacidad de regenerar plantas verdes a partir de los callos formados en la fase de inducción de la embriogénesis somática, también se puede observar una amplia variabilidad en la respuesta, en función de la procedencia de las muestras. Así, hay poblaciones de cuyas muestras cultivadas *in vitro* no se han regenerado plantas verdes, como es el caso de las muestras de las poblaciones Bd162 (2n=10), Bd361 (2n=30) y Bd1200 (2n=10), mientras que en otros casos se han producido por encima de 4 brotes/callos, como ocurre con las muestras de las poblaciones Bd250 y Bd409 (ambas 2n=30).

Teniendo en cuenta los resultados de producción de callos embriogénicos y la capacidad de regeneración de plantas verdes se puede concluir que las poblaciones analizadas

encierran una amplia variabilidad de respuesta, que abarca desde poblaciones recalcitrantes, como las muestras de la población Bd129 ($2n=20$), a otras con un nivel de respuesta medio-alto, como ocurre con las muestras procedentes de las poblaciones Bd220 y Bd341 (ambas $2n=30$) y la línea comercial 'Zulema' ($2n=10$), que pueden constituir un buen material de partida para ensayos más amplios de cultivo *in vitro*.

A la luz de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar se eligieron seis poblaciones de la colección: Bd160 y 'Zulema' (ambas $2n=10$); Bd114 y Bd115 (ambas $2n=20$); y Bd238 y Bd341 (ambas $2n=30$). A partir de estos materiales se llevó a cabo un estudio sobre la influencia de los diferentes niveles cromosómicos de las poblaciones analizadas, el tipo y concentración de la auxina añadida a los medios (2,4-D, Dicamba, o Piclorán) y la interacción 'medio x genotipo' en dos etapas del cultivo: inducción de embriogénesis somática y regeneración de plántulas verdes. El estudio se desarrolló en 9 medios de cultivo de inducción de callos y un medio de regeneración.

En la primera etapa del cultivo, consistente en la inducción de la embriogénesis somática, intervienen una serie de variables que determinan en gran parte el potencial embriogénico real de cada genotipo ensayado: TC= nº de callos totales/nº total de embriones; CC= nº de callos compactos/ nº total de callos; SC= nº de callos fofos/ nº total de callos. Los callos embriogénicos son los que presentan una mayor importancia, por ser los que generalmente tienen capacidad para regenerar plántulas. Por ello, se ha realizado un estudio de la producción de callos embriogénicos en las seis poblaciones evaluadas. El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas entre los distintos materiales ensayados para las tres variables citadas. Además, el test de LSD aplicado a los datos reveló también la existencia de diferencias significativas entre las muestras pertenecientes a las poblaciones de distintos niveles cromosómicos.

La variable CC es la más determinante del éxito de esta primera fase. Los genotipos de menor número de cromosomas ($2n=10$) son los que manifestaron las respuestas más bajas en cuanto a la producción de callos compactos/ total de callos formados. Son además los que han producido un porcentaje más alto de callos blandos. Los restantes materiales, con $2n=20$ y $2n=30$, presentaron unas buenas respuestas con niveles más altos para esta variable. Además, los medios BR1, BR2 y BR3 preparados con la auxina 2,4-D a unas concentraciones de 1mg/l, 2 mg/l y 3mg/l, respectivamente, son los que mejor respuesta ofrecieron a la producción de callos embriogénicos. Sin embargo, los medios BR7, BR8 y BR9, preparados con piclorán

(1mg/l, 2 mg/l y 3mg/l, respectivamente) ofrecieron los valores más bajos de formación de callos embriogénicos y unos porcentajes altos de callos fofos.

Son muchos los trabajos en los que se ha estudiado la influencia de la composición del medio en el desarrollo de los embriones inmaduros (Carman y col., 1988 y Hanzel y col., 1985). En este sentido, Elwafa y Ismail (1999), y Alok y col. (1999), han propuesto que la formación de callos depende de varios factores determinantes tal como el tipo del explante (Vasil, 1994) y su estado de maduración (Varshney y col., 1996), el tamaño del embrión (Draper y col., 2001) y la composición nutricional del medio de cultivo empleado (Mathias y Simpson, 1986 y Ahmad y col., 2002)

Los resultados del presente trabajo confirman lo observado por Serhantová y col. (2004), que analizaron la respuesta al cultivo *in vitro* de 12 cultivares de cebada en medios suplementados con 2,4-D, Dicamba y Piclorán y concluyeron que la mejor respuesta la presentan los embriones sembrados en medios preparados con 2,4-D a una concentración igual a 2,5 mg/l, sin que fuesen significativos los resultados en los medios suplementados con Dicamba y Piclorán. De igual manera, Sikandar y col. (2007), estudiaron la respuesta al cultivo de dos variedades de trigo harinero y sugirieron que la frecuencia de callos embriogénicos variaba en función de la concentración de la fitohormona utilizada (2,4-D) y observaron un potencial máximo a una concentración de 3,5 mg/l en las variedades utilizadas. También, Shafquat y col. (2009), estudiaron la respuesta al cultivo *in vitro* de tres variedades de *Triticum aestivum* en diferentes concentraciones de auxinas y sugirieron que la variedad 'Khirman' produjo un porcentaje alto de callos compactos en un medio suplementado con 2,4-D (1 mg/l) + kin (1 mg/l) + NAA (2 mg/l) mientras que la variedad 'Soghat-90' no ha mostrado una preferencia a un medio en concreto. Por el contrario, Kilinc y col. (2004), analizaron el comportamiento de siete cultivares de trigo blando en medios preparados con distintas concentraciones de Dicamba (2,5; 5; 7,5 y 10 mg/l) y sus resultados mostraron que la tasa de formación de callos está influida significativamente por el genotipo y la concentración de la fitohormona, obteniéndose las tasas más altas de callos cuando se empleó una concentración de 5 mg/l de Dicamba. En este contexto, Sener y col. (2008), estudiaron el comportamiento de los embriones inmaduros de unos genotipos de cebada sembrados en medios preparados con Piclorán a diferentes concentraciones (2,5; 5; 7,5 y 10 mg/l) y observaron unas diferencias muy significativas en la tasa de producción de callos embriogénicos en función de la concentración, que iba del 0,0 a 39,1%. Este mismo grupo de investigadores, confirmaron que los genotipos ensayados dieron mejor respuesta en medios suplementados con una concentración bastante

alta de Piclorán (7,5 mg/l) con una tasa de formación de callos estimada en el 31,3%. Sin embargo, en el caso de *B. distachyon* los medios preparados con Piclorán indujeron la formación de una mayor proporción de callos fofos, independientemente de su concentración en el medio de cultivo.

En el presente estudio, es de destacar la interacción del ‘medio x genotipo’, así como la importancia del número de cromosomas de las poblaciones analizadas en la fase de inducción de la embriogénesis somática. Las poblaciones con números de cromosomas superiores ofrecen mejor respuesta, lo que coincide con los resultados obtenidos por Christiansen (2005), que analizó la respuesta al cultivo *in vitro* a partir de embriones inmaduros de 4 poblaciones de *B. distachyon* y concluyó que los genotipos BDR017 y BDR030 ambos con $2n=20$ daban tasas de inducción de callos embriogénicos muy altas y próximas al 91%. Por el contrario, los genotipos BDR001 y BDR018, que poseen un número cromosómico de $2n=10$, mostraban unas tasas de inducción de callos más bajas (30%).

La segunda fase del cultivo *in vitro*, la fase de regeneración de brotes verdes, es una de las etapas más críticas en todo el proceso de cultivo. Los callos obtenidos en cada uno de los nueve medios de inducción (BR1 a BR9) se distribuyeron en cuatro replicas y fueron sembrados en el medio de germinación G1. Las variables que caracterizaron esta fase son TSV, TSVC, SCC, SSC y R. En casi todos los casos se observaron diferencias estadísticamente significativas y es de destacar que las poblaciones Bd238 y Bd341 ($2n=30$) fueron las que ofrecieron la mejor respuesta. Sin embargo, las poblaciones con $2n=20$ cromosomas han formado un número de plántulas verdes más bajo del que sería previsible en función de la alta tasa de callos embriogénicos formados en la fase anterior. De hecho, los genotipos de $2n=20$, dieron lugar a callos compactos de gran tamaño, cuyas superficies presentaban, en algunos casos, centenares de embriones somáticos. Sin embargo, al pasarlos al medio de germinación, se observó que un gran porcentaje de estos callos apenas producían brotes y tras dos semanas de cultivo aparecían unas zonas necróticas en los calli, que finalmente no dieron lugar a brotes verdes. Este fenómeno no había sido observado en el ensayo preliminar, lo que sugiere una influencia de las condiciones en que se han desarrollado las plantas donadoras de los embriones, que en el segundo ensayo crecieron en un ambiente más húmedo que en el primer experimento.

Estos resultados apoyarían los resultados de Hess y Carman (1998), quienes afirmaron que las condiciones ambientales en las que crecen las plantas podrían afectar la

concentración endógena de hormonas, ralentizando la capacidad para formar callos embriogénicos, independientemente del genotipo utilizado. De igual manera, Dejan y col. (2010), analizaron la respuesta al cultivo *in vitro* de 96 genotipos de trigo harinero y demostraron la importancia de los factores climáticos del ciclo vegetativo de la planta tal como la temperatura y la lluvia en la producción de callos, también se observó la influencia del estado de floración en el éxito de la fase de regeneración de plantas. Sin embargo, el número de plantas/embrión no estaría condicionado por ningún tipo de factor climático.

Los resultados de este trabajo, apoyan también las conclusiones de Papenfus y Carman (1987), Ozgen y col. (1998), y Benkirane y col. (2000), que señalan que en trigo, en condiciones óptimas de cultivo, la fase de inducción de callos y la fase de regeneración de plantas verdes son fenómenos independientes. En *Brachypodium* el comportamiento de las poblaciones analizadas confirman esta hipótesis y permite concluir que el proceso de cultivo *in vitro* está determinado por dos fases separadas en el tiempo y que cada una debe contar con un sistema de control genético distinto (Hammami y col., 2011). En las fases de crecimiento de embriones o de callos podrían intervenir varios genes reguladores, como han explicado Bhaskaran y Smith (1990) y Bregitzer y Campbell (2001), quienes han sugerido además que la fase de regeneración de plántulas podría depender de un sistema poligénico bajo el control de una serie de genes reguladores desconocidos.

Finalmente, la estimación global [R] de la capacidad de una población para regenerar plantas, partiendo del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros, indica diferencias estadísticamente significativas entre las seis poblaciones evaluadas. Así, Bd238 (2n=30) mostró el valor más elevado, alcanzando un porcentaje de 2,21 plantas regeneradas/embrión cultivado, seguida por la población Bd341 (2n=30) que manifestó un valor próximo a 0,47. Las poblaciones que peor aptitud mostraron fueron las de 10 cromosomas y la Bd114 (2n=20).

Estos resultados apuntan a los materiales con 2n=30 como los más apropiados para la obtención de plantas por regeneración *in vitro*. Los resultados obtenidos también señalan la influencia del genotipo y su interacción con los componentes del medio, en el mismo sentido que los resultados obtenidos en trigo por Mitic y col. (2006), sugiriendo que el genotipo juega un papel fundamental en la capacidad de los callos para regenerar plántulas.

5.3 DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Brachypodium distachyon*

5.3.1 Estudio de la variabilidad genética en *B. distachyon*

Desde sus comienzos, el objetivo de la mejora genética vegetal ha sido seleccionar genotipos superiores a partir del reconocimiento de fenotipos superiores. El grado de éxito de este proceso depende del manejo de la diversidad genética que encierra el material, del sistema de control genético de los caracteres de interés y de la influencia ambiental. Para estudiar la variabilidad genética y evaluar la diversidad existente en un material vegetal de partida, diverso por su procedencia, como es el caso de las poblaciones silvestres de *B. distachyon* en el presente trabajo, se pueden aplicar una serie de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares. Estos nos ofrecen el conocimiento de la heterogeneidad del material y permiten estimar el grado de similitud existente entre los genotipos de la colección analizada.

Entre los marcadores utilizados en este trabajo, las proteínas de reserva del endospermo ofrecen una buena visión de la diversidad. En una primera aproximación, se procedió a la extracción y estudio de las proteínas totales de unas 15 plantas de cada población siguiendo el método descrito por Singh y Shephred (1991), con ciertas modificaciones. Tras la electroforesis en medio básico (SDS-PAGE) se identificaron 23 proteínas distintas. Algunas mostraron un cierto valor discriminatorio tal como la proteína “2” y “201” (Tabla 4.12). Examinando la matriz de presencia-ausencia de las proteínas se aprecia una elevada diversidad genética de la mayoría de las proteínas entre las distintas poblaciones lo cual se traduce en una distribución de las poblaciones en dos grupos discretos con tendencia opuesta (Figura 4.15), que reflejan en cierta medida la proximidad geográfica de las zonas de recolección de las poblaciones de cada grupo. Sin embargo, las proteínas totales fueron poco informativas y dejaban algunas ambigüedades por la saturación de los geles de poliacrilamida en bandas y la dificultad de distinción entre algunas de ellas al no poderse distinguirse claramente las comunes en diferentes geles por peso molecular.

Con el fin de precisar aun mejor la diversidad en proteínas, se planteó un segundo ensayo, utilizando un método de extracción diferencial, separando las gluteninas de las gliadinas en geles de acrilamida concentrados al 12%. De este modo, se pudieron distinguir un total de 22 gluteninas cuyos peso moleculares variaron entre 22.14 y 89.2 kDa, de las bandas 1 a la 18 A, respectivamente. Este rango se corresponde con el de las gluteninas de bajo peso

molecular LMW-GS identificadas en trigo. Las 22 bandas de gluteninas identificadas dieron bastante información sobre la estructura genética de las poblaciones estudiadas.

Para conocer el grado de la diversidad genética que abarca la colección se estimó el índice de Heterogeneidad (Het. Index) registrado en la Tabla 4.13. Este parámetro varió de 0,16 (Bd115) hasta 0,43 (Bd250). Al examinar las frecuencias de gluteninas entre las poblaciones y entre plantas de cada población, se constata, el orden creciente de diversidad al aumentar el número de cromosomas. Asins y Carbonell (1986) y Soler y col. (1993), sugirieron que una población debe considerarse polimórfica para los sistemas de proteínas e isoenzimas ensayados habitualmente en las gramíneas, cuando se observa una variación en una banda/o patrón en al menos un individuo de la población. De acuerdo con esto, las 23 poblaciones silvestres de *B. distachyon* serían polimórficas y en su conjunto presentan un alto grado de polimorfismo y variabilidad genética inter y intra-poblacional.

Al igual que en el caso de las gluteninas LMW, en los dos sistemas moleculares analizados, microsatélites (SSR) y inter-microsatélites (ISSR), se detecta un alto grado de polimorfismo inter e intra-poblacional. Las proteínas de reserva del endospermo y los productos de amplificación del ADN genómico poblacional con microsatélites e inter-microsatélites nos muestran un panorama de gran variabilidad. En el caso de las gluteninas LMW se observaron 94 patrones electroforéticos diferentes en el conjunto de 289 plantas de las 23 poblaciones naturales de *B. distachyon* analizadas. En el caso de los marcadores moleculares en que se ha podido aplicar a un conjunto de 240 plantas individuales tampoco se han encontrado dos poblaciones idénticas. De acuerdo con los criterios señalados anteriormente todas las poblaciones resultaron polimórficas.

Los 11 sistemas SSRs utilizados han proporcionado un total de 156 fragmentos polimórficos, con mayor número de fragmentos en las formas de $2n=30$ que de $2n=20$, y de $2n=20$ que de $2n=10$. El conjunto de poblaciones comparte solo el 15% de las bandas amplificadas. Las formas de 30 cromosomas presentan más del doble de los fragmentos amplificadas (98 fragmentos) que las de 10 cromosomas (44 fragmentos) y las de 20 cromosomas ocupan una posición intermedia (87 fragmentos). En este sentido, Vogel y col. (2009), analizaron la diversidad genética de una colección de 187 líneas diploides de *B. distachyon* recolectadas en 56 localidades distintas del territorio turco, utilizando 43 microsatélites y sus resultados mostraron la existencia de una diversidad genotípica considerable entre las líneas, también se observó un alto nivel de polimorfismo entre los

genotipos procedentes de la misma localidad. Según los mismos autores, se observaron ciertas correlaciones entre los SSR y la distribución geográfica del material. Además se destacó un nivel muy alto de variabilidad genética en cada localidad.

El estudio de la diversidad intra-poblacional para los sistemas microsatélites, entre las 240 plantas pertenecientes a 23 poblaciones naturales de *B. distachyon* y las dos líneas comerciales 'Ibros' y 'Zulema', muestra un patrón por cada individuo y la inexistencia de patrones comunes. En este contexto, Chen Guo-yue y col. (2007), utilizaron los microsatélites para estudiar la variabilidad genética en anfiploides sintéticos artificiales de trigo tetraploide (*Triticum durum*) y concluyeron que esos marcadores son altamente polimórficos llegando a detectar 326 alelos en 46 loci con una media de 6,65 alelos por locus.

Resultados similares se observan al examinar los resultados de la amplificación del ADN poblacional de los individuos pertenecientes a las 23 poblaciones silvestres de *B. distachyon* y las dos líneas comerciales con los inter-microsatélites, ISSR. El conjunto de los 16 ISSRs proporcionaron un total de 580 fragmentos polimórficos con una medio de 36,25 bandas por ISSR. De nuevo la diversidad se incrementó en función del número de cromosomas de las poblaciones. Las formas de $2n=30$ presentaron un total de 470 fragmentos en su conjunto, mientras que las de $2n=20$ y $2n=10$, presentaron 314 y 361 fragmentos, respectivamente.

Al evaluar los resultados obtenidos por los ISSRs, destaca su mayor importancia en el análisis de la variabilidad intra-poblacional. Al examinar el dendrograma del global de las plantas (Figura 4.25), se aprecia que las pertenecientes a la misma población aparecen agrupadas en subgrupos más pequeños, pero conviene decir que en ningún caso se observaron plantas que compartieran el mismo perfil de bandas amplificadas, lo que demuestra el elevado grado de variabilidad que encierra el material estudiado para este tipo de marcadores.

Los resultados del presente trabajo respecto a la diversidad encontrada concuerdan con los de trabajos previos realizados en otras especies. De este modo, Terzopoulos y Bebeli (2008), estudiaron la diversidad genética de 20 poblaciones locales griegas de una colección de *Vicia faba*, anteriormente descrita por Terzopoulos y col. (2003). El objetivo del análisis fue determinar el grado de concordancia entre los datos morfológicos y la clasificación basada en el estudio de los ISSRs. En un ensayo preliminar se evaluaron once sistemas ISSRs, seis de los cuales no dieron resultados importantes y uno proporcionó bandas monomórficas. Los cuatro restantes (ISSR-3, ISSR-5, ISSR-8 y ISSR-13) permitieron discriminar la variación existente, generando 55, 34, 50 y 53 bandas, que se tradujeron en un polimorfismo del 100%, 97%, 100%

y 98.1% respectivamente. En 2004, Brantestam y col., aplicaron cuatro inter-microsatélites (UBC-888, UBC-889, UBC-890 y UBC-891) al estudio de la diversidad genética en cultivares de cebada bálticos y nórdicos. El conjunto de marcadores produjo 47 bandas polimórficas, demostrando un elevado grado de diversidad.

Dado que *B. distachyon* es una especie preferentemente autógama, con tendencia a la fijación de genotipos homocigotos, la heterogeneidad observada debe ser debida más a mezclas de líneas homocigóticas que a heterocigosis. Sin embargo, ninguno de los sistemas analizados permite la distinción de alelos, por lo que este extremo no puede ser comprobado. Lo más lógico es pensar que las poblaciones analizadas están compuestas por mezclas de genotipos homocigóticos, entre los que podría haber uno predominante, mantenidos como mezclas de líneas puras por auto-polinización durante generaciones. De este modo, al analizar las proteínas de más de una decena de plantas de la misma población en cada población se encuentran un patrón predominante y algunas plantas con patrones electroforéticos distintos. Esto sugiere la existencia de fenómenos de polinización cruzada que darían lugar a formas heterocigóticas segregantes, de las que con el tiempo y por la autogamia predominante se generarían nuevas combinaciones genéticas homocigóticas en el seno de cada población. Esta hipótesis explicaría el alto nivel de polimorfismo observado en las poblaciones y tiene importancia al considerar la estructura genética de la especie.

Las poblaciones de *B. distachyon* en la península Ibérica se encuentran en los límites occidentales del área de distribución de la especie, y de acuerdo con Stebbins (1957), las especies autógamas presentan un mayor grado de diversidad en los bordes de su distribución, lo que podría explicar la elevada diversidad inter e intra-poblacional encontrada en las muestras de *B. distachyon* analizadas. También es posible que las diferencias de variabilidad dentro y entre las poblaciones sean consecuencia de niveles diferentes de un porcentaje previsiblemente bajo de alogamia, dependiendo de factores ambientales que pueden afectar a las poblaciones de una misma especie en un lugar y en un momento concreto (Sanders y Hamrick, 1980; Schoen y Clegg, 1985; Golenberg, 1988; Monte y col., 1999 y Nieto y col., 2000).

5.3.2 Utilidad de los marcadores bioquímicos y moleculares en el análisis de la diversidad

En realidad son muy pocos los trabajos orientados al estudio de la diversidad genética en *B. distachyon* utilizando marcadores bioquímicos como las proteínas de reserva del endospermo.

Los trabajos publicados hasta el momento sobre proteínas de *Brachypodium* se han interesado sobre todo en la identificación de su naturaleza bioquímica, o en su aplicación para

esclarecer la filogenia de la especie y sus afinidad con otras especies, en particular las de climas templados tales como el trigo, la cebada y restantes gramíneas. Laurentia-Chingcuanco y Vensel, (2008) fueron los primeros en identificar las proteínas del endospermo de *B. distachyon* en una forma de $2n=10$ cromosomas y sugirieron que el endospermo de *Brachypodium* está básicamente compuesto por dos globulinas tipo 12S y 7S. Además, fueron identificadas como globulinas las proteínas de otras tres formas de $2n=30$ cromosomas. Recientemente, Larré y col. (2010), estudiaron la composición en proteínas de las semillas de una línea diploide de *B. distachyon*, separando las proteínas por su solubilidad combinado con una técnica de proteómica. Los autores citados han detectado la coexistencia de dos tipos de proteínas, globulinas y prolaminas, pero no han identificado proteínas tipo albumina. El mismo grupo de investigación, sugiere que las globulinas identificadas son de tipo 11S y su propiedad de solubilidad se parece mucho a las gluteninas del arroz. De acuerdo con estos autores, este resultado clasificaría a *Brachypodium* como más relacionado con el arroz y la avena que con el trigo. En este contexto, Wang y col. (2010), han confirmado la abundancia de gluteninas tipo LMW como las habituales en el endospermo del trigo en los extractos proteicos de tres líneas de $2n=10$ cromosomas y otras diez de $2n=30$ de *Brachypodium*, y sugieren la existencia de una expresión mínima de gluteninas tipo HMW como las presentes en la harina de trigo. En este trabajo se destaca la utilidad de las proteínas como marcadores muy informativos y reproducibles en la identificación de proteínas del endospermo de diferentes especies que podrían tener un cierto grado de parentesco entre ellas.

En cambio, Opanowicz y col. (2010), mostraron que la composición de la pared celular de *Brachypodium* es más parecida a la de cebada y avena que a la de trigo. Por otra parte, los mismos autores han confirmado que el desarrollo del endospermo de los granos de *B. distachyon* es muy similar al de las gramíneas de clima templado, reflejando su posición filogénica entre la tribu de *Triticeae* y el arroz. En el mismo contexto, Christensen y col. (2010), realizaron un estudio comparativo de la composición de la pared celular de *Brachypodium*, cebada y trigo blando y demostraron que en las tres especies, el depósito de los arabinosilanos aumentó constantemente durante el crecimiento de la planta.

El objetivo de partida de este trabajo no ha sido el de identificar los tipos de proteínas encontrados en el endospermo de *Brachypodium*, sino la evaluación de la diversidad natural que encierra el material y la capacidad de este tipo de marcadores para analizar la diversidad que encierran y la proximidad genética entre las diferentes poblaciones, teniendo en cuenta el número de cromosomas y la procedencia geográfica. Las 22 gluteninas identificadas

en los geles de poliacrilamida han permitido establecer un dendrograma compuesto por 3 grupos, que separan las poblaciones en grupos de diferente número de cromosomas. Al examinar esta distribución se observa la mayor similitud de algunas poblaciones de origen geográfico próximo. De este modo, las poblaciones recolectadas de la zona de Guadalajara (Bd700, Bd701 y Bd900) aparecieron con un índice de similitud máximo. Las proteínas de reserva del endospermo al estar codificadas por genes de expresión muy estable juegan un papel fundamental en el establecimiento de distancias genéticas, lo que permite sacar conclusiones preliminares sobre la estructura genética de cada población, ya que algunas de ellas presentaron un alto valor discriminatorio.

De este modo, Khan (1992), aplicó el estudio de las proteínas del endospermo de algunas especies del género *Brachypodium* con el fin de esclarecer la proximidad taxonómica de las diferentes especies. El estudio comprendió 9 especies del género *Brachypodium* (*B. sylvaticum*, *B. glaucovirens*, *B. pinnatum*, *B. rupestre*, *B. phoenicoides*, *B. retusum*, *B. mexicanum* y *B. distachyon*). Sobre la base de las proteínas observadas en este conjunto de especies, se estimó un índice de semejanza que permitió determinar el grado de afinidad entre las 9 especies estudiadas. Se identificaron 8 grupos de bandas, de las que en cada grupo hubo una banda como mínimo y seis como máximo. Los citados autores realizaron un análisis de similitud y establecieron un agrupamiento identificando las relaciones entre todas las especies. La mayoría de las especies Europeas (*B. sylvaticum*, *B. glaucovirens*, *B. pinnatum*, *B. rupestre*, *B. phoenicoides* y *B. retusum*) presentaban un índice de semejanza muy elevado (cerca de 78%) y se alejaban de las dos especies perennes *B. sylvaticum* y *B. glaucovirens*, que presentaban un coeficiente de afinidad que superó el 93%. *B. distachyon* y *B. mexicanum* mostraban un alto nivel de afinidad (85,7%), aunque la primera está adaptada al clima mediterráneo y la segunda se extiende por la zona mesoamericana, siendo esto indicativo de la dispersión y la evolución de las especies. Las muestras analizadas de la especie *B. pinnatum* no han mostrado unas diferencias significativas, y aquellas caracterizadas por un número de cromosomas igual a $2n=18$ tuvieron casi las mismas bandas que las pertenecientes a la especie *B. rupestre*. La especie *B. distachyon* tuvo un índice de afinidad muy variable que iba desde el 68,3% con *B. sylvaticum* hasta el 85,7% con *B. mexicanum* (Khan, 1992).

El polimorfismo basado en proteínas ha sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas. Las proteínas de reserva del endospermo se han utilizado en cereales para clasificar variedades cultivadas y afines de trigo, cebada y otros cereales (Meachman y col.,

1978; Damania y col., 1983; Nevo y col., 1983; Wilson, 1985; Bernardo y col, 1996; Nieto Taladriz y col., 1997, 1998, 2000; De Bustos, 1999; Nieto López y col., 2003).

Tras el desarrollo de las tecnologías del ADN, la investigación de la diversidad se ha visto potenciada por la disponibilidad de una gran cantidad de marcadores. Los marcadores moleculares en general, y los SSRs e ISSRs en particular, son de una gran utilidad para los estudios de la diversidad genética ya que se analiza directamente y sin interferencias una diversidad oculta y previsiblemente neutra del material vegetal (Breyne y col., 1999; Amsell y col., 2000). Se trata además de un tipo de marcadores que alcanza a cualquier tipo de región del genoma, lo que permite utilizar una muestra seleccionada apropiada para los estudios de diversidad genética (Monte y col., 2002; Gómez de Nova y col., 2001, Gómez de Nova, 2003; Nieto y col., 2003).

Los microsatélites son muy útiles en estudios genéticos ya que combinan varias ventajas como su codominancia, multiallelismo y su alta heterocigosidad, permitiendo una discriminación precisa incluso entre individuos estrechamente emparentados. Otras ventajas añadidas son la necesidad de cantidades mínimas de ADN para proceder a su estudio, la alta reproducibilidad y la posibilidad de su automatización empleando marcajes fluorescentes y analizadores genéticos. En el caso del presente estudio, los SSRs e ISSRs han resultado muy informativos respecto a la caracterización de la variabilidad existente en el material vegetal analizado. Los estudios de agrupación de las poblaciones utilizando estos marcadores demuestran que las poblaciones de la misma composición cromosómica tienden a agruparse en las mismas ramas de los dendrogramas.

Por otra parte, al examinar los resultados obtenidos con los SSRs y la distribución global de las poblaciones se concluye que las poblaciones de $2n=30$ cromosomas suman fragmentos amplificados en las muestras del ADN genómico de las poblaciones $2n=10$ y $2n=20$. Este resultado apoya los resultados de FISH y GISH sobre el origen alopoloide de las formas de $2n=30$, a partir de un híbrido entre las formas de $2n=10$ y $2n=20$. Además se observó la aparición de microsatélites específicos de las formas con un determinado número de cromosomas. Así, el sistema SSR8 amplifica solo en muestras de poblaciones de 30 cromosomas, lo que se podría explicar por la falta de tipos representativos en la colección analizada o por la existencia de distintos donantes genómicos para la constitución de las formas de $2n=30$.

En este contexto, Brasad y col. (2000), han demostrado la eficiencia de los marcadores SSR en detectar el polimorfismo y la diversidad genética en una colección de 55 genotipos élitos de trigo procedentes de 29 países. Los mismos autores propusieron que con solo 12 sistemas microsatélites se podrían distinguir 48 ecotipos del total de los 55 analizados, concluyendo sobre la utilidad de los sistemas SSR para evaluar la diversidad genética poblacional. De la misma manera, Landjeva y col. (2006), estudiaron la diversidad genética en 91 variedades de trigos de Bulgaria, cultivadas entre 1925 y 2003 y concluyeron que con 19 SSRs se puede discriminar entre las variedades antiguas, que manifestaron un alto nivel de heterogeneidad, y las variedades modernas que parecen ser más homogéneas.

Además, los marcadores SSR resultan muy informativos para conocer la composición del genoma. Si nos fijamos en los porcentajes de amplificación de los sistemas SSRs en las muestras de las distintas poblaciones aquí estudiadas se constató que el porcentaje de amplificación incrementa con el número cromosómico y que con solo 11 SSR se amplificaron 156 fragmentos. Esto refleja la riqueza del genoma de *Brachypodium* en este tipo de secuencias. Eso coincide con los trabajos de Naxin y col. (2008), que demostraron la frecuencia de los microsatélites en los BES de *Brachypodium distachyon* estimadas en un SSR cada 3,9 kb secuenciadas. Si se compara este dato con los de otras especies de plantas como el arroz (un SSR cada 84,6 Mb) o *Arabidopsis thaliana* (un SSR cada 27,5 Mb) se aprecia que un genoma pequeño, como el de *Brachypodium* es especialmente rico en marcadores SSR.

Del mismo modo, los inter-microsatélites corroboran la gran diversidad natural del material estudiado. Resultan incluso más polimórficos, probablemente debido al gran número de fragmentos amplificados y detectados en los geles de agarosa. Examinando los distintos perfiles de ISSRs se subraya una gran variabilidad intra-poblacional, de manera que en las 240 muestras de plantas analizadas no hay coincidencias de perfiles. Además la observación global del dendrograma resultante del análisis de similaridad (Figura 4.25) muestra que las plantas pertenecientes a la misma población tienden a parecer congregadas en grupos comunes con unas distancias mínimas. Sin embargo, el dendrograma que representa la variabilidad inter-poblacional (Figura 4.24) no clasifica de manera tan nítida las diferentes poblaciones con relación a los niveles cromosómicos, lo que podría ser explicado por la saturación que supone el gran número de bandas generadas. Con un sistema compuesto por 16 ISSR hemos estudiado 580 bandas lo que refleja el grado de polimorfismo que encierra la colección.

Varios autores han utilizado los ISSR para evaluar la diversidad genética en cultivares de maíz (Kantety y col., 1995; Pejic y col., 1998) de trigo duro (Nagaoka y Ogihara, 1997), arroz (Matos y Benito, 2001) y cebada (Fernández y col., 2002). Esta técnica demostró una elevada conservación de ciertas secuencias repetidas dentro del mismo género, lo que facilita el aislamiento de secuencias de ADN repetitivo específico para la especie estudiada (Fernández y col., 2002). Recientemente, Emel (2010), ha utilizado doce ISSR para estudiar la variabilidad genética que encierra una colección de 11 triticales hexaploides y ha demostrado la utilidad de este tipo de marcadores para determinar las distancias génicas entre los genotipos analizados y su gran importancia en el establecimiento de las relaciones filogenéticas dentro de la colección.

Una visión general de los datos proporcionados por los tres tipos de marcadores (gluteninas, SSRs e ISSRs) permite destacar su utilidad para los objetivos propuestos en este trabajo, dada su capacidad para caracterizar la diversidad genética entre las poblaciones autóctonas de la colección de *B. distachyon*. Además, todos los marcadores resultan muy útiles para el conocimiento del grado de heterogeneidad intra-poblacional. El estudio de las frecuencias con que aparece cada marcador y la determinación del número de patrones en cada población (caso de gluteninas) son reveladores del grado de diversidad genotípica de las poblaciones y de la utilidad potencial de obtención de un número considerable de líneas puras por cada población analizada.

Budak y col. (2004), han señalado que en la mayoría de las especies de gramíneas, los ecotipos no se pueden distinguir visualmente según sus números cromosómicos. Sin embargo, la variabilidad genotípica observada entre las poblaciones de *B. distachyon* aquí analizadas, se refleja también en la variabilidad fenotípica detectada entre las plantas de acuerdo con los niveles cromosómicos que poseen, aun en condiciones de crecimiento en invernadero. Las plantas de $2n=10$ se pueden diferenciar de las de $2n=20$ y $2n=30$ por su morfología, por su menor porte y altura, menor longitud de las semillas y las variaciones de la duración del ciclo hasta la madurez. Esto ha sido confirmado por Vogel y col. (2009), que han mostrado que en condiciones de invernadero se pueden distinguir las formas de $2n=10$ de las de $2n=30$.

5.4 INFLUENCIA DE FACTORES ECO-GEOGRÁFICOS EN LA DIVERSIDAD

Según Nevo (1978), la variabilidad encontrada en las especies autógamas puede estar influida por los factores eco-geográficos y climáticos del hábitat de procedencia. Así, las poblaciones con distribuciones amplias deben ser relativamente más polimórficas y heterogéneas que las de distribuciones más restringidas. Las poblaciones naturales de una especie autógama tienden a estar constituidas por genotipos homocigóticos. Como se ha señalado en los apartados anteriores, los distintos marcadores bioquímicos y moleculares observados en las poblaciones naturales de *B. distachyon* indican la existencia de una mezcla de genotipos dentro de cada población, aunque con predominancia de un patrón en casi todos los casos. Los diversos patrones de proteínas y marcadores moleculares observados pueden representar genotipos homocigóticos distintos, que se podrían mantener como mezclas de líneas puras por autofecundación. Las poblaciones naturales de *B. distachyon* aquí estudiadas, recolectadas en diferentes lugares de la Península Ibérica, presentan una gran variación, lo que podría deberse a la diversidad de factores eco-geográficos. De acuerdo con Stebbins (1975), es de esperar que cuando una especie autógama se extiende hacia hábitats nuevos, en los bordes de distribución aparezca un mayor número de genotipos distintos que en las poblaciones que han permanecido durante muchas generaciones en el mismo hábitat (Jouve y Soler, 2010). Las poblaciones de *B. distachyon* de la Península Ibérica se encuentran en el límite occidental de distribución de la especie, por lo que no es de extrañar el notable grado de variación genotípica observada en todos los marcadores analizados.

También podría ocurrir que parte de la variabilidad fuese consecuencia de algún grado de alogamia, influida por factores ambientales (Sanders y Hamrick, 1980; Schoen y Clegg, 1985; Golenberg, 1988; Monte y col., 1999; Nieto y col., 2000, 2003). En el caso de *B. distachyon* aquí estudiado, si hubiese algo de alogamia, por baja que fuese su frecuencia, podría contribuir en mayor o menor medida a añadir variación intrapoblacional, aunque por la predominancia de la autogamia habría una tendencia a la homocigosis y por tanto las variantes encontradas estarían constituyendo mezclas de genotipos homocigóticos. En cualquier caso, esto no se puede saber con los marcadores analizados, dada la imposibilidad de conocer las variantes alélicas de las gluteninas LMW, microsatélites e inter-microsatélites, analizados.

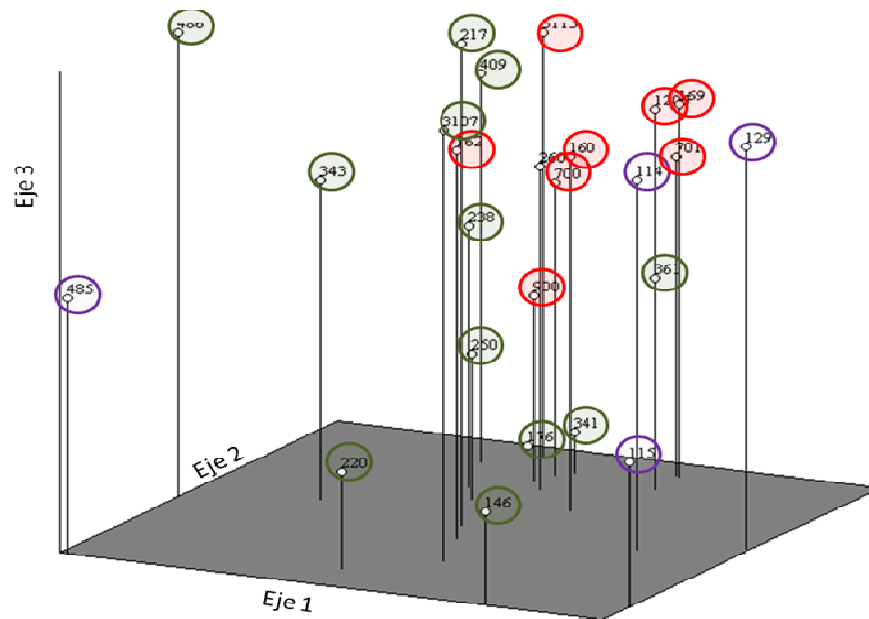
En el presente estudio, las poblaciones con $2n=10$, presentan el nivel más bajo de diversidad y la distribución más limitada. Por el contrario, las poblaciones $2n=30$ son las más extendidas en diversas áreas de la Península Ibérica (827 kilómetros entre las poblaciones más

distantes: Bd341 en Huelva y Bd486 en Tarragona). Las formas 2n=20 muestran un nivel intermedio de diversidad y de distribución geográfica (385,5 kilómetros entre las poblaciones más separadas de las aquí analizadas: Bd485 en Alicante a Bd129 en Granada).

Para estudiar la influencia de los factores eco-geográficos y climáticos en la distribución de las poblaciones estudiadas, se ha hecho un análisis de correspondencias partiendo de una matriz bidireccional de contingencia que incluye el número de cromosomas y los datos de 11 variables geográficas y climáticas, correspondientes a los lugares de origen de las poblaciones naturales. Los resultados indican que los principales factores que influyen en los 3 primeros ejes del análisis de correspondencias acumulan un 85,15% de la variación total, como se refleja en la Tabla 5.1

- ❖ *Tabla 5. 1: Influencia de 11 variables eco-geográficas y climáticas y el número de cromosomas (2n) en la distribución de 25 poblaciones de *Brachypodium distachyon*. Los valores registrados corresponden a la contribución de cada variable en los 3 primeros ejes del análisis de correspondencias. Estos ejes acumulan el 85,15% de la varianza. (Alt = altitud geográfica; Lat = latitud geográfica; Long = longitud geográfica; Pv = pluviosidad media anual; P = precipitación en verano.; T = temperatura media anual; M = máxima temperatura del mes más frío; It = índice de termicidad = $T + m + M/10$, siendo m la temperatura mínima del mes más frío; Fdf = número de días libres de heladas al año; Im3 = Índice de Mediterraneidad.*

	<i>Eje 1</i>		<i>Eje 2</i>		<i>Eje 3</i>
Alt	0.364	Pv	0.379	Im3	0.390
Lat	0.202	Alt	0.070	It	0.133
Pv	0.188	Long	0.067	Alt	0.125
P	-0.011	T	-0.020	T	0.085
Long	-0.021	M	-0.028	2n	0.069
T	-0.190	Fdf	-0.031	Fdf	0.065
M	-0.212	It	-0.063	M	0.028
It	-0.244	m	-0.091	Lat	-0.001
Fdf	-0.245	2n	-0.116	Long	-0.011
2n	-0.278	P	-0.131	m	-0.062
Im3	-0.335	Im3	-0.281	P	-0.231
m	-0.427	Lat	-0.444	Pv	-0.296



❖ *Figura 5.2: Distribución de las poblaciones en función de los tres ejes principales de un análisis de correspondencias en el que se contemplan 11 factores eco-geográficos y climáticos y el n° de cromosoma*

A partir de este análisis se estimó la correlación entre los factores eco-geográficos y climáticos mencionados y el número de cromosomas y la diversidad observada en las poblaciones. Para ello se calculó el índice de la heterogeneidad tanto para las proteínas del endospermo (ver Tabla 4.13) como para el conjunto de microsatélites observados en los conjuntos de plantas de cada población. Los resultados del análisis de correlaciones se registran en la Tabla 5.2

❖ *Tabla 5. 2: Correlación entre los índices de heterogeneidad de gluteninas y microsatélites, el número de cromosomas y 7 de las variables climáticas y eco-geográficas de los lugares de procedencia de las 25 poblaciones de *Brachypodium distachyon* analizadas.*

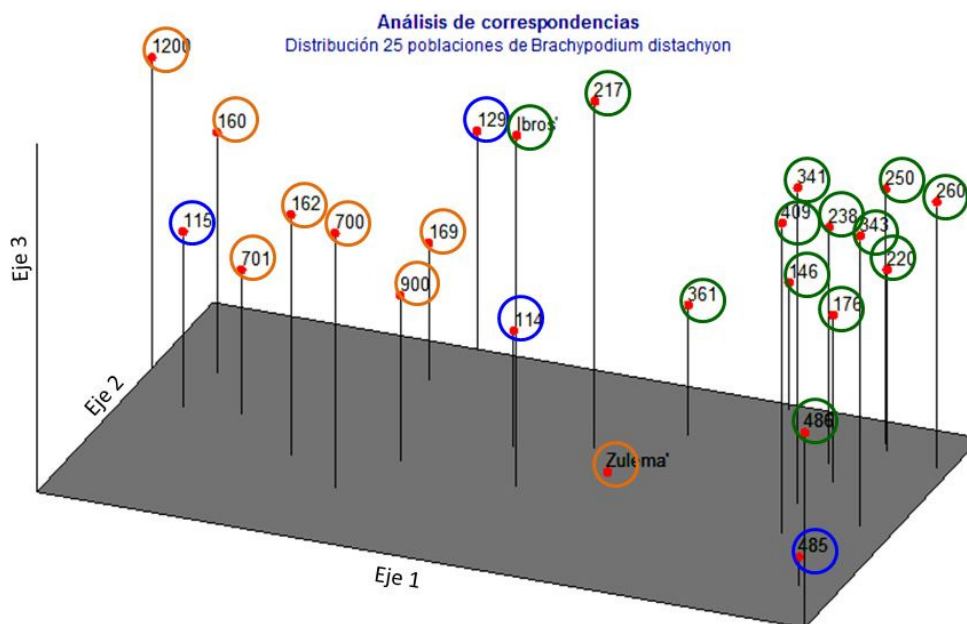
	<i>HetGlut</i>	<i>HetMicr</i>	<i>Altitud</i>	<i>Longitud</i>	<i>T</i>	<i>Pv</i>	<i>It</i>	<i>Im3</i>	<i>2n</i>
<i>HetGlut</i>	1.000								
<i>HetMicr</i>	0,596***	1.000							
<i>Altitud</i>	-0,596***	-0,402	1.000						
<i>Longitud</i>	-0,475	-0,180	0,160	1.000					
<i>T</i>	0,520**	0,214	-0,547**	-0,594***	1.000				
<i>Pv</i>	-0,354	-0,077	0,233	0,834***	-0,652***	1.000			
<i>It</i>	0,509*	0,235	-0,482	-0,513**	0,907***	-0,642***	1.000		
<i>Im3</i>	0,488	0,129	-0,236	-0,766***	0,757***	-0,885***	0,786***	1.000	
<i>2n</i>	0,874***	0,779***	-0,455	-0,484	0,437	-0,325	0,455	0,431	1.000

Como era de esperar la diversidad observada por ambos tipos de marcadores se correlaciona positivamente en el conjunto de las poblaciones, y ambos tipos de parámetros correlacionan igualmente de forma positiva y significativa con el número de cromosomas (**2n**). Se observa también correlación entre la diversidad en gluteninas LMW, la temperatura media anual (**T**) y el índice de termicidad (**It**). El resto de las correlaciones significativas se refieren a los factores eco-geográficos, siendo negativa entre la altitud y longitud y la temperatura, entre los índices de termicidad y de mediterraneidad y la longitud y la pluviosidad en verano. También se observan correlaciones positivas entre parámetros climáticos de similar significado, como los índices de termicidad y mediterraneidad y la temperatura. No son significativas las correlaciones entre la heterogeneidad para gluteninas y microsatélites con la longitud y los índices de precipitación en verano y de mediterraneidad

Finalmente se ha hecho un análisis de correspondencias de la diversidad en gluteninas y microsatélites con los factores más influyentes (**Alt, Long, T, Pv, It, Im3** y **2n**) de acuerdo con el estudio de correlación de todos estos parámetros entre sí. En la Tabla 5.3 se registran los resultados en cuanto al peso de las diferentes variables en los 3 primeros ejes de la distribución espacial del conjunto de datos incluidos. Los tres primeros ejes acumulan una variación del 94,25%, siendo el primer eje el más determinante al contribuir con un 70,56% de la variación total. A la vista de los datos extremos de cada eje se puede concluir que el número de cromosomas junto con el índice de mediterraneidad y la altitud con tendencias opuestas, explican la separación de las poblaciones en el primer eje. El índice de mediterraneidad y la altitud con tendencia opuesta a la pluviosidad en verano, discrimina las poblaciones en el segundo eje. Finalmente, la pluviosidad opuestamente a los índices de termicidad y mediterraneidad son los factores que más influyen en la separación de las poblaciones en el tercer eje.

❖ *Tabla 5. 3: Influencia de 6 variables eco-geográficas y climáticas el número de cromosomas (2n) y la variabilidad en gluteninas y proteínas en la distribución de 25 poblaciones de B. distachyon*

	<i>Eje1</i>		<i>Eje 2</i>		<i>Eje 3</i>
2n	0.250	Im3	0.345	Pv	0.235
Im3	0.218	Alt	0.174	2n	0.092
HetGlut	0.193	It	0.078	Alt	0.086
It	0.117	2n	0.054	HetGlut	0.051
T	0.028	HetGlut	0.024	HetMier	0.001
HetMier	0.013	T	0.021	Long	-0.031
Long	-0.096	HetMier	-0.042	T	-0.120
Pv	-0.342	Long	-0.049	It	-0.202
Alt	-0.435	Pv	-0.381	Im3	-0.265



❖ *Figura 5. 3: Distribución de las 25 poblaciones de *B. distachyon* en función de los tres ejes principales de un análisis de correspondencias en el que se contemplan 6 factores eco-geográficos y climáticos, la diversidad en gluteninas y microsatélites y el n° de cromosomas.*

La distribución vuelve a mostrar las agrupaciones de las poblaciones bajo la influencia de los factores que influyen en cada eje. Siendo el eje 1 el más determinante, es también el que mejor delimita la separación de los tres grupos de poblaciones de *B. distachyon* en función del número de cromosomas y la altitud con tendencias opuestas (formas con $2n=10$ y de $2n=30$, de las más próximas a las más alejadas del origen, respectivamente). Se pone de manifiesto la tendencia a una mayor presencia de las formas de $2n=10$ en zonas elevadas y clima más extremado. También se observa una mayor concentración entre sí de las poblaciones de $2n=30$ con valores máximos en el tercer eje, lo que significa una tendencia a su distribución preferente en regiones de mayor pluviosidad en verano y menor índice de mediterraneidad. Las poblaciones de $2n=20$ son las que muestran una mayor dispersión, aunque al tratarse de tan solo 4 poblaciones no parece lógico establecer relaciones entre su distribución y los factores eco-geográficos incluidos en este análisis.

5.5 EVALUACIÓN DE LA COLECCIÓN DE *Brachypodium distachyon* COMO FUENTE PARA LA DOMESTICACIÓN Y LA OBTENCIÓN DE LÍNEAS Y VARIEDADES ÚTILES PARA LA PROTECCIÓN DE SUELOS DEGRADADOS.

La necesidad de producir mayor cantidad de alimentos se contrapone con un marcado deterioro de uno de los principales recursos no renovables, el suelo. La pérdida de suelo por erosión hídrica y eólica en el mundo y en España en particular alcanza valores alarmantes y está asociada al arrastre de sustancias contaminantes derivadas de las prácticas agrícolas hacia los cursos de agua. Proteger el suelo en las áreas de cultivos leñosos, mediante una adecuada cubierta vegetal se ha convertido en una necesidad, que debe sustentarse en un conocimiento adecuado de las especies a utilizar (Soler y col. (2004)). De este modo, un buen recurso lo ofrecen las especies herbáceas naturales autóctonas con características adaptativas adecuadas al tipo de hábitats al que van a ser destinadas, lo que requiere el conocimiento de su distribución, diversidad, modo de reproducción, preferencias climáticas, etc. El conocimiento de estas características nos permitirá elegir el material vegetal más idóneo.

En este sentido, se ha incrementado el interés por las especies silvestres, sobre todo gramíneas, que constituyen un grupo vegetal excelente por la variedad de géneros y especies que ofrece y sus características adaptativas y fisiológicas. Actualmente se están utilizando gramíneas que entre otras ventajas ofrecen las de su adecuación para establecer cubiertas de suelos pobres y escasos, constituyendo macollas densas con fuerte sistema radicular, que fijan bien el suelo y retienen el agua, evitando la escorrentía, y que ofrecen céspedes resistentes al pisoteo y a los factores climáticos adversos. La caracterización de la diversidad de una colección de material es el paso inicial necesario para la posterior selección de formas vegetales de las que se derivarán líneas adaptadas al sistema de cultivo aptas para proteger suelos degradados, con un potencial de producción de biomasa vegetal y coste reducido de siembra. Como buenas protectoras de suelos cabe citar especies tal como *Paspalum notatum* Flugge, recomendada para la protección frente a la erosión de terrenos escarpados por su capacidad de formar céspedes densos, colonizar arenas costeras y otros suelos arenosos, ser tolerante a la inundación y a la salinidad, resistente a la sequía y a suelos pobres con intenso pastoreo (Gómez y col., 2003). Otros géneros que se han utilizado también con fines de revegetación y protección de taludes son *Agropyron* Gaertner, *Dactylis* L., *Elymus* L., *Lolium* L. y *Psathyrostachys* Nevski. Además de su interés agronómico como especies protectoras de suelos y olivares, las gramíneas constituyen reservorios de genes

favorables que podrían ser aislados e introducidos en cultivares de mayor importancia agronómica.

Dadas las ventajas que presenten las gramíneas, el Departamento de Medio Ambiente del INIA planteó varias expediciones de recolección de unas especies autóctonas españolas de gramíneas silvestres como es el caso de la colección de *B. distachyon* objetivo de esta tesis (Soler y col., 1997). Los programas de recolección conservación y utilización de los recursos genéticos vegetales requieren la realización de estudios de caracterización de la variabilidad existente, con el fin de establecer estrategias para su utilización y eventual domesticación, de acuerdo con los objetivos que se deseen afrontar.

En los comienzos de la mejora genética los cultivares se diferenciaban casi exclusivamente por de sus características morfológicas. Este sistema de diferenciación es eficiente cuando los cultivares presentan caracteres diferenciales bien definidos, pero plantea ciertas limitaciones en aquellos casos de materiales en que no existen tales diferencias de forma manifiesta o están estrechamente emparentados (Hinrichsen y col., 2002). Stebbins, (1950), Allard (1965) y Allard y col. (1968), realizaron los primeros estudios de la variabilidad utilizando caracteres morfológicos. En general se trata de caracteres cualitativos regulados por genes que se expresan con una mínima interferencia ambiental. Como la descripción del germoplasma es importante para los mejoradores, a los caracteres morfológicos se les unieron pronto en los descriptores de utilidad en la explotación del germoplasma, otros caracteres de interés agronómico, algunos de tipo cuantitativo y con fuerte influencia ambiental en su expresión.

En el presente caso, se ha llevado a cabo un análisis mínimo de caracteres morfológicos, mediante observaciones en las muestras de poblaciones de *B. distachyon* mantenidas en invernadero. A pesar de las limitaciones de este estudio, desde el principio se pusieron de manifiesto diferencias entre plantas de diferentes poblaciones, especialmente en la altura de la planta, la duración del ciclo de crecimiento y el porte. El estudio del número de cromosomas permitió clasificar las poblaciones en tres grupos de $2n=10$, 20 y 30 cromosomas. Se observó que las plantas de $2n=10$ son las que presentan la menor talla, y las más lentas de crecimiento. Estas diferencias permiten manejar bien las fechas de siembra, entre formas precoces y otras tardías, de manera que garantizamos la persistencia de una cubierta vegetal el máximo tiempo posible en el suelo a proteger. Las especies naturales anuales y autógamas, con una buena dehiscencia de la semilla a la maduración, como es el caso de *B. distachyon* se adaptan muy bien a la auto-siembra. Esto significa que cuando se realiza la primera siembra, la siguiente es espontánea, de forma que tras las primeras lluvias

otoñales, la vegetación se regenera por sí misma y eso supone un ahorro económico importante en el coste de producción. Por otra parte, el carácter cespitoso de las plantas de *B. distachyon* con un sistema radicular profundo y bien ramificado permite una buena fijación del suelo e incrementa la retención del agua. Este carácter se acentúa en las formas de porte postrado, en las que los tallos crecen lateralmente cubriendo una gran superficie alrededor del eje de la planta, circunstancia que presentan la mayoría de las poblaciones $2n=30$ cromosomas. Mediante un aumento de la densidad de siembra se puede obtener unas cubiertas muy densas que tapizan muy pobladamente el suelo. Dada la diversidad de procedencia de las poblaciones estudiadas, es evidente que *B. distachyon* es una especie que se adapta a una gran diversidad de tipos de suelos y climas, lo que también se refleja en la diversidad genética que encierra la colección analizada.

Las muestras de plantas de las poblaciones estudiadas en este trabajo son de origen silvestre, recolectadas directamente en sus hábitats de procedencia y por tanto no sometidas a procesos de selección. Dado que *B. distachyon* es una especie autógama que se reproduce por autopolinización, se podría esperar un cierto grado de homogeneidad en las muestras de cada población y de hecho, las poblaciones se presentaron como mezclas de genotipos supuestamente homocigotos y sin manifiestas diferencias fenotípicas morfológicas. Sin embargo, al examinar los perfiles electroforéticos de gluteninas se observó que algunas poblaciones mostraron hasta 9 patrones diferentes, siendo las de $2n=10$ cromosomas las menos heterogéneas. Cabe destacar que las proteínas de reserva del endospermo y las gluteninas en particular son codificadas por genes o grupos de genes discretos. El análisis de los geles de poliacrilamida para este tipo de proteínas revela la existencia de una gran riqueza y diversidad genética para este carácter en las 23 poblaciones silvestres de *B. distachyon* aquí analizadas. De la misma forma, las 240 plantas analizadas para los dos tipos de marcadores moleculares utilizados en este trabajo, SSR e ISSR, presentaron perfiles diferentes. Las diferencias se reflejan a todos los niveles, tanto con los 16 sistemas inter-microsatélite, que amplificaron un total de 580 fragmentos polimórficos, como con los 11 sistemas microsatélites, que proporcionaron un total de 156 fragmentos de amplificación. Destaca el hecho de que las plantas $2n=20$ cromosomas y $2n=10$ cromosomas compartieron relativamente pocos fragmentos de amplificación en común, lo que pone de relieve la separación genética de las formas pertenecientes a ambos niveles de ploidia.

Dadas las características agro-morfológicas y sencillez genómica de *B. distachyon* ha crecido su interés como material vegetal para experimentación biotecnológica. En este sentido uno de los objetivos de este trabajo era el del análisis del comportamiento de las

diferentes poblaciones de *B. distachyon* en cultivos *in vitro*. De entre las 25 poblaciones y líneas analizadas han demostrado una mejor respuesta para el cultivo *in vitro*, las muestras de las poblaciones Bd238 y Bd341, de $2n=30$ cromosomas, que han generado un número importante de plantas verdes, que tras su obtención fueron trasplantadas a tierra y mantenidas en invernadero. Las plantas obtenidas de este modo a partir de un mismo embrión inmaduro original son genotípicamente idénticas y constituyen un material idóneo para plantear nuevos ensayos sobre el mantenimiento de su capacidad favorable al cultivo *in vitro*, para experimentos de propagación clonal y transformación genética.

La variabilidad dentro y entre las poblaciones para los proteínas del endospermo, dos tipos de marcadores, moleculares caracteres morfológicos y cultivo *in vitro*, pone de relieve la amplitud de la base genética disponible en la colección de poblaciones autóctonas españolas de *B. distachyon* estudiado. Por el volumen del material analizado y los resultados obtenidos se considera esta colección suficiente y de una gran utilidad potencial para iniciar la domesticación y selección de líneas útiles para la obtención de cubiertas vegetales de interés agronómico y para aplicaciones biotecnológicas.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de una colección de 23 poblaciones naturales autóctonas de *Brachypodium distachyon*, recolectadas en la Península Ibérica, que forman parte de una colección más amplia conservada en el Departamento de Medio Ambiente del INIA (La Canaleja, Alcalá de Henares). La caracterización abarca el estudio de la constitución cromosómica, el comportamiento del cultivo *in vitro* y la diversidad genética intra e interpoblacional para tres tipos de marcadores: proteínas de endospermo, microsatélites e intermicrosatélites, en relación con las regiones geográficas de procedencia. Estos análisis tienen como objetivo global la evaluación de la colección analizada como fuente de material para la obtención de líneas útiles en programas de revegetación y aplicaciones biotecnológicas.

Las principales conclusiones son las siguientes:

1. Los análisis citogenéticos revelan que las poblaciones españolas de *Brachypodium distachyon* se distribuyen en tres citotipos de diferente número de cromosomas: de $2n=10$, $2n=20$ y $2n=30$. La aplicación de hibridación *in situ* FISH y GISH permite diferenciar cromosómica y genómicamente las formas de $2n=10$ y $2n=20$ y sustentar la hipótesis de que presumiblemente se trata de dos especies diferentes.
2. El análisis citogenético por medio de FISH y GISH demuestra el carácter aditivo del citotipo $2n=30$ cromosomas con respecto a las formas de $2n=10$ y $2n=20$. El análisis de los resultados obtenidos con algunas gluteninas LMW y microsatélites (SSRs) pone de manifiesto que las poblaciones de $2n=30$ suman proteínas y fragmentos amplificados de las muestras del ADN genómico de las poblaciones $2n=10$ y $2n=20$. Este resultado apoya los resultados de FISH y GISH sobre el origen alopoloide de las formas de $2n=30$. Se supone un origen alopoloide por duplicación cromosómica del híbrido entre las formas de 10 y 20 cromosomas.
3. Los resultados derivados del estudio de gluteninas LMW, y dos sistemas de marcadores moleculares, microsatélites (SSR) y inter-microsatélites (ISSR), demuestran un alto grado de polimorfismo inter e intra-poblacional. Todas las poblaciones se separan perfectamente, resultando las gluteninas LMW y los SSR los que mejor discriminan la diversidad interpoblacional.

4. Dado que *B. distachyon* es una especie autógama, con tendencia a la fijación de genotipos homocigotos, la gran heterogeneidad intrapoblacional observada debe ser debida a mezclas de líneas homocigóticas.
5. El análisis de similitud basado en las matrices de presencia-ausencia de los diferentes tipos de marcadores analizados da como resultado marcadas tendencias de agrupación de las plantas y poblaciones del mismo citotipo, y entre las recolectadas en zonas geográficas próximas. Las poblaciones del centro peninsular y zonas elevadas presentaron el menor número de cromosomas y se agruparon con índices de semejanza más elevados, mientras que las poblaciones originarias de Andalucía y la costa mediterránea presentaron números cromosómicos superiores y se caracterizaron por un alto nivel de polimorfismo.
6. El análisis de correspondencias entre la diversidad en gluteninas LMW y microsatélites y los factores ecogeográficos y climáticos pone de relieve la influencia de algunos de estos factores en la distribución y la diversidad de las poblaciones. Los tres primeros ejes del análisis acumulan una variación del 94,25%, siendo el primer eje el más determinante al contribuir con un 70,56% de la variación total. El número de cromosomas, junto con el índice de mediterraneidad y la altitud explican la separación de las poblaciones en el primer eje. Otros factores como la pluviosidad en verano y el índice de termicidad influyen en la separación de las poblaciones en los tres ejes.
7. La diversidad observada en gluteninas LMW y SSR se correlaciona positiva y significativamente con el número de cromosomas. Hay además una correlación entre la diversidad en gluteninas LMW, la temperatura media anual (T) y el índice de termicidad (It).
8. Bajo condiciones de invernadero se aprecian diferencias morfológicas entre las poblaciones de *B. distachyon* de $2n=10$ y las de números cromosómicos superiores. Las de $2n=10$ presentaron menor talla y fueron más tardías que las de 20 y 30 cromosomas, que no muestran caracteres morfológicos y fisiológicos diferenciales.
9. Teniendo en cuenta los resultados de producción de callos embriogénicos y la capacidad de regeneración de plantas verdes se destaca la interacción del 'medio x genotipo'. Las dos fases del proceso deben contar con un sistema de control genético distinto. Las poblaciones analizadas encierran una amplia variabilidad de respuesta, que abarca desde poblaciones recalcitrantes, como las muestras de la población Bd129 ($2n=20$), a otras

con un nivel de respuesta medio-alto, como ocurre con las muestras procedentes de las poblaciones Bd220 y Bd341 (ambas $2n=30$) y la línea comercial 'Zulema' ($2n=10$), que pueden constituir un buen material de partida para ensayos más amplios de cultivo *in vitro*.

10. La variabilidad tanto la intrapoblacional como la interpoblacional detectada en las poblaciones analizadas, pone de relieve la amplitud de la base genética disponible en la colección de poblaciones autóctonas españolas de *B. distachyon*. Por el volumen del material analizado y los resultados obtenidos se considera esta colección suficiente y de una gran utilidad potencial para iniciar la domesticación y selección de líneas útiles para la obtención de cubiertas vegetales de interés agronómico y para aplicaciones biotecnológicas.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. REFERENCIAS BIBIOGRAFICAS

- **Ahloowalia BS. 1982.** Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Sci* 22. pp: 405-410.
- **Ahmad A, Zhong H, Wang W, Sticklen M.B. 2002.** Shoot apical meristem. *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum*). *In vitro* Cell Development. *Biol. Plant*, 38: 163-167.
- **Aguiriano E, Ruiz M, Fité R, Carrillo J.M. 2006.** Analysis of genetic variability in a sample of the durum wheat (*Triticum Durum Desf.*) Spanish collection based on gliadin markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53: 1543-1552.
- **Allard R.W, Jain S.K. y Workman P.L (1968).** The genetics of inbreeding populations. *Adv. Genet.* 14: 55-131.
- **Allard R.W. 1965.** Genetic systems associated with colonizing ability in predominantly self-pollinated species. En: *The genetics of colonizing species*. Baker H.G and Stebbins G.L. (Eds). Academic Press, New York. Pp: 49-76.
- **Alok V, Jain S, Kathari S.L, Varshney A, Jsin S. 1999.** Plant regertation from mature embryos of 20 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf.) *Cereal Res. Comm.*, 27 (1-2): 163-170.
- **Altschul S.F, Gish W, Miller W, Myers E.W, Lipman D. 1990.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- **Ammirato P.V. 1973.** Some affects of abscisic acid on the development of embryos caraway cells in suspension culture. *Amer. J. BOT.* 60 (supl.): 22-23.
- **Ammirato P.V. 1974.** The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). *Bot.Gaz.* 135: 328-337.
- **Ammirato P.V. 1983.** Embryogenesis. En: Evans, D.A; Sharp, W.R; Ammirato, P.V. y Yamada, Y. (eds). *Handbook of plant cell culture*. Mac Millan Publishing, Nueva York. V.1, p: 85-128.
- **Asíns M. J, Carbonell E. A. 1986.** A comparative study on variability and phylogeny of *Triticum* species. 1. Intraspecific variability. *Theor. Appl. Genet.*, 72: 551-558.
- **Bablak P, Draper J, Davey M.D, Lynch PT. 1995.** Plant regeneration and micropropagation of *Brachypodium distachyon*. *Plant cell Tissue and Organ Culture* 42: 97-107.

- **Backs-Husemann D. y Reinert J. 1970.** Embryobildung durch isolierte einzellen aus gewebeulturen von *Daucus carota*. Protoplasma 70: 49-60.
- **Bahar S.O, Hernandez P, Filiz E, Budak H. 2008.** *Brachypodium* genomics. Journal of Plant Genomics volume 2008, Article ID 536104, 7 pages doi. 10.1155/2008/536014.
- **Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C 2007.** Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Mol Ecol, 16:3759-3767
- **Barceló P, Lazzeri P.A. 1995.** Transformation of cereals by microprojectile bombardment of immature inflorescence and scutellum tissues. En: Jones H (Ed) Methods in molecular biology: plant gene transfer and expression protocols. Humana Press, Totowa N.J. pp: 13-123
- **Beauvois P. 1812.** Essai d'une nouvelle Agrostographie, Paris.
- **Becerra V. Gepts P. 1994.** RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) in its centres of origin. Genome 37: 253-263.
- **Belanger F y Kriz A. 1989.** Molecular characterization of the major maize embryo globulin encoded by the *Glb1* gene. Plant Physiol. 91: 636-643.
- **Benkirane H, Abounji, Chlyah S.A, Chlyah H. 2000.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of *durum* wheat plant. *Cell Tissue and Organ Culture*, 61: 107-113.
- **Benmoussa M, Vézina L.P, Pagé M. 2000.** Genetic polymorphism in low-molecular-weight glutenin genes from *Triticum aestivum*, variety *Chinese Spring*. Theor Appl Genet (2000) 100: 789-793.
- **Bennett M.D, Leitch I.J. 1995.** Nuclear DNA amounts in angiosperms. Annals of Botany, 76: 113-176.
- **Bhaskaran S, Smith R.H. 1990.** Regeneration in cereal tissue culture: A review. *Crop Sci.*, 30: 1328-1336.
- **Bluff M. J, Nees, Esenbeck C.G, Schauer J. C. 1836.** Compendium Florae Germaniae 1 (1) Schrag, J. L. Nurnberg.
- **Bommineni VR, Jauhar PP. 1996.** Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of *durum* wheat. Plant Science (Ireland) Vol 116 (2) p. 197-203.

- **Bossolini E, Wicher T, Knobel P.A, y Keller B. 2007.** Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation. *P. Journal*, 49: 704-717.
- **Brantestam K.A, Von Bothmer R, Dayteg C, Rashal I, Tuveesson S y Weibull J. 2004.** Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationships in cultivated barley of Nordic and Baltic origin. *Hereditas* 141: 186-192.
- **Brantestam k.A, Von Bothmer R, Rashal I, Weibull J. 2004.** Changes in the genetic diversity of barely of Nordic and Baltic origin, studied by isozyme electrophoresis. *Plant Genet Resour Charact Util* 1: 143-149.
- **Bregitzer P, Campbell R.D. 2001.** Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley callus. *Crop Sci.* 41: 173-179.
- **Breyne P, Rombaut D, Van Gysel A, Van Montagu M, Gerats T. 1999.** AFLP analysis of genetic diversity within and between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Mol and Gen. Genet.* 216:627-634.
- **Brian R.O, Linda J.M, Grace I. E. J, Pierre H, Kartga K. 1990.** Improvement embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultures in médium with maltose. *Pant Cell Reports* vol 9, nº 7: 365-369.
- **Brinegar y Peterson D.M. 1982.** Separation and characterization of oat globulin polypeptides, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 219: 1: 71–79.
- **Brown A. H. D, Zohary D, Nevo E. 1978.** Outcrossing rates and heterozygosity in natural populations of *Hordeum spontaneum* Koch in Israel. *Heredity* 41:49–62.
- **Budak H, Shearman R.C, Parmaksiz I, Gaussoin R.E, Riordan T.P, Dweikat I. 2004.** Molecular characterization of buffalagrass germplasm using sequence-related amplified markers. *Theor. App Genet:* 108:328-334.
- **Carman J.G, Jeferson N.E, Campbell W.F. 1988.** Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. Quantification of genotype and culture medium effects. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 12: 83-95.
- **Castro J, Pastor M. 1994.** Control de la erosión en el olivar mediante el empleo de una cubierta viva. *Agricultura* 746:745-758.

- **Castro J, Pastor M. 1996.** Sistemas de manejo del suelo en el olivar. *Agricultura* 772:916-919.
- **Catalan P, Shi Y, Armstrong L Draper J, Stace C.A. 1995.** Molecular phylogeny of the grass genus *Brachypodium* P.Beauv based on RFLP and RAPD analysis. *Bot. J. Linn. Soc.* 117:263-280.
- **Chauhan H, Srinivas A.D, Khurana P. 2007.** Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 91: 191- 199.
- **Chen Guo-yue, Li.L, Wang Y. 2007.** Detection of genetic diversity in wheat varieties based on Gliadin fingerprinting patterns in spring wheat belt of the Northeast. *Journal of Jilin Agricultural University.* V.
- **Chesnut R.S, Shotwell M.A, Boyer S.K, Larkins B.A. 1989.** Analysis of Avenin proteins and the expression of their mRNAs in developing oats seeds. *Plant Cell* vol, 1: 913-924.
- **Christensen U, Simon A.A, Schelleer H.V, Willats W.G.T, Harholt J. 2010.** Characterization of the primary cell walls of seedlings of *Brachypodium distachyon*- A potential model plant for temperate grasses. *Phytochemistry* 71: 62-69.
- **Christiansen P, Andersen CH, Didion T, Folling M, Nielson K.K. 2005.** A rapid and efficient transformation protocol for the grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Rep* (2005) 23: pp 751-758.
- **Clayton W.D, Renvoize S.A. 1986.** *Graminum*. Her Majesty's Stationery Office, London.
- **Condit R, Hubbell S.P. 1991.** Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome.* 34(1): pp. 66-71.
- **Cuadrado A, Acevedo R, Moreno Díaz de la Espina S, Jouve N, de la Torre C. 2004.** Genome remodelling in three modern *S. officinarum* x *S. spontaneum* sugarcane cultivars. *Journal of Experimental Botany.* 55: 847-854.
- **Cutanda M.C, Chatelet P, Bouquet A, Lopez G, Botella O, Montero F.J y Torregrosa L. 2007.** Optimización del proceso de embriogénesis somática y

regeneración de plantas ‘Macabeo’ y ‘Tempranillo’. Actas Horticultura nº48. Sociedad española de Ciencias Hortícolas. ISBN: 978-84-690-5619-6.

- **Damania A.B**, Porceddu E, Jackson M.T. 2003. A rapid method of the evaluation of variation in germplasm collections of cereals using polyacrilamide gel electrophoresis. *Euphytica* 32: 877-883.
- **Debbie L.C, Vensel W.H 2008**. Globulins are the main seed storage proteins in *Brachypodium*. *Theor Appl Genet* 117: 555-563.
- **Dejan D.I, Miroslav Z, Mitic N, Radomirka N, Stephen R. K, Blazo L, Gordana S.M. 2010**. Morphologic responses of embryo culture of wheat related to environment culture conditions of the explant donor plant. *Sci. agric (Piracicaba. Braz.)* Vol.67 nº 3.
- **Delaporte K, Conran J, Sedgley M. 2001**. Morphological analysis to identify the pollen parent of an ornamental interspecific hybrid *Eucalyptus*, *Sci .Hort*: 89: pp 55-72.
- **Donini P, Bryan G.J. 1998**. The potential of microsatellite for high throughput genetic diversity assessment in wheat and barley. *Genetic resources and Crop evolution* 45: 415–421.
- **DraperJ, Mur L. A. J, Jenkins G, Ghosh-Biswas G.C, Bablak P, Hasterok R, Routledge A.P.M 2001**. *Brachypodium distachyon*. A New model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol.*127, 1539-1555.
- **Dumortier B.C. 1824**. Notice sur un nouveau genre de plantes: Hulthemia; précédée d’un aperçu sur la classification des roses, In 8° Tournay.
- **Elwafa A. A. A, Ismail A. E. S. A. 1999**. Callus induction and plant regeneration from cultures of immature embryos of spring wheat. *Aust. J. Agric Sci.*, 303: 13-23.
- **Emel S. 2010**. Evaluation of ISSR markers to assess genetic variability and relationship among winter triticale (x triticosecale witimack) cultivars. *Pak. J. Bot.* 42 (4): 2755-2763.
- **Evans D.A, Sharp W.R, Flick C.E. 1981**. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe T.A (ed). *Tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, Nueva York. P: 45-113.
- **Fernández M.E, Fygueiras A.M, Benito C. 2002**. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism genotype identification and genetic diversity among barely cultivars with known origin. *Theor Appl Genet* 104.845-851.

- **Filiz E, Ozdemir B.S, Tuna M, Budak H. 2009.** Diploid *Brachypodium distachyon* of Turkey: Molecular and Morphologic Analysis. T.Yamada and G.Spangenberg (eds.), Molecular Breeding of Forage and Turf, doi: 10.1007/978-0-387-39144-9_7; © Spring Science + Busniess Media, LIC 2009.
- **Fridborg G, Pedersen M, Landstron L.E, Eriksson T. 1978.** The effect of activated charcoal on tissue cultures: Adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol.* 43:104-106.
- **Garvin D.F. 2007.** *Brachypodium distachyon*: New model system for structural and functional analysis of grass genome. *Model Plants and Crop Improvement*, pp: 109-123.
- **Garvin F.D, Gu Y.Q, Hasterok R, Hazen P.S, Jenkins G, Mocker, T.C, Mur A, J Vogel, P. 2008.** Development of Genetic and Genomic Research Resources for *Brachypodium distachyon*, a New Model System for Grass Crop Research. *Crop Sci.*48 (51): 569-584.
- **Gayler K. R y Sykes G. E. 1985.** Effect of nutritional stress on the storage proteins of soybeans. *Plant Physiol.* 78: 582-585.
- **Gepts P. 1990.** Genetic diversity of seed storage proteins in plants. In : Brown, H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A. L. and Weir B.S (Eds) *Plant population genetics, breedings and genetic resources.* Sunderland Massachusetts, U.S.A. p: 64-82.
- **Gepts P. y Bliss F.A. 1985.** F1 hybrid weakness in the common bean: differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated bean germplasm. *J Hered* 76: 447-450.
- **Gepts P. y Bliss F.A. 1986.** Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Econ. Bot.* 40: 469-478.
- **Gerlach W L y Bedbrook J.R. 1979.** Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* 7: 1869-1885.
- **Gerlach W. L y Dyer T. A. 1980** Sequence organisation of the repeating units in the nucleus of wheat which contains 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* g: 4851-4865.
- **Golenberg E. M. 1988.** Outcrossing rates and their relationship to phenology in *Triticum dicoccoides*. *Theor. Appl. Genet.* 75: 937-944.
- **Gómez de Nova P.J. 2003.** El género *Festuca* en España. Estudios de variabilidad y de relaciones entre las especies: (Tesis doctoral).

- **Gómez de Nova P.J, Monte J.V, de La Cruz M, Casanova C, Soler C. 2001.** Relaciones genéticas en especies españolas del género *Festuca* basadas en AFLPs” Congreso de la Sociedad Española de genética, Sevilla 2001: 120. ISBN 84-8474-031-5
- **González J.M, Ferrer E, Jouve N. 2001.** Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. Cultivars. Plant breeding vol 120 (6), pp: 513-517.
- **Gómez de Nova P.J, de la Cruz M, Monte J.V, Soler C. 2006.** “Genetic relationships withing and among Iberian fescues (*Festuca* L.) based on PCR amplified markers” markers” Genome , 49: 1170-1183.
- **Griffiths S, Sharp R, Foote T.N, Bertin I, Wanous M, Reader S, Colas I, Moore G. 2006.** Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. Nature, 439: 749-752.
- **Guo W, Wang W, Zhou B, Zhang T.2006.** Cross-species transferability of *G. arboreum*-derived EST-SSRs in the diploid species of *Gossypium*. Theor Appl Genet 112:1573-1581.
- **Haberlandt G. 1902.** Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen, Sitzungsber K Preuss Akad Wiss Wien, Math-Naturwiss 1902; 111: 69–92.
- **Halámková E, Vafera J, Ohnoutková L. 2004.** Regeneration capacity of calli derived from immature embryos in spring barely cultivars. Biologia Plantarum 48 (2): 313, 316
- **Hammami R, Cuadrado A, Friero E, Jouve N, Soler C, González J.M. 2001.** Callus induction and plant regeneration from immature embryos of *Brachypodium distachyon* with different chromosome numbers. Biologia plantarum (article in press).
- **Hanzel J. J, Miller J.P, Rinkman M.A.B, Fendos E. 1985.** Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop Sci.*, 25: 27-31.
- **Harz C.O. 1880.** Beiträge zur systematik der Gramineen. *Linnaea* 43: 1-30.
- **Hasterok R, Draper J, Glyn J.2004.** Laying the cytotaxonomic foundations of a new model grass, *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. Chromosome Research 12: 397-403.
- **Hasterok R, Dulawa J, Jenkins G, Leggett M, Langdon T. 2006a.** Multi-substrate chromosome preparations for high throughput comparative FISH. BMC Biotechnol. 6, 20.

- **Hasterok R, Marasek A, Donnison I. S, Armstead I, Thomas, A, King I.P, Wolny E, Idziak D, Draper J, Jenkins G. 2006b.** Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence in situ hybridization. *Genetics* 173, 349–362
- **Havranek P, Vagera J. 1979.** Regulation of in vitro androgénesis in tobacco through iron-free media. *Biol. Plant.* 21: 412-417.
- **Hawkes JG. (1980).** Crop genetic resources. Field collection manual for seed crops, root and tuber crops, tree fruit crops and related wild species. International Board for plant Genetic Resources (I.B.P.G.R) and the European Association for Research on Plant Breeding (EUCARPI).
- **He G.Y, Lazzeri P.A. 2001.** Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from *durum* wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* Desf.) scutellum and inflorescence cultures. *Euphytica* 119: 369-376
- **Heesacker A, Kishore VK, Gao W, Tang S, Kolkman JM, Gingle A, Matvienko M, Kozik A, Michelmore RM, Lai Z, Rieseberg LH, Knapp SJ. 2008.** SSRs and INDELS mined from the sunflower EST database: abundance, polymorphisms, and cross-taxa utility. *Theor Appl Genet*, 117:1021-1029
- **Hess J.R, J.G. Carman J.G. 1998.** Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels. *Crop Sci.*, 38, 249-253.
- **Higuchi W y Fukazawa C.1987.** A rice glutelin and a soyabean glycinin have evolved from a common ancestral gene. *Gene*, 55: 245-253
- **Hinrichsen, P.R, Castro M.H, Mellado M. 2002.** Mejoramiento de trigos harineros (*Triticum aestivum* L.) en la zona centro sur de Chile. IV. Caracterización de cultivares de trigo basado en perfiles electroforéticos de gluteninas y gliadinas. *Agric. Téc. (Chile)* 62:56-67.
- **Hong G. Rodriguez C.A.M. 2006.** Effect of cirrus clouds on the diurnal cycle of tropical deep convective clouds. *J. Geophys. Res*, 111, D06209, doi: 10.1029/2005JD006208.
- **Hutcheson K. 1970.** A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *J. Theor. Biol.* 29: 151-154.

- **Jacques-Félix, H. 1962.** Les Graminées d'Afrique Tropicale I: généralités, classification, description des genres. Institute de Recherche Agronomiques Tropicales et des Cultures vivantes, Paris, Francia. p345
- **Jouve N, Soler C. 2010.** “La localización de la variabilidad disponible para el mejorador”. En “Mejora genética y recursos fitogenéticos: Nuevos avances en la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos”. Eds. J.M. Carrillo, M.J. Diez, M. Pérez de la Vega y F. Nuez. Sociedad Española de Genética – Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, pp. 243-271.
- **Kalendar R, Schulman A.H. (2006).** “Retrotransposons and their use as molecular markers in *Brachypodium*”, in Plant and Animal Genomes XIV Conference, San Diego, Calif, USA, January 2006.
- **Kantety R.V, Zeng X.P, Bennetzen, J.L. 1995.** Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays*.L) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. - Mol.Breeding 1: 365-373.
- **Kantety R. V, Zeng X. P, Bennetzen, J. L. 1995.** Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays*.L) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Mol. Breeding 1: 365-373.
- **Karsai I, Bedo Z, Hayes P.M. 1994.** Effect of induction medium pH and maltose concentration on *in vitro* androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture vol 39, n°1: 49:53.
- **Kato H. y Takeguchi M. 1966.** Embriogenesis from the epidermal cells of carrot hypocotyl. Sci. Papers College Gren. Educ. Univ. Tokyo 16: 245-254.
- **Kellogg E.A. 2001.** Evolutionary history of the grasses. Plant Phys. 125, 1198–1205.
- **Khan M.A, Stace C.A. (1999).** Breeding relationships in the genus *Brachypodium* (*Poaceae: Pooideae*). Nord J Bot 19: 257-269.
- **Khan M.A. 1984.** Biosystematic studies in *Brachypodium* (*Poaceae*) _PhD thesis, University of Leicester.

- **Khan M.J. 1992.** Seed Protein Electrophoretic Pattern in *Brachypodium* P.Beauv. Species. *Annals of Botany* 70: 61-68.
- **King L.M. y Schaal, B.A. 1989.** Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution*, **43**: 1117–1119.
- **Kilinc M. 2004.** Effects of dicamba concentration on the embryo cultures of some bread wheat (*Triticum aestivum*). Genotypes. *Biotechnol. And Biotechnol. Eq.* 18/2004/2.
- **Kozuharov S.I, Petrova, A.V, Stoeva M. 1974.** Chromosomal variation in the *Brachypodium* genus in Bulgaria with regard to its evolution and taxonomy. *Genet. Pol.*15: 13-23
- **Kriz A L y Schwartz D. 1986.** Synthesis of globulins in maize embryos. *Plant Physiol.* 82:1069.
- **Kumar R.S.S, Singh S.A, Rao A.G.A. 2009.** Conformational stability of α -amylase from malted sorghum (*Sorghum bicolor*): reversible unfolding by denaturants. *Biochimie*, 91: 548-557.
- **Landjeva S, KorzunV, Tsanev V, Vladova R, Ganeva G. 2006.** Distribution of the wheat-rye translocation 1RS.1BL among bread wheat varieties of Bulgaria. *Plant Breed.* 125:102–104.
- **Larré C, Penninck S, Bouchet B, Lollier V, Tranquet O, Denery-Papini S, Guillon F, Rogniaux H. 2010.** *Brachypodium distachyon* grain: identification and subcellular localization of storage proteins. *J. Exp. Bot.* 61 (6): 1771-1783.
- **Larsen K. 1963.** Cytology of the endemic Canarian Elements. 1I. *Bot. Notiser* 116:409-424
- **Laudencia-Chingcuanci D.L, Vensel W.H. 2008.** Globulins are the main seed storage proteins in *Brachypodium distachyon*. *Theoretical and Applied Genetics.* 117:555-563.
- **Leonard A, Damerval C, De Vienne D. 1988.** Organ-specific variability and inheritance of maize proteins revealed by two dimensional electrophoresis. *Genet Res.* 52: 97-103.
- **Li G.Y, Huang C.Y, Sui X.X, He Z.H, Sun Q X, Xia X.C. 2006.** Tissue culture efficiency of different explants from wheat. *Journal of Triticeae Crop*, 26, 21-25 (in Chine)

- **Linsmaier E. M y Skoog F. 1962.** Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- **Luo Na, Liu J, Xiaoqing Y, Yiwei J. 2011.** Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiologia Plantarum* 141: 19-29. ISSN 0031-9317.
- **Mathias R.J, Simpson E.S. 1986.** The interaction of genotype and culture medium on tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 7, 31-37.
- **Matos M, Pinto- Carnide O, Benito C. 2001.** Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas* 134(3):229-236
- **Matos M, Benito C. 2001.** Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas* 134(3):229-236
- **Meachman D. K, Kasarda D. D, Qualset C.O. 1978.** Genetic aspects of wheat gliadin proteins *Biochem. Genet.* 16 :813-853
- **Mehra P. N, Koshla P. K, Kohli B. L, Koonar J. S. 1968.** Cytological studies in the North Indian grasses I. *Res. Bull. Paniab.Univ. Sci.* 19: 157-230.
- **Mireya Z, Denise G. S, Doris P.R, Patricio H. R. 2000.** Microsatélites associated to gluten protein genes of Chilean wheat varieties: Description and potential use as bread quality markers. *Agric. Téc.v.* 60 n.1 Chillán ene. 2000.
- **Mitic N, Dogig D, Nikolic R. 2006.** Variability of *in vitro* culture response in wheat genotypes, genotype and environmental effects. *Genetika*, vol 38 n°3, 183-193.
- **Monte JV, Gómez de Nova PJ, Soler C. 2002.** AFLP-based analysis to study genetic variability and relationships in Spanish species of the genus *Aegilops* *Hereditas*, 135: 233 – 238
- **Monte. J.V, Casanova C, Soler C. 1999.** Genetic variation in Spanish populations of the genus *Aegilops* revealed by RAPDs. *Agronomie* 9, 419-427.
- **Morgante M, Brunner S, Pea G, Fengler k, Zuccolo A, Rafalski A. 2002.** Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. *Nature Genet.* 37, 997-1002.

- **Munazir M, Qureshi R, Muhammed Ali G, Rashid U, Noor S, Mehmood K, Ali S, Arshad M. 2010.** Primary callus induction, somatic embryogenesis and regeneration studies in selected elite wheat varieties from Pakistan. *Pak. J. Bot* 42 (6): 3957-3965.
- **Murashige T, Skoog F. 1962.** “A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue culture”, *Physiologia Plantarum*, vol.15, no.3, pp.473-497, 1962.
- **Mzouri K, Amsaa M. 2002.** Amélioration de l'embryogenèse somatique à partir d'embryons immatures chez le Blé tendre (*Triticum aestivum L.*). Société Botanique de France, *Acta bot. gall.*, Actualités botaniques, Tome 149 - Fascicule 2, p179
- **Nagaoka T, y Ogihara Y. 1997.** Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94(5):597-602
- **NagaokaT, y Ogihara Y. 1997.** Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94(5):597-602.
- **Natarjan G. 1978.** 1. O.P.B. Chromosome number reports. *Taxon* 27: 527.
- **Naxin H, Gerard R. L, Vogel J, Frank M. Y, Yaqin M, Daniel M. H, Coleman-Derr D, Hill TA Olin J.D, Ming-Cheng Luo A, Yong Q. G. 2008.** The nuclear genome of *Brachypodium distachyon*: analysis of BACend sequences. *Funct Integr Genomics* 8: 135-147.
- **Nevena M, Dejan D, Radomirka N. 2006.** Variability of *in vitro* culture response in wheat genotypes, genotype and environmental effects. *GENETIKA*, vol.38 n°3: 183-192.
- **Nevo E, Beiles A, Starch N. 1983.** "Natural selection of allozyme polymorphisms: a microgeographical differentiation by edaphic, topographical and temporal factors in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). *Theor. Appl. Genet*, 64: 123-132.
- **Nevo E. 1978.** Genetic variation in natural populations: patterns ant theory. *Theor. Popul. Biol.* 13: 121-177.
- **Nieto López R.M, Soler C, García P. 2003.** Genetic diversity in wildf Spanish populations of *Thinopyrum Junceum* and *Thinopyrum junceiforme* using endosperm proteins and PCR-based markers”. *Hereditas*, 139: 18-27
- **Nieto R.M, Casanova C, Soler C. 2000.** Characterization and Evaluation of a collection of wild Spanish populations of the genus *Elymus* and *Thinopyrum* using morphological and agronomical traits”. *Agronomie* 20: 111 -122

- **Nieto-Taladriz M.T, Rodríguez-Quijano M, Carrillo J.M. 2000.** Polymorphism of waxy proteins in Spanish durum wheat. *Plant Breeding* 119: 277-279
- **Nieto-Taladriz M.T, Rodríguez-Quijano M, Carrillo J.M. 1998.** Biochemical and genetical characterization of a D glutenin subunit encoded at the Glu-B3 locus. *Genome* 41: 215-220.
- **Nieto-Taladriz M.T, Ruiz M, Martínez M.C, Vázquez J.F, Carrillo J.M. 1997.** Variation and classification of B low molecular weight glutenin subunit alleles in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 125-130.
- **Norgaard J.V. 1997.** Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* LK. 1997. *Plant Science*: 211-221
- **Okita T. W, Hwang Y. S, Hnilo J, Kim W.T, Aryan A. P, Larson R, Krishnan H. B. 1989.** Structure and expression of the rice glutenin multigene family. *J. Biol. Chem* 264: 12573-12581.
- **Oldach K.H, Morgenstern A, Rother S, Girgi M, O'Kennedy M, Lorz H. 2001.** Efficient *in vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.)] and sorghum bicolor (L.) Moench. *Plant Cell Rep* 20: 416-421.
- **Opanowicz M, Hands P.H, Betts D, Parker M.L, Toole G. A, Mills E. N. C, Doonan J. H, Drea S. 2011.** Endosperm development in *Brachypodium distachyon*, *Journal of Experimental Botany*, vol 62 n° 2: 735-748.
- **Opanowicz M, Vain P, Draper J, Parker D, Doonan J. H. 2008.** *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild grass. *Trends Plant Sci* 13: 172-177
- **Osborne T. B. 1924.** The vegetable proteins (pp. 51-56), Longmans-Green, London
- **Ozgen M, Turet M, Altinok S, Sancak C. 1998.** Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Reports*, 18: 331-335.
- **Papenfus J.M, Carman J.G .1987.** Enhanced regeneration from wheat callus culture using dicamba and Kinetin. *Crop Science*, 27: 588-593.

- **Payne P. I, Nightingale M. A, Krattiger A. F, Holt L. M. 1987.** The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *J.Sci. Food Agric.* 40:51-65
- **Pejic I.P, Ajmone-Marsan M, Morgante V, Kovumplick P, Castiglioni G, Taramino, M. 1998.** Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theor.Appl.Genet.*97:1248-1255
- **Raji A.A.J, Anderson J.V, Kolade O.A, Ugwu C.D, Dixon A.G.O, Ingelbrecht I.L. 2009.**Gene-based microsatellites for cassava (*Manihot esculenta* Crantz): prevalence, polymorphisms, and cross-taxa utility *BMC Plant Biology*, **9**:118doi:10.1186/1471-2229-9-118
- **Rasco-Gaunt S, Barcelo P.1999.** Immature inflorescence culture of cereals: A highly responsive system for regeneration and transformation. *Methods in Molecular Biology, Plant Cell Protocols.* Eds. R D Hall.Totowa, NJ: Humana Press Inc., pp: 71-81.
- **Rashid. U, Shaukat. A, Ghulam M. A, Najma A, Shahid. M (2009).** Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458, Vol 12 n°3.
- **Reinert J. 1958.** Untersuchungen uber die morphogenese und gewebeulturen. *Ber. Dtsch. Bot.Ges.* 15-71.
- **Reinert J. 1967.** Some aspects of embryogenesis in somatic cells of *Daucus carota*. *Phytomorphology* 17: 510-516.
- **Reinert J. 1973.** Aspects of organization-organogenesis and embryogenesis. En: Street, H.E. (ed). *Plant cell and tissue culture.* Blackwell Sci. Pub, Oxford, Inlaterra. 338-355.
- **Rikiishi K, Matsuura T, Maekawa M, Noda k, Takeda K. 2003.**Barely lines ahowing prominent high green shoot regeneration in cultures derived from immature embryos. *Plant Breeding* 122, pp: 105-111.
- **Rivas- Martinez. 1990.** Climate and vegetation at the Eurosiberian-Mediterranean boundary in the Iberian Peninsula, *Journal of Vegetation Science* 1: 233-244.
- **Roberts-Oehlschlager SL, Dunwell JM, Faulks R. 1990.** Changes in the sugar content of barely anthers during culture on different carbohydrates. *Plant Cell Tiss Org Cult* 22: 77-85.

- **Robertson I. H. 1981.** Chromosome numbers in *Brachypodium* Beauv. (*Gramineae*). Genetic 56:55-60.
- **Rodríguez-Quijano, M, Nieto-Taladriz M.T, Carrillo J.M. 2001.** Polymorphism of high molecular weight glutenin subunits in three *Aegilops* species. Genetic Resources and Crop Evolution 48: 599-607.
- **Rodríguez-Quijano M, Nieto-Taladriz M.T, Carrillo, J.M. 1998.** Polymorphism of waxy proteins in Iberian hexaploid wheats. Plant Breeding 117: 341-344
- **Rodríguez-Quijano M, Nieto-Taladriz M.T, Carrillo J.M. 1997.** Variation of B-LMW glutenin subunits in Einkorn wheats. Genetic Resources and Plant Evolution 44: 539-543

- **Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC, Maya MM, Bonierbale MW, Iglesias C, Tohme J. 2000.** Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. Am J Bot 2000, 87:1647-1655
- **Ruiz M, Quijano M.R, Metakovsky E.V, Vazquez J.F, Carrillo J.M. 2002.** Polymorphism variation and genetic identity of Spanish common wheat germplasm base don gliadin alleles. Field Crops Research 79: 185-196.
- **Saha MC, Cooper JD, Mian MA, Chekhovskiy K, May GD. 2006.** Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. Theor Appl Genet, 113:1449-1458
- **San Miguel A. 2008.** Gramíneas de interés para la implantación de praderas y la revegetación de zonas degradadas. Ecología y pautas básicas de utilización.
- **San Miguel P.J, Ramakrishna W, Bennetzen J.L, Busso C, Dubcovsky J. 2002.** Transposable elements, genes and recombination in a 215Kb contig from wheat chromosome 5. Am. Funt.Integr. Genomics, 2:70-80.
- **Sanders T.B, Hamrick J.L. 1980.** "Variation in the breeding system of *Elymus Canadensis*". Evolution, 34: 117-122
- **Schippmann U. 1991.** Revision der europäischen Arten der Gattung *Brachypodium* Palisot de Beauvois (*Poaceae*). Bossier 45:1-249.

- **Schoen D.J, Clegg M.T. 1985.** "The influence of flower color on outcrossing rate and male reproductive success in *Ipomoea purpurea*". *Evolution*, 39: 1242-1249.
- **Schwartz C.J, Doyle M.R, Manzaneda A.J, Rey P.J, Mitchell-Olds T, Amsino R.M. 2010.** Natural variation of flowering time and vernalization responsiveness in *Brachypodium distachyon*. *Bioenerg. Res* 3:38-46.
- **Schwartz D. 1979** Analysis of the size alleles of the *Pro* gene in maize-evidence for a mutant protein processor. *Mol. Gen. Genet.* 174: 233-240.
- **Schwarzacher T, Leitch A.R, Bennett M.D, Heslop-Harrison J.S. 1989.** *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany*, 64: 315-324.
- **Şener O, Can A, Arslan M, Celiktaş N. 2008.** Effects of genotype and picloram concentrations on callus induction and plant regeneration from immature inflorescence of spring Barely cultivars (*Hordeum Vulgare L.*). *Biotechnol.* *Biotechnol* 22: 915-920.
- **Serhantová V, Ehrenbergerova J, Ohnoutková L. 2004.** Callus induction and plant regeneration efficiency of spring barely cultivars registered in the Czech Republic. *Plant Soil Environ.* 50 2004 (10): 456-462.
- **Shafquat Y, Imtiaz A.K, ABULLAH K, Nighat S, Ghulam S. N, MOHAMMAD A. A. 2009.** *In vitro* plant regeneration in bread wheat (*Triticum aestivum*) *Pak. J. Bot.*, 41 (6) 1869-2876.
- **Shewry P. R, Tatham A. S, Halford N. G. 1999.** The prolamins of the Triticeae, In: Casey R,
- **Shewry P.R, Tathan A.S. 1995.** Seed storage proteins: structure and biosynthesis. *Plant Cell* 7:945-956.
- **Sikandar W.A, Israr K, Iqbal M. 2007.** Optimization of *in vitro* conditions for callus induction, proliferation and regeneration in wheat (*Triticum aestivum*L.) cultivars. *Biotechnology* 6 (3): 420-425.
- **Singh NK, Shepherd KW. 1991.** A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J. Cereal Sci*, 14: 203-208.
- **Sneath P. H.A, Sokal R.R. 1973.** *Numerical Taxonomy*. W.H.Freeman and Company, San Francisco, CA. p573.

- **Sofalian O, Chaparzadeh N, Javanmard A, Hejazi M.S. 2008.** Study the genetic diversity of wheat Landraces from Northwest of Iran based on ISSR molecular markers. Inter. J. Agri and Bio. ISSN online: 466-468.
- **Sokal R. R, Sneath A.P.H. 1963.** Principles of Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Co. Francisco, USA. p: 359.
- **Soler C, Ruiz-Fernández J, Monte J.V, De Bustos A. Jouve N. 1997.** The assessment of variability in Spanish populations of wild relatives of cereals. En Proc. Workshop on Conservation of Wild Relatives of European Crops”, (V. Heywood, B. Valdés and D. Zohary, Eds.). I.S.B.N: 88-7915-007-3. Bocconeia, 7: 107-119.
- **Soler C, Casanova C, Rojo A. 2004.** Desarrollo de cubiertas vegetales a partir de gramíneas seleccionadas, para su explotación en tierras de olivar Actas de Horticultura Nº41 II Congreso de Mejora Genética de Plantas León 2004.
- **Soler C, Galindo C, Garcia P, Gonzalez-Castaño S, Casanova C. 1993.** Isozyme variation in Spanish natural populations of *Elytrigia pungens* (pers.) and *Elytrigia repens* (L.) Newski. Heredity 71: 51-58
- **St. Yves A. (1934).** Contribution á l'étude des *Brachypodium distachyon* (Europe et Région méditerranéenne). Candollea 5:427-493.
- **Stebbins G.L. 1957.** Self fertilization and population variability in the higher plants, Am. Nat. 91 pp. 337–354.
- **Stebbins G.L. 1975.** Shrubs as centers of adaptive radiation and evolution. Proc. Symp. Workshop wildland Shrubs, H.C.Stutz, ed. pp: 120-140.
- **Stebbins G.L. 1950.** Variation and Evolution in Plants. Columbia Univ. Press. NY p 643
- **Steward F.C, Mapes M.O, Mears K. 1958.** Growth and organized development of cultured cells. II. Organisation in cultures grown from freely suspended Am.J. Bot 45: 705-708.
- **Sung Z.R, Fienberg A, Chorneau R, Borkind C, Furner I. Smith J, Loshiavo F, Giuliano G, Pitto I y Nuti-Ronchi V. 1984.** Developmental biology of embryogenesis from carrot culture. Plant Molecular Biology Reporter, 2:3-14.
- **Takeota T. 1968.** Phytogeographical notes on the genus *Brachypodium* (*Poaceae*).P. Beauv. (Gramíneas). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 12:44-56

- **Talavera S. 1978.** Aportación al estudio cariológico de las Gramíneas Españolas. *Lagasalia*. 7 (2):133-142.
- **Terzopoulos PJ, Bebeli PJ. 2008.** Genetic diversity of Mediterranean faba bean (*Vicia FabaL.*) with ISSR markers. *Field Crops Research* 108 (2008): 39-44.
- **Terzopoulos PJ, Kaltsikes P. J, Bebeli P. J. 2003.** Collection, evaluation and classification of Greek populations of faba bean (*Vicia faba.L.*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 373-381.
- **Tisserat B, Esan E. B, Murashige T. 1979.** Somatic embryogenesis in angiosperms *Hort.Rev.*1:1-78.
- **Varshney A.T, Kant V.K, Sharma A, Kothari S.L. 1996.** High frequency plant regeneration from immature embryo cultures of *Triticum aestivum* and *Triticum. Durum.* *J. Cereal Res. Commun*, 24: 409-416.
- **Vasil I.K. 1994.** Molecular improvement of cereals. *Plant Mol. Biol.*, 25, 925-937.
- **Vasil V, Vasil I.K. 1980.** Isolation and culture of cereal protoplasts; 2: Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum* *Theor.Appl. Genet.* 56: 97-100
- **Virk PS, Ford-Lloyd B.V, Newbury H. J. 1998.** Mapping AFLP markers associated with subspecific differentiation of *Oryza sativa* (rice) and an investigation of segregation distortion. *Heredity* 81:613-620.
- **Vitte C, Bennetzen J.L. (2006).** Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(47):17638-4. [Pub Med Link](#)
- **Vogel J y Hill T. 2008.** High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep.* 27, 471–478
- **Vogel J. P, Bragg J 2009.** Chapter 16: *Brachypodium distachyon*, a new Model for the *Triticeae*. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*7, Doi 10.1007/978-0-387-77489-3-16.
- **Vogel J. P, Garvin, D. F, Leong, O.M, Hayden, D. M. 2006a.** *Agrobacterium*-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85, 199–211.

- **Vogel J. P, Tuna M, Budak H, Huo N, Gu Y. Q. 2009.** Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. BMC Plant Biology, 9:88.
- **Vogel, J. P, Gu, Y, Twigg, P, Lazo, G, Laudencia-Chingcuanco D, Hayden D, Donze T, Vivian L, Stamova, B y Coleman-Derr D. (2006b).** EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. Theor. App. Genet. 113, 186-195.
- **Wang. Ke, Xiaofeng Han, Kun Dong, Liyan Gao, Hongyu Li, Wujun Ma, Yueming Yan, Xingguo Ye. 2010.** Characterization of seed proteome in *Brachypodium distachyon*. Journal of Cereal Science, 52: 177-186.
- **Watson L, Dallwitz MJ. 1992.** The grass genera of the world. – CAB International, Wallingford
- **Wetherell D. F, Dougall D.K. 1976.** Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiol. Plant. 37: 97-103.
- **Wicker T, Stein N, Albar L, Feuillet, C, Schlagenhauf E, K .2001.** Analysis of contiguous 211 Kb sequence in diploid wheat (*Triticum monococcum*L.) reveals multiple mechanisms of genome evolution. Plant J.26: 307-316.
- **Wilson R. E. 1985.** Inheritance of resistance to *Septoria tritici* in wheat. In A.L. Scharen, ed. *Septoria of Cereals. Proc. Workshop*, Bozeman, MT, USA, 2-4 Aug. 1983, p. 33-35. USDA-ARS Pub. No. 12. 116 pp.
- **Wolny E, Hasterok R. 2009.** Comparative cytogenetic analysis of the genome of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. Annals of A Botany 104:873-881.
- **Wolny E, Lesniewska K, Haterok R, Langdon T. 2010.** Compact genomes and complex evolution in the genus *Brachypodium*. Chromosoma DOI 10.1007/s00412-010-0303-8.
- **Yamagata H, Sugimoto T, Tanaka K, Kasai Z. 1982.** Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. Plant Physiol. 70: 1094-1100.
- **Ye Xing- Guo, TAO Li-Li. (2008).** Research outline on some characteristics of *Brachypodium distachyon* as a new model plant species. Acta Agronomica Sinica vol 34, Issue 6: 919-925.

- **Zale JM, Borchardt-Wier H, Kidwell KK, Steber CM. 2004.** Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 76: pp 217-281.
- **Zhang K, Deng M, Chen T, Waterman M. S, Sun F. 2002.** A dynamic programming algorithm for haplotype blocks partitioning. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99, 7335–7339.
- **Zhao D.L, Atlin G.N, Bastiaans L, Spiertz J.H.J. 2006.** Developing selection protocols for weed competitiveness in aerobic rice. *Field Crops Research* 97: 272–285.
- **Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176–183.

8. RESUMEN

RESUMEN

En este trabajo se ha llevado a cabo la evaluación de la diversidad genética que encierra una colección de 23 poblaciones naturales de *Brachypodium distachyon* recogidas en diversas regiones de la Península Ibérica. Se ha utilizado como referencia dos líneas domesticadas y comercializadas. Esta especie presenta variabilidad en el número de cromosomas por lo que el primer objetivo fue el de caracterizar la constitución cromosómica de cada población y estudiar el origen de tal variación, así como su influencia en la variabilidad genética, distribución eco-geográfica, rasgos morfológicos y comportamiento de las muestras en cultivo *in vitro*. La evaluación de la respuesta al cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de muestras procedentes de todas las poblaciones se abordó en varios medios de inducción de la embriogénesis somática y de regeneración.

El análisis de los cariotipos de cada población, permitió clasificar las poblaciones de la colección de *B. distachyon* en tres grupos, con 10, 20 y 30 cromosomas. En base a los resultados de la hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) con las sondas de los genes ribosomales 5SrDNA y 45SrDNA y de hibridación *in situ* genómica (GISH) con ADN de los tres citotipos, se demuestra el carácter aditivo de la constitución cromosómica de las poblaciones con $2n=30$ cromosomas a partir de las de $2n=10$ y $2n=20$. De este modo, las formas de $2n=30$ serían alopoloides originadas por hibridación y duplicación cromosómica de dos formas diploides de cariotipos y número de cromosomas diferentes, $2n=10$ y $2n=20$. Estas diferencias cromosómicas apuntan a que las formas vegetales que las representan podrían tratarse de especies diferentes del mismo género *Brachypodium*, lo que obligaría a una revisión taxonómica del género.

El estudio del comportamiento en cultivo *in vitro* se ha realizado en dos fases. En primer lugar se abordó un estudio del comportamiento de los embriones cigóticos inmaduros de todas las muestras de poblaciones de *B. distachyon* en dos medios de cultivo: MS y MSm, que se diferencian en la fuente de carbono. Del mismo, se puede deducir que existe una amplia variabilidad en la respuesta al cultivo *in vitro*, que abarca desde poblaciones recalcitrantes a otras con un nivel de respuesta medio-alto, tanto en la fase de producción de callos embriogénicos como en la capacidad de regeneración de brotes verdes. Los resultados no permiten recomendar un medio idóneo para todas las poblaciones. En una segunda aproximación, se eligieron 2 poblaciones de cada grupo cromosómico (Bd160 y 'Zulema' de $2n=10$; Bd114 y Bd115 de $2n=20$ y Bd238 y Bd341 de $2n=30$) y se ensayaron 9 medios de cultivo, que se diferenciaban en el tipo y concentración de la fitohormona incorporada al medio (2,4-D, Piclorán y Dicamba). Se observaron diferencias significativas en el

número de callos totales/total de embriones puestos en cultivo (TC), en la fase de inducción de la embriogénesis somática. El análisis de varianza ANOVA aplicado a la variable número de callos compactos/total de callos (CC) indicó diferencias altamente significativas entre los diferentes genotipos ensayados. Esto indica la importancia de la interacción 'genotipo x medio' en el éxito de esta primera fase de cultivo. Los mejores para inducir la embriogénesis somática fueron los medios BR1, BR2 y BR3, preparados con 2,4-D (1 mg/l, 2mg/l y 4mg/l, respectivamente). Los medios que incorporaban Piclorán y Dicamba fueron los que peor resultado dieron, con porcentajes de callos blandos muy altos. Las poblaciones con números cromosómicos superiores. Bd238 y Bd341 ($2n=30$) y Bd114 ($2n=20$), mostraron una buena capacidad embriogénica. Todos los callos se pasaron a un medio de germinación G1, con el fin de producir plántulas verdes. Las muestras con $2n=30$ demostraron nuevamente su mejor capacidad de regeneración de brotes verdes. Las poblaciones con $2n=20$ (Bd114 y Bd115) no manifestaron la respuesta esperada en base a su alta capacidad para formar callos embriogénicos. Teniendo en cuenta los resultados de ambos ensayos de cultivo *in vitro* se destaca la interacción 'medio x genotipo' y el control genético de los mecanismos de inducción de la embriogénesis somática y la regeneración de brotes verdes que parecen estar controlados por sistemas genéticos distintos.

El estudio de la diversidad genética interna de cada población y entre las poblaciones se ha llevado a cabo utilizando tres tipos de análisis: proteínas de reserva del endospermo y marcadores moleculares tipo microsatélites (SSR) e inter-microsatélites (ISSR). Los tres tipos de aproximaciones han permitido establecer relaciones de similitud entre las poblaciones.

El análisis de la diversidad de las proteínas de reserva del endospermo demuestra el orden creciente de variabilidad genética al aumentar el número de cromosomas de las poblaciones. Se ha llevado a cabo un análisis de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard y el agrupamiento de las poblaciones de acuerdo con el método UPGMA. Las poblaciones con el mismo número cromosómico tienden a agruparse entre sí, dentro del mismo clúster, con coeficientes de aproximación variables. Se demuestra la influencia de algunos factores ecogeográficos y climáticos en la distribución de las 23 poblaciones naturales de *B. distachyon* analizadas.

La aplicación de dos tipos de marcadores moleculares al análisis de la diversidad es revelador de un elevado grado de polimorfismo, tanto interno en cada población como entre poblaciones. Los 156 fragmentos amplificados por los 11 sistemas microsatélites (SSR) estudiados, permiten una separación perfecta de las poblaciones con respecto a sus números cromosómicos. Los resultados de los 16 marcadores inter-microsatélites (ISSR) seleccionados resultaron especialmente útiles para la estimación de la diversidad intra-poblacional.

La variabilidad intra-poblacional e inter-poblacional detectada en las poblaciones analizadas, pone de relieve la amplitud de la base genética disponible en la colección de poblaciones autóctonas españolas de *B. distachyon*. Por el volumen del material analizado y los resultados obtenidos se considera esta colección suficiente y de una gran utilidad potencial para iniciar la selección de líneas útiles para la obtención de cubiertas vegetales de interés agronómico y para aplicaciones biotecnológicas.

SUMMARY

The analysis of the genetic diversity in a collection of 23 natural populations of *Brachypodium distachyon* collected in diverse regions of the Iberian Peninsula has been carried out. Two domesticated and commercialized lines have been added as a reference. This species displays variability in the number of chromosomes. For this reason the preliminary goal was to characterize the chromosome constitution of each population and to study the origin of such variation, as well as its influence in the genetic variability, eco-geographic distribution, morphologic characteristics and behavior of the samples cultured *in vitro*. The analysis of the karyotypes of each population, allowed classifying the populations in three groups with 10, 20 and 30 chromosomes. The results of the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with the ribosomal sequences of the genes 5SrDNA and 45SrDNA and genomic *in situ* hybridization (GISH) with DNA of the three cytotypes, demonstrate the character additive of the chromosome constitution of the populations with $2n=30$ chromosomes from those of $2n=10$ and $2n=20$. In this way, the forms of $2n=30$ are allopolyploid presumably originated by hybridization and chromosome doubling of two diploid forms of $2n=10$ and $2n=20$. The chromosome differences of both diploid forms support the assumption that these forms could be different species being necessary a taxonomic revision of the genus *Brachypodium*.

The *in vitro* culture behavior has been studied in two phases. The first approach proceeds to analyze the behavior of immature zygotic embryos of all the populations in two different media: MS and MSm, which differ in the source of carbon. It was observed a great variability, some populations being recalcitrant and others showing a moderate to high level of the *in vitro* culture response, as in the production of embryogenic calli as much in the capacity of regeneration of green buds. The results do not allow recommending an only suitable culture mean for all the populations. In the second approach, two populations of each chromosomal group (Bd160 and 'Zulema' of $2n=10$; Bd114 and Bd115 of $2n=20$ and Bd238 and Bd341 of $2n=30$) were utilized trying 9 different culture media, which differ in the type and concentration of hormones incorporated in the medium (2.4-D, Picloran and Dicamba). Significant differences in the number of total calluses/total embryos put in culture were observed (TC), in the phase of induction of the somatic embryogenesis. The ANOVA analysis of variance applied to the number of compact calluses/total of calluses (CC) indicated significant differences between the different genotypes tried. This point to the importance of the interaction 'genotype x medium' in the success of this first stage of culture. The best media to induce somatic embryogenesis were BR1, BR2 and BR3, prepared with 2.4-D (1 mg/l, 2mg/l and 4mg/l, respectively). The media that incorporated Picloran and Dicamba gave the worst result, with a high percentage of soft calluses. The populations with superior chromosomal numbers, Bd238 and Bd341

($2n=30$) and Bd114 ($2n=20$), showed a good embryogenic capacity. All the calli were transferred to a regeneration medium, G1, with the purpose of producing green plants. The samples with $2n=30$ demonstrated again their better capacity of regeneration of green plants. The populations with $2n=20$ (Bd114 and Bd115) showed the expected response according to their high capacity to form embryogenic calli. Considering the results of both tests of *in vitro* culture it is deduced that the genetic control of the mechanisms of induction of the somatic embryogenesis and the regeneration of green buds must be controlled by different genetic systems.

The study of the internal genetic diversity of each population and between the populations has been carried out using three types of analysis: proteins of endosperm and two molecular markers, microsatellites (SSR) and Inter-microsatellites (ISSR). The three types of approaches have allowed establishing relations of similarity between the populations.

The analysis of the diversity of endosperm proteins demonstrates the increasing tendency of genetic variability when increasing the number of chromosomes of the populations. An analysis of similarity has been carried out using the Jacquards' coefficient grouping the populations following the UPGMA method. The populations with the same chromosomal number tend to group together within the same cluster, with variable approaching coefficients. The influence of some eco-geographic and climatic factors in the distribution of the natural populations of *B. distachyon* is demonstrated.

The application of two molecular markers to the analysis of the diversity revealed a high degree of polymorphism, as much internal in each population as between populations. The 156 fragments amplified by the 11 SSR systems studied, allow to a perfect separation of the populations according to their chromosome numbers. The results of the 16 selected Inter-microsatélites markers were especially useful for the estimation of the intra-population diversity.

The intra and inter-population variability in the analyzed collection stands up the amplitude of the genetic base available in the Spanish native populations of *B. distachyon*. By the obtained volume of the analyzed material and results, this collection is sufficient enough and contains a great potential utility to initiate the selection of useful lines for the obtaining of vegetal covers of agronomic interest and for biotechnological applications.

RESUMÉ

Au cours de ce travail, nous avons procédé à l'évaluation de la diversité génétique qui possède une collection de 23 populations naturelles de *Brachypodium distachyon* provenant de différentes régions de la Péninsule Ibérique, tout en utilisant comme référence deux lignes récemment domestiquées et commercialisées. Examinant la composition chromosomique de chaque population nous avons observé une bonne variabilité concernant le numéro de chromosomes de chaque population. Pour cette raison, notre premier objectif était orienté d'une part, à la caractérisation cytogénétique de chaque accession, l'étude de l'origine de cette diversité, son influence sur l'amplitude de la variabilité génétique que présente le matériel végétal en question, et d'autre part, à sa possible relation avec la distribution éco-géographique des populations, l'aspect morphologique de chaque génotype et le comportement des échantillons de embryons immatures cultivés *in vitro*. L'évaluation de la réponse à la culture *in vitro* d'embryons immatures des échantillons issus de toutes les populations est abordée dans différents milieux d'induction de l'embryogenèse somatique et de régénération de pousses vertes.

L'analyse des caryotypes de chaque population, a permis la classification de la collection de *B. distachyon* en trois groupes différents avec 10, 20 et 30 chromosomes. Tout en basant sur les résultats de l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) avec des sondes des gènes ribosomiques 5SrDNA et 45SrDNA et l'hybridation génomique *in situ* (GISH) avec l'ADN des trois cytotypes étudiés, nous avons prouvé le caractère additif de la constitution chromosomique des populations $2n=30$ chromosomes à partir de celles avec $2n=10$ et $2n=20$. Ainsi que les formes $2n=30$ seront des allopoloïdes formés par hybridation et duplication chromosomique spontanée de deux formes diploïdes de caryotypes y nombre de chromosomes différents, $2n=10$ et $2n=20$. Ces différences exigent alors une nouvelle révisions taxonomique du genre *Brachypodium*.

L'étude du comportement en culture *in vitro* a été menée en deux phases. D'abord, nous avons entamé une étude du comportement des embryons zygotiques immatures de tous les échantillons des populations de *B. distachyon* dans deux milieux de culture: MS et MSm, qui se distinguent principalement par la source de carbone incorporée. Tout en respectant les différentes étapes de cette technique d'amélioration, nous avons remarqué une grande variabilité à la réponse à la culture *in vitro* révélant que cette collection s'est distinguée à la fois par la présence des populations recalcitrantes et autres avec une réponse moyenne à vers élevée. Dans une deuxième approche, nous avons choisi deux populations de chaque groupe chromosomique (Bd160 et 'Zulema' $2n = 10$; Bd114 et Bd115 $2n = 20$ et Bd341 BD238 et $2n = 30$) et nous avons testé leur comportement dans 9 milieux de culture

différenciés par le type et la concentration de la phytohormone incorporée dans chaque milieu (2,4-D, Dicamba et Piclorán). Comme résultat pertinent, on a observé des différences significatives quand il s'agit de la variable numéro total de calcs/total d'embryons en culture (TC) qui caractérise souvent la phase de l'induction de l'embryogenèse somatique. L'analyse de la variance ANOVA appliquée à la variable numéro de calcs compacts/total de calcs (CC), a montré aussi des différences hautement significatives entre les différents génotypes analysés. Ce dernier résultat, indique l'importance de l'interaction « génotype x environnement » pour le succès de cette première phase de culture *in vitro*. Les milieux BR1, BR2 et BR3 préparés avec 2,4-D (1 mg/l, 2mg/l et 4 mg/l, respectivement) sont considérés les meilleurs pour induire l'embryogenèse somatique. Par contre les milieux préparés avec Picoran et Dicamba ont montré des mauvais résultats avec des pourcentages de calcs soft très élevés. Il est a signalé que les populations portant des numéros chromosomiques supérieurs BD238 et Bd341 ($2n = 30$) et Bd114 ($2n = 20$) ont manifesté une bonne capacité embryogénique. Au cours d'une étape postérieure, toutes les calcs ont été transférées à un nouveau milieu de germination G1, afin de régénérer des plantes vertes adultes. Les spécimens á $2n=30$ ont montré de nouveau la meilleure capacité de régénération des pousses vertes. Quant aux populations á $2n=20$ (Bd114 et Bd115) n'ont pas manifesté la réponse attendue en fonction de leur bonne capacité de formation des calcs embryogéniques. Tenant en compte, les résultats des deux expériences de culture *in vitro*, on apprécie davantage l'interaction « milieu x génotype » et l'existence des mécanismes du control génétique de la phase d'induction de l'embryogenèse somatique et la régénération des pousses vertes qui semblent être contrôlés par différents systèmes génétiques.

L'étude de la diversité génétique intra-populationnel et entre les populations a été effectuée en utilisant trois types de marqueurs: les protéines de réserve de l'endosperme, les microsatellites (SSR) et les inter-microsatellites (ISSR). Les trois types d'approches ont permis l'établissement des relations de similitude entre les populations.

L'analyse de la diversité des protéines de réserve de l'endosperme a montré l'ordre croissant de la variabilité génétique tout en augmentant le nombre de chromosomes des populations. On a réalisé également, une analyse de similitude via le coefficient de Jaccard et le groupement des populations par la méthode UPGMA. Les accessions ayant le même numéro de chromosomes ont tendance á se regrouper au sein d'une même rame avec des coefficients de similitudes variables. Examinant la répartition de l'ensemble des populations dans le dendrogramme, on a constaté l'influence de certains facteurs éco-géographiques et climatiques dans la distribution des 23 populations naturelles de *B. distachyon*.

L'application de deux types de marqueurs moléculaires en vue d'analyser la diversité, révèle un haut degré de polymorphisme entre les populations et au sein de la même. Les 156 fragments

amplifiés par l'ensemble de 11 systèmes microsatellites (SSR) étudiés ont permis une séparation parfaite des populations tout en respectant leur numéro de chromosomes. De la même manière les seize 16 inter-microsatellites (ISSR) employés ont montré une grande utilité pour l'estimation de la diversité intra-populationnel.

La variabilité entre les populations et au sein de la même met en évidence l'amplitude de la base génétique disponible dans la collection des populations autochtones de *B .distachyon*. Ainsi le volume du matériel analysé et les résultats obtenus sont considérés comme assez suffisants et de grande utilité potentiel pour commencer la sélection des lignes utiles pour l'obtention du couverture végétale de grande intérêt agronomique y pour réaliser d'autres applications biotechnologiques.

ANEXOS

ANEXOS

- **Nota:** Todas las matrices de presencia-ausencia de los marcadores utilizados van en el CD como ficheros Excel.
- **Tabla 1:** porcentajes en el total de plantas estudiadas de las 22 gluteninas analizadas en las 23 poblaciones silvestres de *B.distachyon* y las dos líneas comerciales ‘Ibros’ y ‘Zulema’
- **Tabla 2:** porcentajes en el total de plantas analizadas de los microsatélites (SSR) en las 240 plantas pertenecientes a las 23 poblaciones silvestres y líneas comerciales ‘Ibros’ y ‘Zulema’

❖ **Tabla 1**

Gluteninas	114	115	129	146	160	162	169	176	217	220	238	250	260	341	343	361	409	485	486	700	701	900	1200	Ibros'	Zulema'
1	0	0	0	0	33	0	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0
2	0	0	67	0	0	0	0	0	0	17	0	0	33	100	42	92	0	33	0	0	0	0	0	0	0
3	100	25	22	100	0	0	0	100	83	67	100	50	0	67	0	8	8	0	75	0	0	0	0	0	0
4	0	8	11	0	0	8	0	58	0	25	0	17	42	42	1	92	92	83	25	0	0	0	0	58	0
5	8	8	22	100	0	8	0	42	83	75	67	100	58	0	0	8	42	67	75	0	0	0	33	42	33
6	100	25	67	0	0	0	58	0	0	25	17	0	0	0	58	0	50	0	0	0	0	0	0	67	0
7	0	67	0	0	25	75	0	0	17	8	0	0	0	0	58	0	25	100	25	100	9	100	67	0	75
8	100	25	33	100	42	17	0	17	83	50	75	92	33	0	0	0	25	100	75	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	25	83	58	100	8	50	0	42	100	100	42	50	100	83	25	0	0	0	33	100	92
9A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	100	100	100	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10A	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	92	25	0	67	0	0	0	0	0	0
11	0	75	0	0	75	100	100	100	17	83	92	100	0	92	92	8	100	100	75	100	100	100	100	100	100
12	100	25	89	100	0	0	0	92	83	58	50	83	100	100	83	58	100	0	75	0	0	0	0	25	8
13	0	0	33	8	0	0	0	0	8	42	58	50	0	100	25	92	50	0	0	0	0	0	0	0	0
14	8	0	33	100	0	0	0	0	75	50	0	50	33	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	17	8
15	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	83	83	8	8	0	0	25	0	0	0	0	0	0	33	8
16	8	0	22	100	0	0	0	1	75	67	17	92	67	0	58	8	75	0	75	0	0	0	0	100	17
17	0	75	11	0	100	100	100	0	17	8	67	17	100	100	42	92	0	0	0	100	100	100	100	0	100
17A	0	0	22	100	0	0	0	75	83	92	33	83	0	0	58	0	75	0	75	0	0	0	0	100	0
18	100	25	77	0	0	0	0	17	8	58	0	17	100	100	100	92	100	100	100	0	0	0	0	58	0
18A	0	0	22	100	1	1	1	82	92	25	100	83	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	42	17

❖ **Tabla2**

MicSat	114	115	129	146	160	162	169	176	217	220	238	250	260	341	343	361	409	485	486	700	701	900	1200	Ibros'	Zulema'
3-220	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-221	0	11	0	0	0	0	0	0	10	20	30	10	0	0	20	20	0	0	80	0	0	50	0	0	88
3-222	0	88	0	90	30	100	90	20	40	60	40	90	80	30	80	80	100	0	0	60	100	0	100	40	55
3-223	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-230	0	0	0	0	0	22	0	10	0	60	60	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-233	11	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
3-234	22	11	77	20	0	0	0	0	20	0	0	20	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
3-235	44	88	11	70	30	22	10	10	20	90	70	70	20	0	0	10	80	90	90	70	0	0	0	40	0
3-236	0	77	11	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-237	0	0	0	0	10	0	0	0	20	0	0	0	0	90	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-238	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-246	0	0	0	0	0	88	0	0	10	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100
3-503	0	33	0	70	0	0	0	10	20	50	30	70	20	30	30	0	20	0	0	60	0	0	0	0	0
3-504	0	66	0	10	0	0	0	10	70	30	50	30	0	70	70	100	0	0	0	0	0	0	0	10	0
16-140	100	22	77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	90	0	0	0	0	0	0	0
16-174	0	66	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16-180	0	55	11	100	100	77	90	90	100	100	100	70	60	80	90	40	100	0	100	100	100	100	100	100	100
16-188	11	0	0	0	0	66	90	90	100	100	100	90	100	80	90	100	100	0	100	100	100	100	0	100	100
16-189	88	88	100	100	80	55	10	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	70	0	0	0	0	100	0	0
16-194	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16-260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16-261	88	22	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0
16-264	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8-249	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8-250	0	0	0	70	0	0	0	40	80	90	100	70	30	100	100	0	70	0	70	0	0	0	0	70	0
8-268	0	0	0	0	0	0	0	0	100	80	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8-395	0	0	0	80	0	0	0	0	80	30	50	70	100	0	0	80	70	0	80	0	0	0	0	70	0
13-120	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	p
13-125	22	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	p

13-126	77	22	88	20	0	0	0	30	50	60	20	70	30	0	0	0	90	30	60	0	0	0	0	50	p
13-127	0	11	11	70	0	0	0	70	30	0	10	0	0	10	0	10	0	50	10	0	0	0	0	40	p
13-128	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	40	30	50	20	0	0	0	0	0	0	0	0	p
13-129	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	p
13-134	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	50	20	0	0	0	p
13-135	0	66	0	90	80	100	90	80	60	100	70	70	90	50	70	80	90	0	30	40	60	90	75	60	100
13-136	0	0	0	10	0	0	0	10	30	0	20	0	10	50	20	0	10	0	0	0	0	0	0	40	0
32-111	0	0	0	0	80	22	90	100	100	90	60	100	60	20	10	10	100	0	100	100	100	100	100	100	100
32-115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	50	0
32-135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-138	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	100	0	0	30	0	100	0
32-140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	50	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0
32-184	11	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-189	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-191	55	33	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0	0	0	0	0	0	0
32-198	100	66	77	10	0	0	0	0	0	0	30	0	0	50	60	90	0	100	80	0	0	0	0	90	0
32-204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-213	0	66	22	100	90	100	100	100	100	100	100	100	100	90	90	60	100	0	100	100	100	100	100	100	100
32-217	0	11	11	0	0	0	0	0	0	0	40	0	40	80	60	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-237	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10	70	50	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-240	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-245	33	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
32-256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-295	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
32-299	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	20	90	60	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-303	0	11	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
32-308	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-314	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-318	44	11	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	90	40	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
32-322	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-332	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	80	50	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32-335	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
32-338	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0

32-341	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	
21-107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	
21-158	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21-161	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21-173	0	44	22	100	100	100	90	100	100	100	100	80	80	10	20	10	90	0	100	100	100	100	75	100	100	
21-176	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	10	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21-183	66	11	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21-227	77	33	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21-261	33	22	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21-270	88	33	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	
21-277	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	
21-361	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	40	0	0	0	0	40	0	
21-365	100	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17-110	11	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17-132	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	
17-150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	
17-157	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17-180	0	0	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	10	100
17-181	0	77	11	0	30	33	90	100	90	100	80	100	50	0	10	10	80	0	100	0	0	0	75	90	0	
17-183	0	0	0	100	70	77	0	0	0	0	30	10	70	90	90	90	0	0	0	100	90	60	0	0	0	
17-185	0	0	0	0	0	66	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	20	0	20	100	80	60	25	0	0	
17-190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	
17-216	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17-220	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17-226	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17-234	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17-238	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17-240	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	
17-249	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17-281	55	77	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	
17-289	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17-319	33	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	
17-322	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

17-366	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	
17-368	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17-397	88	22	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	
17-412	11	11	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	
17-425	44	0	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	
19-111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
19-114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	
19-127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0	0	0	
19-138	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	
19-142	22	44	33	50	0	0	0	30	20	0	0	0	0	0	0	0	0	10	40	0	0	0	0	70	100
19-145	22	33	33	0	0	55	80	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	100	0	80	0
19-152	44	55	22	30	0	0	30	10	0	0	30	0	50	80	80	80	0	0	20	0	0	0	0	20	0
19-155	44	44	77	70	0	44	60	80	100	90	100	100	90	90	100	100	100	100	100	0	0	0	0	100	88
19-158	0	33	33	60	80	11	30	80	100	90	70	100	60	0	20	0	100	0	80	100	0	0	25	70	22
19-213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0
20-135	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	10	40	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
20-147	11	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
20-151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20-154	0	22	0	10	0	0	0	40	60	60	50	20	40	10	0	0	50	0	50	30	0	0	0	10	22
20-156	0	11	22	40	40	0	0	50	10	0	0	0	0	0	0	0	40	0	20	50	100	100	75	90	77
20-161	0	22	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	80	40	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20-164	0	44	11	100	100	100	100	80	90	60	0	80	0	0	20	10	100	0	40	100	100	100	75	90	88
20-185	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20-191	11	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20-246	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20-492	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-156	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-191	0	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-196	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-207	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
5-218	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	10	0	90	0	0	0	0	0	10	0
5-243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-245	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

5-249	0	22	0	10	100	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	100	100	75	10	77
5-251	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
5-256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-259	0	44	11	80	0	0	100	100	90	100	60	0	80	60	50	100	100	10	70	0	0	0	25	90	22
5-275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-283	0	11	11	0	22	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	30	0	0	0
5-285	0	0	0	10	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	30	0
5-297	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
5-313	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-322	0	0	0	20	0	0	0	20	0	0	30	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-331	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-348	0	0	0	0	0	0	0	20	0	30	0	0	10	0	0	10	20	0	0	0	0	0	0	70	22
5-350	0	0	0	10	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-365	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	10	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-431	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-437	33	22	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-475	0	0	0	30	0	0	0	50	0	30	10	0	10	0	0	10	40	70	20	0	0	0	0	100	44
5-487	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-497	55	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	20	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
5-560	0	0	0	20	0	0	0	10	0	0	0	0	30	20	0	0	0	50	0	0	0	0	0	30	11
18-51	11	11	22	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18-54	22	0	22	0	10	0	0	10	0	20	0	10	0	10	0	0	10	0	20	0	0	0	25	0	0
18-58	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
18-61	100	88	88	100	90	88	40	80	90	90	70	100	90	100	100	80	100	80	100	90	50	80	100	100	100
18-64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	10	0	0	0
18-79	55	66	55	80	40	44	20	60	80	30	70	90	90	100	80	80	80	60	80	70	70	70	75	90	100
18-118	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	30	20	10	0	20	30	20	0	20	0	0	0	0	30	44
18-185	0	44	22	70	0	44	90	50	20	50	20	20	40	50	30	0	30	0	40	60	0	0	75	20	44

PUBLICACIONES

- **Callus induction and plant regeneration from immature embryos of *Brachypodium distachyon* with different chromosome numbers.**
Hammami R, Cuadrado A, Frierio E, Jouve N, Soler C, González J.M. Trabajo aceptado por la revista *Biologia Plantarum* (article in press).

- **Prolamin storage proteins and alloploidy in wild populations of the small grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv**

- **Hammami R, Jouve N, Cuadrado A, Soler C, González J.M.** Trabajo enviado a la revista. *Plant Systematics and Evolution*.