



Universidad de Alcalá

**ANÁLISIS DE CARACTERES AGROMORFOLÓGICOS Y MOLECULARES EN
EL PROCESO DE DOMESTICACIÓN DE POBLACIONES SILVESTRES DE
Brachypodium spp. PARA SU USO COMO CUBIERTAS VEGETALES**

TESIS DOCTORAL



GILMA PAOLA LÓPEZ URREA

DIRECTORES

**MARÍA CONSUELO SOLER LLINARES
JUAN MANUEL GONZÁLEZ TRIGUERO**



2014



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y
BIOTECNOLOGÍA
Campus Universitario
Ctra. Madrid-Barcelona, km. 33,600
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Teléfono: 91 885 46 73 / 47 51
Fax: 91 885 46 63 / 47 99
dpto.biomebiotec@uah.es

MARÍA CONSUELO SOLER LLINARES, INVESTIGADORA DEL
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION Y TECNOLOGÍA AGRARIA
Y ALIMENTARIA Y JUAN M. GONZÁLEZ TRIGUERO, PROFESOR
TITULAR DE GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Análisis de caracteres agromorfológicos y moleculares en el proceso de domesticación de poblaciones silvestres de *Brachypodium spp.* para su uso como cubiertas vegetales” realizada bajo nuestra dirección por Dña. **Gilma Paola López Urrea** en el Departamento de Medio Ambiente, S.G.I.T., I.N.I.A., La Canaleja, y en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología 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 quince de mayo de dos mil catorce.

M^a Consuelo Soler Llinares

Juan M. González Triguero



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y
BIOTECNOLOGÍA
Campus Universitario
Ctra. Madrid-Barcelona, km. 33,600
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Teléfono: 91 885 46 73 / 47 51
Fax: 91 885 46 63 / 47 99
dpto.biomebiotec@uah.es

**JUAN SOLIVERI DE CARRANZA, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA Y
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y
BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ,**

CERTIFICA:

Que Dña. Gilma Paola López Urrea, ha realizado la Tesis Doctoral titulada: “**Análisis de caracteres agromorfológicos y moleculares en el proceso de domesticación de poblaciones silvestres de *Brachypodium spp.* para su uso como cubiertas vegetales**”, en el Departamento de Medio Ambiente, S.G.I.T., I.N.I.A., La Canaleja, y en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá, y reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste, firma en Alcalá de Henares a quince de mayo de dos mil catorce.



Juan Soliveri de Carranza



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DE CARACTERES AGROMORFOLÓGICOS Y MOLECULARES EN EL
PROCESO DE DOMESTICACIÓN DE POBLACIONES SILVESTRES DE
Brachypodium spp. PARA SU USO COMO CUBIERTAS VEGETALES**

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Gilma Paola López Urrea

PARA OPTAR AL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

DIRECTORES:

**María Consuelo Soler Llinares
Juan Manuel González Triguero**

ALCALÁ DE HENARES, 2014



*El desarrollo de la investigación de esta tesis y gran parte de la formación de su autora han sido posibles gracias a la financiación del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). La autora ha disfrutado de la beca predoctoral FPI-INIA Recogida en la resolución de convocatoria de 22 de febrero de 2008 (BOE 27 de febrero de 2008) denominada "Evaluación de poblaciones naturales de *Brachypodium distachyon* y selección de líneas puras para su utilización en transformación de cereales".*



A mi esposo
y a nuestros hijos
Esteban y Thiago

ÍNDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	7
ABREVIATURAS	11
RELACIÓN DE TABLAS	15
RELACIÓN DE FIGURAS	19
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	25
1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>Brachypodium</i>	26
1.3 DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA DEL GÉNERO <i>Brachypodium</i>	27
1.4 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DEL GÉNERO <i>Brachypodium</i>	29
1.5 CITOGENÉTICA DEL GENERO <i>Brachypodium</i>	31
1.6 <i>Brachypodium distachyon</i> COMO ESPECIE MODELO PARA PARA LA INVESTIGACIÓN EN GRAMÍNEAS	34
1.7 GENOMA Y SECUENCIACIÓN DE <i>Brachypodium distachyon</i>	36
1.8 DOMESTICACIÓN DE PLANTAS	37
1.8.1 Primeros registros sobre la domesticación de las gramíneas.....	38
1.8.2 <i>Einkorn</i> como ejemplo primitivo de domesticación.....	39
1.8.3 Cambios asociados a la domesticación de plantas.....	40
1.8.4 Implicación genética en la domesticación de Gramíneas	43
1.8.5 <i>Brachypodium</i> frente a la domesticación y su utilización como cubiertas vegetales vivas.....	44
1.9 CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MARCADORES MORFOLÓGICOS.....	46
1.10 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES.....	47
1.10.1 Intermicrosatélites (ISSR).....	48
1.10.2 Microstélites (SSR).....	49
2. OBJETIVOS.....	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS	57
3. 1 MATERIAL VEGETAL.....	59
3. 2 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL SILVESTRE	60
3. 3 PROCESO DE DOMESTICACIÓN DE LAS PLANTAS.....	62
3.3.1 Plantas silvestres y plantas domesticadas	66

3. 4 ANÁLISIS DE CARACTERES AGROMORFOLÓGICOS.....	67
3. 5 EXTRACCIÓN DEL ADN	68
3. 6 AMPLIFICACIÓN DEL ADN	69
3.6.1 Amplificación de secuencias Inter-microsatélite (ISSR)	69
3.6.2 Separación por electroforesis de los alelos amplificados.....	70
3.6.3 Cuantificación y análisis de los patrones polimórficos.....	71
3.6.4 Amplificación de microsatélites (SSR).....	71
3.6.5 Análisis y detección de microsatélites (SSR).....	74
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	75
4. RESULTADOS	77
4.1 ESTUDIO DE CARACTERES AGRO-MORFOLÓGICOS ENTRE POBLACIONES SILVESTRES Y DOMESTICADAS	79
4.2 REGISTRO DE CARACTERES AGRO-MORFOLÓGICOS EN FITOTRÓN E INVERNADERO	86
4.3 ANALISIS DE VARIABILIDAD MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES DE ADN GENÓMICO.....	91
4.3.1 Estudio de Intermicrosatélites (ISSR)	91
4.3.2 Estudio de la diversidad inter-poblacional mediante marcadores ISSR.....	95
4.3.3 Análisis de la diversidad intra-poblacional mediante marcadores ISSR.....	99
4.3.4 Estudio de Microsatélites (SSR)	100
4.3.5 Estudio de la diversidad inter-poblacional mediante marcadores SSR.....	103
4.3.6 Estudio de la diversidad intra-poblacional mediante marcadores SSR.....	107
4.4 ANALISIS CONJUNTO DE MARCADORES ISSR, SSR Y CARACTERES AGROMORFOLÓGICOS	108
5. DISCUSIÓN	115
5.1 CULTIVO Y DOMESTICACIÓN DE ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO <i>Brachypodium</i>	117
5.2 PROTECCIÓN DEL SUELO MEDIANTE ESPECIES DE GRAMÍNEAS SILVESTRES	119
5.3 DOMESTICACIÓN	120
5.3.1 Estudio agromorfológico.....	121
5.3.2 Comparación entre poblaciones silvestres y líneas seleccionadas de <i>Brachypodium</i>	122
5.3.3 ¿Cuándo se alcanza la domesticación?.....	129
5.3.4 Aplicación de los marcadores moleculares SSR, ISSR y marcadores morfoagronómicos en las poblaciones analizadas.....	131
5.4 MARCADORES MOLECULARES	132
5.4.1 Distancia genética	133
5.5 Influencia del origen geográfico en relación a las adaptaciones genéticas y fenotípicas de las poblaciones evaluadas	134
5.6 Evaluación de las poblaciones estudiadas para su uso como cubiertas vegetales vivas.....	136

6. CONCLUSIONES	139
7. BIBLIOGRAFÍA	145
AGRADECIMIENTOS	157

RESUMEN

Los cereales actualmente cultivados proceden de la domesticación, ocurrida hace varios milenios de especies silvestres; siendo el maíz, el arroz, el trigo, la cebada, la avena y el centeno los vegetales principales que sustentan la alimentación humana. Todos estos cereales guardan entre sí una relación filogenética más o menos próxima, así como con otras especies de la familia de las *Poaceae*, entre las que se incluye el género *Brachypodium* del que forman parte las especies *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*.

Desde hace algo más de una década, se ha propuesto a *B. distachyon* como especie modelo de los cereales de climas templados, ya que presenta unas características especiales como son: un ciclo de vida corto y facilidad de cultivo, reproducción principalmente autógama, posibilidad de transformación genética y un genoma pequeño, lo que ha permitido abordar su secuenciación con relativa facilidad. Con todo ello, se ha abierto un amplio abanico de posibilidades para la identificación de genes de interés agronómico, en los cereales cultivados de mayor importancia económica.

Por otra parte, *Brachypodium* es capaz de implantarse en suelos pobres y alterados, por lo que se está utilizando como cubierta vegetal, para proteger el suelo de la erosión en cultivos leñosos como el olivo y el almendro. En este sentido, gracias a trabajos conjuntos con el INIA, IFAPA y la empresa de semillas Agrosa S.A, se han obtenido dos variedades comerciales ('Zulema' e 'Ibros'), a partir de la selección de poblaciones silvestres inducidas a domesticación.

En el presente trabajo, se han utilizado tres especies de *Brachypodium* recientemente clasificadas y denominadas: *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*, en las que se ha llevado a cabo un estudio de diversidad, selección y domesticación a partir de poblaciones silvestres. Desde hace más de 10 años, investigadores del Departamento de Medio Ambiente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), han hecho expediciones a lo largo de la Península Ibérica, para recolectar poblaciones naturales de especies de gramíneas, entre las que se encuentran las del género

Brachypodium. A partir de éstas se ha iniciado un proceso de selección y cultivo anual en la Finca 'La Canaleja' en Alcalá de Henares. El objetivo principal ha sido la obtención de líneas homogéneas en cuanto a porte, precocidad y producción, para que pudiesen ser empleadas como cubiertas vegetales vivas en suelos de secano. De la colección conseguida, se han seleccionado 13 poblaciones en proceso de domesticación y 13 poblaciones silvestres, con diferente origen geográfico, de las que derivan.

Para detectar los cambios morfológicos producidos entre las poblaciones naturales y sus líneas derivadas sometidas a presión de cultivo y selección, se utilizaron 18 descriptores agromorfológicos. Se han observado cambios característicos de los procesos de domesticación en las especies vegetales, como son: el incremento del tamaño de las plantas y de las semillas. En algunos casos en las poblaciones inducidas a domesticación el incremento de altura en la etapa de maduración, alcanza valores que superan los 25,2 cm de altura, respecto a las poblaciones silvestres de las que derivan. En algunas poblaciones en proceso de domesticación, se ha observado la disminución en los días de desarrollo.

El estudio agromorfológico se ha completado con el análisis de marcadores moleculares de tipo intermicrosatélite (ISSR) y microsatélite (SSR). Así, el empleo de 16 cebadores para la amplificación por PCR de ISSR, ha posibilitado la identificación 2.378 fragmentos polimórficos, en un conjunto de 26 poblaciones (13 silvestres + 13 derivadas). Mediante 11 parejas de cebadores para la amplificación por PCR de SSR, en 10 poblaciones (5 silvestres + 5 derivadas) se han podido detectar 42 loci polimórficos.

El estudio comparado de las poblaciones silvestres y las líneas derivadas de ellas, ha revelado una pérdida general de diversidad en las líneas en proceso de domesticación. En especial para las parejas de las poblaciones 326F y S-401 (*B. hybridum*) y 129F – S-513 (*B. satacei*). No obstante, en algunos casos se ha podido identificar algún marcador de tipo ISSR y SSR en las líneas derivadas que no se detectaron en las poblaciones silvestres de origen, probablemente debido a que la baja frecuencia de los mismos en estas poblaciones impidió su detección.

En los análisis de marcadores SSR, las poblaciones de *B. hybridum* presentaron un 25% de alelos SSR exclusivos mientras que las poblaciones de *B. distachyon* y *B. stacei* presentaron un 11.1% de alelos únicos.

Por otra parte los análisis de marcadores ISSR, revelaron diferencias entre ejemplares silvestres con sus respectivas líneas derivadas en *B. distachyon*, de entre 11 y 25 fragmentos. En *B. stacei* se presentaron 11 fragmentos no compartidos y en *B. hybridum* entre 21 a 29 fragmentos.

Los resultados presentados sirven para avanzar en el conocimiento de la variación agromorfológica y molecular en *Brachypodium*, como respuesta a la selección y domesticación. Así mismo, los resultados obtenidos en el presente trabajo, y debido a la proximidad evolutiva de *Brachypodium* con los cereales cultivados de la familia *Poaceae*, podrían servir de base para el estudio de la domesticación en estas especies que, aunque tienen un gran interés económico, sus genomas son mucho más grandes y complejos, lo que supone una barrera para los análisis genéticos.

Por último, hay que resaltar el potencial de *Brachypodium* para la obtención de cubiertas vegetales vivas, en la protección de cultivos leñosos como son los olivares, y que tienen una gran importancia económica en España. Así, de las tres especies analizadas, *B. stacei* y *B. hybridum* presentan mayor tamaño y tienen habito semipostrado lo que produce una mayor densidad de cobertura del terreno, y, dado que son especies con una amplia distribución geográfica pueden presentar una mayor capacidad de adaptación a diversas zonas. Por otra parte, *B. distachyon* tiene una distribución geográfica más restringida y su capacidad para cubrir el suelo es menor, por lo que sería necesaria una densidad de siembra más alta que en el caso de las otras dos especies.

SUMMARY

The cereals currently produced come from the domestication that occurred over various millennium from wild species; being corn, rice, wheat, barley, oat and rye the principal grains that sustain the human food supply. All of these grains present a close phylogenetic relationship as with other species of the *Poaceae* family, including the genus *Brachypodium* in which are included the species *B. distachyon*, *B. stacei* and *B. hybridum*.

For more than a decade, *B. distachyon* has been proposed as a model specie of temperate climate cereals since it possesses special characteristics such as a short life cycle, ease of harvest, principal self reproduction, and a small genome which has permitted its complete sequencing. With this, an elevated number of possibilities has been opened to identify genes of agronomic interest, in the cultivated cereals with the most importance economically.

On the other hand, *Brachypodium* is capable of been introduced in poor or degraded soils which leads to its use as a vegetable cover to protect the soil from erosion in woody crops such as olives or walnuts. In this context, because of the joint effort of the INIA, IFAPA and the seed company Agrosa S.A, two commercial varieties have been obtained ('Zulema" and "Ibros') based on the selection of wild populations introduced in domestication.

In this project, three recently classified species of *Brachypodium* were used: *B. distachyon*, *B. stacei* and *B. hybridum*, whose diversity, selection and domestication in wild populations have been studied. For more than ten years, researchers from the Department of the Environment of the "Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agraria y Alimentaria (INIA)", have collected natural and wild populations of grasses from different parts of the Iberian Peninsula in which genus *Brachypodium* was contained. From these samples, a process of selection and annual harvest was started in the "Finca La Canaleja" in Alcala de Henares. The primary objective was to obtain homogeneous lines in terms of height, precocity and production, so that they can be used as live vegetable cover in dry soils. Of the obtained collection, 13 populations in the

process of domestication were derived from 13 wild populations from differing geographic origins.

In order to detect morphological changes produced between the natural populations and their derived lines subjected to the pressure of harvest and selection, 18 agro-morphological descriptors were used. Characteristical changes in the process of domestication were observed in the vegetable species, such as an increase in the size of the plants and of the seeds. In some cases in the populations induced to domesticated, reached heights over 25,2 cm greater than the wild populations from they were derived. In some populations in process of , there was a decrease in the time of development.

The agro-morphological study was completed by the analysis of two types of molecular markers: Intermicrosatellite (ISSR) and microsatellite (SSR). The use of 16 probes for the amplification by PCR of ISSR has made possible the identification of 2.378 polymorphological fragments in a group of 26 populations (13 wild populations and 13 derived populations). Using 11 pairs of probes for the amplification by PCR of SSR in 10 populations (five wild populations and five derived populations), 42 polymorphological loci were detected.

Comparing the studies of the wild populations and the lines derived from them, has revealed a general loss in the diversity of the lines in process of domestication. More specifically, in the pairs of populations 326-F and S-401 (*B. hybridum*) and 129F - S-513 (*B. stacei*). However, in some cases an ISSR or SSR molecular marker could be identified in the domesticated lines but weren't detected in their original wild populations, probably most likely low frequencies in these wild populations hindered their detection.

The analysis of SSR markers in the populations of *B. hybridum* presented 25% of unique SSR alleles while in both, populations of *B. distachyon* and *B. satcei* presented 11% of unique SSR alleles.

On the other hand, the analysis of ISSR markers showed differences in *B. distachyon* between 11 and 25 fragments that are not shared with the wild populations and their derived lines; in *B. stacei* were detected differences in 11 fragments; and in *B. hybridum* between 21 and 29 fragments.

The results serve to advance the knowledge of the agro-morphological and molecular variations in *Brachypodium*, as a result of the process of selection and domestication. The results obtained in this project and the evolutionary proximity of *Brachypodium* with the cultivated cereals of the *Poaceae* family, could serve as a base to study the domestication of these species which, although have great economic potential, pose a challenge in their genetic analysis due to larger and more complex genomes.

Finally, the potential of *Brachypodium* should be underlined in the cultivation of alive vegetable covers, in the protection of woody crops such as olive groves, ought to its great economical importance in Spain. Of the three analyzed species, *B. stacei* and *B. hybridum* have a higher size with a semipostrated bearing, wich produced a better coverage density on the soil, and owing to both are species with a broad geographic distribution, could have a greater capacity of adaptation in diverse geographical regions. By the other hand, *B. distachyon* have a restricter geographical distribution and its capacity to cover the soil could be smaller, compared with the other two species, about that could be required a greater density of harvest.

ABREVIATURAS

3'	Región corriente abajo en la secuencia de un gen
5'	Región corriente arriba en la secuencia de un gen
a.C	Antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i> , polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados.
Aprox.	Aproximadamente
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i> , Cromosoma artificial bacteriano
BAD	Gen determinante de la fragancia del grano del arroz
Bd 21	Brachypodium distachyon accesión 21
cm	Centímetros
COS	Secuencia ortologa conservada
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
EST	<i>Expressed sequence tag</i> , marcador de secuencia expresada
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> , Hibridación in situ fluorescente
GIF1	Gen determinante del llenado del grano en arroz
GISH	Genomic <i>in situ</i> hybridization, Hibridación genómica <i>in situ</i>
Gn1a	Gen determinante del número de granos en el arroz.
gr	Gramos
GS3	Gen determinante del tamaño y forma del grano del arroz
GW2	Gen determinante del peso del grano del arroz
IBI	International Brachypodium Initiative http://www.brachypodium.org
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
IFAPA	Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
ISSR	<i>Intersimple sequence repeats</i>
Kb	Kilo base
m	Metro
Mb	Mega bases
mm	milímetros
mM	milimolar
Mpb	Mega pares de bases
ng	nanogramos

NPGS	<i>National Plant Germoplasm System.</i>
Nud	Gen determinante del grano desnudo en cebada
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en gel de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PCA	<i>Principal component analysis</i> , Análisis por componentes principales
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PROG1	Gen determinante del crecimiento erecto o postrado en arroz
Q	Gen determinante de la fragilidad de la espiga en trigo domesticado.
qSH1	Gen de dispersión del grano en la domesticación del arroz
QTL	<i>Quantitative trait loci</i> , locus de un carácter cuantitativo
R	<i>The R project for statistical computing</i> http://www.r-project.org
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> , amplificación aleatoria de ADN polimórfico.
Rc	Gen del color del pericarpio en arroz
rDNA	Ribosomal DNA, ADN ribosomal
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> , polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> , Microscopio electrónico de barrido
SH4	<i>Grain shattering quantitative trait locus on chromosome 4</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , polimorfismo de nucleotido simple.
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i> , secuencia de repetición simple.
STS	<i>Sequence tagget site</i> , sitio de secuencia reconocida.
TAE	Tampón de disolución para electroforesis.
Tga1	Gen <i>teosinte glume architecture 1</i> , gen determinante de la cubierta del grano en maíz
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> , algoritmo para análisis genético.
Vrs1	Gen determinante de 2 a 6 carreras en cebada.
Waxy	Gen de textura del grano cocido en arroz.
μL	Microlitros.

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1.1. Número de cromosomas y estimación del tamaño del genoma de algunas especies del género <i>Brachypodium</i>	32
Tabla 1.2. Comparación entre diferentes sistemas modelo y plantas cultivadas	36
Tabla 3.1 Datos geográficos tomados en la recolección del material vegetal silvestre	61
Tabla 3.2. Año de recolección del material silvestre	63
Tabla 3.3. Descriptores morfo-agronómicos analizados	65
Tabla 3.4. Poblaciones de <i>Brachypodium</i> analizadas	66
Tabla 3.5. Secuencias de los cebadores ISSR utilizados	69
Tabla 3.6. Programa de amplificación por PCR de los ISSR.....	70
Tabla 3.7. Poblaciones analizadas con marcadores SSR.....	72
Tabla 3.8. Secuencias de los cebadores utilizados en la obtención de SSR.....	73
Tabla 3.9. Programas de amplificación SSR por PCR.....	74
Tabla 4.1. Descriptores agro-morfológicos para 7 parejas de poblaciones de <i>Brachypodium</i> con ejemplares silvestres y domesticados.....	80
Tabla 4.2. Datos agro-morfológicos para 26 poblaciones con ejemplares silvestres y domesticados de <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>	84
Tabla 4.3.1. Registro de datos agro-morfológicos en invernadero para 4 parejas de <i>Brachypodium</i> con ejemplares silvestres y domesticados [<i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>]	87
Tabla 4.3.2. Registro de datos agro-morfológicos en fitotrón para 4 parejas de <i>Brachypodium</i> con ejemplares silvestres y domesticados [<i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>]	87
Tabla 4.4. Conjunto de regiones amplificadas para los 16 sistemas ISSR analizados. En la primera columna se muestra el rango de los tamaños obtenidos para las 26 poblaciones totales	93
Tabla 4.5. Número total de fragmentos polimórficos amplificados y tamaño de los fragmentos	

obtenidos por cada ISSR en tres especies de <i>Brachypodium</i> (<i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>)	94
Tabla 4.6. Perdida de fragmentos detectada para poblaciones de <i>Brachypodium</i> silvestres y domesticadas mediante el uso de 16 cebadores ISSR (<i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>)	96
Tabla 4.7. Porcentaje de fragmentos presentes en poblaciones silvestres y ausentes en poblaciones descendientes domesticadas y viceversa	97
Tabla 4.8. Parejas de <i>Brachypodium</i> seleccionadas para el estudio con marcadores SSR	101
Tabla 4.9. Conjunto de alelos SSR obtenidos para un total de 5 parejas de poblaciones silvestres y domesticadas de <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>	102
Tabla 4.10. Alelos amplificados con cada sistema SSR en 10 poblaciones totales de <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>	104
Tabla 4.11. Total de alelos obtenidos con 11 cebadores SSR en las 10 poblaciones de <i>Brachypodium</i> analizadas	105

RELACIÓN DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Representación Simplificada de la posición filogenética de *Brachypodium distachyon*. 27
- Figura 1.2.** Distribución geográfica del género *Brachypodium*. Las áreas resaltadas en verde corresponde a la distribución aportada por registro de herbarios, observaciones en campo y datos de pasaporte de colecciones de germoplasma. 28
- Figura 1.3.** Representación de los cinco cromosomas de *B. distachyon*. 33
- Figura 1.4.** Mapa del Cercano Oriente. El Creciente Fértil (señalado en verde) se establece como la zona geográfica en la que se inició la domesticación de los cereales. Se caracteriza por una topografía variable, con estaciones de inviernos fríos y lluviosos y veranos muy secos..... 38
- Figura 1.5.** Cubiertas vegetales de *Brachypodium* en suelos de olivar en el sur de España. Las variedades *Ibros* y *Zulema* son variedades comercializadas obtenidas por domesticación..... 45
- Figura 1.6.** Representación esquemática de un cebador ISSR (AG)₈, (a) no anclado, (b) anclado en 3', (c) anclado en 5'. La zona intermicrosatélite de reconocimiento corresponde a la repetición de la secuencia (TC)_n flanqueada por 2 regiones ISSR dirigidas inversamente. [tomado de Reddy et al., 2002]. 49
- Figura 3.1.** Zonas de prospección en España de *Brachypodium*. Colección Banco de Germoplasma Depto. de Medio Ambiente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria INIA..... 62
- Figura 3.2.** Parcelas experimentales de *Brachypodium* en la Finca 'La Canaleja' 63
- Figura 3.3.** Desarrollo de las plantas de *Brachypodium* en invernadero..... 67
- Figura 3.4.** Captura de imágenes en gel de electroforesis para la detección de fragmentos ISSR amplificados 71
- Figura 4.1.** Ejemplares de *B. distachyon* (2n=10), *B. stacei* (2n=20) y *B. hybridum* (2n=30) 79
- Figura 4.2.** Parcelas experimentales de *Brachypodium* en la 'Finca La Canaleja', lugar de procedencia de las poblaciones "domesticadas" 81

Figura 4.3. Descripción agromorfológica color de hojas durante el ahijamiento para algunas poblaciones de <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>	82
Figura 4.4. Gráfico de alturas de maduración, espigado y peso de mil semillas para 13 parejas de <i>Brachypodium</i> con ejemplares silvestres y domesticados de tres especies [<i>B. distachyon</i> (2n=10), <i>B. stacei</i> (2n=20) y <i>B. hybridum</i>]	86
Figura 4.5. Desarrollo en fitotrón de plantas de <i>Brachypodium</i> con ejemplares silvestres y domesticados de tres especies diferentes (<i>B. distachyon</i> 2n=10; <i>B. stacei</i> 2n= 20 y <i>B. hybridum</i> 2n=30) en fase de espigado.	88
Figura 4.6. Crecimiento comparativo de poblaciones <i>Brachypodium</i> en tres zonas diferentes de desarrollo. a) alturas en espigado. b) alturas en maduración	90
Figura 4.7. Comparación del tamaño de las semillas de <i>Brachypodium</i> entre poblaciones silvestres y domesticadas. a) <i>B. distachyon</i> ; b) <i>B. stacei</i> ; c) <i>B. hybridum</i>	91
Figura 4.8. Separación en geles de agarosa de fragmentos ISSR amplificados empleando diferentes cebadores, en tres parejas de poblaciones (silvestre izquierda – domesticada derecha) de <i>Brachypodium</i> . a) <i>B. distachyon</i> ; b) <i>B. stacei</i> ; c) <i>B. hybridum</i>	92
Figura 4.9. Gráfica de la distribución de las poblaciones en los dos primeros componentes principales basados en la utilización de 16 sistemas ISSR, para 13 parejas de poblaciones silvestres y domesticadas de <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>	98
Figura 4.10. Dendrograma representando las distancias genéticas entre 13 parejas de poblaciones de <i>Brachypodium</i> , silvestres y domesticadas tras el análisis con 16 cebadores ISSR	100
Figura 4.11. Ejemplos de resultados de SSR amplificados en parejas de poblaciones silvestres y en proceso de domesticación de <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>	103
Figura 4.12. Porcentaje de alelos únicos y compartidos entre poblaciones de <i>Brachypodium distachyon</i> (2n=10), <i>B. stacei</i> (2n=20) y <i>B. hybridum</i> (2n=30), analizadas mediante marcadores SSR.....	106
Figura 4.13. Gráfico análisis de componentes principales para 5 parejas de poblaciones de <i>Brachypodium</i> (<i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>) analizadas con 11 sistemas SSR.....	108
Figura 4.14. Gráfico de componentes principales obtenido mediante el análisis conjunto de marcadores ISSR y SSR representando 3 tipos de poblaciones de <i>Brachypodium</i>	109

Figura 4.15. Gráfico de componentes principales obtenido mediante el análisis conjunto de marcadores ISSR y SSR representando 10 poblaciones de <i>Brachypodium</i> con plantas silvestres y domesticadas	110
Figura 4.16. Dendrograma representando las distancias genéticas entre 10 poblaciones de <i>Brachypodium</i> con ejemplares silvestres y domesticados, analizados con marcadores ISSR y SSR [<i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> , <i>B. hybridum</i>	111
Figura 4.17. Distribución por análisis de componentes principales para 10 poblaciones de <i>Brachypodium</i> (<i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> , <i>B. hybridum</i>), mediante la evaluación de caracteres agromorfológicos [Tabla 4.2]	112
Figura 4.18. Distribución por análisis de componentes principales para 10 poblaciones de <i>Brachypodium</i> (<i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> , <i>B. hybridum</i>), incluyendo análisis con ISSR, SSR y datos morfo-agronómicos de campo	113
Figura 5.1. Comparación de espigas de <i>Brachypodium</i> en poblaciones silvestres (letra F) y domesticadas (Letra S), en <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> y <i>B. hybridum</i>	123
Figura 5.2. Gráfico peso de mil semillas para las poblaciones 'Zulema' (<i>B. distachyon</i> 2n=10) e 'Ibros' (<i>B. hybridum</i> 2n=30) con sus correspondientes poblaciones silvestres de origen	125
Figura 5.3. Comparación tiempo de desarrollo para las poblaciones comerciales domesticadas 'Zulema' (<i>B. distachyon</i>) e 'Ibros' (<i>B. hybridum</i>) con su respectiva población silvestre de origen	129

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

A nivel mundial, la mayor parte de la alimentación procede de unas pocas especies de gramíneas, que pertenecen a la familia *Poaceae* que incluye alrededor de 600 géneros y más de 10.000 especies, que son fundamentales en la ecología y en los sistemas agrícolas (Kellogg et al., 2001). Las especies más importantes son: el trigo, cebada, avena, arroz y maíz (Devos., 2010).

Recientemente, las gramíneas están teniendo cada vez más importancia como fuente de energía renovable, adquiriendo un papel fundamental en la economía global. Por todo ello, se están llevando a cabo cada vez más trabajos de investigación con el fin de conocer en mayor profundidad la biología de estas especies, y poder continuar mejorando genéticamente este importante grupo de plantas (Vain, 2011).

Gran parte de los estudios llevados a cabo en especies gramíneas intentan, de manera sostenible, optimizar estos recursos biológicos para asegurar una alimentación y una obtención energética eficaz. Para ello, se utilizan especies modelo como el arroz cuyo genoma ha sido secuenciado. Sin embargo, esta especie está evolutivamente distante de los cereales de climas templados y fríos como pueden ser el trigo y la cebada, cuyos genomas son muy grandes, lo que dificulta la identificación de genes de interés agrícola. Por esta razón, en los últimos años se ha buscado una nueva especie representativa de los cereales de invierno. En este sentido, se propuso a *Brachypodium distachyon* como especie modelo y hoy en día es ya una realidad, habiéndose realizado un gran número de trabajos de investigación básica, incluyendo la secuenciación de su genoma (Draper et al., 2001; IBI 2010).

1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO *Brachypodium*

El género *Brachypodium* fue descrito por primera vez por Palisot de Beauvois en 1812. Desde entonces, su clasificación ha sufrido varios cambios, incluyéndose sucesivamente en las familias *Triticeae*, *Bromeae* y *Poaceae* (Catalán and Olmstead, 2000) y diversas revisiones han mostrado discrepancia en las clasificaciones propuestas para este género, al basarse principalmente en características morfológicas de la inflorescencia, espigado, cariósipide, almacenamiento del grano y forma del ovario.

Posteriormente, mediante análisis cariológicos, embriológicos y marcadores moleculares, se propuso que *Brachypodium* debía ser considerado como un género independiente (Schippmann, 1991). De este modo se reconoció como tribu *Brachypoidae* y se clasificó, tras la revisión llevada a cabo por Watson y Dallwitz, (1962) de la siguiente manera:

Reino: Plantae
División: Magnolophyta
Clase: Liliopsida
Orden: Poales
Familia: Poaceae
Subfamilia: Pooideae
Tribu: Brachypoidae
Género: *Brachypodium*

En el siguiente gráfico se ilustra la relación de parentesco del género *Brachypodium* con otros miembros de la familia *Poaceae* y la subfamilia *Pooideae*.

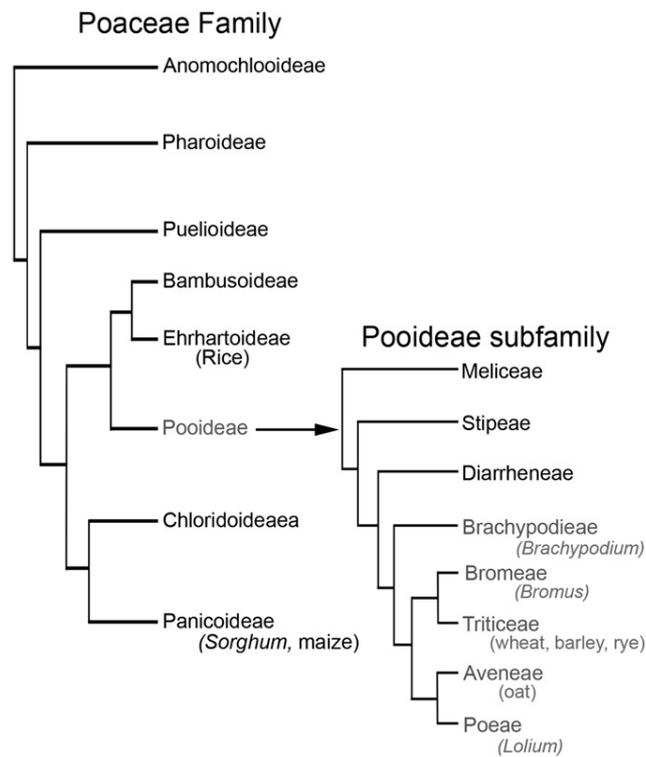


Figura 1.1. Representación simplificada de la posición filogenética de *Brachypodium distachyon*. [Tomado de Hands and Drea, 2012]

1.3 DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA DEL GÉNERO *Brachypodium*

El género *Brachypodium* comprende plantas herbáceas que crecen de manera silvestre, y cuyo origen se encuentra en el Mediterráneo y región Eurosiberiana (Wonly y Hasterok, 2009). Su distribución actual es bastante amplia y se extiende por África, Asia, Europa, Sur América y Norte América e incluso ha sido introducida en Oceanía.

Las condiciones ambientales a las que se han adaptado diferentes especies del género van, desde zonas con humedad moderada, a hábitats de extrema sequía, creciendo en bosques abiertos, a nivel del mar y en algunos casos alcanzan altitudes superiores a los 2000 m (Schippmann, 1991; Garvin et al., 2008).

INTRODUCCIÓN

Las diferentes especies que comprende el género *Brachypodium* presentan una extensa distribución geográfica. Así, *B. pinnaticum* y *B. sylvaticum* están ampliamente distribuidas a lo largo de Eurasia, *B. retusum* a lo largo del Mediterráneo, mientras que *B. rupestre* se encuentra predominantemente en Europa Occidental, y *B. phoenicoides* en el Mediterráneo Occidental.

Otras especies se consideran endémicas como *B. arbuscula* cuyo crecimiento se restringe en las Islas Canarias, *B. boissieri* al Sur de España y *B. kawakamii* a Taiwán, mientras que *B. mexicanum* se encuentra en Centro y Sur América, *B. flexum* en el trópico Oriental y Occidental Africano al igual que en Sudáfrica, y *B. bolussi* en Sudáfrica (Schippmann, 1991; Catalán and Olmstead, 2000).

Fuera de las áreas geográficas ya mencionadas, se ha podido encontrar regiones en las que, diferentes especies del género *Brachypodium*, se han introducido y se han establecido llegando incluso a considerarse invasivas en regiones de Uruguay, Sudáfrica y Australia. En la Figura 1.2 se muestra un mapa en el que se observa la amplia distribución del género *Brachypodium*, indicativo de la rica diversidad genética de este género

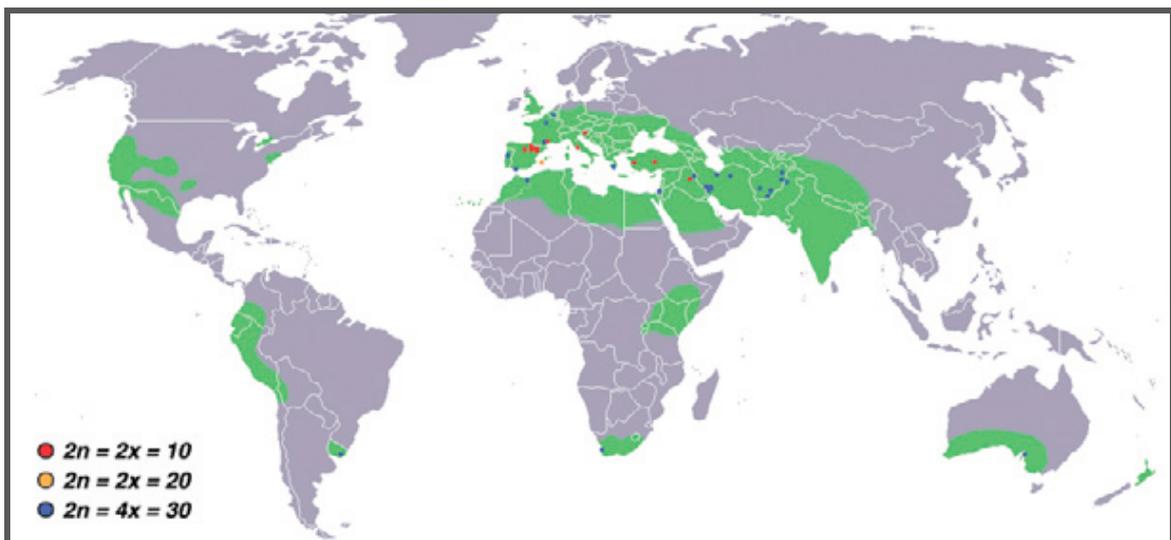


Figura 1.2. Distribución geográfica del género *Brachypodium*. Las áreas resaltadas en verde corresponde a la distribución aportada por registro de herbarios, observaciones en campo y datos de pasaporte de colecciones de germoplasma [Tomado de Garvin et al., 2008].

1.4 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DEL GÉNERO *Brachypodium*

Las especies del género *Brachypodium* se caracterizan principalmente por ser herbáceas con crecimiento cespitoso, pudiendo formar algunas de ellas cubiertas vegetales. El porte puede ser erecto, como es el caso de *B. distachyon*, cuya altura no supera los 20 centímetros, o postrado con hojas más anchas y densas. El cuanto a la longitud de sus tallos o cañas puede variar desde 2 cm hasta 200 cm de altura (Khan and Stace, 1999).

Las hojas de *Brachypodium* son bastante finas, con margen aserrado, y forma lineal, pudiendo medir de 3 a 12 mm de ancho. Su inflorescencia se presenta generalmente en racimo y rara vez en espiga, con raquis excavado; posee espiguillas subsentadas alternas, con numerosas flores. Presenta glumas desiguales, coriáceas con dorso redondeado, entre 3 y 9 nervios, lema coriácea, con dorso redondeado, por lo general con 7 nervios, mucronada o aristada. La palea es casi del mismo tamaño de la lema, coriácea con quilla ciliada y en su mayoría en el androceo se pueden apreciar 3 estambres (Watson and Dallwitz, 1962).

En relación a las formación de raíces, se trata de un sistema radicular fibroso, sin cambium vascular y que emergen desde la base del embrión a partir el interior de la semilla (Watt et al., 2009). El número de raíces seminales es pequeño (de 1 a 8) y puede variar según la especie, el vigor de la semilla y las condiciones ambientales. Estas raíces aparecen durante las primeras semanas de vida de la planta, con un desarrollo muy rápido, pero pronto son reemplazadas por las raíces secundarias.

En cuanto a su fruto y semilla se presenta en cariósipide. El fruto puede estar adherido a la lema y/o palea o estar libre de estas dos, posee un tamaño que se considera medio y longitudinalmente ondulado, comprimido dorso ventralmente con vellosidades confinadas a la zona del hilo. El hilo es linear y alargado, el embrión en este tipo de plantas suele ser pequeño, con endospermo duro conteniendo principalmente almidón. El embrión puede

presentarse con o sin epiblasto, formando un diminuto internudo del mesocótilo.

En cuanto al crecimiento y desarrollo de las plantas del género *Brachypodium*, algunas especies requieren de vernalización, como es el caso de *B. pinnantum* y *B. phoenicoides* que no florecen, o bien, desarrollan una escasa floración si la temperatura se mantiene alta durante el invierno. Por otro lado, especies como *B. hybridum*, *B. mexicanum* y *B. restusum* no requieren de vernalización. Mientras que *B. sylvaticum* y *B. glaucovirens* presentan una situación intermedia entre estos dos grupos, ya que florecen más abundantemente si son vernalizadas, pero pueden producir también floración si no la reciben (Khan and Stace, 1999).

Por otro lado, la inflorescencia de todas las especies se desarrolla en racimo simple que posteriormente madura basipetalmente, emergiendo los primordios desde la vaina de la hoja, sin embargo, la maduración es acropetala. Los periodos de floración se mantienen durante varias semanas y pueden prolongarse por varios meses si se eliminan las inflorescencias, causando así la formación de nuevas inflorescencias.

La antésis ocurre después de que la inflorescencia ha emergido completamente, en un rango de 4 días para *B. distachyon* y hasta 3-4 semanas en *B. sylvaticum*, *B. glaucovirens*, *B. pinnatum* y *B. phoenicoides*.

Durante la antésis la lema y palea se separan, permitiendo que emerjan los estigmas y las anteras. En especies Europeas perennes las flores son casmógamas, con anteras de aproximadamente 3 mm de largo provistas de largos filamentos colgantes. Sin embargo, en la especie Americana *B. mexicanum* y en la especie anual Europea *B. distachyon*, las anteras son menores a 1mm de largo y son cleistógamas (Khan and Stace, 1999).

1.5 CITOGÉNÉTICA DEL GÉNERO *Brachypodium*

El género *Brachypodium* comprende especies con genomas pequeños y un número básico de cromosomas bajo ($X= 5, 7, 8$ y 9) (Catalán et al., 1995), otros autores como Watson y Dallwitz (1962) enmarcan la existencia de especies $2n= 10, 14, 16, 18, 28, 30, 42$ y 56 , cromosomas. También Catalán (1995) registra que la poliploidía es un fenómeno frecuente en *Brachypodium* donde se pueden presentar poblaciones con algunos taxa diploides, tetraploides, hexaploide y octoploides.

Wonly y Hasterok, (2009), llevaron a cabo estudios citológicos para determinar el número de cromosomas somáticos y cantidad de ADN nuclear en seis especies diferentes de *Brachypodium*, representadas por 20 accesiones cada una. El menor número de cromosomas para el estudio, fue observado en *B. distachyon* ($2n=10$) y el número mas alto para *B. retusum* ($2n=38$). Las accesiones de *B. rupestre* y *B. sylvaticum* presentaron 18 cromosomas, excepto una subpoblación de *B. sylvaticum* denominada *glaucovierens* ($2n=16$). Se encontró además, que algunas especies pueden presentar más de un ecotipo con diferente número de cromosomas, por ejemplo, la especie *B. pinnatum* presentó dos accesiones con 18 cromosomas y cuatro con 28. A continuación en la Tabla 1.1 se presentan algunas especies del género *Brachypodium* con su respectivo número de cromosomas y para algunas de ellas el tamaño de su genoma (Wonly and Hasterok, 2009).

Tabla 1.1. Número de cromosomas y estimación del tamaño del genoma de algunas especies del género *Brachypodium*.

Especies	Cromosomas	Tamaño del genoma
	2n	Mpb
<i>B. sylvaticum</i>	18	221
<i>B. pinnatum</i>	18	
	28	468
<i>B. phoenicoides</i>	28	
<i>B. arbuscula</i>	18	
<i>B. distachyon</i>	10	272
<i>B. stacei</i>	20	
<i>B. hybridum</i>	30	530
<i>B. arbuscula</i>	18	
<i>B. glaucovirens</i>	16	
<i>B. mexicanum</i>	40	
<i>B. retusum</i>	38	
<i>B. rupestre</i>	18	

Draper et al. (2001), mediante citometría de flujo, determinaron el tamaño de genoma de diferentes accesiones de *B. distachyon* y lo compararon con el de otras especies del mismo género observándose que el tamaño del genoma para la especie diploide *B. distachyon* es menor de 175 Mpb y que los cariotipos analizados eran morfológicamente iguales. Este estudio permitió establecer un cariotipo consenso para esta especie. Se describieron cinco cromosomas, que fueron ordenados de mayor a menor según la longitud de las cromátidas (Figura 1.3). Siendo el cromosoma 1 submetacéntrico y a su vez el de mayor longitud, el cromosoma 2 menor en tamaño en proporción al 1 y a su vez el más acrocéntrico, el cromosoma 3 es ligeramente mas pequeño que el 2 y el único metacéntrico del complemento, el cromosoma 4 comparte características similares al 3, aunque las pruebas de FISH revelaron que el cromosoma 4 solo tiene un locus 5S de rDNA. Por último, el cromosoma 5 es acrocéntrico y es el más pequeño de todo el complemento y es el único que contiene un locus 45S rDNA.

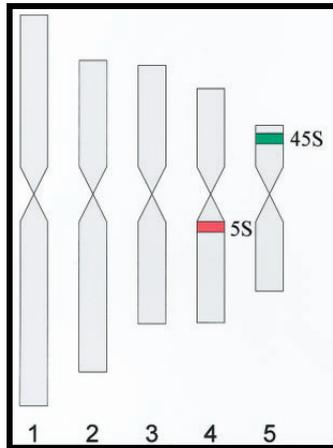


Figura 1.3. Representación de los cinco cromosomas de *B. distachyon*.
[tomado de Draper et al., 2001]

Por otra parte, desde los primeros trabajos llevados a cabo por Robertson (1981), se suponía que *Brachypodium distachyon* era una sola especie con tres niveles ploídicos ($2n=10$, $2n=20$ y $2n=30$). Según Draper et al. (2001), estas variaciones se podrían atribuir a diferentes eventos de hibridación, pudiéndose dar una duplicación posterior de los cromosomas. De esta manera, se habían establecido para *B. distachyon* los tres citotipos como consecuencia de una serie de eventos de autoploidia, derivados de un ancestro diploide inicial con número básico de cromosomas $x=5$ y $2n=10$, que subsecuentemente generaron individuos tetraploides y hexaploides, con $2n=20$ y $2n=30$. Inicialmente se consideraba a los individuos con $2n=20$, como más cercanos a los de $2n=10$, mientras que el citotipo $2n=30$ se consideraba alotetraploide tras sufrir entrecruzamientos entre individuos $2n=10$ y $2n=20$ (Opanowicz et al., 2008).

Sin embargo, diferentes autores mostraban su desacuerdo con mantener el nombre de *B. distachyon* para los tres citotipos que se incluían en esta especie. En un estudio multidisciplinar posterior llevado a cabo por Catalán et al. (2012), se hizo un análisis citogenético comparativo para estos tres citotipos con el fin de determinar la divergencia evolutiva entre ellos. Para ello, se emplearon diferentes técnicas como hibridación *in situ* fluorescente (FISH), con ADN genómico total (GISH) y FISH con genes multicopias de ADN ribosomal.

Tras el análisis de los resultados se pudo deducir que los citotipos $2n=20$ y $2n=10$ representan distintas especies y que a su vez estas tras su hibridación y posterior duplicación cromosómica, dieron lugar a la formación del derivado alotetraploide con $2n=30$. Por otra parte, se establece una naturaleza citogenética distinta para los taxa $2n=10$ y $2n=20$, con un número básico de cromosomas diferentes para cada uno de ellos ($x=5$ y $x=10$). De esta manera se propone que lo que se venía conociendo como *Brachypodium distachyon* realmente se compone de tres especies, proponiéndose una nueva nomenclatura para los taxa $2n=20$ y $2n=30$, pasando a denominarse *B. stacei* para $2n=20$ y *B. hybridum* para $2n=30$ mientras que *B. distachyon* se mantiene exclusivo para $2n=10$ (Catalán et al., 2012 y López-Álvarez et al., 2012).

1.6 *Brachypodium distachyon* COMO ESPECIE MODELO PARA LA INVESTIGACIÓN EN GRAMÍNEAS

En el año 2001, se propuso a *Brachypodium distachyon* como un sistema modelo útil para la investigación de las gramíneas (Draper et al., 2001). Desde entonces y durante la última década, diversos estudios genéticos y moleculares, han permitido a *Brachypodium* convertirse en un tiempo record en un "puente" que acelera y acerca cada vez más la investigación y el conocimiento de los cereales cultivados más extensamente como el trigo, la cebada, la avena y el centeno (Vain, 2011).

Brachypodium posee diversas características, necesarias para que pueda considerarse como un sistema modelo manejable (Draper et al., 2001). Dentro de estas se incluyen:

- ☞ Porte bajo (20 cm aprox.)
- ☞ Un genoma compacto (272 Mb)
- ☞ Poca demanda en el control de crecimiento
- ☞ Ciclo de vida corto (2 - 3 meses)
- ☞ Reproducción autógama
- ☞ Posee facilidad de transformación
- ☞ Presenta un óptimo desarrollo en condiciones de laboratorio e invernadero

En adición a las características descritas previamente por el grupo de Draper, diversos autores han subrayado aún más la importancia de *B. distachyon* como sistema modelo, al disponerse de métodos de transformación altamente eficientes mediados por *Agrabacterium* (Pacurar et al., 2008; Vain et al., 2008; Vogel y Hill, 2008), disponer de bibliotecas y secuencias genómicas EST específicas (Vogel et al., 2006), librerías y secuencias BAC (Huo et al., 2006; 2008), protocolos de mutagénesis, mapas físicos y un mapa genético de alta densidad (Unver and Budak, 2009) entre otros.

Uno de los proyectos claves para avanzar en el desarrollo de la investigación en *Brachypodium*, fue la creación del “*International Brachypodium Initiative*” (IBI), en el que se han involucrado más de 40 instituciones de investigación alrededor del mundo, y cuyos trabajos han permitido conocer la secuencia completa del genoma de *Brachypodium distachyon* (IBI 2010). Actualmente más de 400 laboratorios a nivel mundial trabajan con diversas accesiones de *B. distachyon* y según datos registrados, tan solo entre 2009 y 2010, se publicaron más de 100 artículos utilizando esta planta modelo (Vain, 2011).

A nivel filogenético *Brachypodium* se encuentra en un grado intermedio entre *Triticeae* (incluyendo trigo y cebada) y *Ehrhartoideae* (incluyendo arroz) (Figura 1.1), lo que le permite a su vez ser también un sistema útil para estudios evolutivos y de genómica comparada, al estar la mayoría de los genes de las gramíneas muy conservados y en muchos casos ser colineales (Devos, 2010; IBI, 2010).

Otras especies vegetales como *Arabidopsis thaliana* e incluso *Oriza sativa* han sido ampliamente utilizadas como sistema modelo. Sin embargo, en relación a la biología de las gramíneas, se encuentran más alejadas filogenéticamente que *Brachypodium*. *Arabidopsis* es desde luego uno de los sistemas modelo más importante para la investigación, pero tiene la desventaja de ser una dicotiledónea, lo cual es un inconveniente a la hora de encontrar genes ortólogos con los cereales. Por otro lado, *Oriza sativa* a pesar de ser una

gramínea de gran importancia, presenta como desventaja el tener un genoma grande, sus periodos de desarrollo y generación son muy extensos, y requiere además unas condiciones de crecimiento muy específicas (Ozdemir et al., 2008). En la Tabla 1.2 se destacan algunas relaciones de *Brachypodium* con otros modelos biológicos, estimando variables como altura, densidad de plantas por metro cuadrado, tamaño del genoma, tiempo de generación tipo de reproducción y tipo de células.

Tabla 1.2. Comparación entre diferentes sistemas modelo y plantas cultivadas.

	<i>Brachypodium</i>	<i>Arabidopsis</i>	Arroz	Trigo	Pasto varilla <i>Switchgrass</i>
Tamaño(cm)	15-20	15-20	100	50	200
Densidad (plantas/m ²)	1000	2000	36	50	6
Requerimiento para desarrollo	simple	simple	alta demanda	simple	simple
Tamaño del genoma (Mbp)	272	165	430	16,000	2,400
Ciclo de vida (semanas)	8-12	8-12	30	12	26
Reproducción	autogama	autogama	autogama	autogama	alogama
Tipo de pared celular	Tipo 2	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 2	Tipo 2

1.7 GENOMA Y SECUENCIACIÓN DE *Brachypodium distachyon*

Tras la publicación del genoma de *Brachypodium distachyon* (IBI 2010) esta especie se convirtió en el primer miembro de la subfamilia *Pooideae* de la que se conoce su secuencia completa. Para su secuenciación, se utilizó el ecotipo diploide Bd21 (Garvin et al., 2008) con un tamaño genómico de 272 Mpb.

El análisis de la secuencia ha permitido conocer que se trata de un genoma muy compacto, estando el 21,4 % del mismo, constituido por

retrotransposones, localizados por lo general en los centrómeros donde la densidad de genes es muy baja. Se comprobó también, que los transposones abarcan un 4.77% del total del genoma y están ampliamente distribuidos, principalmente asociados a regiones ricas en genes.

Se han identificado un total de 25,532 genes codificantes de proteínas, lo que representa un rango similar al arroz y al sorgo. En las siguientes web se puede encontrar más información acerca de los mismos

<http://www.brachybase.org>

<http://www.phytozme.net>

<http://www.modelcrop.org>

<http://mips.org>.

1.8 DOMESTICACIÓN DE PLANTAS

Cuando se habla del origen de la agricultura, es necesario diferenciar entre el proceso de cultivar y de domesticar. El primero conlleva la siembra y cosecha tanto de formas silvestres como de cultivadas. En cambio, la domesticación es el proceso de selección genética que, mediante la alteración de características específicas, transforma especies silvestres en variedades de cultivo domesticadas útiles para el hombre (Peng et al., 2011).

Este proceso ha sido llevado a cabo por el hombre durante los últimos 10.000 años (Zohary et al., 2012) y ha permitido seleccionar determinados mutantes que resultan ser útiles para el hombre (Harlan, 1992). El descubrimiento de la agricultura causó muchos cambios en la cultura humana, un fenómeno reconocido como Revolución Neolítica (Salamini et al., 2002). El sedentarismo humano, la urbanización, la cultura y la expansión demográfica han dependido en gran medida de la domesticación y la agricultura. La domesticación de las plantas y el surgimiento de los primeros cultivos los hizo humano-dependientes, capaces de sobrevivir sólo bajo el cuidado humano, facilitando así la estratificación social y el desarrollo tecnológico (Gustafson et al., 2009).

Sánchez-Monje (1974), definió la domesticación vegetal, como la transformación de una especie silvestre en una cultivada por acción del hombre, además de atribuir a este proceso como el eje principal que dio origen a todas las variedades de especies vegetales que se conocen hoy en día.

1.8.1 Primeros registros sobre la domesticación de las gramíneas

Según Salamini et al. (2002), los primeros humanos pioneros en la agricultura vivían en el Creciente Fértil, en una región que se extiende en la actualidad por los estados de Israel, Jordania, Líbano, pasando por el Sureste de Turquía a lo largo de los ríos Tigris y Éufrates, recorriendo también Iraq y los flancos Este de Irán (Figura 1.6).



Figura 1.4. Mapa del Cercano Oriente. El Creciente Fértil (señalado en verde) se establece como la zona geográfica en la que se inició la domesticación de los cereales. Se caracteriza por una topografía variable, con estaciones de inviernos fríos y lluviosos y veranos muy secos. [Tomado de Feuillet et al., 2008].

Los registros arqueológicos establecen que las primeras experiencias de cultivo realizado por el hombre, condujeron a la creación de una serie de

variedades de cereales domesticados, muchos de los cuales permanecen aún en uso alrededor del mundo (Salamini et al., 2002).

En el estudio de la domesticación de cultivos se utilizan datos genéticos, arqueológicos y fitogeográficos. Quizás el ejemplo más relevante en cuanto a la domesticación de las gramíneas es el trigo que es el cereal más cultivado a nivel mundial, seguido del arroz y maíz. Los cultivares modernos de trigo incluyen dos especies una de ellas hexaploide (trigo panadero) *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$ AABBDD) y la otra tetraploide (trigo duro o tipo *durum*) *Triticum durum* ($2n=4x=28$, (AABB) usado para elaboración de pasta y panes de poco crecimiento.

Entre las especies domesticadas en los inicios de la agricultura en Oriente Próximo se encuentran dos trigos, uno diploide ($2n=14$) denominado "Einkorn" y otra tetraploide denominada "Enmer" ($2n=4x=28$). Diversos registros establecen que el trigo hexaploide es una especie que nunca fue silvestre, se originó como consecuencia de la agricultura cuando los cultivos de trigo tetraploide se extendieron desde su zona original hasta la zona donde crecía el diploide silvestre *T. tauschii*. De la hibridación del trigo tetraploide cultivado y el diploide silvestre surgió una nueva especie, tras la duplicación de los cromosomas del híbrido, que presentó unas características agrícolas de interés para los primitivos agricultores.

1.8.2 *Einkorn* como ejemplo primitivo de domesticación

El trigo *Einkorn* es la primera variedad de trigo cultivado de la cual se tiene conocimiento, cuyo progenitor sería *Triticum boeoticum* de genoma diploide AA y cuyo área de distribución se encontraría en la parte Central y Oriental del Creciente Fértil. Se han hallado semillas *T. boeoticum* que datan del Epi-Paleolítico y el Neolítico temprano (12.500 años a.C) en el Creciente Fértil. También se han encontrado granos de mayor tamaño (≈ 10.500 años a.C) que sería indicativo de procesos de domesticación de esta especie (Heun et al., 1997).

Tras la domesticación de *Einkorn* en el Creciente Occidental (aprox. 9.500 años a.C), se extendería su cultivo a Grecia, los Balcanes (aprox. 8.000 años a.C) y más tarde a la antigua Yugoslavia, Bulgaria y Hungría (Salamini et al., 2002). De esta manera, *Einkorn* fue importante para la agricultura primitiva de Europa Central (aprox. 7.000 años a.C), pero su cultivo empezó a declinar en la edad de Bronce.

El origen geográfico de domesticación de *Einkorn* ha sido ampliamente debatido. En un estudio realizado por Heun et al. (1997), se identificó mediante un análisis realizado con 288 marcadores moleculares de tipo AFLP que la especie silvestre *T. boeoticum* procedía de poblaciones originales de las colinas del Karacadag al Sureste de Turquía, sin embargo, otros autores (Jones et al., 1998) han argumentado que la zona de domesticación fue la cuenca del Jordán.

La conclusión del grupo de Salamini (2002) es que las montañas de Karacadag fueron muy probablemente, el lugar de origen de los trigos diploides y tetraploides cultivados. Estos resultados se apoyan en que cerca de estas montañas se encuentran varias localizaciones arqueológicas como Cafer Hüyük, donde se han datado semillas silvestres y cultivadas desde el 7.600 al 6.200 a.C, Cayönü 7.500 a 6.700 a.C, o Nevali Cori, con formas cultivadas en 7.200 a.C.

1.8.3 Cambios asociados a la domesticación de plantas

El cambio más evidente como consecuencia de la domesticación, es la pérdida de diversidad (Gepts., 2004). Otros cambios que acompañan a la domesticación, debidos a la presión de la selección ejercida sobre el cultivo son, según Sánchez-Monge, (1974):

- ❖ Aumento del tamaño de las semillas, especialmente en especies cuyo aprovechamiento son las mismas.

- ❖ Aumento de la uniformidad de maduración de todas las ramificaciones o hijuelos de la planta.
- ❖ Aumento de la fertilidad floral.
- ❖ Aumento en el tamaño y número de inflorescencia.
- ❖ Disminución del contenido proteico de las semillas y aumento de su contenido en hidratos de carbono.
- ❖ Aumento de la rapidez de germinación por eliminación de inhibidores y por reducción o desaparición de las envolturas de la semilla.

Otros autores como Vallejo y Estada (2002), incluyen una descripción mucho más amplia en relación a las diferentes características que pueden ser adoptadas por las plantas, tras sufrir procesos de domesticación. Entre ellas se encuentran:

- ❖ **Competencia:** Las plantas cultivadas pierden la capacidad de competir con la vegetación natural, y no pueden vivir cuando el hombre deja de cultivar la tierra. Sin embargo, algunas plantas cultivadas persisten por varios años pero al final desaparecen.
- ❖ **Gigantismo:** Se manifiesta en el órgano de la planta que el hombre ha seleccionado y no necesariamente en toda la planta. Por ejemplo, el hombre selecciona frutas, semillas, tubérculos o rizomas grandes. Estos órganos son muchos más grandes que sus equivalentes en las plantas silvestres.
- ❖ **Rango amplio de variabilidad morfológica:** Muchos de los cultivos actuales tales como arroz, patata, trigo, maíz y otros, presentan un rango muy amplio de variabilidad morfológica. Como el gigantismo, en este caso, la parte de la planta que más interesa al hombre es la que presenta mayor variabilidad.
- ❖ **Rango amplio de adaptación fisiológica:** Las especies silvestres al ser trasladadas desde su hábitat original, se adaptan a un medio de cultivo con un ambiente diferente. De este modo, presiones naturales de selección de suelo, clima y presiones artificiales del régimen de cultivo, causan cambios adaptativos de las especies silvestres para transformarse

en especies domesticadas. En varios casos las especies silvestres forman híbridos con las plantas cultivadas, lo que conlleva a un intercambio genético entre especies.

- ❖ **Pérdida de los mecanismos naturales de dispersión de semillas:** Por ejemplo, el remplazo de raquis frágil en los pastos silvestres por un raquis fuerte en los cereales domesticados, ha permitido que el hombre pueda cosechar una porción mayor de la semilla. De igual manera, en cereales se presenta reducción en el número y extensión de las aristas. Muchos de los trigos actuales no presentan aristas, aunque en los tipos *durum*, se han retenido las aristas casi siempre.
- ❖ **Disminución o pérdida de factores de defensa:** Muchos de los mecanismos naturales de defensa contra herbívoros, bien sea mediante la acumulación de sustancias repelentes o tóxicas, o por características morfológicas (espinas, pelos, etc) son desfavorables para el hombre, de manera que en las formas cultivadas, han desaparecido.
- ❖ **Cambio de hábito:** En la mayoría de los casos, las gramíneas silvestres producen más meristemas que son útiles para las plantas, por ejemplo, en caso de que sufran predación. En especies domesticadas, por el contrario, se observa un descenso en el número de meristemas.
- ❖ **Germinación rápida y uniformidad de las semillas:** Las semillas de algunas especies pueden presentar latencia por un tiempo, por el contrario, en gramíneas cultivadas carecen de este periodo de latencia.
- ❖ **Autofecundación:** Asegura que las plantas sean genéticamente uniforme mientras que en las especies silvestres la variabilidad ayuda a la especie a sobrevivir cuando las condiciones ambientales son variables.
- ❖ **Poliploidía en plantas cultivadas:** La poliploidía junto con el control de apareamiento homeólogo, son quizás el ejemplo más destacado de poliploidización en gramíneas.

1.8.4 Implicación genética en la domesticación de Gramíneas

Estudios genéticos y genómicos recientes han permitido identificar genes específicos implicados en los efectos de domesticación de gramíneas. El método utilizado para identificar genes implicados en este proceso es mediante el análisis de co-segregación entre marcadores moleculares y fenotipos, comparando especies silvestres y domesticadas (Glémin and Bataillon, 2009). Esto ha permitido la descripción de diversos “loci de caracteres cuantitativos” – QTLs (*Quantitative trait loci*) (Paterson, 2002). Los estudios más precisos se han realizado en especies donde se conoce la secuencia completa de su genoma. Es el caso del arroz, que ha sido la primera gramínea en la que se ha secuenciado su genoma, y en la que se han identificado varios loci relacionados con la domesticación (Goff et al., 2002).

En el caso de *Brachypodium* se han realizado diversos estudios relacionados con procesos de domesticación como son el desarrollo de los meristemas y la morfología del grano. Así, Opanowick et al. (2008) estudiando diferentes accesiones de *B. distachyon*, observaron variabilidad en el número de espiguillas en las inflorescencias según su procedencia geográfica. De igual manera, en la morfología del grano, se observó para algunas poblaciones, la retención de las semillas antes de la maduración dentro de la espiga y mediante microscopía electrónica de barrido, se comprobó que la abscisión del grano es diferente entre accesiones según su origen geográfico.

Resultados similares se han observado en el arroz, que además cuenta con un amplio número de genes clonados que participan en el control de la arquitectura de la inflorescencia y que también han podido ser identificados en maíz, aprovechando la sinténia entre ambas especies. De esta manera, se ha sugerido que, comparando genes candidatos entre *Brachypodium* y otras gramíneas se podría explicar algunas de las diferencias en la arquitectura de sus inflorescencias (Opanowicz et al., 2008).

Una de las características más importantes durante el proceso de domesticación en las gramíneas, es la retención del grano maduro en la inflorescencia, de tal forma que este pueda ser recogido fácilmente en la post-cosecha mediante el trillado. La manera en la cual el grano se rompe o se desarticula de la espiga varía entre especies de gramíneas. Sin embargo, el momento y la extensión en la desarticulación es crucial en los procesos de domesticación de una especie. Cuando la desarticulación ocurre muy pronto, la cosecha se hace ineficiente, si por el contrario, la desarticulación es muy complicada, los granos no se liberan fácilmente lo que conlleva a una reducción en el valor energético del cultivo. Se cree que el desarrollo de un raquis fuerte fue uno de los cambios cruciales que tuvo lugar durante la domesticación del trigo (Lev-Yadun et al., 2006), y según se ha descrito en el genoma del arroz, los genes *sh4* juegan un papel importante en el establecimiento de la abscisión en un estadio temprano del desarrollo de la flor (Li et al., 2006).

1.8.5 *Brachypodium* frente a la domesticación y su utilización como cubiertas vegetales vivas

Son pocos los estudios que se ha realizado en relación con la selección y domesticación del género *Brachypodium*. Algunos autores como Opanowickz et al. (2008), han indicado que *Brachypodium* es una especie sin domesticar, de manera que se convierte en una herramienta útil para comprender cómo la selección humana puede influir en la domesticación de esta especie.

En este sentido, Soler et al. (2002; 2004) han propuesto el uso de *Brachypodium* como cubiertas vegetales vivas con el propósito de actuar contra la erosión del suelo en zonas de plantación de olivo del Sur de España, empleando variedades de esta especie obtenidas por selección a partir de materiales silvestres. Diversos estudios han demostrado que las cubiertas vegetales vivas, además de reducir drásticamente la pérdida de suelo, facilitan un mejor aprovechamiento del agua de lluvia, asimismo conservan y enriquecen la fauna y mesofauna propias de la zona, entre otras características (Soler et al., 2004).

En el caso de *Brachypodium*, se observó que presentaba un buen control de malas hierbas, sin necesidad de agregar al cultivo herbicidas selectivos. En cuanto a su cobertura se determinó que era de talla baja o mediana y que producía excelentes residuos protectores del suelo durante la temporada de verano (Soler et al., 2004). Posteriores avances en esta misma línea de investigación, permitieron la obtención por domesticación a partir de variedades silvestres de dos variedades comerciales de *Brachypodium*. En este importante avance, participaron el INIA, y el IFAPA y la empresa comercializadora de semillas Agrosa. Estas variedades (Figura 1.8) fueron reconocidas y aprobadas por la Ofician de Variedades Europea y sus semillas son comercializadas por la empresa Agrosa Semillas S.A. con la denominación "Ibros" y "Zulema" respectivamente.



Figura 1.5. Cubiertas vegetales de *Brachypodium* en suelos de olivar en el sur de España. Las variedades 'Ibros' y 'Zulema' son variedades comercializadas obtenidas por domesticación.

1.9 CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MARCADORES MORFOLÓGICOS

Los marcadores morfológicos son caracteres fácilmente detectables, aunque normalmente hay que esperar al desarrollo completo de la planta para su manifestación. Pocos de ellos son neutros en relación con dicho desarrollo y en general con cualquier tipo de actividad vital. Casi nunca muestran codominancia y con cierta frecuencia son controlados por genes pleiotrópicos, esto es, que afectan a más de una función al mismo tiempo. Algunos tienen un claro efecto sobre la planta (clorosis, enanismo, etc), otros reflejan por ejemplo la composición química de las plantas, y en gramíneas podría citarse el color y la forma del grano (Cubero, 2002).

La evaluación de caracteres morfológicos, implica la descripción para atributos de importancia agronómica, de la variación existente en una colección. Los descriptores empleados permiten evaluar caracteres considerados importantes y/o útiles en la descripción de una muestra. De esta manera, se establece que un descriptor es una característica que se puede identificar y medir, usada para simplificar la clasificación, almacenamiento, recuperación y uso de datos (Painting et al., 1993). Un descriptor puede adoptar valores numéricos, estar comprendido en una escala, corresponderse con un código o puede estar definido por un adjetivo calificativo.

Existen distintas categorías de datos, según la expresión del descriptor que puede ser de forma cualitativa o cuantitativa. Si se expresa en forma cualitativa se puede expresar en datos binarios (también llamados de doble estado), datos con secuencia (ordinales) y datos sin secuencia (nominales). Si se expresa en forma cuantitativa los datos generados pueden ser discontinuos (llamados también discretos) y continuos (Franco and Hidalgo, 2002).

La caracterización agro-morfológica es una herramienta fundamental para proveer información útil en programas de mejoramiento de plantas. Diferentes autores han reportado el uso de caracteres morfo-agronómicos en la caracterización y estudio de germoplasma de especies gramíneas. Por ejemplo, en *Brachypodium*, Vogel y Bragg (2009), han caracterizado una colección de germoplasma de aproximadamente 30 accesiones y han descrito diversos

caracteres agromofológicos dentro de los que se incluyen: requerimientos de vernalización, iniciación del periodo de floración, tamaño de las plantas, pubescencia en las semillas, y arquitectura de la inflorescencia.

1.10 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN o proteínas, valiosas para la detección y uso de la diversidad genética, lo que permite su utilización en programas de selección y mejora genética vegetal.

Para que un marcador molecular sea útil, debe mostrar una variación detectable entre los individuos y un modo de herencia claro. Un marcador ideal debe tener las siguientes características:

- ✎ **Altamente polimórfico:** con varios alelos, que faciliten la realización de estudios genéticos.
- ✎ **Heredable y preferiblemente con herencia codominante:** es decir, que cuando un individuo presente dos alternativas alélicas de un locus, ambas se manifiesten. De esta manera, se pueden diferenciar homocigotos y heterocigotos.
- ✎ **De fácil y rápida identificación:** siendo conveniente que se puedan analizar también en los estadios tempranos de la planta.

La caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN resulta muy útil, porque es relativamente rápida, fácil de interpretar y puede ser usada en cualquier laboratorio con herramientas estándar de Biología Molecular (Vogel et al 2006; 2009). Dentro de estos se destacan dos tipos de marcadores, aquellos basados en técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR y aquellos basados en hibridación de ácidos nucleicos como los RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción). Dentro de los marcadores basados en PCR se encuentran técnicas muy diversas como son: AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados), RAPD (Amplificación Aleatoria de ADN), SSR (Microsatélites) e ISSR (Intermicrosatélites).

1.10.1 Intermicrosatélites (ISSR)

Los ISSR se obtienen mediante la amplificación por PCR de ADN genómico utilizando un único cebador complementario de una secuencia microsatélite, anclado mediante 1-3 bases en los extremos 3' o 5'. La utilización de este tipo de marcador molecular es técnicamente más sencilla en comparación con otros sistemas de marcadores moleculares y permite además, obtener resultados ampliamente reproducibles, generando abundantes polimorfismos en diversos sistemas (Liu and Wendel, 2001). La detección de los fragmentos obtenidos se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa o bien en geles de poliacrilamida (PAGE), que posteriormente son teñidos para la identificación de los fragmentos amplificados.

En la Figura 1.9 se ilustra este método que involucra la amplificación de segmentos de ADN presentes entre dos regiones idénticas de microsatélite, orientadas en dirección opuesta. Las regiones microsatélites utilizadas generalmente tienen longitudes de 16-25 pb. La utilización de un único cebador en una reacción PCR permite el estudio de varios loci del genoma siempre y cuando tengan diferentes tamaños. Los cebadores utilizados pueden no estar anclados, aunque como se mencionó anteriormente, es más común que se encuentren anclados en los extremos 3' o 5' con 1-4 bases que se extienden a lo largo de las secuencias flanqueantes con el fin de reducir el número de fragmentos amplificados (Reddy et al., 2002).

Los microsatélites son codominantes, abundantes, multialélicos y se encuentran uniformemente distribuidos a lo largo del genoma, siendo fácil su detección y análisis (Powel et al., 1996). Estas importantes características han permitido que los microsatélites sean marcadores ampliamente utilizados para la mejora asistida por marcadores (MAS), análisis de huella de ADN, obtención de mapas genéticos y en la clonación de genes específicos, aunque los mecanismos de evolución de los microsatélites y el origen de su amplia distribución a lo largo del genoma, siguen sin haber sido esclarecidos por completo (Sonah et al., 2011).

En *Brachypodium* se han identificado una gran cantidad de regiones microsatélite. Así, Sonah et al. (2011), identificaron un total de 51.875 marcadores SSR en el genoma de *Brachypodium* con un máximo de 30.573 dominios mono-nucleótidos, seguido de 10.625 di-nucleótidos y 9.407 repeticiones de trinucleótidos. Las repeticiones de penta y hexa nucleótidos fueron de 1.270, lo que representa un 2,5% del total de marcadores SSR identificados en *Brachypodium*. Además, identificaron 22.879 marcadores SSR validados por PCR electrónica (e-PCR) y mapeados en los diferentes cromosomas de *Brachypodium*, con una frecuencia de 101 marcadores SSR por Mb. Estos datos se encuentran disponibles en la base de datos denominada 'BraMi' *.

Diversos estudios han descrito el uso de marcadores de tipo microsatélite en *Brachypodium*. Así, en un estudio reciente desarrollado por Garvin et al. (2010), se obtuvo un mapa de ligamiento genético en el que se utilizaron 139 loci de tipo SSR, usando poblaciones F₂ derivadas del cruzamientos entre las líneas diploides Bd3-1 y Bd21.

En un estudio previo llevado a cabo por Vogel et al. (2009) se describió la utilización de 187 líneas diploides procedentes de 56 regiones diferentes de Turquía, que fueron analizadas con 43 marcadores tipo SSR, para determinar la variación genotípica entre estas poblaciones. Los resultados, permitieron demostrar que existe una variación genética y fenotípica dentro de las líneas

* http://125.18.242.19/plantgenonedb/brachypodium_markersearch.jsp

estudiadas, concluyendo además que la distribución geográfica de los genotipos SSR sugieren que una amplia dispersión de las semillas determina un factor relevante en la estructura de diversas poblaciones de *Brachypodium*. Otros autores como Azhaguvel et al. (2009) han descrito de igual manera el uso de marcadores SSR para evaluar la diversidad genética entre accesiones de *Brachypodium*.



2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es identificar cambios agromorfológicos y moleculares, en una colección de poblaciones de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum* que, tras la recolección en campo de ejemplares silvestres, se han sometido a un proceso de selección a lo largo de varias generaciones, con el propósito de obtener poblaciones homogéneas en cuanto a precocidad, porte y producción para su posterior uso como cubiertas vegetales vivas en suelos de secano.

Este propósito general se concreta con los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis de la diversidad genética de las poblaciones silvestres de *Brachypodium spp.* recolectadas, tanto a nivel intra como interpoblacional, mediante el estudio de marcadores agromorfológicos y moleculares de tipo intermicrosatélite (ISSR) y microsatélite (SSR).
2. Obtención de líneas en proceso de domesticación, derivadas de las poblaciones silvestres de *Brachypodium*, tras el cultivo y selección en campo durante periodos consecutivos de siembra, comprendidos entre 7 y 9 años.
3. Análisis comparativo de los cambios fenotípicos entre las poblaciones silvestres y sus respectivas líneas descendientes, mediante el uso de descriptores agromorfológicos.
4. Análisis comparativo de marcadores moleculares de tipo ISSR y de tipo SSR entre las poblaciones silvestres y las líneas derivadas de ellas.
5. Estudio de las líneas en proceso de domesticación para su uso como cubiertas vegetales en la protección de suelos degradados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. 1 MATERIAL VEGETAL

Para este estudio se seleccionaron un total de 26 poblaciones de *Brachypodium* que incluyen tres especies: *B. distachyon* (2n=10), *B. stacei* (2n=20) y *B. hybridum* (2n=30), procedentes de la colección de germoplasma del Departamento de Medio Ambiente del Instituto Nacional de Alimentación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), conservado en la Finca La Canaleja – Alcalá de Henares (Madrid). El material vegetal de este proyecto, procede de diversas expediciones de estudio y recolección de gramíneas silvestres en la Península Ibérica, realizadas por el grupo de la Dra. Consuelo Soler. Los límites geográficos establecidos para el muestreo del género *Brachypodium*, estuvieron apoyados en revisiones bibliográficas e información aportada por herbarios y diversos Jardines Botánicos.

Las 26 poblaciones seleccionadas para este estudio comprenden 13 poblaciones silvestres, recolectadas en diferentes zonas de la Península Ibérica. Posteriormente estas poblaciones fueron trasladadas a la Finca La Canaleja, donde se sometieron a la presión del cultivo y domesticación durante diferentes periodos.

Las 13 poblaciones restantes, derivan de las poblaciones silvestres mencionadas anteriormente, tras el periodo de domesticación consistente en varios algunos años de siembra y selección de cultivo. El tiempo correspondiente a la presión del cultivo es diferente para algunas poblaciones según la fecha en que se llevaron a cabo las expediciones. Por otra parte cabe destacar que, durante el periodo de domesticación se seleccionaron las plantas en base a características de interés agronómico, como homogeneidad de las muestras cultivadas, con vistas a su utilización como cubiertas vegetales vivas que sean eficaces en la protección de suelos susceptibles a la erosión en cultivos de olivar.

Dentro de las 13 poblaciones domesticadas, destacan dos poblaciones que actualmente se comercializan y que fueron obtenidas por domesticación. Estas líneas denominadas "Ibros" (*B. hybridum*) y "Zulema" (*B. distachyon*), son

el producto de una selección masal conducente a una homogeneidad en el porte, precocidad, producción y buenos resultados en su utilización como cubiertas vegetales vivas, según se pudo comprobar en diversos ensayos llevados a cabo en diferentes localidades Españolas. Estas líneas fueron registradas y aprobadas por la Oficina de Variedades Europeas y actualmente están comercializadas por la empresa de semillas del grupo Agrosa S.A. Cabe destacar, que su obtención se consiguió gracias al trabajo conjunto de la Dra. Consuelo Soler y colaboradores, el INIA, el IFAPA y la empresa Agrosa.

3.2 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL SILVESTRE

Para la recolección del material vegetal en campo se siguió la metodología propuesta 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 no fuera inferior a 1 m.

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. 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 del muestreo 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** = $ETP_{Jun} + ETP_{Jul} + ETP_{Ago} / P_{Jun} + P_{Jul} + P_{Ago} > 2,5$
(ETP, evapotranspiración potencial mensual de Thornwaite)

Tabla 3.1. Datos geográficos tomados en la recolección del material vegetal silvestre.

Pob	Prov	LatN	Long	Alt	T	It	Pv	Im3
129F	Granada	37,3333	-3,7833	1084	12,843	222,000	24,343	18,002
137F	Jaén	37,6589	-3,7950	830	14,420	269,000	29,479	17,677
160F	Albacete	38,9500	-2,5331	1035	12,205	193,000	56,099	7,058
162F	Cuenca	39,8833	-2,8000	830	13,253	214,000	54,401	7,543
176F	Córdoba	37,9803	-4,7608	445	16,317	317,000	29,336	16,226
260F	Málaga	36,9739	-4,6756	528	15,468	324,000	18,256	27,815
326F	Badajoz	39,1061	-4,9642	520	16,008	302,000	41,469	10,763
333F	Huelva	37,9206	-6,7311	623	15,444	304,000	36,746	11,587
357F	Ciudad Real	38,4603	-3,9269	450	17,006	326,000	31,669	16,997
365F	Jaén	37,6814	-3,6058	725	15,456	301,000	30,930	15,558
395F	Jaén	38,2961	-2,5922	1300	11,596	176,000	56,861	7,299
480F	Madrid	40,8100	-3,5983	780	12,592	213,000	81,293	4,276
481F	Madrid	40,5080	-3,2622	730	13,185	213,000	52,484	7,804

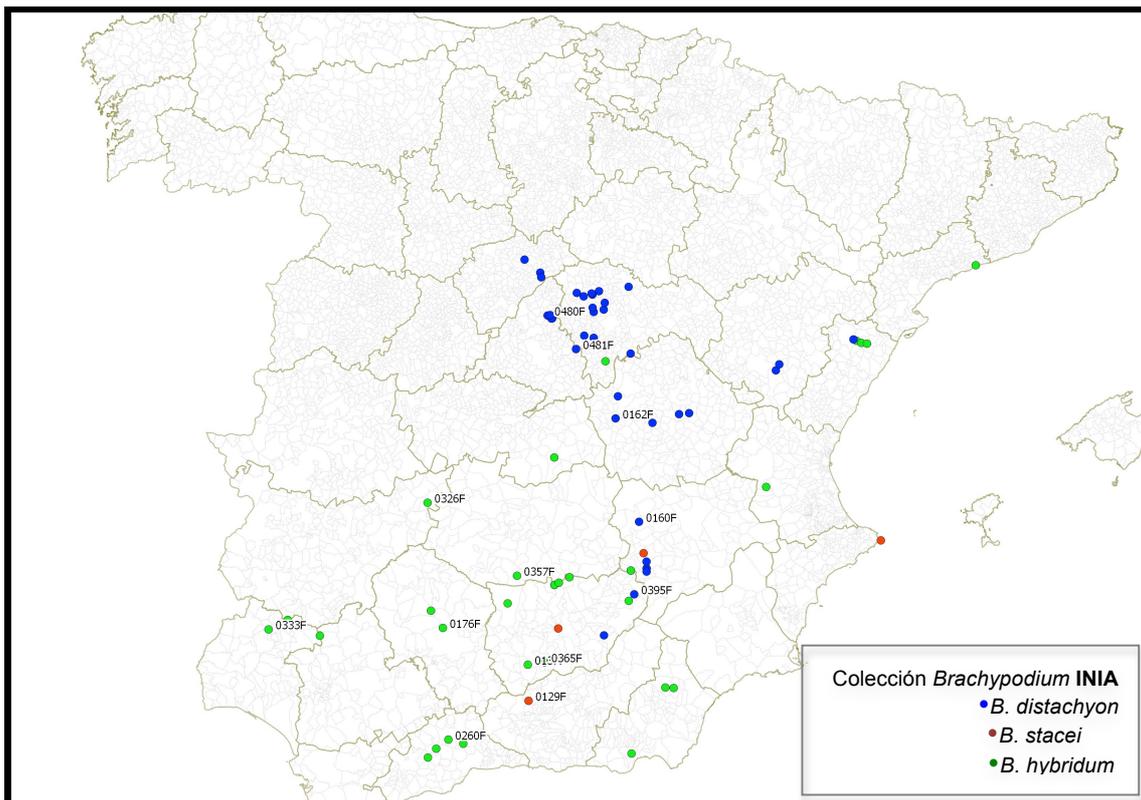


Figura 3.1. Zonas de prospección en España de *Brachypodium*. Colección Banco de Germoplasma Depto. de Medio Ambiente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria INIA.

3.3 PROCESO DE DOMESTICACIÓN DE LAS PLANTAS

Las plantas silvestres fueron recolectadas en los años que se citan en la tabla 3.2. Tras la recolección del material silvestre en campo, las plantas fueron trasladadas a la Finca La Canaleja, donde se llevó a cabo la descripción del material vegetal, aportación de datos de pasaporte, asignación de número de entrada y descripción de datos de gestión.

El proceso de domesticación se llevó a cabo en siembras controladas en parcelas experimentales de 35 cm de ancho (Figura 3.2), sembrando las semillas a una proporción de 65 - 100 semillas/m. Las fechas de siembra se realizaron en época de otoño - invierno entre los meses de octubre a diciembre, para obtener la producción de espigas en verano. Por otra parte, algunas poblaciones fueron sembradas en cámaras de germinación e invernadero, para poder tener un control más detallado sobre los factores

abióticos, y así poder determinar ciertas demandas de este tipo de plantas tal como la vernalización. Las siembras se repitieron anualmente para todas las poblaciones, desde el año de recolección (Tabla 3.2) hasta verano de 2012. Las semillas recolectadas durante cada cosecha se fueron almacenando en botes de cristal con tapa de aluminio y conservadas a 4°C, debidamente rotulado con el año correspondiente a su recolección y se asignó una nueva numeración a cada generación obtenida. Posteriormente de cada cosecha se seleccionaron nuevamente semillas al azar para repetir la siembra anualmente y así sucesivamente.

Tabla 3.2. Año de recolección del material silvestre.

Población Silvestre	Año de recolección
129F	1998
137F	1998
160F	1998
162F	1998
176F	1998
260F	1999
326F	2000
333F	2000
357F	2000
365F	2000
395F	2000
480F	2004
481F	2004



Figura 3.2. Parcelas experimentales de *Brachypodium* en la Finca ‘La Canaleja’

Durante el desarrollo de la planta se tuvieron en cuenta diversos factores para describir el comportamiento de este material en condiciones de cultivo, los descriptores empleados se citan a continuación en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Descriptores morfo-agronómicos analizados.

Carácter	Nivel
Porte de la planta (durante el ahijamiento)	Erecta Erecta a Intermedia Intermedia Intermedia a postrada Postrada
Color de la hoja (comienzo del ahijamiento)	Verde claro Verde medio Verde oscuro
Época de floración (50% de la parcela florecida)	Muy precoz Precoz Media Tardía Muy tardía
Porte de la planta (durante la floración)	Erecta Erecta a intermedia Intermedia Intermedia a Postrada Postrada
Altura de la planta (durante la maduración)	Muy baja (<30cm) Baja (30-40cm) Alta (>40cm)
Sección del tallo (durante la maduración)	Hueco Semilleno Lleno
Tipo de inflorescencia (durante la maduración)	Espiguilla poco divergente con el eje de la inflorescencia. Muy divergente con el eje de la inflorescencia.
Longitud de la inflorescencia (durante la maduración)	Corta (<5cm) Media (3-5cm) Larga (>5cm)
Número máximo de espiguillas por inflorescencia (durante la maduración)	Pequeño (2-3 espigas) Medio (4 espigas) Grande (5 espigas) Muy grande(>6 espigas)
Longitud de la espiguilla terminal (durante la maduración)	Corta (<3cm) Media (3-4cm) Larga (>4cm)
Longitud de aristas en la parte central de la espiguilla (durante la maduración)	Normal (<10mm) Media (10-11mm) Larga (>11mm)
Longitud de la gluma (durante la maduración)	Corta (<8mm) Media (8-9mm) Larga (>9mm)
Longitud de la lemma/arista (durante la maduración)	Menor Igual mayor
Peso de 1000 semillas	Alto (<4gr) Medio (4-6gr) Bajo (>6gr)

3.3.1 Plantas silvestres y plantas domesticadas

Como se mencionó anteriormente, el material vegetal utilizado para el presente estudio se compone de 13 parejas de plantas silvestres y plantas domesticadas; la nomenclatura de cada especie y los años de siembra en cultivo se cita a continuación en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Poblaciones de *Brachypodium* analizadas.

Pob. Silvestre	Pob. Domesticada	Especie	Años de Domesticación	Zona de Origen
160F	S-515	<i>B. distachyon</i>	7	Albacete
162F	S-514(Zulema)	<i>B. distachyon</i>	9	Cuenca
395F	S-403	<i>B. distachyon</i>	9	Jaén
480F	S-406	<i>B. distachyon</i>	5	Madrid
481F	S-501	<i>B. distachyon</i>	6	Madrid
129F	S-513	<i>B. stacei</i>	7	Granada
137F	M-61	<i>B. hybridum</i>	8	Jaén
176F	S-506 (Ibros)	<i>B. hybridum</i>	9	Córdoba
260F	S-502	<i>B. hybridum</i>	7	Málaga
326F	S-401	<i>B. hybridum</i>	9	Badajoz
333F	S-405	<i>B. hybridum</i>	8	Huelva
357F	S-500	<i>B. hybridum</i>	8	Ciudad Real
365F	S-402	<i>B. hybridum</i>	8	Jaén

Las semillas correspondientes al material de análisis, fueron sembradas en noviembre de 2008, en invernadero en la Finca La Canaleja – INIA, Alcalá de Henares. Se utilizaron tiestos de plástico con una composición de sustrato de una cuarta parte de mantillo, 2 partes de vermiculita y 1 parte de tierra. En cada tiesto se sembró una semilla individual, a la que posteriormente se le asignó un número de individuo, para su seguimiento en los análisis moleculares. Las condiciones de crecimiento en invernadero fueron de una temperatura mínima de 4°C y máxima de 25°C, y fotoperiodo de 16 horas (Figura 3.3). Durante el tiempo de desarrollo de las plantas sembradas, comprendido entre diciembre y marzo se hizo un seguimiento hasta que alcanzaron un tamaño adecuado y un número de hojas suficientes para la extracción del ADN. En algunas

poblaciones fue necesario repetir la siembra dado que el porcentaje de germinación de algunas semillas fue inferior a lo esperado.

Las poblaciones silvestres 129F (*B. stacei*), 160F (*B. distachyon*) y 481F (*B. distachyon*) y su correspondiente pareja domesticada S-513, S-515 y S-501, fueron añadidos en una parte más avanzada del trabajo dado el interés de aumentar el número de poblaciones de *B. distachyon* e incluir un ejemplar de *B. stacei* con un número considerable de años en proceso de selección.

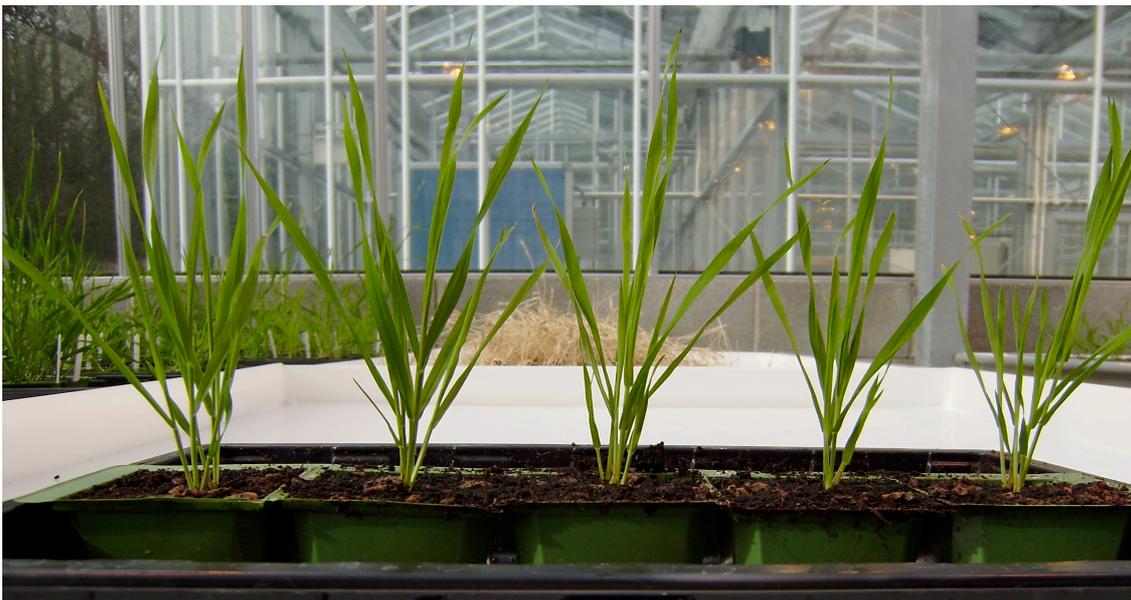


Figura 3.3. Desarrollo de las plantas de *Brachypodium* en invernadero

3.4 ANÁLISIS DE CARACTERES AGROMORFOLÓGICOS

Tanto para las plantas silvestres como para las plantas domesticadas, se llevó a cabo un estudio detallado de caracteres agromorfológicos, según los descriptores citados en la Tabla 3.3.

Para las plantas silvestres analizadas en este trabajo, se tomaron semillas obtenidas en las expediciones citadas en la Tabla 3.2. Las semillas se colocaron sobre papel filtro humedecido y posteriormente se trasladaron a una estufa a 25°C, donde permanecieron hasta su germinación, que ocurre a los 5 días aproximadamente. Trascurrido este periodo, fueron sembradas en tiestos con

sustrato compuesto de una cuarta parte de mantillo, dos partes de vermiculita y una parte de tierra. Los tiestos se llevaron a cámaras de germinación bajo las siguientes condiciones de crecimiento:

- Fotoperiodo Día /Noche: 16/8
- Temperatura Día / Noche: 23/21°C
- Temperatura de vernalización: 6°C
- Porcentaje de humedad Día/ Noche: 68/68 ± 10%
- Valor PAR ($\text{mmol s}^{-1} \text{m}^{-2}$): 140 ± 10
- Fuente lumínica: 55W (Osram) tubos de alta frecuencia (4,580 lumen) suplementado con 2x30W luz clara fría (Osram)

En las parcelas experimentales, también se llevaron a cabo estudios agromorfológicos para comparar la susceptibilidad de las plantas frente a factores abióticos no controlados y controlados.

3.5 EXTRACCIÓN DEL ADN

El material vegetal seleccionado para la extracción de ADN consistió en hojas jóvenes de los primeros estadios de las plantas que fueron congeladas con nitrógeno líquido y pulverizadas en morteros, para romper las paredes celulares. De cada una de las poblaciones se seleccionaron 19 individuos representativos, a partir de los cuales se llevó a cabo la extracción utilizando el kit "DNeasy® plant mini kit (250)" de la casa comercial Qiagen, siguiendo el protocolo y las recomendaciones del fabricante.

La cuantificación y detección de la cantidad de ADN se realizó mediante la utilización de un Nanodrop 2000c de *Thermo Scientific*, midiendo una muestra de 1 μL de ADN; una vez conocida la concentración de ADN obtenido en cada muestra, se llevó a una concentración final de 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Las muestras de ADN fueron conservadas a -20°C hasta su posterior uso.

3.6 AMPLIFICACIÓN DEL ADN

3.6.1 Amplificación de secuencias Inter-microsatélite (ISSR)

De cada una de las 23 poblaciones se seleccionaron 19 individuos, utilizándose 16 cebadores para amplificar, mediante PCR, regiones intermicrosatélites (ISSR) (Tabla 3.5). Los cebadores fueron elegidos por su reproducibilidad y variabilidad según estudios previos realizados por Hammami (2011). Se tomaron 10 ng de ADN genómico por muestra y se hizo una mezcla de la reacción PCR con los siguientes componentes: 1,5 μ L de tampón de reacción 10 x (100 mM Tris-HCL pH= 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ y 0.01% gelatina), 0,6 μ L dNTP (2,5 mM), 0,2 μ L de cebador (10 mM) y 0,3 μ L de Taq polimerasa (5 U/ μ L, de la casa comercial Sigma) para un volumen final de 15 μ L.

Se utilizaron dos programas de PCR, que se diferenciaron entre sí en la temperatura de anillamiento. Las reacciones se hicieron en un termociclador 2720 de *Apply Biosystems*, bajo las condiciones especificadas en la Tabla 3.6.

Tabla 3.5. Secuencias de los cebadores ISSR utilizados

Cebador ISSR	Secuencias (5' → 3')
ISSR 1	AGAGAGAGAGAGAGAGAG G
ISSR 6	TCTCTCTCTCTCTCTC G
ISSR 8	AGAGAGAGAGAGAGAG GYC
ISSR 9	GAGAGAGAGAGAGAG AA
ISSR 10	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
ISSR 17	GTGGTGGTG GC
ISSR 19	CACACACACACAC ARC
ISSR 20	ATGATGATGATGATGATG
ISSR 21	AGAAGAAGAGAGAGA GYT
ISSR 22	CCTCCTCCTCCTCCT G

❖ Y=C,T; R=A,G

Tabla 3.6. Programa de amplificación por PCR de los ISSR.

Cebador ISSR		Programación PCR	
		94°C → 5'	
ISSR 8	ISSR 15	94°C → 30''	
ISSR 9	ISSR 19	52°C → 45''	40 ciclos
ISSR 10	ISSR 21	72°C → 2'	
ISSR 11	ISSR 22	72°C → 7'	
ISSR 14		4°C → ∞	
		94°C → 5'	
		94°C → 30''	
ISSR 1	ISSR 16	52°C → 45''	40 ciclos
ISSR 12	ISSR 17	72°C → 2'	
ISSR 13	ISSR 20	72°C → 7'	
		4°C → ∞	

3.6.2 Separación por electroforesis de los fragmentos amplificados

La separación de los fragmentos amplificados se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% (p/v), se utilizaron cámaras de electroforesis horizontal modelo SGU-020 de 20x20cm, de C.B.S. *Scientific Co.* con peines para 20 muestras. Una vez finalizada las reacciones de PCR, se añadió a cada muestra 2 µL de tampón de carga (0.10% azul de Bromofenol, 0,25% xileno-cianol, 30% glicerol). Los geles de agarosa se hicieron con tampón TAE 1x (20 mM Tris acetato y 0,5mM EDTA pH= 8,0), posteriormente se colocó en cada pocillo 17 µL de ADN amplificado y se dejó migrar durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente, a un voltaje de 100 V/cm.

Una vez finalizada la electroforesis se procedió a la tinción de los geles con una solución de 12,5 µL de bromuro de etidio, diluidos en 250 mL de TAE 1x durante al menos 20 minutos. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador "1Kb plus DNA ladder" de la casa comercial Invitrogen.

Posteriormente se llevaron los geles a un transiluminador de luz ultravioleta *UVIdoc*, donde se capturó y documentó la imagen de cada gel.

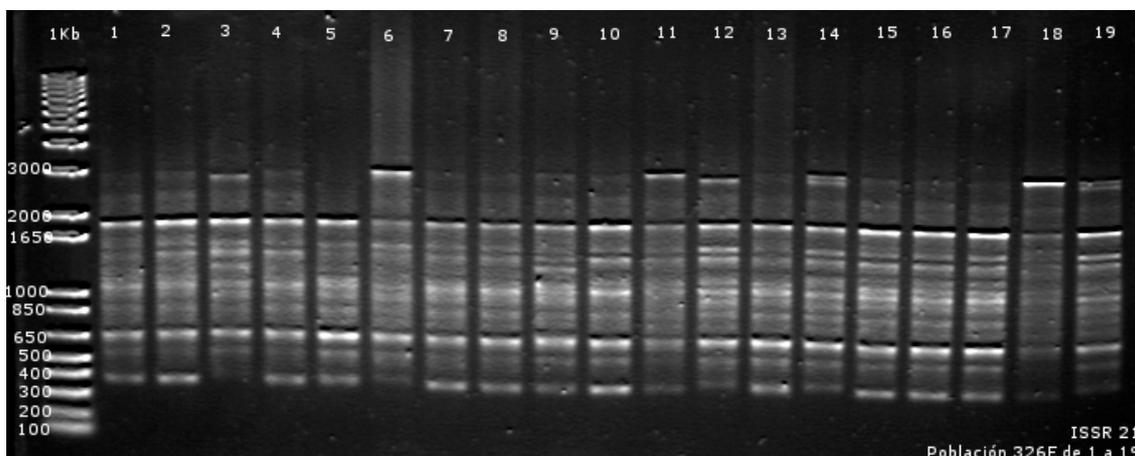


Figura 3.4. Captura de imágenes en gel de electroforesis para la detección de los fragmentos ISSR amplificados

3.6.3 Cuantificación y análisis de los patrones polimórficos

Las bandas generadas en la amplificación de cada ISSR se estudiaron empleando el analizador de imágenes GIMP, tomando como patrón de referencia el marcador de peso molecular 1Kb, de esta manera se estimó el tamaño de cada uno de los fragmentos amplificados. Los fragmentos observados en cada población, se registraron en una matriz binaria de datos donde "1" indicaba presencia y "0" ausencia.

3.6.4 Amplificación de microsatélites (SSR)

Para el análisis de SSR, se seleccionaron 4 parejas de poblaciones (silvestre y domesticada), que tras ser previamente analizadas mediante marcadores ISSR, mostraron mayor y menor variabilidad genética entre ellas. Posteriormente, se añadió la pareja formada por las poblaciones 129F y S-513 a este análisis como único ejemplar representate de la especie *B. stacei*. Las poblaciones analizadas mediante SSR se muestran a continuación en la tabla 3.7.

Tabla 3.7. Poblaciones analizadas con marcadores SSR.

Parejas de poblaciones		Especie
Pob. Silvestre	Pob. Domesticada	
162F	S-514 ('Zulema')	<i>B. distachyon</i>
480F	S-406	<i>B. distachyon</i>
129F	S-513	<i>B. stacei</i>
176F	S-506 ('Ibros')	<i>B. hybridum</i>
326F	S-401	<i>B. hybridum</i>

Se utilizaron 12 parejas de cebadores para amplificar regiones de tipo SSR. Los cebadores se eligieron en base a estudios anteriores realizados por Hammami (2011), según se indica en la Tabla 3.8. La longitud de estos cebadores varió entre 11 y 39 pb. Todos los cebadores "forward" presentaban en el extremo 5' una secuencia de nucleótidos correspondiente a un fragmento del fago M13. En la reacción de PCR se añadió un tercer cebador marcado con el fluorocromo 6-FAM (6-carboxyfluoresceine) en el extremo 5', complementario a la secuencia de la cola de los cebadores M13 forward", con el fin de permitir la detección del tamaño de los fragmentos amplificados. Para la reacción de PCR se tomaron: 20 ng de ADN genómico, 1,5 µL de tampón 10x (100 mM Tris-HCL, pH 8,3, 500 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ y 0.01% gelatina), 0,6 µL dNTP (2,5 mM) (1,25 µL diluidos en 50 µL de agua ultrapura destilada), 0,2 µL de cada cebador (10 mM) y 0,3 µL de Taq polimerasa (5 U/µL, de Sigma). Para la amplificación de los SSR se utilizaron dos programas de PCR según se indica en la tabla 3.9.

Tabla 3.8. Secuencias de los cebadores utilizados en la obtención de SSR.

Oligonucleótidos	Secuencia 5' → 3'
Bra-3F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCA GTA AGT GCA CAC ATG TTA
Bra-3R	CCT TGT ACT TGT GCT TAT GGT
Bra-5F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TAC GTG TCA GTT TAG CAC CTT
Bra-5R	AGG AGG CCA CAT CCT ACC T
Bra-8F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GTC AGT ATG AGT TTC CTC GTG
Bra-8R	CTG ACT GAA AGC TCA AGT TGT
Bra-13F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AAA CGA ACA ACC CAA CAA C
Bra-13R	CTT AAT TAA TCT GCG GTT GC
Bra-16F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CGC GTA TCT AGA TGC TTT TT
Bra-16R	GTT TCC CAC TAG AAC AAA GGT
Bra-17F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGT TGG CGG TCT ACA TCT ATT
Bra-17R	ACT AAA GAC CAC TCA CGT TTG
Bra-18F	TGTAAA ACG ACG GCC AGT GAA GAA AGG AAG AAG AGA TGC
Bra-18R	AAT TCC TCC ATT CAC ATC G
Bra-19F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCT TGA GCC TCA TCT TTT AGT
Bra-19R	GAA AGA TTT ACA GCC CCT AAC
Bra-20F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GTG GAA CAA GAG ATG TAT GGA
Bra-20R	CCC TGT TGA CTA AAA ACC TT
Bra-21F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTT TAT ACA AGG GGC AAG AG
Bra-21R	CCA ATT AAT TCC CTT CCT TC
Bra-32F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCC AAT TAC TTT CCC GTA GT
Bra-32R	GCC GGA TTT AGA GAA CAA C

❖ F= Forward; R= Reverse

Tabla 3.9. Programas de amplificación SSR por PCR

Cebador SSR	Programación PCR
Bra 17 Bra 20 Bra 21 Bra 32	<i>Primera fase</i>
	94°C → 5'
	94°C → 20''
	58°C → 1' 14 Ciclos
	72°C → 30''
	<i>Segunda fase</i>
	94°C → 20'
	56°C → 1' 28 Ciclos
	72°C → 30''
	72°C → 10'
4°C → ∞	
Bra 3 Bra 5 Bra 7 Bra 8 Bra 16 Bra 18 Bra 19	<i>Primera fase</i>
	94°C → 5'
	94°C → 20''
	58°C → 1' 14 Ciclos
	72°C → 30''
	<i>Segunda fase</i>
	94°C → 20'
	56°C → 1' 28 Ciclos
	72°C → 30''
	72°C → 10'
4°C → ∞	

3.6.5 Análisis y detección de microsatélites (SSR)

Una vez concluida las reacciones de PCR, se llevó a cabo el análisis de los productos amplificados utilizando un secuenciador capilar ABI 3130 (*Genetic analyzer* de Applied Biosystem). Posteriormente para el estudio de los fragmentos amplificados se utilizó el programa "Peak Scanner Software v 1.0", con el que se realizó la alineación de los picos y su estandarización según un marcador de peso molecular "GS500 (-250) LIZ".

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico y gráfico, se utilizó el software de programación R (www.r-project.org/), mediante la aplicación de los paquetes de análisis Adgenet, Ade4 y Rcomander. Mediante este programa se llevaron a cabo análisis de correspondencia, distancias genéticas, análisis de componentes principales, obtención de dendrogramas etc.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO DE CARACTERES AGRO-MORFOLÓGICOS ENTRE POBLACIONES SILVESTRES Y DOMESTICADAS

Este estudio se ha realizado en una selección de plantas de *Brachypodium* de las especies *B. distachyon* ($2n=10$), *B. stacei* ($2n=20$) y *B. hybridum* ($2n=30$) [Figura 4.1], procedentes de poblaciones tanto silvestres como sometidas a un proceso de selección y domesticación.

Durante los diferentes años de siembra, se ha establecido un registro de descriptores agro-morfológicos por medio de los cuales se ha pretendido detallar el comportamiento y evolución de algunos de estos materiales tras haber sido extraídos de condiciones silvestres, e intentar llevar a cabo un proceso selectivo de domesticación. La finalidad de este trabajo fue la de obtener poblaciones homogéneas, que posteriormente pudiesen ser utilizadas como cubiertas vegetales vivas en la protección de suelos susceptibles a la erosión, especialmente en zonas asociadas al cultivo de olivar.

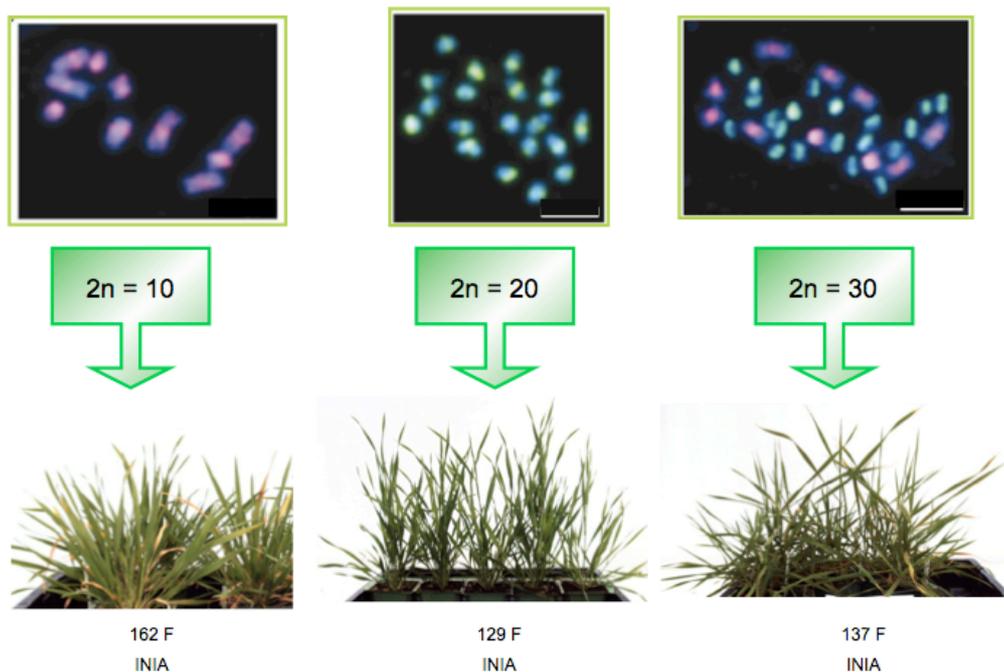


Figura 4.1. Ejemplares de *B. distachyon* ($2n= 10$), *B. stacei* ($2n=20$) y *B. hybridum* ($2n=30$)*.

* Imagen de cromosomas tomada de Draper et al. 2001.

RESULTADOS

Se analizaron en total 14 descriptores agro-morfológicos de 7 parejas de poblaciones de *Brachypodium* silvestres y domesticadas, procedentes de parcelas experimentales de la Finca La Canaleja – Alcalá de Henares. Tres de estas parejas corresponden a *B. distachyon* y las cuatro parejas restantes pertenecen a *B. hybridum*

En la Tabla 4.1 se muestra para cada una de las poblaciones, los datos incluidos en los descriptores. Una vez recolectado el material silvestre se obtuvo una primera generación a la cual se le ha denominado “silvestre”, la nomenclatura de estas poblaciones se acompaña de la letra F. Posteriormente se llevaron a cabo siembras sucesivas anuales en parcelas experimentales de campo, hasta obtener la última generación en la que se han registrado datos incluidos en este trabajo, que corresponden al verano de 2012, fecha en la se concluyó la fase experimental. A este grupo de plantas se les ha denominado poblaciones “domesticadas” y su nomenclatura se acompaña de la letra S (Figura 4.2).

Tabla 4.1. Descriptores agro-morfológicos para 7 parejas de poblaciones de *Brachypodium* con ejemplares silvestres y domesticados.

Población	Pareja 1 <i>B. distachyon</i>		Pareja 2 <i>B. distachyon</i>		Pareja 3 <i>B. distachyon</i>		Pareja 4 <i>B. hybridum</i>		Pareja 5 <i>B. hybridum</i>		Pareja 6 <i>B. hybridum</i>		Pareja 7 <i>B. hybridum</i>	
	S-514	162F	S-501	481F	S-515	160F	S-500	357F	S-502	260F	M-61	137F	S-506	176F
porte ahijamiento	erecta	erecta	erecta	erecta	erecta	erecta	intermed	intermed	Intermed a postra	Intermed a postra	intermed	intermed	intermed	intermed
color hoja ahijamiento*	7	7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
época floración	Intermed	tardía	tardía	intermed	tardía	tardía	precoz	precoz	intermed	intermed	precoz	precoz	intermed	intermed
porte floración	erecta a intermed	erecta a intermed	erecta a intermed	erecta a intermed	erecta a intermed	erecta a intermed	intermed a postrada	Intermed a postrada	intermed a postrada	intermed a postrada	Intermed a postrada	Intermed a postrada	intermed	intermed
altura maduración (cm)	42,2	26	35,4	12,33	40,8	28,6	37,91	28,33	55,2	50,4	37,25	35,2	37,12	46,1
sección tallo (maduración)	hueco	hueco	hueco	hueco	hueco	hueco	hueco	hueco	hueco	hueco	hueco	hueco	hueco	hueco
tipo de inflorescencia	poco divergen	poco divergen	muy divergen	muy divergen	poco diverge	poco diverge	poco divergen	poco divergen	poco divergen	poco divergen	poco divergen	poco divergen	poco divergen	poco divergen
longitud total de inf. con arista (cm)	6,8	5,2	6,13	6,42	6,06	6,5	7,46	7,1	9,23	6,86	7,43	5,3	10,2	6,73
# máximo de inflor.	5	4	4	5	6	4	3	5	4	4	4	4	5	4
long. Espiguilla terminal (cm)	3,9	3,26	3,4	4,625	2,72	4,5	5,36	3,5	5,56	4,4	4,13	3,3	5,2	4,3
longitud de aristas (cm)	0,875	1,33	0,86	1,275	0,78	1,2	0,9	1,7	0,96	1,83	1	1,36	0,96	1,36
longitud de gluma (cm)	0,65	0,56	0,6	0,575	0,76	0,4	0,83	0,73	0,93	0,88	0,9	0,6	0,73	0,73
Relación lema/arista	menor	menor	menor	menor	menor	menor	menor	menor	menor	menor	menor	menor	menor	menor
peso de mil semillas (gr)	4,05	3,27	3,95	2,75	4,62	3,37	7,69	4,96	4,8	5,49	5,38	5,01	6,75	5,35

*color ahijamiento: 3 verde claro; 5 verde medio; 7 verde oscuro
fondo azul: *B. distachyon*; fondo verde: *B. hybridum*

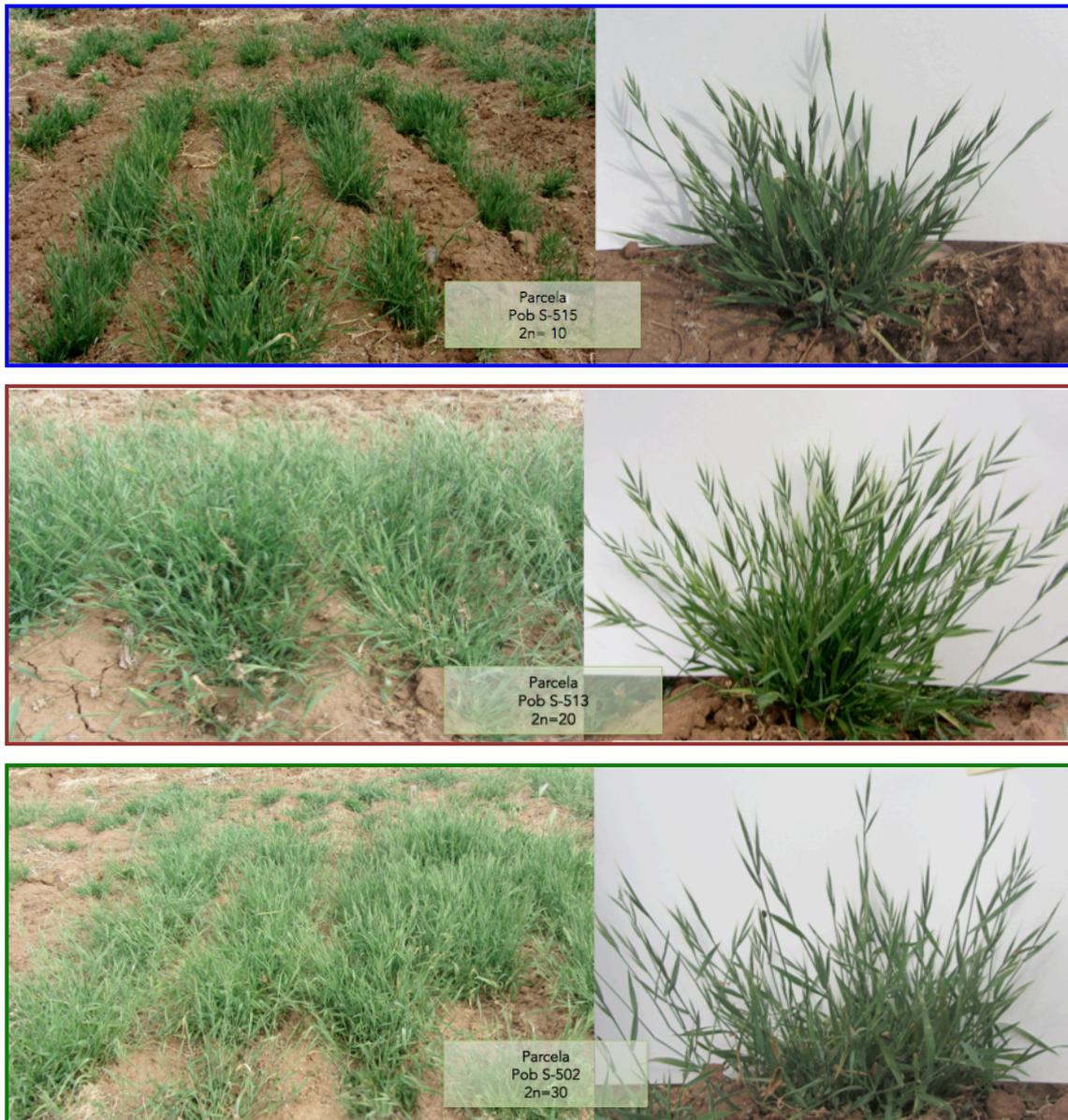


Figura 4.2. Parcelas experimentales de *Brachypodium* en la 'Finca La Canaleja', lugar de procedencia de las poblaciones "domesticadas". *B. distachyon* $2n=10$; *B. stacei* $2n=20$ y *B. hybridum* $2n=30$.

Dentro de los 14 descriptores estudiados (Tabla 4.1), se ha podido observar que, algunas de las características morfo-agronómicas pueden llegar a verse influenciadas por la presión y selección del cultivo, mientras que otras se mantienen constantes durante los diferentes años de siembra, como por ejemplo el porte de las plantas. Así mismo, se ha podido observar que las plantas de *B. distachyon*, presentan un porte generalmente erecto durante las épocas de ahijamiento y floración aunque, en esta última fase, tienden a observarse un poco más postradas. Por el contrario, plantas procedentes de poblaciones *B. hybridum* muestran un porte de intermedio a postrado desde el

RESULTADOS

ahijamiento hasta la floración. Esta característica, ha sido decisiva para determinar la utilidad de *Brachypodium* para su uso como cubiertas vegetales vivas, tal como lo han mostrado los trabajos llevados a cabo por Soler et al. (2004).

Otras características que se mantienen constantes entre parejas de plantas silvestres y domesticadas son el color de la hoja durante el ahijamiento, la sección del tallo durante la maduración y el tipo de inflorescencia. En cuanto a la sección del tallo, se ha observado que es hueco en todas las plantas de *Brachypodium*, independiente la especie. Por otro lado, el color de la hoja durante el ahijamiento se ha descrito como verde medio y tiende a ser similar para todas las poblaciones estudiadas, excepto la pareja formada por las poblaciones 162F y S-514 (*B. distachyon*), en las que se pudo apreciar en la mayoría de sus ejemplares un color más oscuro.

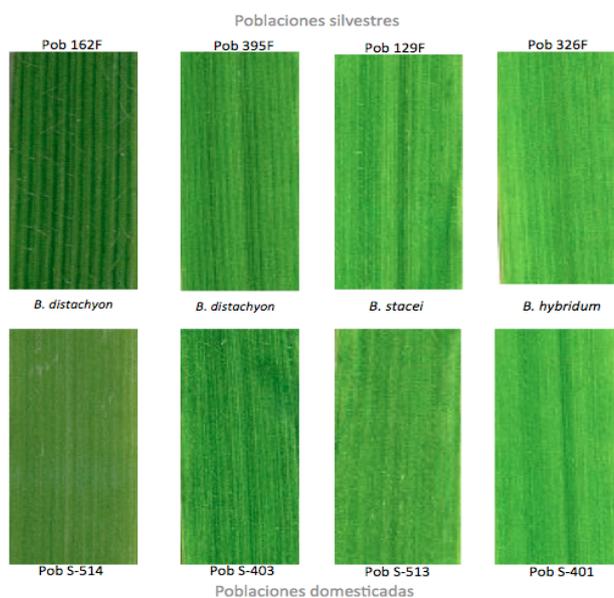


Figura 4.3. Descripción agromorfológica color de hojas durante el ahijamiento para algunas poblaciones de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*.

Por otra parte, de acuerdo con los datos registrados, existen ciertos caracteres que se han visto afectados por los efectos de la presión y selección del cultivo. Dentro de estos cabe citar aquellos que se analizan durante la etapa de maduración como son: altura de la planta, longitud de la inflorescencia, longitud de la espiguilla terminal, longitud de la arista en la

parte central de la espiguilla, longitud de la gluma, longitud entre lema y arista y el peso de mil semillas.

Con el fin de incluir en el estudio de caracteres agro-morfológicos a las 26 poblaciones que forman parte de este trabajo, se han tenido que reducir el número de caracteres a evaluar. Así, en la Tabla 4.2 se pueden observar los datos registrados para 6 descriptores, dentro de los que se destacan principalmente la altura de maduración, altura de espigado y peso de mil semillas.

Tanto para las poblaciones silvestres como para las poblaciones domesticadas, los datos resultan de la media de 10 plantas por población seleccionadas en el campo. Hay que señalar que, el registro de los datos correspondientes a las poblaciones domesticadas presentados en la Tabla 4.2, proceden del último año de siembra.

De este modo, al comparar entre poblaciones silvestres y domesticadas, se ha podido observar que en cuanto a la altura de maduración, altura de espigado y peso de mil semillas, existe una tendencia al incremento de sus valores en poblaciones domesticadas, especialmente en plantas de *B. distachyon*. Así, la altura de maduración pueden llegar a tener valores que están entre 12,2 cm y los 25,2 cm, por encima de los de las poblaciones silvestres de las que derivan, como son los casos de la población S-515 con 7 años de siembra y de la población S-406 con 5 años de siembra respectivamente.

RESULTADOS

Tabla 4.2. Datos agromorfológicos para 26 poblaciones con ejemplares silvestres y domesticados de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*.

Población	Porte ahijamiento	Altura de maduración	Sección del tallo	Color de Ahijamiento*	Altura de espigado	Peso de mil semillas
160F	erecta	28,6	Hueco	5	30,2	3,37
S-515	erecta	40,8	Hueco	5	36,8	4,62
162F	erecta	26	Hueco	7	25,8	3,27
S-514	erecta	42,2	Hueco	7	36,2	4,05
395F	erecta	20,2	Hueco	5	21,2	2,91
S-403	erecta	38,75	Hueco	5	24,91	5,63
480F	erecta	14,8	Hueco	3	15,7	2,72
S-406	erecta	40,75	Hueco	3	39,75	3,6
481F	erecta	12,33	Hueco	5	19	2,75
S-501	erecta	35,4	Hueco	5	23,95	3,95
129F	intermed	29,4	Hueco	5	31,2	6,51
S-513	intermed	57	Hueco	5	52,4	6,46
176F	intermed	46	Hueco	5	45,8	5,01
S-506	intermed	37,12	Hueco	5	44,4	6,75
137F	intermed	35,2	Hueco	5	38,8	5,35
M-61	intermed	37,25	Hueco	5	30,17	5,38
260F	intermed a postrada	50,4	Hueco	5	49,6	5,49
S-502	intermed a postrada	55,2	Hueco	5	42,75	4,8
326F	intermed	30,2	Hueco	5	29,2	4,17
S-401	intermed	32,5	Hueco	5	23,1	5,64
365F	intermed a postrada	35,2	Hueco	5	34,8	4,26
S-402	intermed a postrada	58	Hueco	5	32,7	5,18
357F	intermed	28,33	Hueco	5	42,33	4,96
S-500	intermed	37,91	Hueco	5	33,34	7,69
333F	intermed a postrada	30,66	Hueco	7	39,33	4,34
S-405	intermed a postrada	43,91	Hueco	7	35,31	7,33

*color ahijamiento: 3 verde claro; 5 verde medio; 7 verde oscuro
(*B. distachyon*, *B. stacei*, *B. hybridum*)

En cuanto a las plantas domesticadas de *B. stacei* (S-513), se ha observado que, trascurridos 7 años de siembra en campo, han llegado a mostrar para la altura de maduración valores de hasta de 27,6 cm por encima de su población de origen, al igual que para la altura de espigado con un incremento de 24 cm. Por el contrario, el peso de mil semillas presenta un valor muy similar al de su correspondiente ejemplar silvestre, aunque hay que precisar que durante el último año de siembra los valores en estas variables fueron menores en relación a años anteriores.

En el caso de *B. hybridum* el incremento entre las poblaciones silvestres y domesticadas para la altura de espigado, fue en la población S-402 de 22,8 cm después de 8 años de siembra en campo, mientras que para el resto de las poblaciones las diferencias están comprendidas entre los 2 cm y los 13,25 cm. En cuanto a la altura de espigado para este grupo de plantas, se observó que, los valores registrados para las poblaciones silvestres, son mayores que para sus correspondientes descendientes en proceso de domesticación, con diferencias de entre 1 cm y 10 cm por encima para las silvestres, destacando una vez más que, los datos registrados para el último año (2012) en poblaciones domesticadas son menores en relación a años anteriores.

Finalmente, comparando el peso de mil semillas y su relación entre plantas silvestres y en fase de domesticación, se observaron diferencias desde 0,3 gr a 2,99 gr, siendo los datos de las plantas domesticadas siempre mayores que su correspondiente ejemplar silvestre.

El conjunto de datos de alturas de maduración, espigado y peso de mil semillas se muestra mediante representación gráfica en la Figura 4.4, donde además se hace evidente que las mayores alturas en estas variables se alcanzan para las poblaciones domesticadas, en especial para el ejemplar S-513 (*B.*

RESULTADOS

stacei 2n=20), seguido de las poblaciones S-502 y S-402 ambas correspondientes a *B. hybridum* (2n=30).

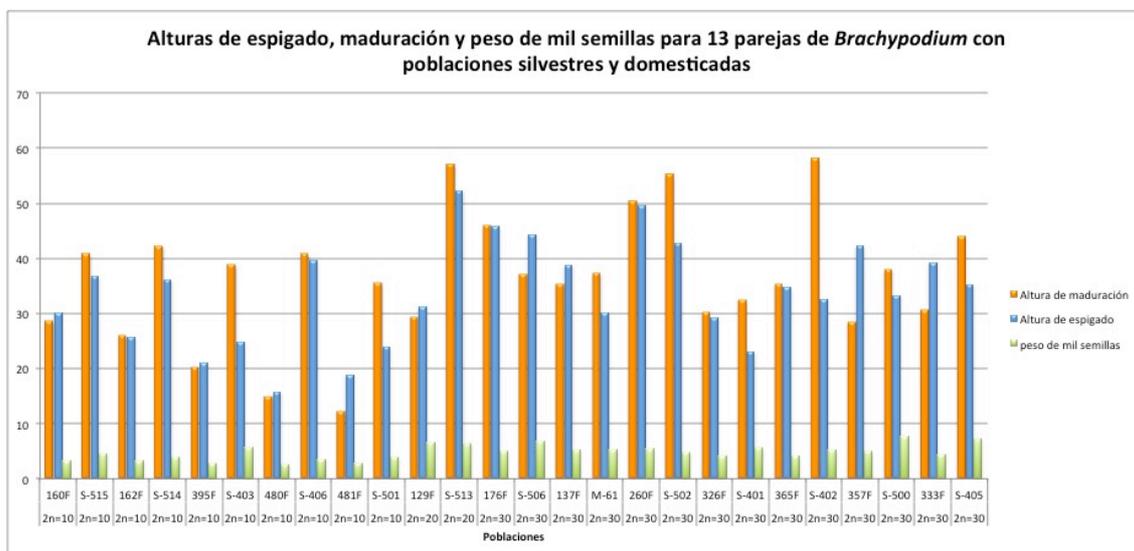


Figura 4.4. Gráfico de alturas de maduración, espigado y peso de mil semillas para 13 parejas de *Brachypodium* para poblaciones silvestres y domesticadas de las especies [*B. distachyon* (2n=10), *B. stacei* (2n=20) y *B. hybridum* (2n=30)].

4.2 REGISTRO DE CARACTERES AGRO-MORFOLÓGICOS EN FITOTRÓN E INVERNADERO

Con el fin de estimar el comportamiento de las plantas y su desarrollo en diferentes ambientes de crecimiento, se llevó a cabo una evaluación de caracteres agro-morfológicos en fitotrón e invernadero, para algunas poblaciones *Brachypodium* silvestres con respecto a su correspondiente población en proceso de domesticación (Figura 4.5). Estos datos posteriormente fueron comparados con los registros de campo, considerando entre estas tres zonas de desarrollo los 10 caracteres (descriptores) agromorfológicos que se cita en las Tabla 4.3.1 y 4.3.2.

Los caracteres evaluados en esta fase del trabajo derivan de la media de 10 plantas por población en cada uno de los tres ambientes, durante diferentes

periodos de siembra. En las Tablas que siguen a continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.3.1. Registro de datos agro-morfológicos en invernadero para 4 parejas de *Brachypodium* con ejemplares silvestres y domesticados [*B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*].

Datos en invernadero										
POB	Días de Siembra a espigado	Días de Espigado a 50% mad.	Días de 50% mad a mad. total	Altura de Espigado (cm)	Diámetro en maduración (cm)	Color	Porte	Largo hoja bandera (cm)	Ancho hoja bandera (cm)	Altura en maduración
160F	163	33,1	8,3	20,9	7,1	medio	erecto	1,8	0,2	16,1
S-515	160	32,2	8,4	23,7	6,9	medio	erecto	2,0	0,2	17,1
481F	169	33,3	8,9	29,6	6,8	medio	erecto	1,9	0,2	14,8
S-501	168	35,3	8,6	24,4	6,8	claro	erecto	2,3	0,2	18,1
129F	165	33,3	9,3	28,5	6,3	claro	semipostrado	2,9	0,2	19,2
S-513	163	33,5	9,6	24,3	6,9	medio	semipostrado	2,4	0,3	17,3
365F	160	32,4	8,1	15,6	7,1	medio	postrado	2,0	0,2	13,8
S-402	162	34,1	7,2	17,3	6,9	medio	postrado	1,9	0,2	12,5

Tabla 4.3.2. Registro de datos agro-morfológicos en fitotrón para 4 parejas de *Brachypodium* con ejemplares silvestres y domesticados [*B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*].

Datos en Fitotrón										
POB	Días de Siembra a espigado	Días de Espigado a 50% mad	Días de 50% mad a mad. total	Altura de Espigado (cm)	Diámetro en maduración (cm)	Color	Porte	Largo hoja bandera (cm)	Ancho hoja bandera (cm)	Altura en maduración
160F	172	33,8	9,5	23,9	7,2	medio	erecto	1,8	0,2	17,6
S-515	174	34,3	8,3	27,4	7,2	medio	erecto	1,8	0,2	18,8
481F	165	34,6	10,2	21,5	6,8	medio	erecto	1,7	0,2	15,5
S-501	168	35,2	11,1	26,9	7,1	claro	erecto	2,3	0,2	18,0
129F	178	32,1	7,2	28,9	6,9	claro	semipostrado	2,9	0,3	18,1
S-513	173	35,4	8,7	23,4	7,1	medio	semipostrado	2,3	0,3	17,3
365F	174	30,1	8,2	15,8	6,9	medio	postrado	2,1	0,2	13,7
S-402	175	33,2	9,1	17,2	6,9	medio	postrado	1,9	0,2	13,1

En las Figuras 4.6 a y b, se muestran gráficamente los resultados de las Tablas 4.3.1 y 4.3.2, comparando los datos de alturas de espigado y maduración, para estas poblaciones en los tres ambientes de desarrollo.

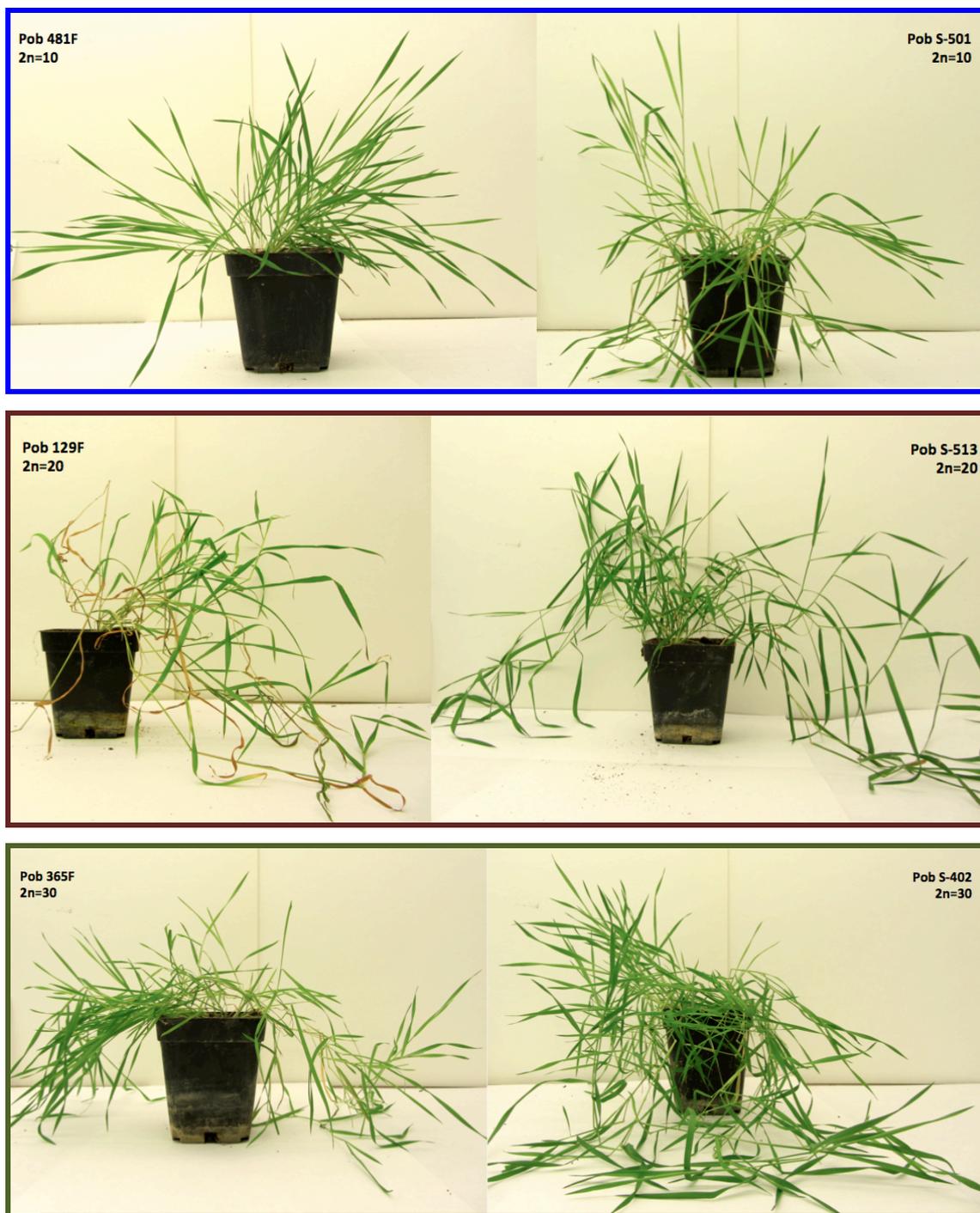


Figura 4.5. Desarrollo en fitotrón de plantas de *Brachypodium* con ejemplares silvestres y domesticados de tres especies diferentes (*B. distachyon* 2n=10, *B. stacei* 2n=20 y *B. hybridum* 2n=30) en fase de espigado.

De acuerdo con estos resultados, se ha podido observar un mayor crecimiento de estas plantas en campo, llegando en algunas poblaciones a obtener valores muy por encima de la media de invernadero y fitotrón como en el caso de la población 365F (*B. hybridum*).

Por otra parte, se ha podido observar que las medias obtenidas para invernadero y fitotrón son muy similares entre sí, destacando también que en estas dos zonas de desarrollo se ha intentado mantener condiciones similares de temperatura y vernalización, mientras en campo las plantas se desarrollaron espontáneamente sin una vernalización previa.

También es de destacar que los valores obtenidos para alturas, tanto de espigado como de maduración, son un reflejo del porte de las plantas durante estas etapas del desarrollo, lo que permite señalar que, en invernadero y fitotrón, las plantas tienden a presentar un hábito postrado en una etapa más precoz, mientras que en campo en general se conservan con mayor altura, aunque hay que tener presente que, el hábito de las plantas de *Brachypodium* varía ampliamente entre las tres especies, tal como se puede apreciar en la Figura 4.5.

RESULTADOS

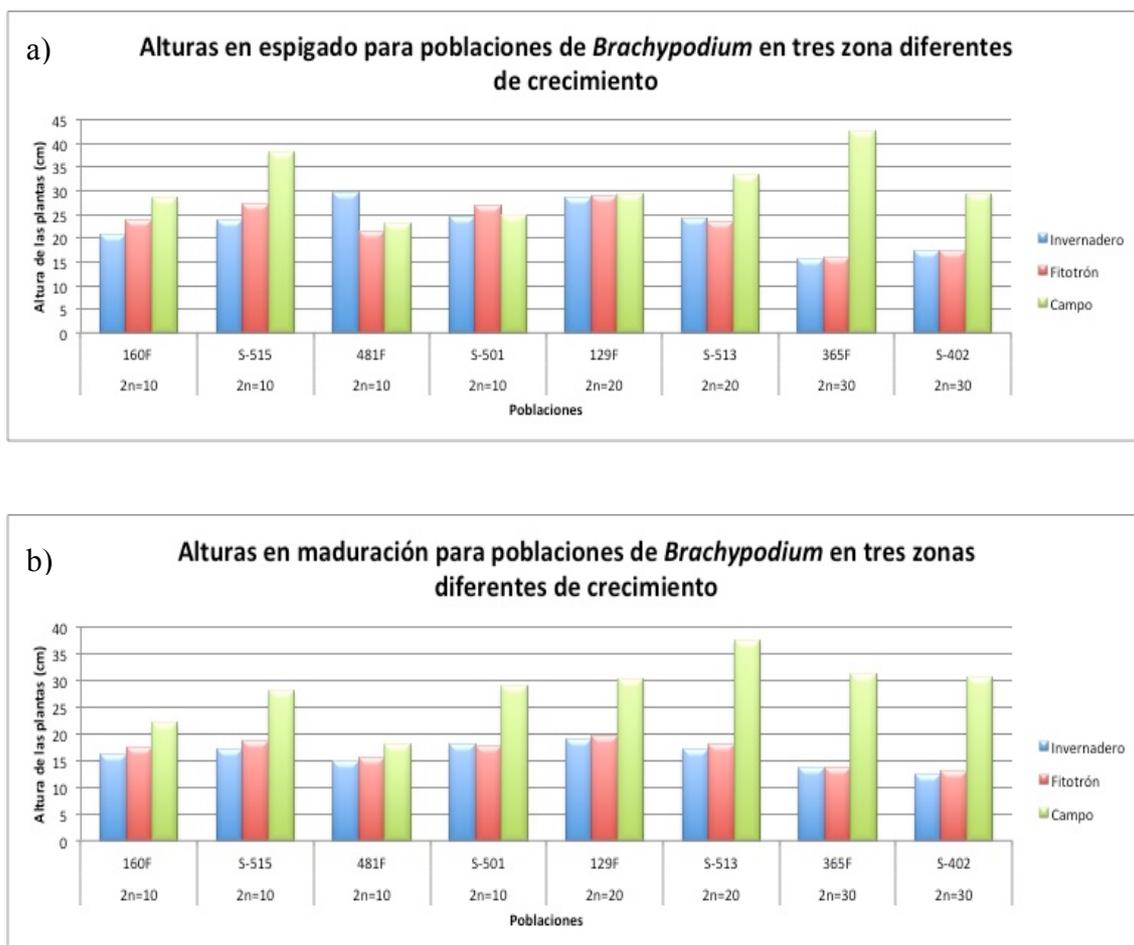


Figura 4.6. Crecimiento comparativo de poblaciones de *Brachypodium* (*B. distachyon* 2n=10, *B. stacei* 2n=20 y *B. hybridum* 2n=30) en tres zonas diferentes de desarrollo. a) alturas en espigado. b) alturas en maduración.

Por otra parte, al establecer una comparación entre plantas silvestres y las plantas en proceso de domesticación que derivan de éstas, se ha podido observar que, algunas de estas últimas, alcanzan tamaños superiores a su correspondiente ejemplar silvestres en especial en las poblaciones de *B. distachyon* y *B. hybridum*. Esta característica también se ha podido observar en el tamaño de los granos que es superior para las poblaciones domesticadas, en comparación con su correspondiente pareja silvestre (Figura 4.7)

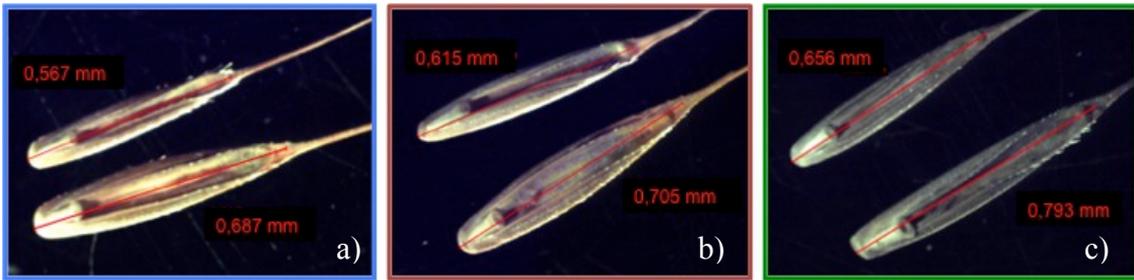


Figura 4.7. Comparación del tamaño de las semillas de *Brachypodium* entre poblaciones silvestres y domesticadas con diferente número de cromosomas. **a)** *B. distachyon*; **b)** *B. stacei*; **c)** *B. hybridum*.

4.3 ANALISIS DE VARIABILIDAD MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES DE ADN GENÓMICO

Con el fin de conocer la variabilidad genética que encierran las poblaciones de las tres especies de *Brachypodium* seleccionadas, y determinar los cambios de variabilidad que se producen durante el proceso de domesticación, se ha llevado a cabo un estudio de marcadores moleculares tipo ISSR y SSR.

4.3.1 Estudio de Intermicrosatélites (ISSR)

Se han empleado 16 cebadores para amplificar regiones intermicrosatélites (ISSR) en 19 individuos de cada una de las 26 poblaciones, contabilizándose un total de 494 individuos y 7.904 amplificaciones. En la Figura 4.8 se muestra algunos ejemplos de los productos amplificados en las tres especies estudiadas, tras su separación en geles de agarosa.

El análisis de los geles de agarosa, ha permitido identificar un total de 2.378 fragmentos polimórficos para el conjunto de las 26 poblaciones y los 16 cebadores ISSR empleados. Estos fragmentos se agruparon en 28 rangos según el tamaño de las bandas obtenidas. Cada uno de los fragmentos obtenidos con los diferentes cebadores, se ubicó según su tamaño en uno de los rangos de acuerdo con los valores mostrados en la Tabla 4.4. Posteriormente con todos los fragmentos obtenidos, se generó una matriz de

RESULTADOS

presencia-ausencia con 84.472 datos registrados que luego fueron analizados con el programa estadístico R.

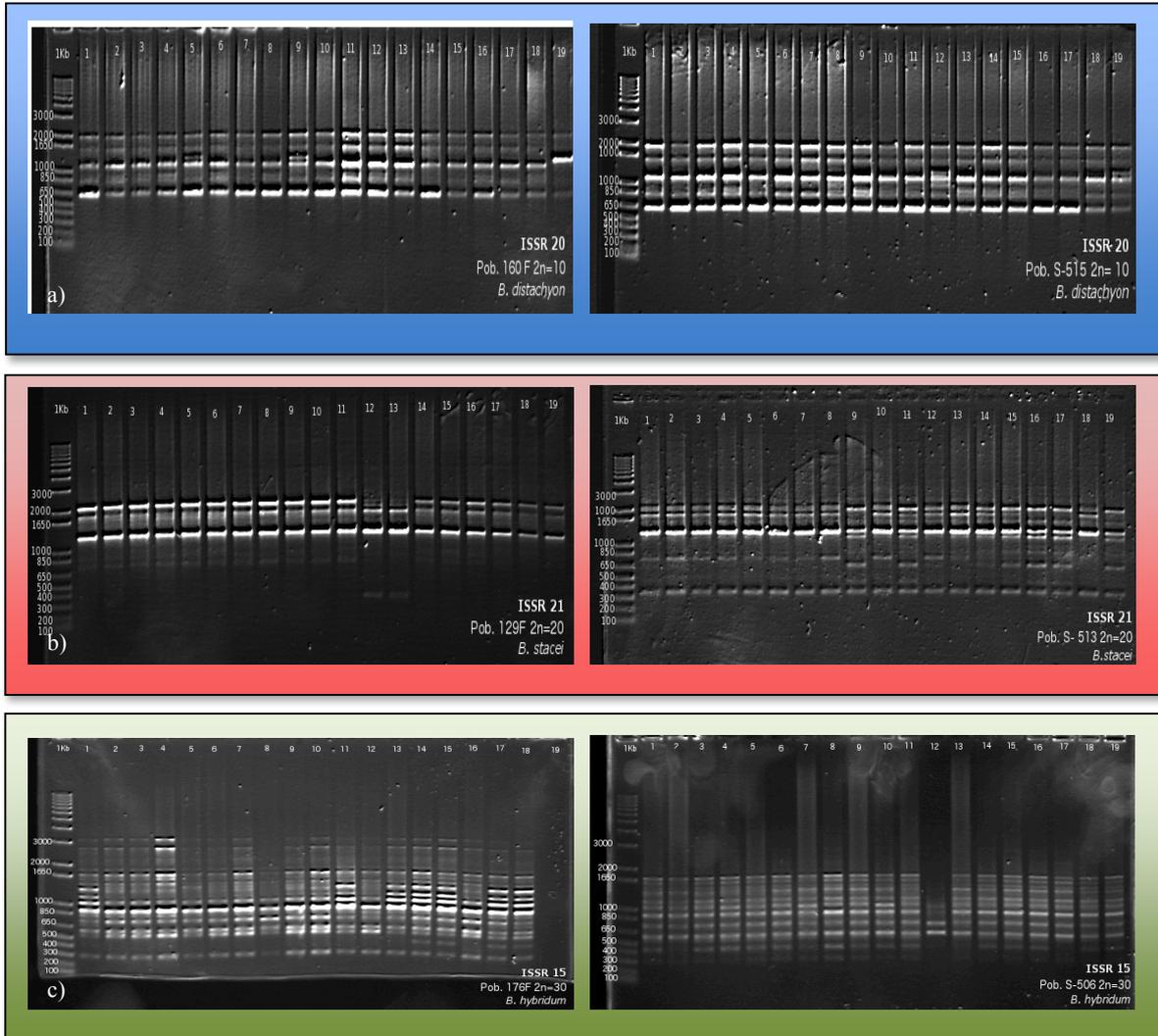


Figura 4.8. Separación en geles de agarosa de fragmentos ISSR amplificados empleando diferentes cebadores, en tres parejas de poblaciones (silvestre izquierda – domesticada derecha) de *Brachypodium* a) *B. distachyon*; b) *B. stacei*; c) *B. hybridum*.

Tabla 4.4. Conjunto de regiones amplificadas para los 16 sistemas ISSR analizados. En la primera columna se muestra el rango de los tamaños obtenidos para las 26 poblaciones totales.

Rangos de fragmentos Tamaño (pb)	ISSR 1	ISSR 3	ISSR 8	ISSR 9	ISSR 10	ISSR 11	ISSR 12	ISSR 13	ISSR 14	ISSR 15	ISSR 16	ISSR 17	ISSR 19	ISSR 20	ISSR 21	ISSR 22	
4000pb	4000		4000														
3500pb	3500		3500														
3000pb	3000		3000	3000	3000	3000		3000	3000								
2900pb	2900	2900	2900	2900	2900	2900	2900				2900	2900		2900	2900		
2700pb	2700																
2500pb	2500	2500	2500	2500	2500	2500		2500	2500	2500		2500	2500	2500		2500	
2200pb	2200																
2100pb	2100																
2000pb	2000				2000								2000	2000	2000	2000	
1900pb	1900	1900	1900	1900	1900	1900	1900	1900				1900		1900			
1800pb	1800																
1700pb	1700	1700	1700	1700	1700			1700	1700	1700	1700	1700	1700	1700		1700	
1650pb	1650																
1600pb	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600		1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	
1500pb	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	
1300pb	1300																
1200pb	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	1200	
1100pb	1100																
1000pb	1000		1000	1000		1000	1000										
900pb	900		900	900			900	900	900	900	900	900	900	900		900	
850pb	850	850	850	850	850	850	850							850		850	
700pb	700		700	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700		700	
650pb	650		650	650	650		650	650									
600pb	600			600	600					600	600	600	600				
500pb	500						500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	
450pb	450		450	450	450	450											
400pb	400		400				400	400		400	400	400		400			
350pb	350		350	350													
# rangos por ISSR	9	14	15	17	14	12	12	9	10	14	8	10	10	7	11	7	
Total 179																	

En conjunto, por cada cebador de ISSR se obtuvieron entre 104 a 194 fragmentos con una media de 148,62 productos amplificados por marcador según se muestra en la Tabla 4.5, con tamaños comprendidos entre 350 pb y 4.000 pb dependiendo del cebador empleado. El sistema con menor número de amplificaciones fue el ISSR 20, mientras que el mayor número de fragmentos se registró para los ISSR 9 y 15.

RESULTADOS

Tabla 4.5. Número total de fragmentos polimórficos amplificados y tamaño de los fragmentos obtenidos por cada ISSR en tres especies de *Brachypodium* (*B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*).

ISSR	# Fragmento amplificados por ISSR	2n=10 <i>B. distachyon</i>	2n=20 <i>B. stacei</i>	2n=30 <i>B. hybridum</i>	Tamaño de Fragmentos (pb)
1	125	46	10	69	3000 - 850
3	105	41	6	58	4000 - 400
8	189	79	7	103	3000 - 350
9	194	74	10	110	3500 - 350
10	166	69	10	87	3000 - 450
11	148	60	11	77	2000 - 450
12	139	64	11	64	4000 - 400
13	129	59	11	59	3000 - 500
14	154	66	11	8	2000 - 450
15	194	75	15	104	3000 - 300
16	111	49	6	56	2500 - 400
17	172	68	11	93	2000 - 400
19	162	62	10	90	2900 - 500
20	104	47	9	48	2000 - 500
21	154	56	10	88	3000 - 400
22	128	47	8	73	2500 - 700

Los porcentajes totales de fragmentos obtenidos para cada grupo de poblaciones según su la especie analizada, fueron los siguientes: para las poblaciones formadas por *B. distachyon* se obtuvo un total de 962 fragmentos (40,45%), para las poblaciones de *B. stacei* se amplificaron 156 fragmentos (6,56%) y para las poblaciones de *B. hybridum* se alcanzaron 1.260 fragmentos (52,99%).

Se ha observado que, algunos fragmentos fueron exclusivos de alguna especie de los genotipos analizados. Por ejemplo, los fragmentos comprendidos en el rango de 1.600 pb generados por los cebadores ISSR 11 e

ISSR 15, se presentan sólo en las poblaciones de *B. hybridum*, al igual que los fragmentos de 2.700 pb generados por el cebador ISSR 1, detectados únicamente en las poblaciones *B. hybridum* y *B. stacei*.

Por otra parte, la presencia de algunos fragmentos resulta común para el conjunto de los 16 cebadores de ISSR estudiados; destacando principalmente los comprendidos entre rangos de 1.500 pb, seguido de 1.200 pb y 700 pb, presentes en todos los sistemas ISSR con exclusión de los cebadores ISSR 1, 3 y 20 en los que no se registró ninguna población con 700 pb, mientras que en los sistemas ISSR 16 y 22 no se detectaron fragmentos con 1.200 pb. A pesar de haberse encontrado fragmentos dentro de los mismos rangos según el tamaño generado en los diferentes ISSR, se da por entendido que las regiones genómicas amplificadas deben ser diferentes.

4.3.2 Estudio de la diversidad inter-poblacional mediante marcadores (ISSR)

A partir del análisis de los 16 cebadores para amplificar ISSR, se llevó a cabo un estudio entre las parejas de poblaciones, para detectar si hubiese pérdida de variabilidad genética, a consecuencia de los diversos periodos en los que las plantas fueron sometidas a presión de cultivo y domesticación. En este sentido, se comprobó la disminución para el número de fragmentos en 13 parejas de las poblaciones estudiadas.

El número de fragmentos perdidos entre ejemplares silvestres y en proceso de domesticación se resume en la Tabla 4.6, donde se observó que algunas parejas de poblaciones presentan mayor diversidad genética entre sí. Así, al analizar las parejas de *B. distachyon* se observó que los ejemplares 395F-S-403, 480F-S-406 y 481F-S-501 presentan diferencias de entre 11 a 25 fragmentos entre individuos silvestres y domesticados. Por su parte, en la pareja de *B. stacei* (129F-S-503) se detectaron 11 fragmentos diferentes derivados de 8 cebadores, mientras que para las parejas de *B. hybridum* formadas por las poblaciones 326F-S-401, 333F-S-405 y 365F-S-402, se detectaron entre 21 y 29 fragmentos de diferencia entre ejemplares silvestres y domesticados.

RESULTADOS

Tabla 4.6. Pérdida de fragmentos detectada para poblaciones de *Brachypodium* silvestres y domesticadas mediante el uso de 16 cebadores ISSR (*B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*).

Pareja de poblaciones Silvestre -Domesticada	Total de bandas perdidas por pareja (silv / domes)	Cebadores de ISSR's afectados
160F - S-515	9	ISSR 1, 3, 8, 9, 17, 19
395F - S-403	25	ISSR 3, 8, 11, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22
162F - S-514	4	ISSR 12, 15, 17, 21
480F - S-406	25	ISSR 3, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 19, 20, 21
481F - S-501	11	ISSR 8, 9, 10, 11, 14, 15, 29, 22
129 F - S-513	15	ISSR 1,8,10 11, 13, 14, 15, 17, 19, 20
137F - M-61	6	ISSR 9, 13, 15, 19, 21
176F - S-506	5	ISSR 9, 13, 15, 19, 21
260F - S-502	4	ISSR 11, 15, 16
326F - S-401	29	ISSR 1, 3, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22
333F - S-405	21	ISSR 1, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 21, 22
357F - S-500	8	ISSR 1, 15, 16, 17
365F - S-402	22	ISSR 3, 8, 9, 14, 5, 16, 19, 21, 22

Se ha podido observar que, en la pérdida de fragmentos entre parejas de plantas silvestres y domesticadas, puede presentarse una de las dos situaciones siguientes: que existan fragmentos presentes en poblaciones silvestres y ausentes en domesticadas o viceversa. En la Tabla 4.7, se muestra el porcentaje de pérdida de fragmentos entre poblaciones silvestre y domesticadas e inversamente.

Tabla 4.7. Porcentaje de fragmentos presentes en poblaciones silvestres y ausentes en poblaciones descendientes domesticadas y viceversa.

	Poblaciones <i>B. distachyon</i>	Poblaciones <i>B. stacei</i>	Poblaciones <i>B. hybridum</i>
Porcentaje de fragmentos presentes en plantas silvestres y ausentes en domesticadas	10,11	10,22	8,55
Porcentaje de fragmentos presentes en plantas domesticadas y ausentes en silvestres	3,81	6,81	4,05

Según se muestra en la tabla anterior, los porcentajes de pérdida de fragmentos de tipo ISSR, son más altos en las poblaciones domesticadas respecto a las poblaciones originales, como era de esperar al haberse dado una presión y selección del cultivo a lo largo de varias generaciones. También se observó la situación contraria, es decir presencia de fragmentos en las poblaciones domesticadas que no fueron detectados en las correspondientes poblaciones silvestres, siendo más evidente esta situación para la pareja de las poblaciones de *B. stacei* en la que el porcentaje llegó a ser del 6,81 %.

Para analizar la relación genética entre poblaciones silvestres y domesticadas, y los cambios moleculares detectados con los marcadores ISSR a consecuencia de la presión de cultivo tras varias generaciones, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) mediante la utilización de programa estadístico R, con la aplicación de los paquetes Adegenet y Ade4. En la Figura 4.9 se representan las 26 poblaciones incluidas en el estudio, donde se observa la distribución de los materiales analizados con el conjunto de los 16 cebadores para amplificar ISSR empleados en esta parte del estudio.

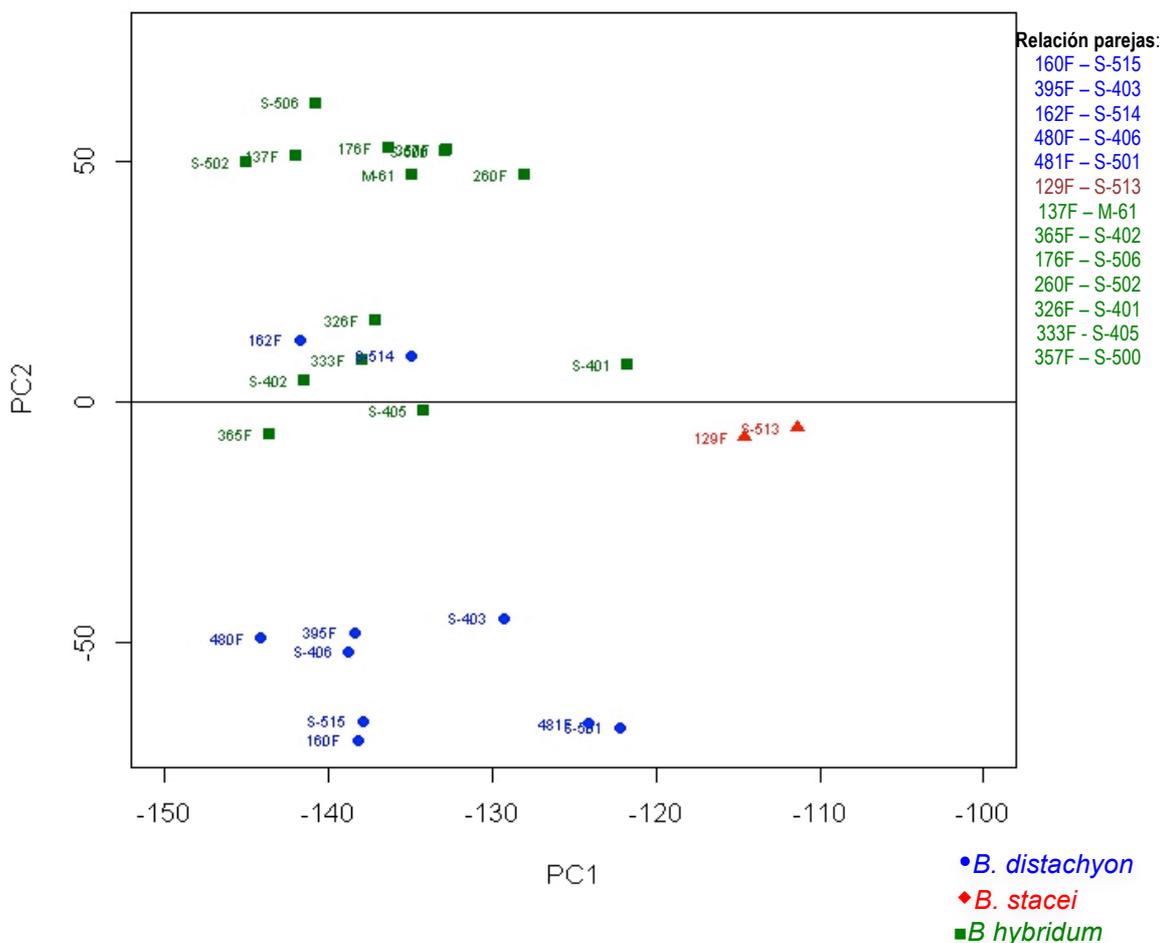


Figura 4.9. Gráfica de la distribución de las poblaciones en los dos primeros componentes principales basados en la utilización de 16 sistemas ISSR, para 13 parejas de poblaciones silvestres y domesticadas de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*. Los dos primeros componentes principales explican el 23,13 % de la varianza.

En la gráfica de la Figura 4.9, se muestra el agrupamiento de las poblaciones según su especie, de esta manera se distinguen tres grupos de poblaciones diferenciados claramente, correspondientes a *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*, a excepción de la pareja 162F – S514 (*B. distachyon*) que se muestra más próxima a las poblaciones de *B. hybridum*.

Por otra parte, al detallar la distribución obtenida entre poblaciones silvestres y sus correspondientes poblaciones domesticadas, se hace evidente para algunas parejas un distanciamiento menor como en el caso de la parejas 160F – S-515 (*B. distachyon*); mientras que algunas parejas presentan un

distanciamiento mayor entre ejemplares silvestres y los domesticados derivados de estas. Tal es el caso de las parejas de *B. distachyon* 395F - S403 y 480F - S406 mientras que las parejas de *B. hybridum* que más diferencia muestran corresponden a las poblaciones 260F - S502 y 326F - S-401.

4.3.3 Análisis de la diversidad intra-poblacional mediante marcadores (ISSR)

A partir de la matriz de presencia-ausencia del conjunto de fragmentos ISSR analizados, se ha llevado a cabo un análisis de distancias genéticas mediante la elaboración de un dendrograma con la utilización del programa estadístico R y el paquete Adegenet, este es un programa dedicado al análisis multivariante de marcadores genéticos en el que se aplica el método de agrupamiento UPGMA. En este estudio se ha empleado el índice de distancia genética absoluta o método de Prevosti (1974). Este método calcula una distancia general entre las poblaciones, basado en las diferencias entre frecuencias de los agrupamientos genéticos que puedan presentarse en las poblaciones de estudio.

En el dendrograma obtenido (Figura 4.10) se observa que las poblaciones en proceso de domesticación se encuentran muy próximas a las silvestres de las que derivan y también se puede observar que, en conjunto las poblaciones pertenecientes a una misma especie, están muy próximas entre sí, exceptuando la pareja de *B. distachyon* 162F - S514 que se encuentra alejada del resto del grupo de su misma especie.

También se ha observado que los dos grupos de poblaciones de *B. hybridum* que se forman, se hallan en una posición intermedia entre las poblaciones de *B. distachyon* y *B. stacei*. Así mismo, las poblaciones de *B. stacei* se encuentran ubicadas en medio de las poblaciones *B. hybridum*, por lo que, se puede establecer que los ejemplares de *B. hybridum* comparten características genéticas tanto de las otras dos especies. Así mismo, los ejemplares de *B. stacei* resultan más similares a las poblaciones de *B. hybridum*. Estos resultados también corroboran el estudio de caracteres agro-

RESULTADOS

morfológicos, en los que en general *B. stacei* y *B. hybridum*, se muestran muy similares entre sí, en especial en cuanto a porte y tamaño se refiere.

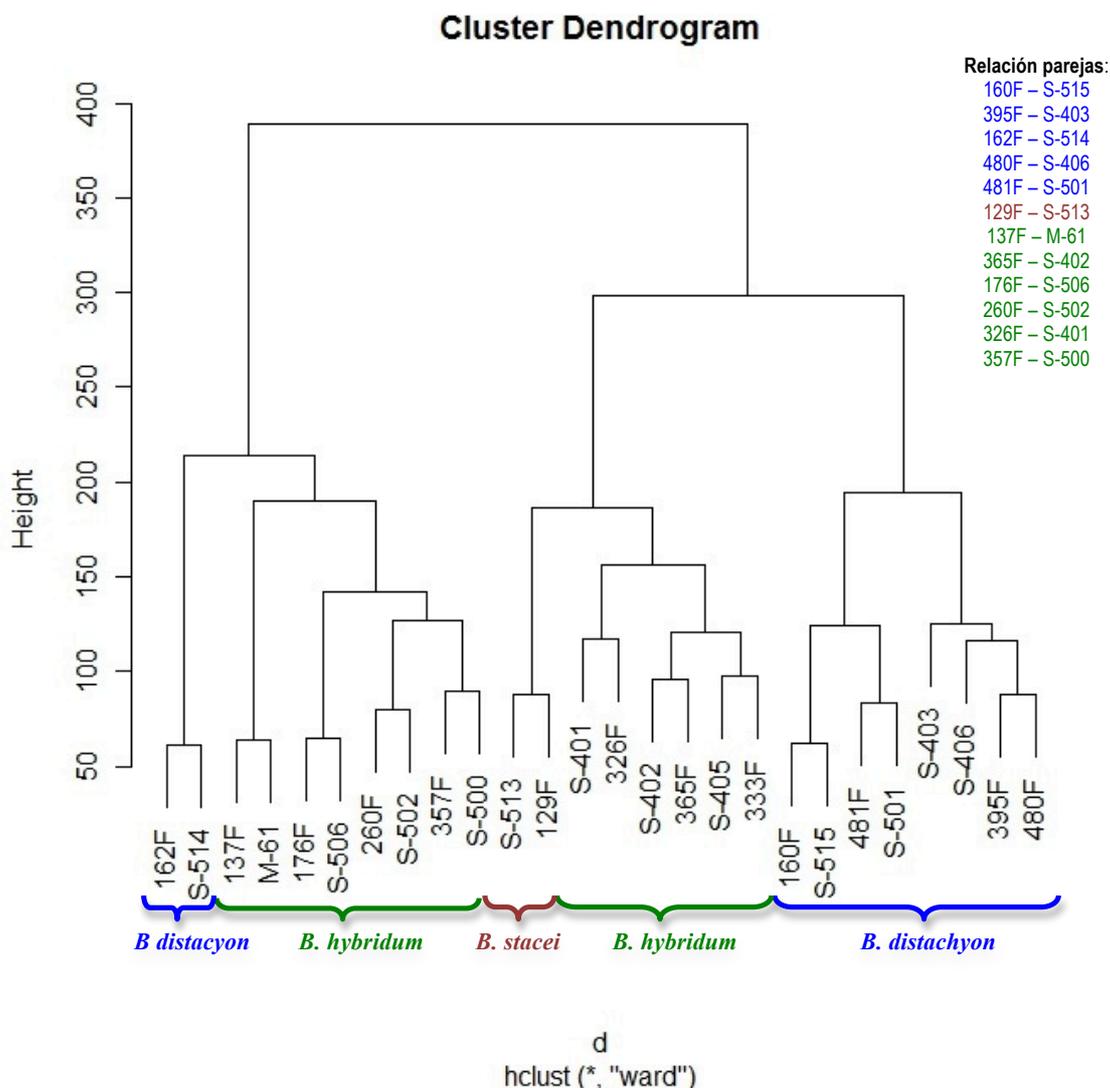


Figura 4.10. Dendrograma representando las distancias genéticas entre 13 parejas de poblaciones de *Brachypodium*, silvestres y domesticadas tras el análisis con 16 cebadores ISSR.

4.3.4 Estudio de Microsatélites (SSR)

Para este estudio se seleccionaron 5 parejas de poblaciones, elegidas entre las anteriormente analizadas mediante marcadores ISSR. Las parejas incluidas en este análisis se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Parejas de *Brachypodium* seleccionadas para el estudio con marcadores SSR.

<i>B. distachyon</i>	Pareja 1		Pareja 2	
	162F	S-514	480F	S-406
<i>B. stacei</i>	Pareja 3			
	129F		S-513	
<i>B. hybridum</i>	Pareja 4		Pareja 5	
	176F	S-506	326F	S-401
F= Poblaciones silvestres S= Poblaciones domesticadas				

Para la selección de estas cinco parejas de poblaciones, se tuvo en cuenta el grado de variabilidad que se había observado en el estudio de ISSR. Así, las parejas 162F – S514 (*B. distachyon*), 129F – S513 (*B. stacei*) y 326F – S401 (*B. hybridum*) presentaron una elevada variabilidad, mientras que las parejas 480F – S406 (*B. distachyon*) y 176F – S506 (*B. hybridum*) mostraron un nivel bajo de variación entre las poblaciones silvestres y las poblaciones domesticadas derivadas de ellas.

De cada una de las poblaciones anteriormente mencionadas se seleccionaron 19 plantas, de modo que se incluyeron un total de 95 individuos, en los que se analizaron secuencias tipo microsatélites (SSR), empleando 11 parejas de cebadores SSR que, en estudios anteriormente realizados por Hammami (2011) en diversas poblaciones de *Brachypodium* de la misma colección de germoplasma INIA, dieron fragmentos analizables y polimórficos.

Se han realizado un total de 1.045 reacciones de PCR, a partir de las cuales se estudiaron los fragmentos amplificados para cada individuo según su población de origen, detectándose un total de 42 fragmentos de distinto tamaño (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Conjunto de fragmentos SSR obtenidos para un total de 5 parejas de poblaciones silvestres y domesticadas de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*.

Cebador SSR	N° fragmentos amplificados	Tamaño pb	
		Min	Max
SSR 3	1	170	
SSR 5	16	53	514
SSR 8	7	53	479
SSR 13	3	170	189
SSR 16	2	188	189
SSR 17	5	59	184
SSR 18	2	184	185
SSR 19	2	154	157
SSR 20	1	164	
SSR 21	2	174	173
SSR 32	1	213	

En general, en las poblaciones analizadas con cada sistema SSR, se obtuvo uno o dos fragmentos, mostrándose habitualmente el mismo patrón para todo el conjunto de los 19 individuos por población (Figura 4.11).

Con algunos cebadores se logró la amplificación de fragmentos idénticos en todas las poblaciones, a pesar de tratarse de especies diferentes. Este ha sido el caso al emplear los cebadores SSR 3, SSR 20 y SSR 32.

Por otra parte, algunos cebadores son específicos de alguna de las tres especies analizadas. Por ejemplo, se observó que los cebadores SSR 5, 8 y 17 amplifican fragmentos únicos en poblaciones de *B. hybridum* que no se comparten con las otras dos especies y estos mismos cebadores amplificaron fragmentos únicos en poblaciones de *B. stacei*, mientras que para las poblaciones de *B. distachyon* sólo el SSR 5 amplifica fragmentos. Por otro lado, cabe destacar que el cebador SSR 5, mostró el mayor número de fragmentos amplificados para todo el conjunto de poblaciones, con un total de 16 fragmentos diferentes, seguido del cebador SSR 8 con el que se detectaron 7 fragmentos.

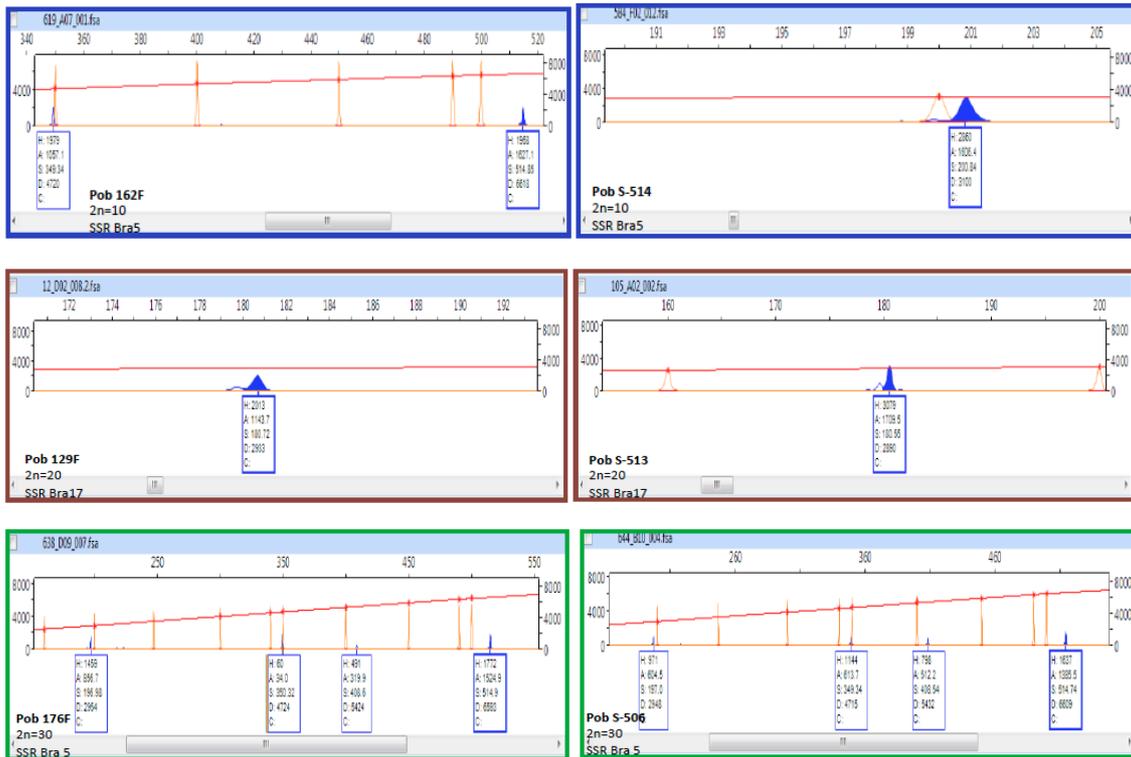


Figura 4.11. Ejemplos de resultados de SSR amplificadas en parejas de poblaciones silvestres y en proceso de domesticación de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*.

4.3.5 Estudio de la diversidad inter-poblacional mediante marcadores SSR

En la Tabla 4.10 se muestra los fragmentos observados en cada una de las 5 parejas de poblaciones de *Brachypodium* analizadas, agrupadas según su especie. En la Tabla 4.11 se muestran los fragmentos de los SSR detectados en cada una de las especies de *Brachypodium*, indicándose aquellos fragmentos compartidos y/o únicos para cada especie.

RESULTADOS

Tabla 4.10. Fragmentos amplificados con cada sistema SSR en 10 poblaciones totales de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*.

SSR	<i>B. distachyon</i>	<i>B. stacei</i>	<i>B. hybridum</i>
SSR 17	162F: 180; 184 S514: 180; 184	129F: 59, 180Pb S513: 180pb	176F: 180; 181 S506: 180; 181
	406F: 180; 184 S480: 180; 184		326F: 183 S401: 180; 181
SSR 21	162F: 174 S514: 174 406F: 173; 174 S480: 174	129F: ninguno S513: 174	176F: 174 S506: 174 326F: ninguno S401: 174
	162F: 172 S514: 172 406F: 172 S480: 172		176F: 172; 249 S506: 172 326F: 53; 64; 112; 172; 474 S401: 172
SSR 8	162F: 197;199;200;223; 455; 621; 514 S514: 130; 197; 200	129F: 129;130; 109; 514; 349 S513: 130; 190; 200; 349; 514	176F: 53; 130; 196; 197; 349; 408; 514 S506: 53; 130; 149; 196; 197; 200; 349; 408
	406F: 200 S480: 130; 200; 274; 621		326F: 53; 197 S401: 53; 129; 196; 197; 349
SSR 20	162F: 164 S514: 164 406F: 164 S480: 164	129F: ninguna S513: 164	176F: 164 S506: 164 326F: 164 S401: 164
	162F: 213 S514: 213 406F: 213 S480: 213		176F: 213 S506: 213 326F: 213 S401: 213
SSR 32	162F: 170 S514: 170 406F: 170 S480: 170	129F: 170 S513: 170	176F: 170 S506: 170 326F: 170 S401: 170
	162F: 188 S514: 189 406F: 170 S480: 170		176F: 188 S506: 189 326F: 189 S401: 189
SSR 13	162F: 188 S514: 189 406F: 189 S480: 189	129F: 189 S513: 188	176F: 188 S506: 189 326F: 188 S401: 189
	162F: 184 S514: 184 406F: 184 S480: 184		176F: 184 S506: 184 326F: 185 S401: 184
SSR 18	162F: 157 S514: 157 406F: 157 S480: 157	129F: 154 S513: 154; 157	176F: 154; 157 S506: 154; 157 326F: 154 S401: 154
	162F: 184 S514: 184 406F: 184 S480: 184		176F: 184 S506: 184 326F: 185 S401: 184
SSR 19	162F: 157 S514: 157 406F: 157 S480: 157	129F: 154 S513: 154; 157	176F: 154; 157 S506: 154; 157 326F: 154 S401: 154
	162F: 184 S514: 184 406F: 184 S480: 184		176F: 184 S506: 184 326F: 185 S401: 184

Tabla 4.11. Total de fragmentos obtenidos con 11 cebadores SSR en las 10 poblaciones de *Brachypodium* analizadas.

Fragmentos Totales (Pb)	<i>B. distachyon</i>	<i>B. stacei</i>	<i>B. hybridum</i>
53			53
59		59	
64			64
109		109	
112			112
129		129	129
130	130	130	130
149			149
154	154	154	
157	157	157	157
164	164	164	164
170	170	170	170
172	172	172	172
173	173	173	
174	174	174	174
180	180	180	180
181			181
183			183
184	184	184	184
188	188	188	188
189	189	189	189
190		190	
196			196
197	197		197
199	199		
200	200	200	200
213	213	213	213
223	223		
249			249
250		250	
349		349	349
408			408
455	455		
472			472
514		514	514
621	621		
36*	19	21	26

*Total de fragmentos SSR amplificadas para tres especies de *Brachypodium*

RESULTADOS

A partir de los datos de la Tabla 4.11 se han estimado los porcentajes de fragmentos exclusivos en cada una de las tres especies. Así como el porcentaje de fragmentos compartidos y se han representado en la Figura 4.12.

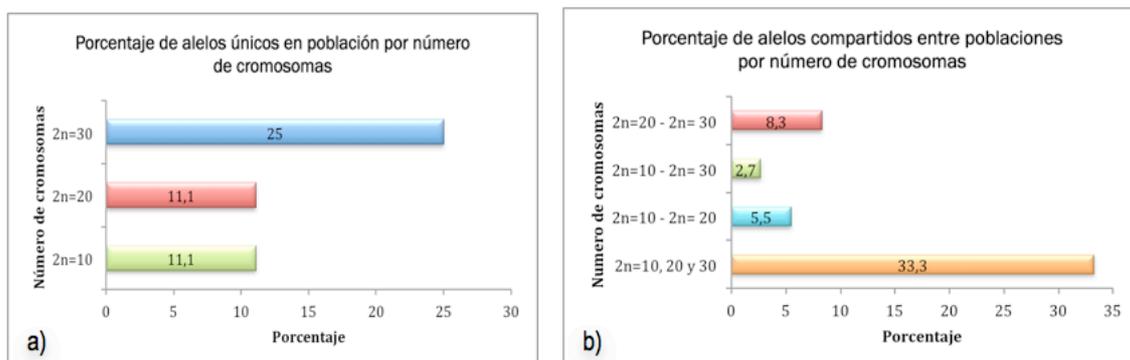


Figura 4.12. Porcentaje de fragmentos únicos y compartidos entre poblaciones de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*, analizadas mediante marcadores SSR.

Según se observa en la Figura 4,11 (a), las poblaciones de *Brachypodium* correspondientes a *B. hybridum* son las que muestran un mayor porcentaje (25%) de fragmentos exclusivos, mientras que las poblaciones de *B. distachyon* y *B. stacei* tienen un 11.1% de fragmentos únicos para cada una de ellas.

En la Figura 4,12 (b), se muestra el porcentaje de fragmentos compartidos en el conjunto de poblaciones y por parejas de poblaciones según la especie. Así, todas las poblaciones comparten un total de 33,3% de fragmentos. Las poblaciones de *B. stacei* y *B. hybridum* comparten el 8,3%, las poblaciones de *B. distachyon* y *B. stacei* comparten el 5,5 del total de fragmentos mientras que el porcentaje más bajo de fragmentos compartidos corresponde a las poblaciones de *B. distachyon* y *B. stacei* que sólo alcanzan el 2,7%, lo que podría indicar una mayor distancia genética entre estas poblaciones.

Al igual que en el estudio realizado con marcadores ISSR, en el presente análisis se observó que para algunas parejas de poblaciones, en ciertos individuos silvestres no se detectó la presencia de algún fragmento, que si se detectó en la correspondiente población domesticada. Por ejemplo, con el

cebador SSR 21 en la población silvestre 129F (*B. stacei*), no se obtuvo amplificación en ninguno de los 19 individuos analizados, mientras que al analizar su correspondiente población domesticada (S-513), se observó un único fragmento de 174 pb en todos los individuos analizados. Esta misma situación se presentó para las parejas formadas por las poblaciones 326F – S401 de *B. hybridum*, en las que se observa un menor de fragmentos en poblaciones silvestres con este mismo cebador.

En contraste con la situación anterior, se han observado algunos fragmentos SSR presentes en las poblaciones silvestres pero no en las domesticadas derivadas de ellas. Es el caso de algunos fragmentos amplificados con el cebado SSR 5 en las parejas 480F – S406 (*B. distachyon*).

4.3.6 Estudio de la diversidad intra-poblacional mediante marcadores SSR

Se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) basado en el estudio de los 11 sistemas SSR, para determinar el grado de variabilidad genética entre las 5 parejas de las tres especies de *Brachypodium*, como consecuencia de los diversos periodos en el que las plantas se sometieron a presión y selección del cultivo. Para la representación gráfica por componentes principales (Figura 4.13), se utilizó el programa estadístico R con los paquetes Adegenet y Ade4.

Como se indicó al inicio del apartado del estudio de microsatélites, las poblaciones presentaron un alto o un bajo grado de variabilidad para ISSR. Este hecho se ve reflejado en la Figura 4.13, en donde aparecen parejas de poblaciones claramente separadas como 129F – S513 (*B. stacei*) ó 326F – S401 (*B. hybridum*), mientras que el resto de poblaciones ocupan zonas del gráfico colindantes o solapadas.

Debido a que la selección de las poblaciones se hizo en función de su mayor o menor variabilidad genética tras los estudios llevados a cabo con ISSR, puede deducirse que, en el primer caso, corresponde a aquellas poblaciones silvestres que mostraron una mayor variabilidad, y tras la presión del cultivo han dado origen a poblaciones domesticadas claramente diferenciadas de las

RESULTADOS

silvestres de las que proceden. En el segundo caso se trata de poblaciones que, pese a la presión del cultivo, se siguen manteniendo genéticamente similares a las silvestres con una menor variación, con lo cual las poblaciones domesticadas siguen siendo semejantes a la población de origen.

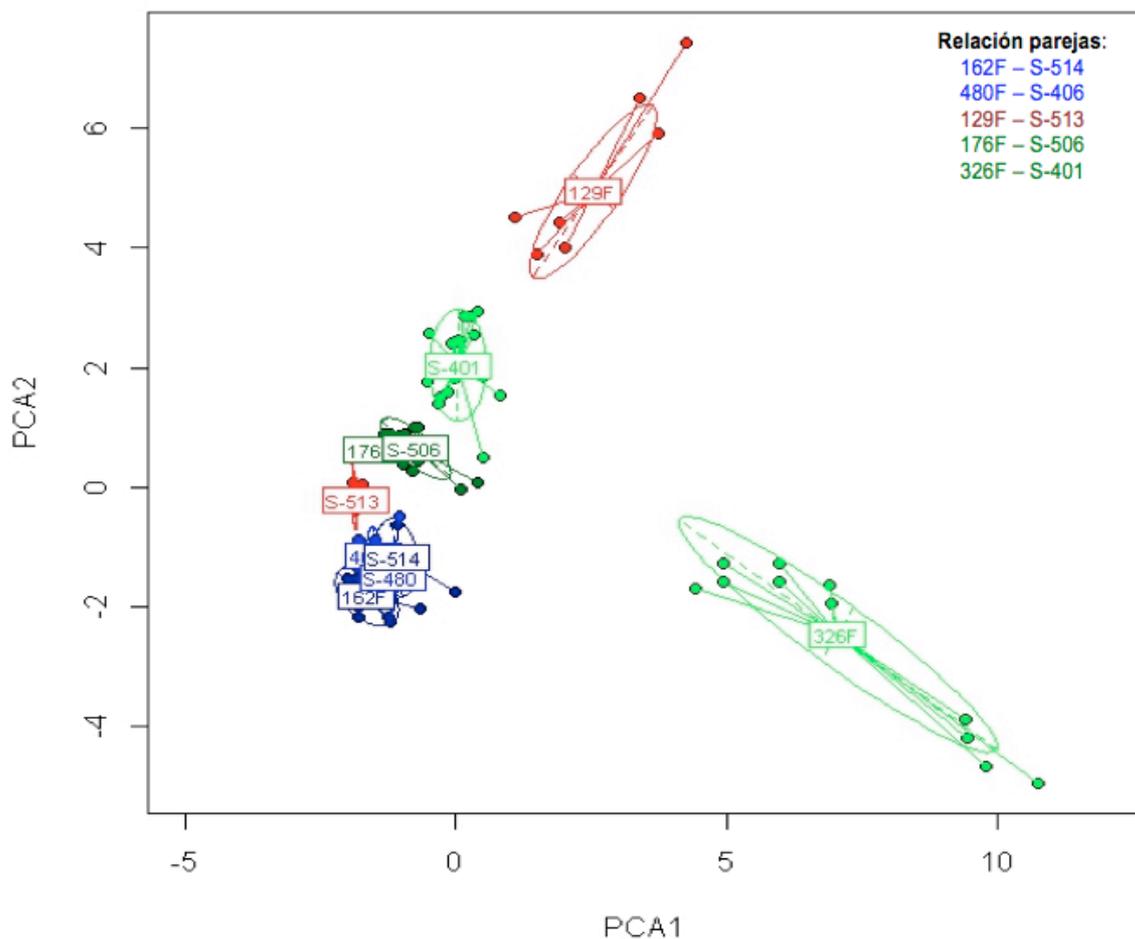


Figura 4.13. Gráfica del análisis de componentes principales para 5 parejas de poblaciones de *Brachypodium* (*B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*) analizadas con 11 sistemas SSR. Entre los dos primeros componentes principales se explica el 94 % de la variabilidad total.

4.4 ANALISIS CONJUNTO DE MARCADORES ISSR, SSR Y DE LOS CARACTERES AGROMORFOLÓGICOS

Se ha llevado a cabo un análisis conjunto de los marcadores moleculares ISSR y SSR en las 10 poblaciones seleccionadas inicialmente para el estudio con

microsatélites, fusionando las matrices obtenidas para estos dos tipos de marcadores y convirtiendo los datos de presencia-ausencia en valores de frecuencia. A partir de la matriz resultante, se realizó un análisis estadístico de componentes principales con Adegent en programación R.

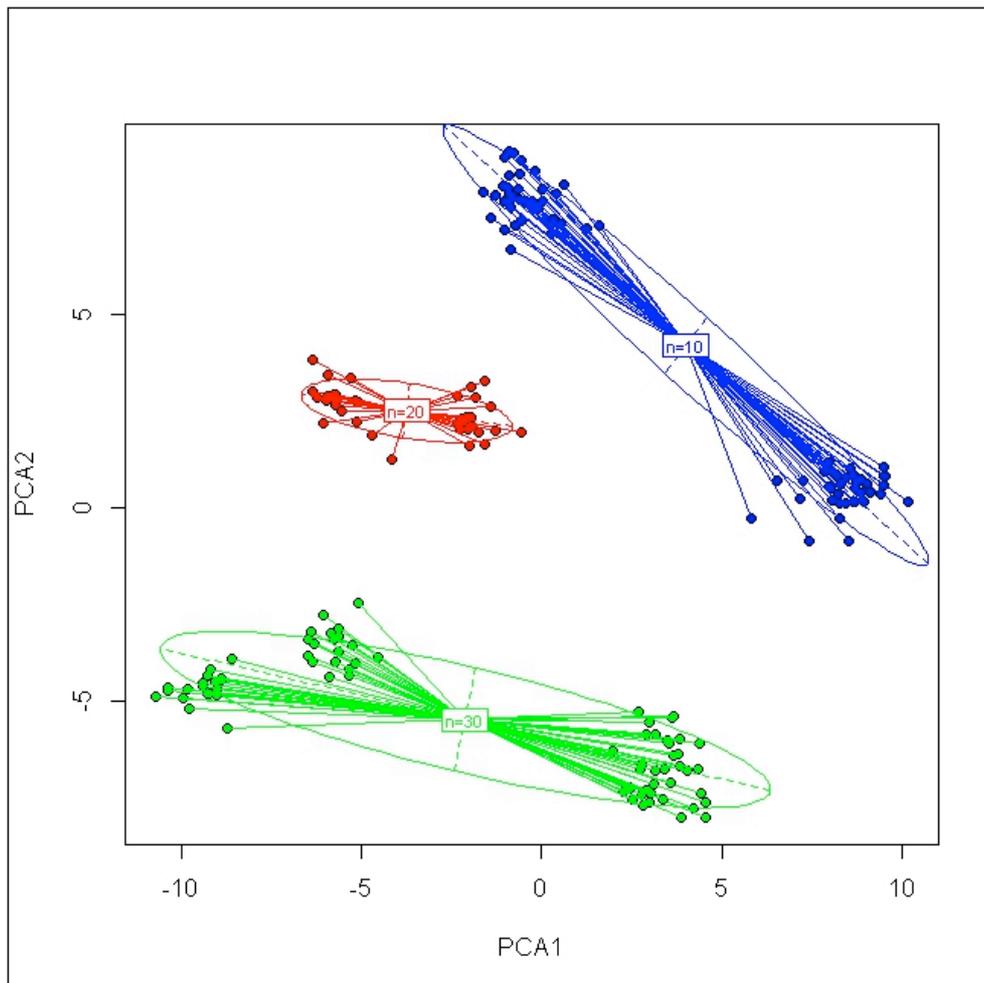


Figura 4.14. Gráfico de componentes principales obtenido mediante el análisis conjunto de marcadores ISSR y SSR representando 3 tipos de poblaciones de *Brachypodium* (*B. distachyon*, *B. stacei*, *B. hybridum*). Los dos primeros componentes principales explican el 49,98 % de la varianza

Inicialmente se analizaron las 10 poblaciones anteriormente mencionadas agrupándolas en función de la especie. En la Figura 4.14, se puede observar que al realizar un estudio conjunto entre los dos tipos de marcadores se hace más evidente la separación de las poblaciones en función de la especie, formándose de esta manera tres grupos principales. Así mismo, a partir de estos se forman pequeños subgrupos que, representan un claro

RESULTADOS

distanciamiento genético entre los individuos silvestres y domesticados que conforman cada una de estas poblaciones.

La formación de grupos para cada una de las tres especies y su separación entre ejemplares silvestres y domesticados mencionada anteriormente, se hace más evidente al observar la Figura 4.16, en la que el estudio se hizo tomando en cuenta a cada una de las 10 poblaciones.

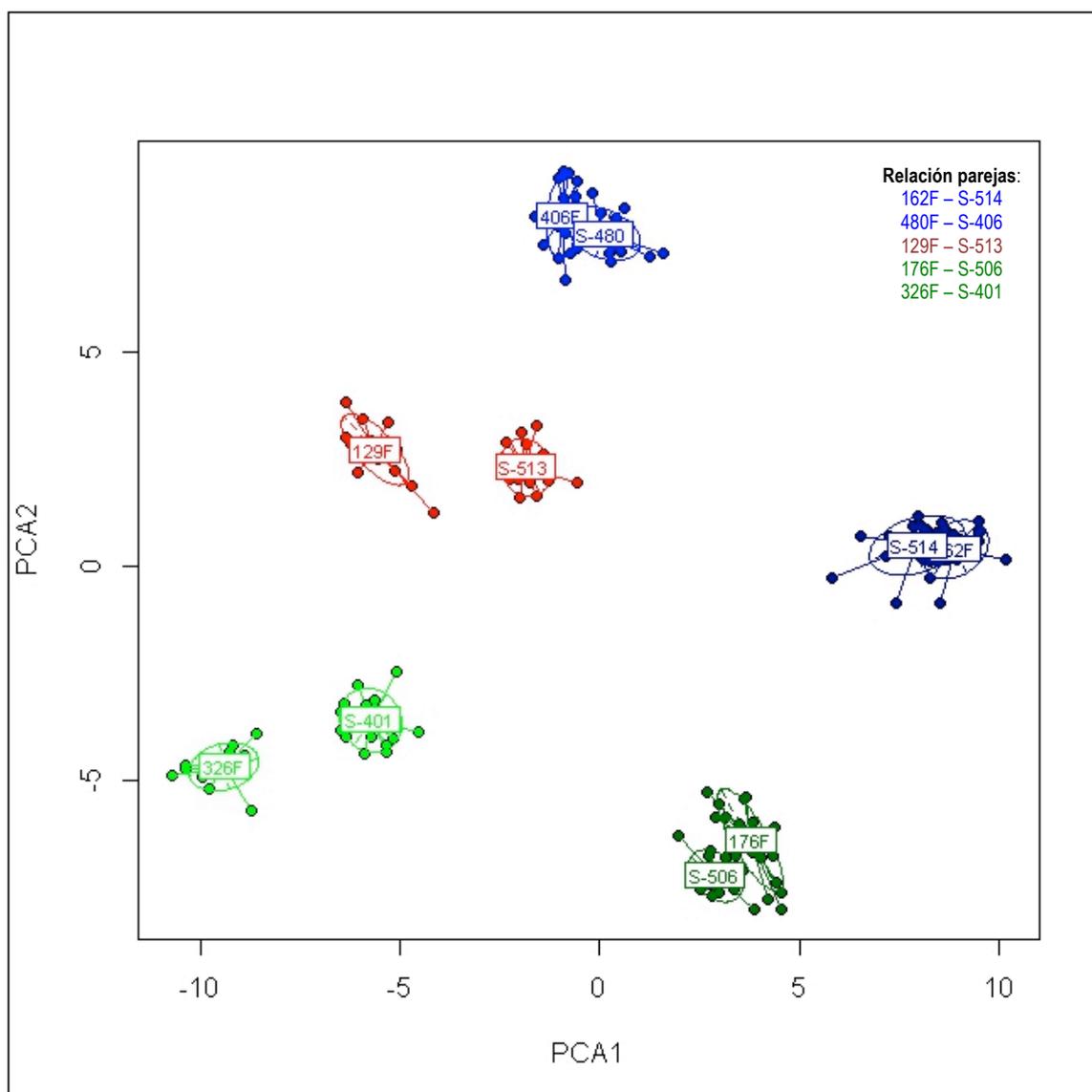


Figura 4.15. Gráfico de componentes principales obtenido mediante el análisis conjunto de marcadores ISSR y SSR representando 10 poblaciones de *Brachypodium* con plantas silvestres y domesticadas [*B. distachyon*, *B. stacei*, *B. hybridum*]. Los dos primeros componentes principales explican el 49,98 % de la varianza.

Finalmente, se ha aplicado el índice de Prevosti (1974) para analizar la similitud entre las 10 poblaciones seleccionadas y a continuación se aplicó el método UPGMA para establecer la agrupación entre ellas. La representación gráfica del dendrograma obtenido se muestra en la Figura 4.16, donde se observa que las poblaciones silvestres y sus domesticadas derivadas se ubican más próximas entre sí. A nivel general las poblaciones se separan en dos grupos principales, uno de ellos integrado por las poblaciones 162F – S-514 (*B. distachyon*) y 176F – S-506 (*B. hybridum*) y el segundo grupo integrado por las parejas 406F –S-480 (*B. distachyon*), 129F–S-513 (*B. stacei*) y 326F–S-401 (*B. hybridum*).

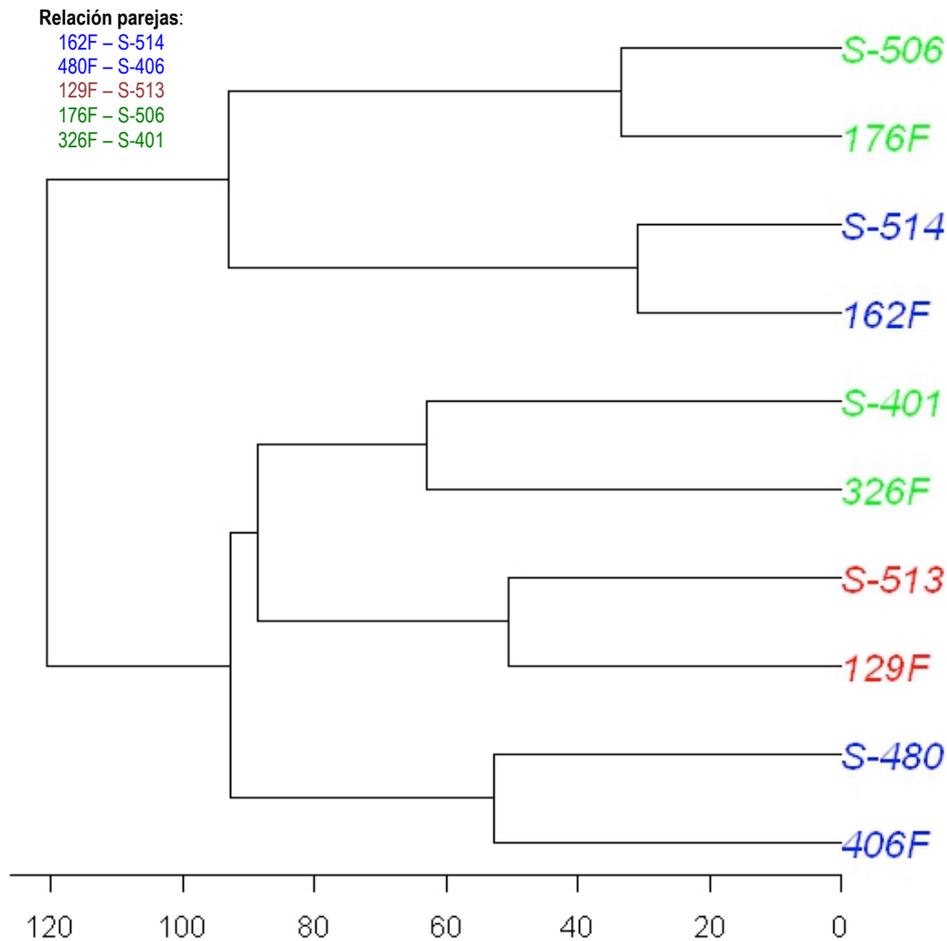


Figura 4.16. Dendrograma representando las distancias genéticas entre 10 poblaciones de *Brachypodium* con ejemplares silvestres y domesticados, analizados con marcadores ISSR y SSR [*B. distachyon*, *B. stacei*, *B. hybridum*].

RESULTADOS

En este segundo grupo, las poblaciones de *B. stacei* ocuparían un nivel intermedio entre las poblaciones de *B. distachyon* y *B. hybridum*, aunque con más semejanza a los ejemplares de *B. hybridum*.

El análisis de componentes principales utilizando los caracteres agromorfológicos citados en la Tabla 4.2, para las 10 poblaciones de *Brachypodium* en las que se analizaron los marcadores moleculares, permite observar la separación de las parejas de *B. distachyon* y *B. stacei*, mientras que las parejas de *B. hybridum* tienden a situarse más cercanas entre sí (Figura 4.18).

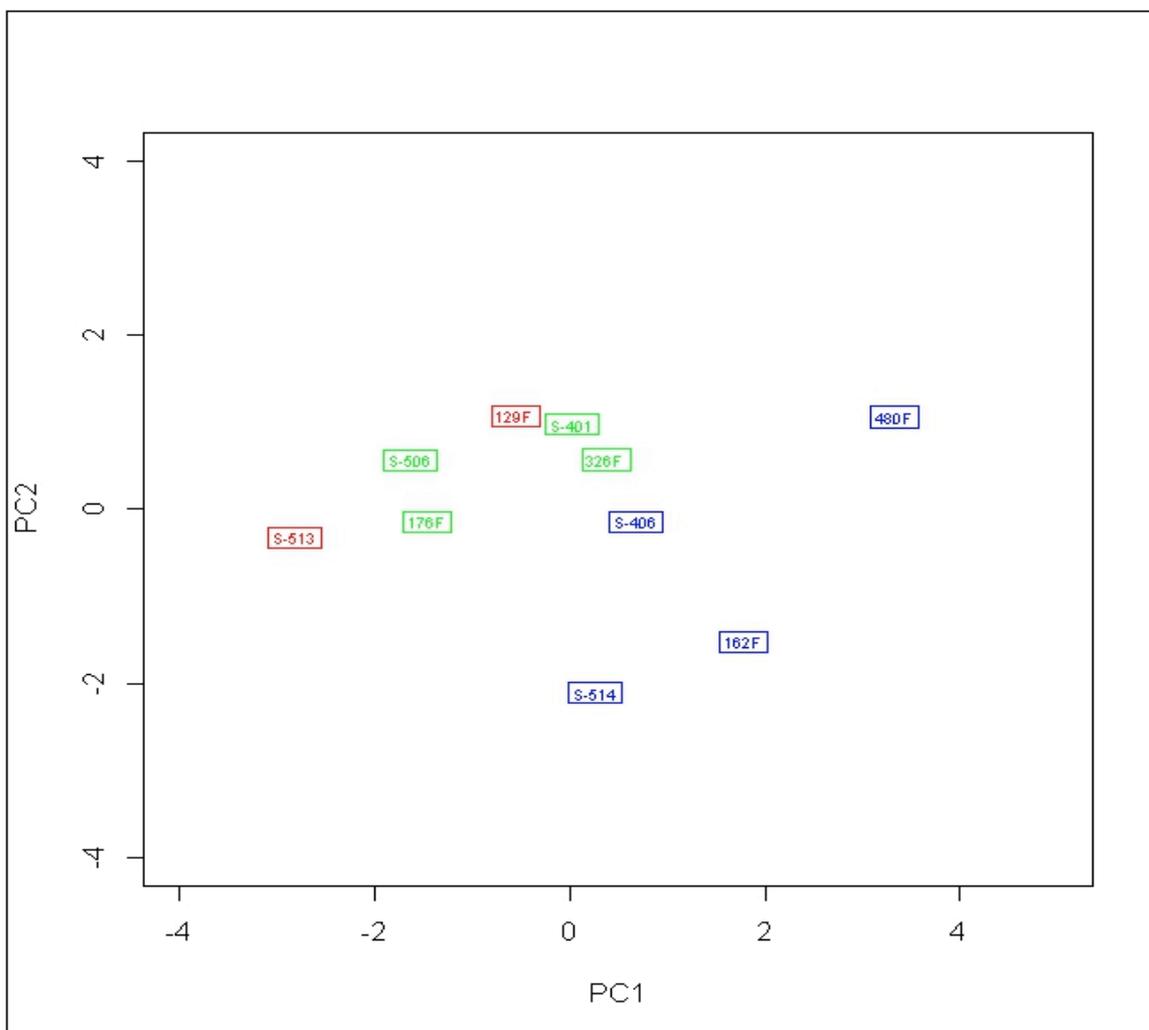


Figura 4.17. Distribución por análisis de componentes principales para 10 poblaciones de *Brachypodium* (*B. distachyon*, *B. stacei*, *B. hybridum*), mediante la evaluación de caracteres agromorfológicos [Tabla 4.2]. Los dos primeros componentes principales explican el 77,48 % de la varianza.

Se ha realizado un análisis de componentes principales con los tres tipos de marcadores utilizados en este estudio, lo que incluye marcadores ISSR, SSR y marcadores agromorfológicos.

La representación de los dos primeros componentes principales, se muestra en la Figura 4.18, donde se observa que las mayores diferencias entre poblaciones silvestres y domesticadas, se dan en las parejas 129F – S-513 (*B. stacei*) y 326F – S-401 (*B. hybridum*).

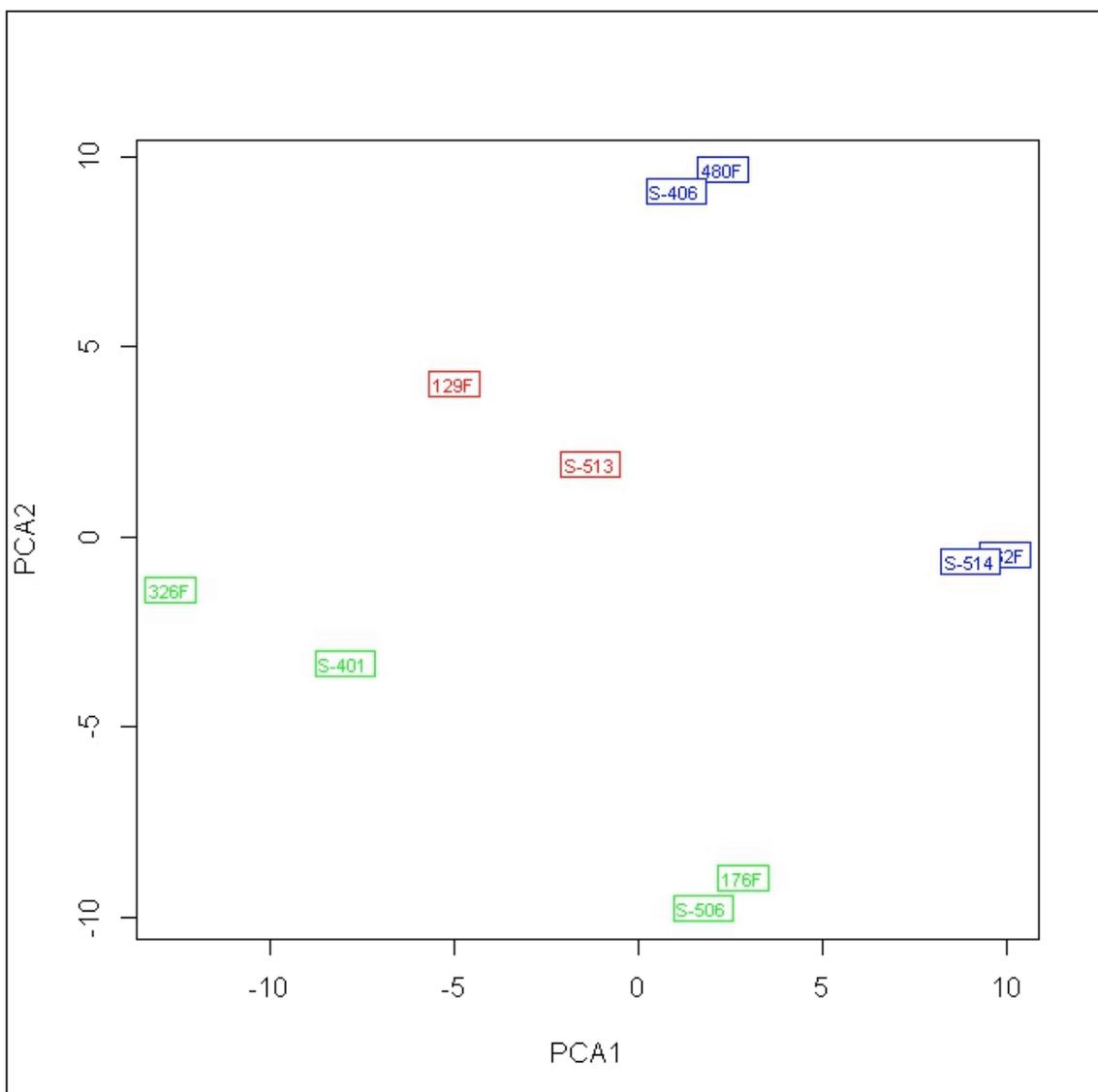


Figura 4.18. Distribución por análisis de componentes principales para 10 poblaciones de *Brachypodium* (*B. distachyon*, *B. stacei*, *B. hybridum*), incluyendo análisis con ISSR, SSR y datos morfo-agronómicos de campo.

5. DISCUSIÓN

5.1 CULTIVO Y DOMESTICACIÓN DE ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO *Brachypodium*

La domesticación "inconsciente" de especies vegetales silvestres en los albores de la Agricultura, posibilitó la obtención de cultivares primitivos formados por mezclas de genotipos que mostraban fenotipos de interés para los primeros agricultores (indehiscencia de las semillas, semillas más grandes, plantas más productivas etc.). Los cereales han sido de las primeras especies en ser domesticadas y permanecen hoy en día como una de las principales fuentes de la alimentación humana (Glémin y Bataillon 2009).

Actualmente, los avances conseguidos en diferentes ramas científicas, especialmente la Genética, la Biología Celular y la Biología Molecular, permiten desarrollar de forma más rápida y eficaz programas de mejora genética dirigidos a la obtención de variedades más productivas, tolerantes a estreses bióticos y abióticos, de mayor calidad, o con otras características demandadas por los consumidores. También sigue siendo de interés la domesticación de nuevas especies que puedan satisfacer nuevas necesidades de alimentación, o bien para otros usos como la descontaminación o la protección de suelos, mediante cubiertas vegetales, entre las que se incluyen especies pertenecientes a las gramíneas, leguminosas, o en algunos casos crucíferas.

En el caso concreto de las cubiertas vegetales, las leguminosas son capaces de aprovechar el nitrógeno atmosférico gracias a su asociación con las bacterias del género *Rhizobium*, actuando como abono verde y aportando gran parte del nitrógeno requerido por el cultivo; dentro de las especies más comunes empleadas como cubiertas se encuentran: la veza (*Vicia sativa*), yero (*V. ervilia*), la "moruna" (*V. articulata*), algarroba (*V. monantha*), guisantes forrajeros, habas, etc, (Guzmán and Foraster 2007). Por su parte, las crucíferas también son interesantes debido a su capacidad para bombear nutrientes, ya que poseen un sistema radicular muy potente. Dentro de éstas se encuentran especies como la colza (*Brassica napus*) o el rábano forrajero (*Raphanus raphanistrum*).

Así mismo, en suelos de secano las gramíneas presentan la ventaja de tener mayor densidad de cobertura del terreno, además de ser más persistentes durante las diferentes estaciones del año. Al ser especies que mayoritariamente inician su ciclo en invierno, conviven con el cultivo en una época de alta precipitación y escasa evapotranspiración y muchas de ellas cuentan con un sistema radicular muy desarrollado que favorece la infiltración del agua, permitiendo la descompactación en profundidad del suelo (Wolfe, 2000). Dentro de las especies de gramíneas utilizadas se pueden citar *Lolium perenne*, *Festuca arundinaceae*, *Secale cereale*, y también *Brachypodium distachyon* (Ruiz-Colmenero et al. 2012; Soler et al. 2004). Esta última especie, se ha adoptado recientemente como sistema modelo de los cereales cultivados de climas templados como el trigo, cebada, avena y centeno, habiéndose secuenciado el ecotipo Bd-21 (Vain 2011; IBI 2010). A lo largo de este trabajo se pretende destacar también su relevancia como un sistema útil para estudiar la domesticación de nuevas especies silvestres.

En el proceso de domesticación de una especie vegetal, se van a producir cambios, tanto morfológicos como fisiológicos que han sido estudiados en diferentes especies de gramíneas como el arroz (*Oriza sativa*), trigo duro y trigo panadero (*Triticum durum* y *T. aestivum*), maíz (*Zea mays*), cebada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*), centeno (*Secale cereale*), etc, (Fuller et al. 2009; Badr et al. 2000; Jones et al. 1998; Sencer and Hawkes 1980; Brown et al. 2009). Sin embargo, la complejidad tanto de su sistema genético como biológico, es una barrera limitante para su investigación. Por esta razón, *Brachypodium*, aunque no tiene una historia evolutiva tan amplia en cuanto a los procesos de selección y domesticación, es una buena alternativa para llevar a cabo este tipo de estudios. No obstante, y a pesar del gran número de trabajos que se han realizado en el género *Brachypodium*, hasta la fecha no hay ninguno enfocado específicamente a analizar los cambios que se producen durante el proceso de domesticación de estas especies.

5.2 PROTECCIÓN DEL SUELO MEDIANTE ESPECIES DE GRAMÍNEAS SILVESTRES

En España, la erosión del suelo alcanza valores alarmantes como consecuencia de las prácticas agrícolas y de las condiciones eco-geográficas (García et al. 2000). Es el caso de regiones del Sur de la Península como Andalucía, donde gran parte del terreno cultivable es utilizado para la explotación de especies leñosas, principalmente olivo, y en donde las pérdidas de suelo alcanza valores de más de 80 Tm por hectárea al año (Pastor et al. 1997). Las cubiertas vegetales vivas resultan eficaces para la protección del suelo, por el aumento en la retención superficial de agua de escorrentía, también mejoran su estructura (dado un mayor aporte de materia orgánica), a lo que hay que sumar el efecto mecánico de las raíces evitando la compactación y el incremento de la biomasa y de la actividad biológica benéfica del suelo, entre otras (Pastor et al. 2001).

A la vista de los graves problemas de erosión del suelo y desde hace varios años, en el Departamento de Medio Ambiente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), se han evaluado diferentes especies de gramíneas silvestres para su uso en la protección de los suelos que, estuvieran expuestos a erosión hídrica y eólica y en los que se cultivan especies leñosas. Tras los ensayos iniciales, algunas especies del género *Brachypodium* son las que mostraron las mejores perspectivas y con las que se ha continuado trabajando, ya que este género presenta unas características adaptativas y fisiológicas muy adecuadas para este tipo de terreno.

En concreto, el grupo dirigido por la Dra. Consuelo Soler ha llevado a cabo el estudio agrícola de una importante colección de poblaciones del género *Brachypodium* de origen silvestre, recolectadas en diversas expediciones en la Península Ibérica (Soler et al. 1997; Soler et al. 2004). Con ellas se ha dado inicio a un proceso de domesticación, cuya finalidad es alcanzar poblaciones homogéneas en el porte, precocidad y producción (García et al 2002; Soler et al. 2004). Parte del material obtenido se ha utilizado en el presente estudio y dos poblaciones S-514 (*B. distachyon*) y S-506 (*B.*

hybridum) se comercializan hoy en día como variedades 'Zulema' e 'Ibros' respectivamente, por la empresa de semillas Agrosa S.A., para su uso como cubiertas vegetales vivas.

5.3 DOMESTICACIÓN

La domesticación de las plantas se dio como consecuencia del cambio forzado, de un ambiente natural silvestre, a uno nuevo generalmente creado o gestionado por el hombre. Este cambio se acompaña también de modificaciones, muchas veces drásticas en la constitución genética de las poblaciones (Zohary, 2004). En general, las formas cultivadas tienen menor variabilidad genética total que las formas silvestres, incluyendo cambios cualitativos y aleatorios en el acervo genético.

Diversas adaptaciones morfológicas y fisiológicas en las gramíneas cultivadas actualmente, han surgido como resultado de la domesticación durante el desarrollo de la Agricultura, tras una selección gradual de las poblaciones silvestres en las que la variabilidad genética se reduce en muchas ocasiones, para favorecer características demandadas por el hombre. Cabe señalar que, tal como algunos autores predicen, en las especies autógamias, como es el caso de *Brachypodium*, la domesticación puede ocurrir de una manera relativamente más rápida y fácil en comparación con especies alógamas (Zohary and Hopf, 2000).

En el presente trabajo se han realizado dos estudios diferentes y a la vez complementarios, encaminados a conocer los cambios que se dan en el proceso de domesticación de *Brachypodium spp.* Por un lado se ha llevado a cabo un análisis agromorfológico comparando 26 poblaciones (13 silvestres y 13 poblaciones derivadas de ellas por selección masal), con un análisis más detallado en 7 parejas de estas poblaciones, y por otro lado, se ha llevado a cabo un análisis de marcadores moleculares de tipo ISSR y SSR en una selección de las poblaciones anteriores.

5.3.1 Estudio agromorfológico

Partiendo de estudios previos con diferentes gramíneas silvestres, se eligieron tres especies del género *Brachypodium* que mostraron una buena aptitud en relación con la protección de suelos susceptibles a la erosión. La selección posterior de plantas procedentes de diferentes poblaciones silvestres se enfocó hacia la obtención de líneas homogéneas en cuanto al porte, precocidad y producción. En este sentido cabe destacar que las tres especies de *Brachypodium* mostraron alturas de crecimiento diferentes entre sí, siendo *B. distachyon* la de menor tamaño, aunque resultó más compacta en cuanto a la ramificación y con un porte más erecto. Por otro lado, las plantas de las poblaciones de *B. stacei* y *B. hybridum*, presentaron mayor tamaño, de porte postrado y con tallos que crecen lateralmente cubriendo una gran superficie alrededor del eje de la planta, lo que fue especialmente notable en el caso de *B. hybridum*. Esta última característica resulta de gran interés en el caso del uso como cubierta vegetal.

El análisis genético comparado de las formas cultivadas y las formas silvestres de las mismas especies, puede aportar información de donde se han producido los eventos de domesticación, y si dicho proceso fue esencialmente único o se produjo más de una vez. Por ejemplo, en la cebada (*Hordeum vulgare ssp. vulgare*) se ha especulado que se produjo una doble domesticación, basándose en la presencia de genes diferentes que confieren un raquis tenaz a la cebada cultivada, apuntando a dos mutaciones diferentes y a dos momentos y lugares de domesticación (Zohary et al., 2012; Morrell and Clegg, 2007). Las primeras evidencias de tipo molecular indicaron que la cebada se domesticó una vez a partir de poblaciones del Creciente Fértil (Salamani et al. 2002). Sin embargo, estudios posteriores basados en el análisis filogenético molecular de cinco loci nucleares y dos caracteres morfológicos (granos vestidos o desnudos y dos o seis carreras), en una gran colección de accesiones de cebada, demostró que las variedades del Sur y Este de Asia son genéticamente distintas de las de Eurasia y el Norte de África (Saisho and Purugganan, 2007). Así, mediante el análisis de las frecuencias de haplotipos y de distribución en diferentes poblaciones del Este y del Oeste, se postuló la migración de la cebada a partir de dos domesticaciones diferentes, una en el Creciente Fértil y otra en la Meseta Iraní (Morrell and Clegg 2007).

En arroz (*Oriza sativa*), la historia de domesticación resulta más compleja, e incluso se debate hasta hoy día. Los estudios realizados empleando diferentes tipos de marcadores genéticos indican que las dos formas varietales de *Oriza sativa* (*índica* y *japónica*) surgieron de acervos genéticos diferentes a partir de un ancestro silvestre común *O. rufipogon*, dando lugar a varias domesticaciones independientes de *O. sativa*. De este modo se ha podido comprobar que, mediante introgresión, se transfirieron alelos claves para la domesticación entre diferentes acervos genéticos (Caicedo et al., 2007; Izawa et al., 2009; Kovach et al., 2007; Sang and Ge, 2007).

En nuestro estudio sobre la domesticación en *Brachypodium*, conocemos las poblaciones silvestres de partida, por lo que es posible su comparación con las poblaciones tras el proceso de domesticación, a pesar de que el número de generaciones en las que se ha llevado a cabo el proceso de selección ha sido pequeño (entre 7 y 10 campañas anuales).

5.3.2 Comparación entre poblaciones silvestres y líneas seleccionadas de *Brachypodium*

Para determinar los cambios agro-morfológicos producidos en el conjunto de poblaciones analizadas y su relación entre ejemplares silvestres y líneas en proceso de domesticación, es preciso considerar para cada población, el tiempo que han estado sometidas a presión de cultivo, así como la zona de procedencia de las poblaciones silvestres, puesto que ciertos cambios en la arquitectura de las plantas pueden desarrollarse más rápidamente en función de las adaptaciones medioambientales (Doust 2007).

En el conjunto de las 26 poblaciones estudiadas (13 silvestres + 13 derivadas), se ha observado que los caracteres: porte al ahijamiento, sección del tallo y color en el ahijamiento, no mostraron diferencias entre las líneas seleccionadas y sus poblaciones de origen. Sin embargo, si se observaron diferencias en los caracteres: altura de maduración y ahijamiento y peso de mil semillas.

Así, la selección y presión del cultivo, se ha visto reflejada principalmente en la diferencia de altura entre plantas silvestres y domesticadas que fue mayor en estas últimas. Por ejemplo, entre las parejas de poblaciones 480F – S403 (*B. distachyon*), se observó un aumento significativo en el tamaño de las plantas en las etapas de espigado y maduración, y lo mismo sucede en las parejas 129F – S513 (*B. stacei*) y para 365F – S402 (*B. hybridum*) (Tabla 4.2). En la Figura 5.1 se presenta una comparación entre las espigas de poblaciones silvestres y poblaciones correspondientes al último año de siembra. En la imagen se ilustran tres ejemplares de *Brachypodium* cada uno de ellos perteneciente a una de las tres especies analizadas.

Las principales gramíneas cultivadas (maíz, trigo, cebada, avena, centeno, arroz y sorgo), parecen compartir características primitivas similares, que se han seleccionado y que hacen referencia al tamaño y dispersión de las semillas y periodos de floración. Las gramíneas silvestres florecen en periodos cortos de tiempo y producen semillas pequeñas que se dispersan de forma natural, mientras que en las domesticadas la selección en la floración incluye periodos más largos, y produce semillas de mayor tamaño e indehiscentes que luego se utilizan en la siguiente plantación (Buckler et al., 2001). Así, respecto al aumento del tamaño de las semillas, se han mapeado QTLs en maíz, arroz y sorgo (Paterson et al., 1995; Peng et al., 2003; Gegas et al., 2010).



Figura 5.1. Comparación de espigas de *Brachypodium* en poblaciones silvestres (letra F) y domesticadas (Letra S), en *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*.

En la colección de *Brachypodium* analizada en este estudio, el incremento de tamaño no sólo se ha podido apreciar en la altura de las plantas, sino también en las semillas que se han ido obteniendo durante los diferentes años de siembra. Desde hace décadas diversos estudios han demostrado que el incremento en el tamaño del grano de cereales domesticados es resultado del aumento en el tamaño del endospermo, lo que garantiza a su vez un alto contenido en carbohidratos (Harlan et al., 1973).

Hands y Drea (2012) llevaron a cabo estudios del desarrollo de los granos de *Brachypodium* en el que determinaron que el endospermo de las poblaciones silvestres de *Brachypodium* analizadas son relativamente pobres en el contenido de almidón, con un 10% del peso total del grano, comparado con las semillas de trigo silvestre que poseen 35-40% y en cereales domesticados el contenido de almidón llega a valores del 50-70% del peso total del grano.

En relación al tamaño de los granos de *Brachypodium*, Vogel et al. (2009) encontraron un rango de 2,5 a 5,9 mg/semilla para líneas silvestres con diferente número de cromosomas y procedentes de varias áreas geográficas de Turquía, siendo el promedio para todas las poblaciones por ellos analizadas de 4,1 mg/semilla. En nuestro estudio, se estimó el peso de mil semillas para cada población con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas entre poblaciones silvestres y poblaciones en proceso de domesticación. El peso promedio de las líneas silvestres fue de 4,75 gr/mil semillas con un rango comprendido entre 2,72 gr y 7,69 gr/mil semillas, mientras que en las líneas domesticadas el promedio se incrementó a 5,46 gr/ mil semillas. Para ilustrar este hecho se puede tomar el ejemplo de las líneas 'Ibros' y 'Zulema' con respecto a las poblaciones silvestres de las que derivan, siendo evidente el incremento de peso en las semillas de las poblaciones sometidas al proceso de selección y domesticación (Figura 5.2).

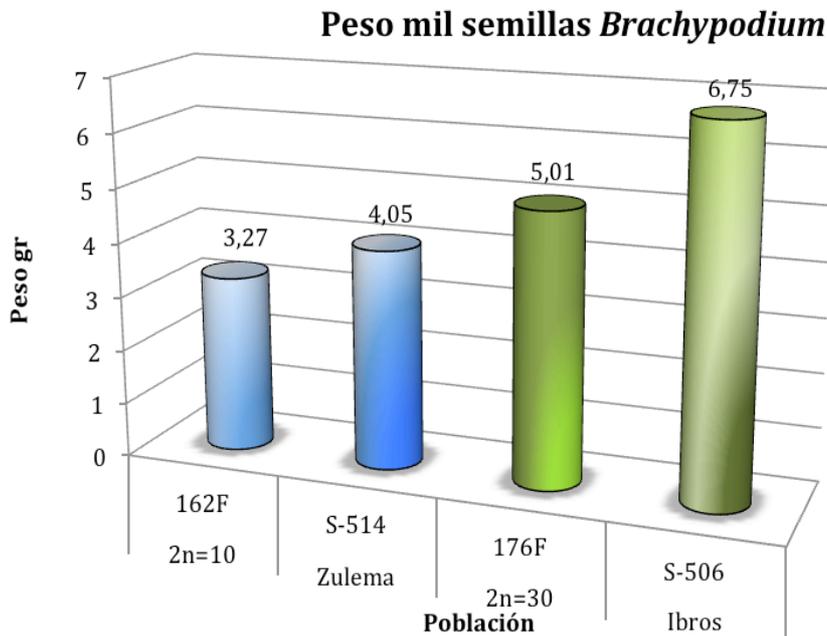


Figura 5.2. Gráfico peso de mil semillas para las poblaciones 'Zulema' (*B. distachyon* 2n=10) e 'Ibros' (*B. hybridum* 2n=30) con sus correspondientes poblaciones silvestres de origen.

El incremento de peso de las semillas de las líneas en proceso de domesticación, podría deberse a un aumento en el contenido de almidón de las semillas, tal como se ha visto en los trabajos de los autores anteriormente comentados, aunque en el presente estudio, al no haberse realizado un estudio del contenido de almidón, no se puede confirmar esta hipótesis.

En cualquier caso, la obtención de semillas de mayor tamaño resulta beneficiosa para conseguir poblaciones que brinden mayor densidad de cobertura en el terreno en que se desarrollan, lo cual se convierte en un factor relevante para su aplicación como cubiertas vegetales vivas.

Con el fin de llevar a cabo un análisis más preciso de algunos caracteres agromorfológicos, se eligieron un total de 7 parejas de poblaciones silvestres y en proceso de domesticación (3 de *B. distachyon* y 4 de *B. hybridum*) en las que se analizaron 14 características agromorfológicas (Tabla 4.1). De nuevo, se observó que algunos caracteres no variaron (color de la hoja, porte al ahijamiento, tipo de inflorescencia, relación lemna/arista, etc.). Sin embargo, sí que hubo diferencias en relación a la altura de maduración, altura de la planta

durante el espigado, longitud de la inflorescencia, longitud de la espiguilla terminal, longitud de la arista, longitud de la gluma longitud entre lema y arista y el peso de mil semillas, resaltando nuevamente los efectos más visibles de la selección en el aumento de estos caracteres en las plantas cultivadas.

Las inflorescencias en las gramíneas presentan patrones muy variados. Cabe señalar que, la domesticación de los cereales se encuentra estrechamente vinculada con los cambios morfológicos de las inflorescencias. En algunas especies se busca reducir el tamaño de las ramas para obtener inflorescencias de mayor tamaño, especialmente en maíz y sorgo. En otras como el trigo, cebada y arroz se intenta obtener un número alto de inflorescencias para así conseguir tallos más densos que garanticen obtener espigas más compactas con flores fértiles. En maíz se han caracterizado un grupo de genes responsables de la variación natural de las inflorescencias. Se trata de los genes *ramosa 1*, *2* y *3* (*Zm-ra 1*, *Zm-ra 2* y *Zm-ra 3*), que controlan la transición entre ramas largas o cortas en las inflorescencias (Vollbrecht et al., 2005; Bortiri et al., 2006). También se han encontrado relaciones ortólogas de este grupo genes entre maíz, sorgo y *Miscanthus* (Brown et al., 2009, Bortiri et al., 2006), sin embargo, su identificación en otras gramíneas como en arroz, no ha sido posible (Vollbrecht et al., 2005).

En *Brachypodium*, el tamaño de las inflorescencias está estrechamente vinculado con la especie de que se trate. De este modo, las plantas de *B. hybridum*, exhiben inflorescencias de mayor tamaño en comparación con *B. distachyon* y *B. stacei*, cuyos tamaños promedio fueron de 7,53 cm, 6,18 cm y 6,97 cm respectivamente. Al comparar las líneas domesticadas y sus correspondientes poblaciones silvestres, los tamaños de las inflorescencias varían entre 6,04 cm y 6,33 cm para poblaciones *B. distachyon*, mientras que en *B. hybridum* el promedio va desde 6,49 cm a 8,58 cm, siendo en todos los casos mayor el tamaño de los ejemplares domesticados (Figura 5.2). Catalán et al. (2011) encontraron que el tamaño de las inflorescencias de poblaciones silvestres para citotipos $2n=10$ fue de 3,25 cm, mientras que para los citotipos con $2n=20$ y $2n=30$, los tamaños fueron de 6,12 cm y 3,93 cm respectivamente. En contraste con los resultados descritos por Catalán et al. (2011), las poblaciones que se han analizado en este trabajo, presentan tamaños mayores tanto en las poblaciones silvestres como en sus respectivas líneas en proceso de domesticación. Otros autores también han hecho referencia a las diferencias

morfológicas existentes entre las tres especies de *Brachypodium*, como es caso del tamaño de las inflorescencias, número de espigas o el eje de disposición de las espigas con el tallo central. (Vogel et al., 2009; Draper et al. , 2001; Catalán et al., 2012).

Los cambios morfo-agronómicos exhibidos por las poblaciones que se han analizado, y que se encuentran en proceso de domesticación, puede resumirse en aumento en el tamaño de las plantas, semillas e inflorescencias y reducción en los días de desarrollo.

El tiempo de floración también ha sido seleccionado en la mayoría de los cereales. Los periodos de floración en gramíneas silvestres se transformaron en las domesticadas, para que la longitud del día no tuviese influencia en la floración (Buckler et al., 2001). Las fechas de inicio de los periodos de floración es un criterio importante para la adaptación geográfica (regional) de los cereales.

El control de la fecha de inicio de floración es crítica para el éxito reproductivo, y su mayor impacto se ha demostrado en el rendimiento de producción de granos en la familia *Triticeae*. Así, los progenitores silvestres de los cereales domesticados, están bien adaptados para desarrollarse en las condiciones medioambientales del Creciente Fértil. Sin embargo, durante los procesos de la domesticación y la expansión geográfica de la agricultura, sufrieron nuevos procesos de selección y adaptación. Un evento clave fue la selección de variedades de primavera que pueden ser sembradas después del invierno. Éstas generalmente carecen de requerimientos de vernalización, y muestran diferente respuesta en relación a la longitud del día. Reducir la respuesta al fotoperiodo es importante para especies que crecen en Europa y Norte América, donde las estaciones son largas. Los estudios realizados por Peng et al. (2003) han permitido la identificación de cuatro QTLs, que están implicados en la determinación de los periodos de floración en las gramíneas. Así, el alelo silvestre para un QTL localizado en el cromosoma 5A incrementa el valor en los periodos de floración de *T. dicoccoides*, siendo responsable de una floración tardía, mientras que los alelos silvestres en los cromosomas 2A, 4B y 6B permite acelerar la época de floración (Peng et al., 2003).

En su uso como cubiertas vegetales vivas sobre suelos de secano (olivar), *Brachypodium* se siembra en otoño, antes de que se produzcan las lluvias típicas de esta estación. De esta manera, la cubierta crecerá durante el otoño-invierno (estación fría y lluviosa), favoreciendo la infiltración de agua sobre el terreno. Posteriormente, durante la primavera y el verano, se dejan sobre la superficie del terreno los residuos vegetales secos que proceden de la siega, reduciendo así la pérdida de agua por evapotranspiración y además, brindando protección contra la erosión en posteriores eventos de lluvia.

En nuestros estudios, un ejemplo de la reducción en los días de desarrollo entre poblaciones en proceso de domesticación puede apreciarse más claramente en las variedades comerciales 'Zulema' (*B. distachyon*) e 'Ibros' (*B. hybridum*). En la Figura 5.3, se hace una comparación entre los días del desarrollo en campo de las poblaciones silvestres y sus líneas derivadas (en este caso las variedades comerciales ya mencionadas). Así, la diferencia más notable se aprecia en una reducción de los días de desarrollo desde la siembra hasta el espigado, y consecuentemente desde el espigado hasta alcanzar el 50% de la maduración. Sin embargo, no podemos atribuir esta disminución de los días de desarrollo en campo directamente con el fotoperiodo, ya que habría que considerar otros factores como la temperatura o disponibilidad de agua sobre el terreno. Por otra parte, este comportamiento se analizó también en plantas que se desarrollaron en invernadero y fitotrón, donde se mantuvo constante el fotoperiodo a 16 horas luz, en este caso las poblaciones silvestres y sus líneas derivadas para domesticaciones, presentaron periodos similares de floración y desarrollo.

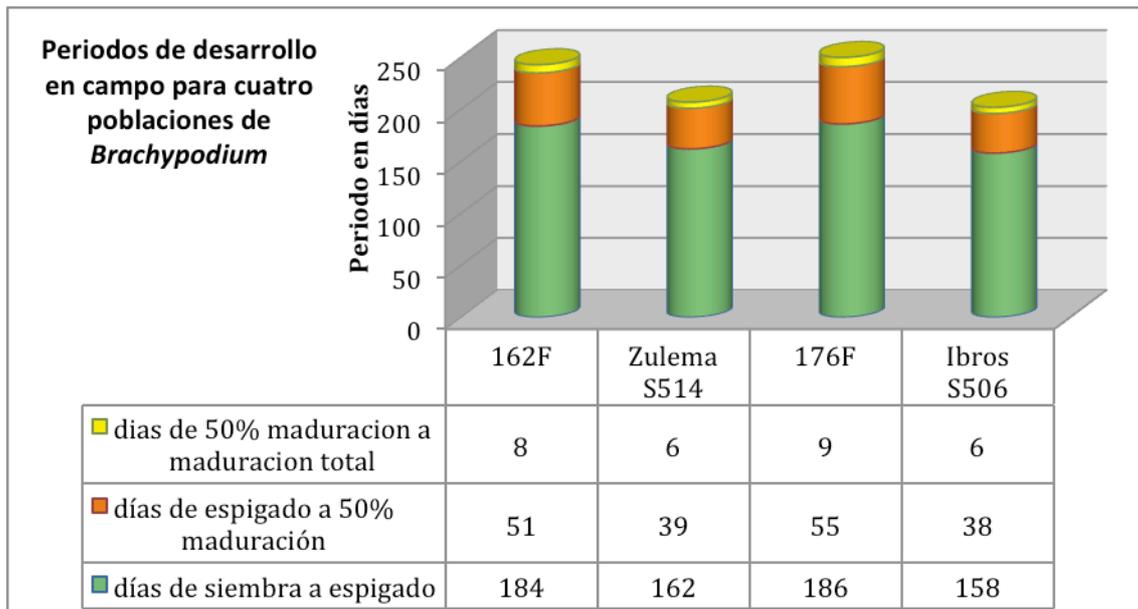


Figura 5.3. Comparación tiempo de desarrollo para las poblaciones comerciales domesticadas 'Zulema' (*B. distachyon*) e 'Ibros' (*B. hybridum*) con su respectiva población silvestre de origen.

5.3.3 ¿Cuándo se alcanza la domesticación?

De acuerdo con la genética de poblaciones, el proceso de domesticación puede considerarse completado cuando los "alelos de domesticación" se han fijado en una población (Hone and Heun 2009). En poblaciones autógamas la probabilidad de fijación de un alelo se determina mediante la aplicación de $\sqrt{s/2N}$, donde s es el coeficiente de selección y N el tamaño de la población. En un contexto simpátrico la autofecundación protege mejor del flujo genético desde las poblaciones silvestres, por ello la domesticación es teóricamente más fácil que ocurra en especies autógamas. En gramíneas, de 23 especies domesticadas, 16 son autógamas, 2 tienen un sistema mixto de polinización y cinco son alógamas (Glémin and Bataillon, 2009)

Así pues, el proceso de domesticación, dependiendo del tipo de especie puede ser largo o corto y de igual manera, está fuertemente influenciado por el tipo de selección en cuanto a las características que se desean obtener en beneficio del agricultor.

Por otra parte, mediante los estudios de domesticación es posible evaluar mecanismos de regulación en las plantas, algunos de los cuales pueden dar lugar a procesos adaptación a cambios medioambientales, e incluso a eventos de especiación (Dvorak and Akhunov 2005). Esta investigación es más fácil si se conoce la secuencia genómica de la especie de interés, puesto que permite el seguimiento de alteraciones genómicas o de genes específicos que influyen en la de domesticación. En el caso de *Brachypodium* la publicación del genoma completo de la especie *B. distachyon* (IBI 2010) es una herramienta muy valiosa para fortalecer este tipo de estudios en investigaciones futuras, permitiendo así ampliar el conocimiento de diversas funciones genéticas y de regulación de genes en las gramíneas.

Centrándonos en el proceso de domesticación que se ha pretendido evaluar a lo largo de esta tesis, cabe señalar que tal como algunos autores predicen, en las especies autógamias, como es el caso de *Brachypodium*, la domesticación puede ocurrir de una manera relativamente más rápida y fácil en comparación con especies alógamas (Zohary and Hopf 2000). Sin embargo, esto no es una regla que se pueda aplicar a todas las gramíneas, puesto que las gramíneas en general presentan sistemas muy variados de cruzamiento según la especie de que se trate (Glémin and Bataillon 2009).

En este contexto, hay que señalar que las líneas candidatas a domesticación que forman parte de este trabajo, se encuentran en una fase temprana de este proceso y que hasta la fecha, transcurridos entre 7 a 10 años de cultivo anual, se han obtenido resultados favorables en la selección de las características deseables para el uso de cubiertas vegetales, como es la obtención de poblaciones homogéneas cuanto al porte y producción.

Los efectos de la selección, de las poblaciones descritas en este trabajo, se han evaluado también genéticamente mediante el estudio de marcadores moleculares que nos han permitido inferir los cambios sucedidos entre poblaciones silvestres y sus correspondientes líneas domesticadas. Estos resultados se comentan en los siguientes apartados.

5.3.4 Aplicación de los marcadores moleculares SSR, ISSR y marcadores morfoagronómicos en las poblaciones analizadas

Actualmente, los cereales se encuentran en el eje principal de programas intensivos de mejora, utilizándose múltiples tipos de herramientas biotecnológicas, entre las que se incluye la aplicación y desarrollo de marcadores moleculares y la identificación de genes implicados en características de interés agronómico (Paterson et al., 2005). Los avances en Biología Molecular están permitiendo la selección asistida por marcadores moleculares, así como su asociación con características de interés, comparación entre diversos genomas y la detección de secuencias ortólogas entre diferentes especies vegetales como las gramíneas, comprobándose que hay un alto nivel de sintenia entre diferentes especies (Devos 2005).

En el caso concreto de *Brachypodium*, se han empleado un gran número técnicas moleculares que han permitido incrementar cada vez más el conocimiento biológico y genético del género, dando mayor énfasis a la especie *B. distachyon*, con investigaciones que avanzan muy rápidamente, desde su postulación como modelo biológico de las gramíneas (Draper et al., 2001). Estos estudios incluyen la obtención de librerías de cDNA, librerías BAC, una amplia colección de EST, mapas de ligamiento genético de alta resolución, mapas físicos, fuentes bioinformáticas y la secuenciación completa de su genoma (Vogel et al 2009; IBI 2010).

A todos estos estudios se le unen los del presente trabajo, con el uso de marcadores moleculares de tipo SSR, ISSR y marcadores morfoagronómicos para la detección de variaciones moleculares y fenotípicas en un grupo de poblaciones silvestres de *Brachypodium*, que han formado parte de un programa de selección y domesticación, mediante cultivos anuales a lo largo de distintos periodos de tiempo, estando la selección llevada a cabo en estas plantas dirigida a alcanzar homogeneidad en porte, tamaño y desarrollo de las plantas.

5.4 MARCADORES MOLECULARES

El análisis molecular de secuencias de genes concretos o de secuencias anónimas, ha sido llevado a cabo en el estudio de variedades silvestres, para establecer el centro de origen de domesticación de una especie determinada. Así, Ren et al. (2013) hicieron un estudio en el que se establece la región del Tibet como posible centro de domesticación de la cebada cultivada en China (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) a partir de su ancestro silvestre (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*). Este estudio se basó en análisis del gen *Nam-1* e incluyó un total de 103 accesiones de cebada con ejemplares silvestres y cultivados de diversas regiones asiáticas. Los resultados de esta investigación fueron comparados también con estudios previamente realizados por Wang et al. (2009) en los que se compararon poblaciones silvestres de cebada del Tibet y Oriente Medio, dado que este último se ha establecido siempre como el centro de origen de la cebada cultivada. En este caso Wang et al. (2009) utilizaron 10 cebadores ISSR, que permitieron amplificar 91 fragmentos, con 81% de polimorfismos para las poblaciones del Tibet y 80,49% de polimorfismo para las poblaciones del Medio Oriente. Así mismo, se emplearon 11 parejas de cebadores para analizar SSR con los que se obtuvieron 100 variantes alélicas para las poblaciones del Tibet y 77 bandas polimórficas para las del Medio Oriente, con lo cual, las poblaciones silvestres de cebada del Tibet presentaban mayor diversidad genética en comparación con aquellas del Medio Oriente, planteando de esta manera nuevas evidencias para la teoría de un nuevo centro de domesticación de la cebada.

En nuestro estudio se han empleado 16 cebadores ISSR con los que se han detectado 2.378 fragmentos polimórficos para 26 poblaciones de *Brachypodium* en las que la mitad incluyen ejemplares silvestres y la otra mitad domesticados. Por cada cebador ISSR se obtuvo en promedio de 148,62 fragmentos amplificados con porcentajes de 40,45% fragmentos para *B. distachyon*; 6,56% para *B. stacei* y 52,99% para *B. hybridum*.

En cuanto a la pérdida de diversidad entre las poblaciones silvestres y domesticadas, se determinó una reducción de fragmentos para las líneas domesticadas de 3,81 % en *B. distachyon*, 6, 81 % en *B. stacei* y 4,05 % en *B. hybridum* (Tabla 4.7).

Respecto a los marcadores SSR, se utilizaron 11 parejas de cebadores para el estudio de 10 poblaciones, cinco silvestres y cinco en proceso de domesticación, obteniéndose 42 alelos polimórficos. Así, la diferencia de diversidad entre poblaciones silvestres y domesticadas implica una reducción de alelos para éstas últimas en valores de 9 % para las poblaciones de *B. distachyon*, 18,18 % para *B. stacei* y 9 % para *B. hybridum*. Cabe también señalar, tal como se comentó en el apartado de resultados, que en algunas poblaciones silvestres se detectaron fragmentos que no fueron posteriormente identificados en sus correspondientes líneas de domesticación, aun así el porcentaje de éstos fue siempre inferior en relación con la pérdida de alelos observada en las poblaciones en proceso de domesticación. Este fenómeno puede explicarse si la frecuencia de estos fragmentos en las poblaciones silvestres es muy baja, lo que dificulta su identificación.

5.4.1 Distancia genética

Según Salamini (2002), los estudios de distancia genética, son de gran importancia ya que estiman, empleando diferentes algoritmos, parentescos entre miembros más o menos relacionados. En nuestro estudio de marcadores ISSR se han empleado algoritmos que tienen en cuenta la presencia-ausencia de los fragmentos analizados. Los resultados obtenidos se reflejan en un dendrograma que muestra las agrupaciones de las poblaciones analizadas. Así, en cuanto a las 26 poblaciones estudiadas con ISSR la distancia genética entre las poblaciones de *B. stacei* y *B. hybridum* (Figura 4.8) es menor en comparación con las poblaciones de *B. distachyon*. Sin embargo, en el estudio de los marcadores SSR de las 10 poblaciones, hay una tendencia al agrupamiento de las poblaciones silvestres por un lado y las domesticadas por otro (Figura 4.12). En este sentido, podría decirse que la variabilidad que se explora con cada uno de estos marcadores es diferente, aunque hay que subrayar que en nuestro estudio los marcadores ISSR, nos han brindado más información al ser mucho mayor el número de fragmentos polimórficos analizados.

5.5 Influencia del origen geográfico en relación a las adaptaciones genéticas y fenotípicas de las poblaciones evaluadas

La distribución geográfica de *Brachypodium* abarca un amplio rango de regiones, incluyendo zonas cálidas de interior, áreas de costa fría y regiones montañosas, lo que permite pensar en la existencia de una amplia diversidad genotípica entre sus poblaciones (Vogel et al., 2009). El rango natural de desarrollo de *Brachypodium* se centra alrededor del Mediterráneo y se extiende por el Norte de Europa hasta el Sur de la India (Garvin et al 2008). La Península Ibérica se encuentra en el límite occidental de crecimiento de *Brachypodium* y de acuerdo con Stebbins (1957, 1975), las especies autógamas tienen a presentar una mayor diversidad en los límites de distribución, lo que explicaría la alta diversidad encontrada en colecciones de estas especies recolectadas en la Península Ibérica, para diferentes marcadores como proteínas de reserva del endospermo (Hammami et al., 2011) y marcadores moleculares de tipo microsatélite e intermicrosatélite (Hammami et al., 2014).

Previamente, Vogel et al. (2009), determinaron la diversidad de poblaciones de *Brachypodium distachyon* procedentes de Turquía mediante el análisis con 43 parejas de cebadores para SSR. Trás el análisis de 187 líneas diploides de *Brachypodium* procedentes de 56 zonas diferentes de Turquía, encontraron una amplia diversidad fenotípica y genotípica. Algunas de estas poblaciones fueron seleccionadas para analizar su posterior desarrollo y crecimiento en condiciones de laboratorio, donde se valoraron además características fenotípicas de las plantas, como el tamaño de la semilla, requerimientos de vernalización, arquitectura de la inflorescencia y presencia de vellosidades. A partir de este estudio, se observó un alto grado de homogeneidad entre las plantas desarrolladas en el hábitat silvestre y en condiciones de laboratorio, atribuyendo principalmente esta poca variación a la autogamia presente en este tipo de plantas; de esta manera, los autores destacan que es posible mantener líneas silvestres puras en condiciones de laboratorio.

Según Doust (2007), el origen geográfico de las plantas en el que se inicia la selección de fenotipos de interés, y el número de veces en el que se repite el proceso de siembra bajo el control del hombre, es esencial para

determinar la domesticación efectiva de un cultivo, convirtiéndolo en un sistema propio de la agricultura.

En nuestro estudio, cada una de las poblaciones silvestres, presentan un origen geográfico diferente, tal y cómo se indica en la Tabla 3.1. El análisis de componentes principales llevado a cabo para cada uno de los tipos de marcadores (ISSR, SSR, agro-morfológicos) por separado y en conjunto ha servido para mostrar el grado de diferencia que muestran las poblaciones domesticadas respecto a las silvestres de las que proceden, junto con su lugar de procedencia. Así, cuando se analizan los ISSR en el total de las 26 poblaciones (13 silvestres + 13 domesticadas) las que más distanciamiento genético muestran tras el proceso de selección son las parejas de *B. distachyon* 395F - S403 y 480F – S406 y las parejas de *B. hybridum* 260F – S502 y 326F – S401. Las formas silvestres de estas poblaciones proceden de Jaén (395F), Madrid (480F), Málaga (260F) y Badajoz (326F) respectivamente.

En cuanto a los análisis con SSR, se redujo a 10 el número de poblaciones evaluadas. De ellas, las que más diferencia presentaron entre ejemplares silvestres y los domesticados, han sido nuevamente la pareja 326F – S401 (*B. hybridum*) y se incluye la pareja 129F – S513 (*B. stacei*) procedente de Granada.

Si sólo se tienen en cuenta los cambios agro-morfológicos presentados entre poblaciones silvestres y domesticadas, las mayores diferencias fenotípicas se observaron para las poblaciones 480F –S406 (*B. distachyon*), anteriormente mencionada entre las que presentaron cambios moleculares detectados con SSR y la pareja 129F - S513 (*B. hybridum*) descrita también entre las más distantes cuando se emplean los marcadores de tipo SSR.

Finalmente, si se tienen en cuenta simultáneamente los tres tipos de marcadores (Figura 4.18), se observa que las parejas 129F – S513 (*B. stacei*) y 326F – S401 (*B. hybridum*), son las que han presentado mayores cambios tanto a nivel fenotípico como molecular, tras ser sometidas a una siembra intensiva en parcelas experimentales de campo. Las formas silvestres de estas poblaciones proceden de las provincias de Granada y Badajoz respectivamente, con periodos de sometimiento a presión de cultivo por 7 años para las parejas de poblaciones 129F - S513 y 9 años para 326F - S401.

Respecto a la influencia del origen geográfico en la reducción de variabilidad encontrada en las líneas de domesticación, no ha sido posible establecer una relación concreta, pues hubiera sido necesario hacer un estudio más amplio de poblaciones silvestres y sus respectivas líneas derivadas. Lo que sí es posible deducir es que las poblaciones de *B. distachyon* son las que muestran diferencias menores entre las silvestres y las domesticadas, debido a la menor variabilidad inicial que presentan las poblaciones naturales, mientras que las poblaciones de *B. stacei* y de *B. hybridum* mostrarían inicialmente una mayor variabilidad y la selección ha dado lugar a una reducción de la misma lo que hace que, en el análisis de componentes principales, aparezcan más distantes.

5.6 Evaluación de poblaciones estudiadas para su uso como cubiertas vegetales vivas

Considerando el interés de las poblaciones de *Brachypodium spp* que forman parte de este trabajo para su posterior uso como cubiertas vegetales vivas, se ha tomado como referencia la experiencia y resultados obtenidos con las variedades 'Zulema' (*B. distachyon*) e 'Ibros' (*B. hybridum*). Para este fin, se han tenido en cuenta los resultados alcanzados en las parcelas experimentales de la Finca "La Canaleja" en las que se llevaron a cabo siembras a una densidad de 150 – 200 semillas / m² con 3 o 4 repeticiones, valorando características como facilidad de implantación, tipo y grado de cobertura a partir del ahijamiento, cantidad de biomasa, altura de las plantas y porte en la maduración de las inflorescencias (característica que resulta muy importante para la recolección mecánica de las semillas), y fecha de la maduración de las plantas.

Así, de las tres especies estudiadas se ha podido apreciar que en cuanto al tipo de cobertura sobre el terreno, las poblaciones de *B. stacei* y *B. hybridum* debido a su porte semipostrado pueden resultar muy favorables para la protección del suelo contra la erosión. Por su parte *B. distachyon* generalmente mantiene un porte más erecto durante las diferentes etapas del desarrollo de las plantas y también desempeña una buena protección del suelo, pero se

destaca que para su uso en cubiertas vegetales es necesaria mayor cantidad de semillas para alcanzar una cobertura apropiada por m², esta diferencia se puede observar en el estudio de caracteres morfo-agronómicos realizado. De este modo cabe resaltar que con la selección e inducción a la domesticación del material que forma parte de este estudio, la obtención de semillas de mayor tamaño resulta favorable para alcanzar en un futuro la comercialización de nuevas líneas. Del mismo modo, obtener plantas de mayor tamaño es un factor relevante para la aplicación de estos materiales en cubiertas vegetales ya que como se mencionó anteriormente se ve favorecida la recolección mecánica de las semillas, lo que representa una ventaja en las zonas de cultivo del olivar que comprende grandes hectáreas.

Por último, cabe destacar la adaptación de dicho material a zonas geográficas distintas a las de sus progenitores silvestres. En este sentido hay que resaltar que de acuerdo con las prospecciones que se llevaron a cabo años atrás, por investigadores del Departamento de Medio Ambiente del INIA, se han hallado un mayor número de ejemplares de poblaciones pertenecientes a *B. hybridum*, las cuales suelen presentar una distribución geográfica más amplia, mientras que las poblaciones de *B. distachyon* suelen tener una dispersión más restringida. Por su parte, las poblaciones de *B. stacei*, suelen ser menos frecuentes en diversas zonas de la península e incluso en las colecciones públicas de *Brachypodium* existentes (USDA - USA, Universidad de Aberystwyth - UK y Universidad de Sabanci - Turquía) se registran menor cantidad de accesiones de dicha especie en comparación con *B. distachyon* y *B. stacei*.

6. CONCLUSIONES

El presente trabajo ha consistido en el estudio de los cambios que se producen durante el proceso de domesticación de poblaciones silvestres de *Brachypodium spp*, y que afectan tanto a caracteres agromorfológicos como a marcadores moleculares. Para ello se ha partido de 13 poblaciones silvestres de *Brachypodium spp*, que se han ido seleccionado en siembras consecutivas a lo largo de un periodo de entre 7 y 9 años. En el estudio se han incluido cinco parejas de la especie *B. distachyon*, una pareja de *B. stacei* y siete parejas de *B. hybridum*. En el estudio comparado entre las poblaciones silvestres y las líneas en proceso de domesticación, se han incluido 18 descriptores agromorfológicos y también marcadores moleculares de tipo intermicrosatélites (ISSR) y de tipo microsatélites (SSR).

Las conclusiones que se obtienen son:

1. El análisis de marcadores agromorfológicos en las poblaciones silvestres y en las líneas en proceso de domesticación, permite deducir que el proceso de selección al que se han visto sometidas estas últimas, induce cambios característicos de la domesticación de las especies vegetales como son: el aumento en altura de las plantas, mayor tamaño en las inflorescencias y de las semillas, y también, en algunos casos, disminución en los días de desarrollo.
2. Durante el proceso de domesticación, algunas características fenotípicas tales como: porte de las plantas, color de la hoja durante el ahijamiento y la sección del tallo durante la maduración, permanecen constantes en las poblaciones silvestres y en las líneas derivadas de ellas.
3. El aumento de altura observado en las poblaciones en proceso de domesticación fue mayor en las poblaciones de *B. stacei*, seguido *B. distachyon* y de *B. hybridum*.
4. El estudio con marcadores moleculares de tipo ISSR en el conjunto de poblaciones silvestres y en proceso de domesticación, ha permitido la identificación de 2.378 fragmentos polimórficos. El número de fragmentos detectados en las poblaciones en proceso de domesticación fue inferior al de las poblaciones silvestres de las

CONCLUSIONES

- que derivan, lo que implica una disminución de la variabilidad. Sin embargo, se han identificado algunos fragmentos ISSR en las líneas en proceso de domesticación que no se observaron en las silvestres, probablemente debido a su baja frecuencia en estas últimas.
5. El análisis de componentes principales y de distancias genéticas mediante los ISSR permite separar claramente las tres especies de *Brachypodium*, estando *B. stacei* y *B. hybridum* más próximas entre sí que con *B. distachyon*. Además, se observa una mayor proximidad entre las poblaciones silvestres y las líneas derivadas de ellas.
 6. El estudio con marcadores de tipo SSR, en una selección de 10 poblaciones (5 silvestres y 5 líneas en proceso de domesticación), permitió identificar un total de 42 fragmentos polimórficos. Al igual que en el caso del estudio con ISSR, se observó una menor variabilidad en las líneas en proceso de domesticación con respecto a sus poblaciones de origen. El 25% de los SSR fueron específicos de *B. hybridum* y el 11,1 % de *B. stacei* y de *B. distachyon*, respectivamente.
 7. De las cinco parejas de poblaciones analizadas con SSR, se pudo comprobar que las poblaciones 129F – S-513 (*B. stacei*) y 326F – S-401 (*B. hybridum*) son las que más diferencias presentan entre los ejemplares silvestres y sus respectivas líneas derivadas.
 8. El análisis conjunto de los caracteres agromorfológicos y de los marcadores moleculares permite concluir que, de las 5 parejas de poblaciones estudiadas, 129F – S-513 (*B. stacei*) y 326F – S-401 (*B. hybridum*), son las que muestran una mayor diversidad. Las poblaciones de *B. distachyon* mostraron una menor diversidad y una mayor semejanza entre poblaciones silvestres y las líneas en proceso de domesticación.
 9. En relación a la utilización de las poblaciones de *Brachypodium*, para su posterior uso como cubiertas vegetales vivas en la protección de suelos de secano, se puede concluir que las poblaciones de *B. stacei* y *B. hybridum*, al presentar mayor tamaño

y un porte semiprostrado durante las etapas de espigado y maduración, pueden resultar muy favorables tanto para la cobertura del suelo como para la recolección mecánica de sus semillas. Además, la amplia distribución ecogeográfica de estas dos especies facilitaría su adaptación a diferentes zonas geográficas. Por su parte, *B. distachyon* también es un buen candidato para su uso como cubiertas vegetales vivas, aunque el tamaño de las plantas es menor y requiere mayor cantidad de semillas para conseguir una buena cobertura del terreno. Por otro lado, la distribución geográfica de esta especie es más restringida, lo que hace suponer que su uso en diferentes zonas también lo sea.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Azhaguvel P, Li W, Rudd J.C, Gill B.S, Michels G.J. Jr, Weng Y. 2009.** Aphid feeding response and microsatellite-based genetic diversity among diploid *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv accesions. *Plant Genet Res. Characterization and Utilization* **7**: 72-79.
- Badr A, Muller K, Schafer-Pregl R, El Rabey H, Effgen S, Ibrahim HH, Pozzi C, Rohde W, Salamini F 2000.** On the origin and domestication history of Barley (*Hordeum vulgare*) *Mol Biol Evol* **17**:499–510
- Bortiri E, Chuck G, Vollbrecht E, Rocheford T, Martienssen R, and Hake, S. 2006.** *Ramosa2* encodes a lateral organ boundary domain protein that determines the fate of stem cells in branch meristems of maize. *Plant Cell* **18**: 574–585
- Brown T.A., Jones M.K., Powell W., Allaby R.G. 2009.** The complex origins of domesticated crops in the Fertile Crescent. *Trends Ecol. Evol.* **24**: 103–109
- Buckler E. D., IV; Thornsberry J. M; Kresovich S. 2001.** Molecular Diversity, Structure and Domestication of Grasses. *Genet. Res.* **77**:213–218.
- Caicedo AL, Williamson SH, Hernandez RD, Boyko A, Fledel-Alon A, et al. 2007.** Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice. *PLoS Genet* **3**: 1745–1756. doi:10.1371/journal.pgen.0030163.
- Catalán P, Olmstead RG. 2000.** Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P. Beauv (Poaceae) from combined sequences of chloroplast *ndhF* gene and nuclear ITS. *Plant Syst Evol* **220**:1-19.
- Catalán P, Shi Y, Armstrong L, Draper J, Stace CA. 1995.** Molecular phylogeny of the grass genus *Brachypodium* P. Beauv. (Poaceae) base on RFLP and RAPD analysis. *Bot. J. Linn. Soc.* **117**: 263-280.
- Catalán P, Muller J, Hasterok R, Jenkins G, Mur LA, 2012.** Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Ann Bot.* **109**: 385-405.
- Cubero J.I. 2002.** Introducción a la mejora genética vegetal. Mundi-Prensa. España

BIBLIOGRAFÍA

Devos KM. 2010. Grass genome organization and evolution. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 139-145.

Devos KM. 2005. Updating the 'Crop Circle'. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 155-162.

Dvorak J, Akhunov ED. 2005. Tempos of deletions and duplications of gene loci in relation to recombination rate during diploid and polyploid evolution in the *Aegilops-Triticum* alliance. *Genetics*. **171**:323–332.

Draper J, 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.

Feuillet C. 2008. Cereal Breeding takes a walk on the wild side. *Trend in Genet.* **24** (1): 24-32

Franco T.L, Hidalgo R. 2002. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica. IPGRI Technical Bulletin **8**: 89pp

Fuller D. Q; Qin L; Zheng Y;Zhao Z; Chen X; Hosoya L.A; Sun G-P 2009 The domestication process and domestication rate in rice: spikelet bases from the Lower Yangtze. *Science* **323**: 1607–1610

García L, Castro J, Civantos M, González P, Gil J, de Prado J. L, Humanes M. D, Martínez A, Ordoñez R. y Poussa F. 2000. Agricultura de Conservación en el olivar: Cubiertas vegetales. Asociación Española Agricultura de Conservación/Suelos Vivos (AEAC/SV). Córdoba.

García, P., Casanova, C. y Soler, C. 2002. "Evaluación de poblaciones naturales de gramíneas silvestres para el establecimiento de cubiertas vegetales en olivar". En *Actas del V congreso de la SEAE. I Congreso Iberoamericano de Agroecología, Gijón*. Valencia. pp. 639-644.

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.

Garvin DF, McKenzie N, Vogel JP, Mockler TC, Blankenheim ZJ et al. 2010. An SSR-based genetic linkage map of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Genome* **53**: 1-13.

- Gegas VC, Nazari A, Griffiths S, Simmonds J, Fish L, Orford S, Sayers L, Doonan JH, Snape JW. 2010.** A genetic framework for grain size and shape variation in wheat. *Plant Cell*; **22**:1046-56.
- Gepts P. 2004.** Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breed Rev.* **24**: 1-44.
- Glémin S, Bataillon T. 2009.** A comparative view of the evolution of grasses under domestication. *New Phyt* **183**: 273-290.
- Goff S.A, Ricke D, Lan T.H, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H. et al. 2002.** A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L.ssp *japonica*). *Science.* **296**: 92-100.
- Guzman G; Forsater L 2007.** Manejo de la cubierta vegetal en el olivar ecológico en Andalucía: siembra de leguminosas entre calles. Centro de recursos *on line* para la agricultura ecológica en Andalucía. Junta de Andalucía.
http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/export/sites/default/cmun/galerias/galeriaDescargas/cap/produccion-ecologica/cubiertas_vegetales_en_olivar_legumbres.pdf
- Gustafson P, Raskina O, Ma X, Nevo E. 2009.** Wheat evolution, domestication, and improvement. In: Carver BF (de) *Wheat: science and trade*. Wiley, Danvers. 5-30.
- Hammami R, Jouve N, Sole, C, Frieiro E, González J. M. 2014.** Genetic diversity of SSR and ISSR markers in wild populations of *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 1-12.
- Hammami R, Jouve N, Cuadrado A, Soler C, González J.M. 2011.** Prolamin storage proteins and allopolyploidy in wild populations of the small grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. *Plant Syst. Evol.* **297** (1-2): 99-111.
- Hands P, Drea S. 2012.** A comparative view of grain development in *Brachypodium distachyon*. *Jour of Cereal Scie.* **56**(1):2-8
- Harlan, J. R., De Wet, J. M. J., Clark, J. D., Cutler, H. C., Hallam, S. J., Kidder Jr, J. E., ... & Yarnell, R. A. 1973.** On the Quality of Evidence for Origin and Dispersal of Cultivated Plants [and Comments and Reply]. *Current Anthropology*, 51-62.

BIBLIOGRAFÍA

Harlan JR. 1992. Crop and man. American Society of Agronomy. Crop Science Society of America, Madison.

Hawkes J.G. 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 resource (IBPGR) and the European Association for Research on Plant Breeding (EUCARPI).

Heun M, Schäfer-Pregl R, Klawan D, Castagna R, Accerbi M, Borghi B, Salamini E. 1997. Site of Einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* **278**: 1312-1314.

Honne B. I., and Heun M. 2009. On the domestication genetics of self-fertilizing plants. *Vegetation history and archaeobotany*, **18**(3), 269-272.

IBI 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* **463**: 763-768.

Izawa T, Konishi S, Shomura A, Yano M. 2009. DNA changes tell us about rice domestication. *Current opinion in plant biology*, **12**(2), 185-192.

Jones M. K, Allaby R. G. and Brown T. A. 1998. Wheat domestication. *Science* **279**: 302–303.

Kellogg E.A. 2001. Evolutionary history of the grasses. *Plant Phys.* **125**:1198-1205.

Khan M.A, Stace C.A. 1999. Breeding relationship in the genus *Brachypodium* (*Poaceae*; *Pooideae*). *Nord J Bot.* **19**: 257-269.

Kovach M. J, Sweeney, M. T, McCouch S. R. 2007. New insights into the history of rice domestication. *Trends in Genetics*, **23**(11), 578-587.

Lev-Yadun, S, Gopher A, Abbo S. 2006. How and when was wild wheat domesticated?. *Science* **313**: 296.

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.

Liu B, Wendel J.F. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Mol Ecol Notes*. **1**: 205-208.

López-Alvarez D, López-Herranz ML, Betekhtin A, Catalán P. 2012. A DNA barcoding method to discriminate between the model plant *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *PlosOne* 23240000.

Morrell PL, Clegg MT. 2007. Genetic evidence for a second domestication of barley (*Hordeum vulgare*) east of the fertile crescent. *Proceedings of the national academy of sciences* **104**: 3289–3294.

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.

Ozdemir B.S, Hernandez P, Filiz E, Budak H. 2008. *Brachypodium* genomics. *Int J Plant Genomics* 536104. doi: 10.1155/536104

Păcurar DI, Thordal-Christensen H, Nielsen KK, Lenk I. 2008. A high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation system for the grass model species *Brachypodium distachyon* L. *Transgenic Res* **17**: 965–975.

Pastor, M., Castro, J., Humanes, M. D. y Muñoz, J. 2001. Sistemas de manejo del suelo en olivar de Andalucía. *Edafología*, **8**: 75-98.

Pastor M, Castro J 1997. Sistemas de manejo de suelo en el olivar. En *Agricultura de conservación, fundamentos agronómicos, medioambientales y económicos*. AELC7SV.

Painting K.A, Perry M.C, Denning R.A, Ayad W.G 1993. Guía para la documentación de recursos fitogenéticos. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos. Roma

Paterson A.H, Freeling M, Sasaki T. 2005. Grain of knowledge: genomics of model cereals. *Genome* **15**:1643-1650

Paterson A.H. 2002. What has QTL. Mapping taught us about plant domestication? *New Phytol.* **154**: 591-608.

BIBLIOGRAFÍA

Paterson A.H, Lin Y-R, Li Z, Schertz KF, Doebly JF, Pinson SRM. 1995. Convergent domestications of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. *Science*. **269**: 1714-1718.

Peng J.H, Sun D, Nevo E. 2011. Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Mol. Breeding* **28**: 281-301

Peng J.H, Ronin Y, Fahima T, Röder MS, Li YC, Nevo E, Korol A. 2003. Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:2489–2494

Prevosti A., 1974. La distancia genética entre poblaciones. *Miscelánea Alcobé*. Univ. Barcelona.

Powell W, Machray G, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant. Sci.* **1**: 215-222.

Reddy M.P, Sarla N, Siddiq E,A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* **128**: 9-17.

Ren X, Nevo E, Sun D, Sun G. 2013. Tibet as potential Domestication centre of cultivated barley of China. *PLoS One* **8**(5): e62700. doi:10.137

Rivas-Martínez S. 1990. Climate and vegetation at the euro-siberian-mediterranean boundary. *J. Veget. Science*, **1**:233-244.

Robertson I.H. 1981. Chromosome numbers in *Brachypodium* Beauv. (*Graminae*). *Genetic* **56**: 55-60.

Ruiz-Colmenero M; Bienes R, Eldridge D.J; Marques M.J. 2012 Vegetation cover reduces erosion and enhances soil organic carbon in a vineyard in the central Spain. *Catena*. **104**: 153-160

Saisho D , Purugganan MD. 2007. Molecular phylogeography of domesticated barley traces expansion of agriculture in the Old World. *Genetics* **177**:1765–1776

Sang T, and Ge S. 2007. The puzzle of rice domestication. *Integr. Plant Biol.* **49**, 760

Sánchez-Monje H. 1974. Fitogenética. Instituto Nacional de Investigaciones agrarias. Vol 12. Colección de monografías I.N.I.A

Salamini F, Ozkan H, Brandolini A, Schafer-Pregl R, Martin W. 2002. Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nat Rev Genet.* **3**: 429-441.

Schippmann U. 1991. Revision der europäischen Arten der Gattung *Brachypodium* Palisot de Beauvois (*Poaceae*). *Bossier* **45**: 1-249.

Sencer, H. A. & Hawkes, J. G. 1980. On the origin of cultivated rye. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* **13**: 299–313

Soler C, Casanova C, Rojo A. 2004. Desarrollo de cubiertas vegetales a partir de gramíneas seleccionadas, para su explotación en tierras de olivar. Acta de Horticultura N°**41** Congreso de Mejora Genética de Plantas León 2004. 41: 97-100.

Soler C, Casanova c, Monte J.V, Saavedra M, Garcia P. 2002. Obtención de variedades de gramíneas para ser utilizadas como cubiertas vivas en el olivar. En: "Investigación y Transferencia de tecnología en el sector oleícola". (Dricc. Gral. de Invest. Y Form. Agraria y Pesquera y DAP, eds.) Junta de Andalucía. Sevilla 257-261. ISBN 84.95083-80-9

Soler C, Ruíz-Fernandez J, Monte JV, De Bustos A, Jouve N. 1997. *Bocconea*. **7**:107-119.

Sonah H, Deshmukh RK, Sharma A, Singh VP, Gupta DK, Gacche RN, Rana JC, Singh NK, Sharma TR. 2011. Genome-Wide distribution and organization of Microsatellites in plants: An insight into marker development in *Brachypodium*. *PLoS One.* **6**: e21298. doi: 10.1371/ Epub.

Stebbins G. L. 1975. Shrubs as centers of adaptive radiation and evolution. Proceedings, symposium and workshop: wildland shrubs: 120-140

Stebbins G. L. 1957. Self fertilization and population variability in higher plants. *American Naturalist* **91**: 337-354.

Unver T, Budak H. 2009. Conserved microRNAs and their targets in model grass species *Brachypodium distachyon*. *Planta* **230**: 659-669.

BIBLIOGRAFÍA

Vain P, Worland B, Thole V, McKenzie N, Opanowicz M, Fish L.J, Bevan M.W, Snape J.W. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biot. Jour.* **6**: 236-245.

Vain P. 2011. *Brachypodium* as a model system for grass research. *Plant Physiol* **157** : 3-13

Vallejo Cabrera F.A, Estrada Salazar E.I. 2002. Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia – sede Palmira.

Vogel J, Hill T. 2008. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep.* **27**: 471-478.

Vogel J. P, Garvin D. F, Leong O.M, Hayden D. M. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **85**: 199-211.

Vogel J, Bragg J. 2009. *Brachypodium distachyon*, a new model for the Triticeae. Springer, **7**: 427–449.

Vogel J.P, Tuna I.M, Budak H, Huo N, Gu Y.Q, Steinwand M.A. 2009. Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant. Biol.* **9**: 88. doi: 10.1186/1741-2229-9-88.

Vollbrecht E, Springer P.S, Goh L, Buckler E.S, Martienssen R. 2005. Architecture of floral branch systems in maize and related grasses. *Nature* **436**: 1119–1126.

Wang AH, Yu ZY, Ding Y. 2009. Genetic diversity analysis of wild close relatives of barley from Tibet and the Middle East by ISSR and SSR markers. *C R Biologies* **332**: 393-403. doi 10.1016

Watson L, Dallwitz M. J, 1962. The grass genera of the world. - CAB International, Wallingford.

Watt M, Schneebeli K, Dong P, Wilson LW. 2009. The shoot and root growth of *Brachypodium* and its potential as a model for wheat and other cereal crops. *Funct. Plant Biol.* **36**: 960-969

Wolfe D. 2000. Summer covers relieve compaction. En: Clark A (coord.) *Managing Cover Crops Profitably*, 2a ed, Sustainable Agriculture Network, Beltsville p 84.

Wolny E, Hasterok R. 2009. Comparative cytogenetic analysis of the genome of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. *Ann of Bot* **104**: 873-881.

Zohary D, Hopf M, Weiss E. 2012. *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin.* Oxford University Press.

Zohary D. 2004. Unconscious selection and the evolution of domesticated plants. *Economic Botany*, **58**(1), 5-10.

Zohary D, Hopf M. 2000. *Domestication of plants in the old world.* Oxford Univ. Press, Oxford.

AGRADECIMIENTOS

Llegar hasta este punto y culminar esta etapa de mi vida me llena de mucha satisfacción, espero que con sencillez pueda dar un reconocimiento especial a quienes me han acompañado durante esta trayectoria.

En primer lugar a mi Directora Consuelo Soler (Chelo), quien me dio la oportunidad de hacer parte de este proyecto. Muchas gracias por la paciencia que has mostrado conmigo en cada momento, gracias por permitirme escalar en mi formación profesional y porque através tuyo se abrió para mi la puerta del INIA. Han sido años de mucha bendición, en los que también he podido recibir apoyo en mi vida personal. *Siempre estaré completamente agradecida.*

Gracias al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), por los programas de Formación Para Investigadores (FPI), por la beca concedida y desde luego, porque es un orgullo haber llevado a cabo mi proyecto Doctoral en esta importante Institución. Un recuerdo especial a Julian Barrera, que fue la primer persona con quien tuve contacto en esta institución, cuando recibí una carta notificando que me concedían una beca.

A mis compañeros del grupo dirigido por la Dra. Consuelo Soler muchas gracias. A Carlos Casanova (Carlitos), eres una gran persona, gracias porque fuiste mi mediador y muchas veces mi vocero, gracias por tu valiosa ayuda en las presentaciones a los congresos y en este documento. A Alfonso Muñoz, muchas gracias por tu ayuda en el laboratorio y también porque siempre me sentí muy apoyada en mis diversas “transiciones personales”, gracias también por tu sentido del humor, porque añadías risas a los días de rutina. A David San Martín (Davidenko), que con los años se convirtió en un gran amigo, gracias por el ánimo que me brindaste, por tu valiosa ayuda en la revisión de datos, por tu trabajo en campo, por los buenos momentos de conversación, por tu ayuda en este documento y desde luego gracias por tu confianza y amistad. A Javier Sánchez (Javi), muchas gracias por tu ayuda en los análisis de datos, por todos los aportes que le has dado a esta tesis, mil gracias también por tu valiosa ayuda en el laboratorio.

A los compañeros de La Canaleja, también muchas gracias por darme acogida y por los buenos momentos que pude compartir. Tengo un grato recuerdo de todos ellos: José Luis Tenorio, Carlos Cadorniga, Encarna, Paco, Miguel Angel, Mari Cruz, Diana, Inés, Ana Patricia, Pepe, Fernando y Agustín.

A mi Director, Profesor Juan Gonzalez, en la Universidad de Alcalá, muchas gracias por hacer parte en la orientación de esta tesis, sin tu ayuda no hubiera podido llegar hasta aquí; gracias por todos los aportes en mi formación profesional, por el tiempo que has

dedicado a las revisiones, gracias por la motivación y porque has sido un excelente tutor. **GRACIAS.**

Para los investigadores del departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá con los que pude compartir, también un grato recuerdo a todos ellos: Eva Friero, Rifka, Yolanda, Angelines, Alfredo, Nicolas Jouve, Ester, Araceli, y a Consuelo Martínez (secretaria del Departamento).

Un agradecimiento especial también para el Profesor Jhon Draper de la Universidad de Aberystrwyth y a los miembros de su equipo, Hassan Zubair y Manfred Beckmann, mi estancia en Gales fue de gran ayuda para la obtención de mi Diploma de Estudios Avanzados (DEA).

Este último apartado lo dedico a mi familia que son mi fuente de ayuda y estabilidad emocional. A mi esposo, mi fuente de motivación, mi mayor bendición; a ti te debo el cumplimiento de mis sueños, gracias por ser mi alegría, quien cuida de mi. Este logro es mutuo, sin tu ayuda y sacrificio no hubiera llegado hasta aquí. A nuestros hijos, que me llenan de orgullo y son mi mayor satisfacción.

A mis padres, que son quienes más se alegran y se sienten orgullosos de mis triunfos y mis éxitos, gracias también por todo el esfuerzo que me han brindado y porque aun continúan dando todo lo mejor de sí por la felicidad de sus hijos y nietos. A mis hermanos, muchas gracias por su inversión en mi formación profesional, cuando los recursos escaseaban.

Lo más importante, gracias a Dios, por todas las bendiciones que me brinda cada día, mi vida no estaría completa si no estuviera El en mi camino, pues separada de El nada podría hacer.