



Escuela Politécnica
Superior - Huesca
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudio citogenético de las especies *Brachypodium boissieri* y *Brachypodium retusum* en el Mediterráneo occidental

Cytogenetic study of the species *Brachypodium boissieri* and *Brachypodium retusum* in the western Mediterranean

Autora

Beatriz Montes Fernández

Director

Luis Ángel Inda Aramendía

Ciencias Ambientales
Escuela Politécnica Superior de Huesca
14/12/18

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a todas las personas que me han acompañado y apoyado durante este trabajo y que han estado presentes en un momento tan importante como es el finalizar mi carrera universitaria:

A mi director, Luis Ángel Inda, por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo, por su constancia y dedicación, por los conocimientos transmitidos y por los buenos momentos.

A Ernesto Pérez, por ser el mayor apoyo durante estos meses en la universidad y fuera de ella.

A todas las personas con las que en algún momento durante mi trabajo he tenido el placer de coincidir en el laboratorio y que me han ayudado y aconsejado: María Fernanda, Antonio Díaz, Rubén Sancho, María Ángeles Decena, Rubén Gorgojo, Belén y Asun.

A mis amigos y compañeros, especialmente a Ainhoa Monroy, Rocío Sus, Adrián Reyes y Marcos Martín.

A Xavi, por haberme acompañado en todo momento en estos últimos años.

Finalmente, este trabajo se lo quiero agradecer especialmente a mis padres, Beatriz y Gregorio, y a mi hermano, David, porque sin su apoyo y sus constantes ánimos nunca hubiera sido posible llegar hasta aquí.

CONTENIDO

Resumen.....	9
Abstract.....	10
1. Introducción.....	11
1.1. Descripción del género <i>Brachypodium</i> P. Beauv.....	12
1.2. <i>Brachypodium retusum</i> (Pers.) P. Beauv.....	14
1.2. <i>Brachypodium boissieri</i> Nyman.....	17
1.3. Posible relación filogenética entre <i>Brachypodium retusum</i> y <i>Brachypodium boissieri</i>	21
1.4. Número cromosómico (2n) de <i>Brachypodium retusum</i> y <i>Brachypodium boissieri</i>	22
1.5. Análisis del tamaño genómico mediante citometría de flujo.....	23
1.6. Técnica de Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	25
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivo general.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. Materiales y métodos.....	29
3.1. Material vegetal utilizado.....	29
3.2. Obtención de embriones germinados.....	32
Germinación de semillas en placas Petri.....	32
Cultivos hidropónicos.....	33
Cultivos <i>in vitro</i>	34
3.3. Obtención de preparaciones microscópicas.....	38
Pretratamiento de los ápices radiculares.....	39

Fijación.....	39
Digestión enzimática.....	39
Extracción de meristemos.....	40
Búsqueda de cromosomas en metafase.....	41
Fijación de las preparaciones microscópicas.....	41
3.4. Tinción con DAPI para determinar el número cromosómico (2n).....	42
Visualización.....	42
3.5. Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	43
3.5.1. Preparación de las sondas de DNA ribosómico.....	43
Preparación de los medios de cultivo LB líquido y sólido.....	44
Siembra de bacterias en el medio sólido.....	44
Siembra de bacterias en el medio líquido.....	45
Extracción de DNA.....	46
Cuantificación del DNA extraído.....	47
Marcaje y lavado del DNA extraído.....	48
3.5.2. Realización de FISH.....	56
Preparación de los reactivos.....	51
Pretratamiento de portaobjetos con cromosomas.....	53
Desnaturalización e hibridación.....	54
Lavado riguroso.....	54
Inmunodetección de la digoxigenina.....	55
Visualización.....	56
3.6. Determinación del tamaño genómico mediante citometría de flujo.....	57
4. Resultados.....	61

4.1. Métodos de cultivo para la obtención de meristemos.....	61
4.2. Número cromosómico y tamaño genómico de <i>Brachypodium retusum</i>	62
4.3. Determinación de las regiones 5S y 25S en <i>Brachypodium retusum</i>	65
4.4. Número cromosómico y tamaño genómico de <i>Brachypodium boissieri</i>	67
4.5. Determinación de las regiones 5S y 25S en <i>Brachypodium boissieri</i>	69
5. Discusión.....	71
5.1. Obtención de meristemos.....	71
5.2. Datos citogenéticos de <i>Brachypodium retusum</i>	72
5.3. Datos citogenéticos de <i>Brachypodium boissieri</i>	74
5.4. Posible ploidía y origen de <i>B. retusum</i> y <i>B. boissieri</i> en base a estos datos citogenéticos.....	75
6. Conclusiones.....	83
7. Referencias bibliográficas.....	85
8. Anexos.....	91

RESUMEN

El género *Brachypodium*, perteneciente a la familia Poaceae y compuesto por 20 taxones distribuidos por todo el mundo, ha recibido una considerable importancia desde que se seleccionó la especie anual *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. y otras especies del género como plantas modelo de gramíneas y monocotiledóneas. Esto ha permitido avances en el estudio genético de cereales templados y pastos.

Los estudios filogenéticos pueden ser importantes para averiguar cuáles han sido los orígenes y sucesos como los procesos de hibridación o poliploidización, que han experimentado muchas de las especies de este género.

En este trabajo se van a estudiar algunos caracteres citogenéticos de dos de las especies perennes del género, que además presentan los mayores niveles de ploidía dentro del mismo: *Brachypodium retusum* (Pers.) Beauv. y *Brachypodium boissieri* Nyman; similares en ciertos aspectos, que anteriormente en otras floras han llegado a ser consideradas como la misma, o como una subespecie.

Para ello, a partir de diversas poblaciones del área del mediterráneo occidental (Francia, España y Marruecos), se han determinado distintos caracteres citogenéticos: número de cromosomas ($2n$), tamaño genómico ($2C$) e identificación de las regiones ribosomales 5S y 25S del ADN mediante la técnica de Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH).

Para *Brachypodium retusum*, el número de cromosomas obtenido ha sido de $2n=32$ con un tamaño genómico medio de 1,7 pg, y de $2n=42$ con un tamaño genómico de 2,3 pg para las distintas poblaciones estudiadas. En el caso de *Brachypodium boissieri*, el número de cromosomas en todas las poblaciones de estudio ha sido de $2n=46$, con un tamaño genómico medio de 3,1 pg.

En cuanto a la identificación de las regiones ribosomales, para *B. retusum* con $2n=32$ se han obtenido 4 regiones 5S y 4 regiones 25S, para los casos con $2n=42$ el número ha entre 5-6 regiones 5S y 5 regiones 25S. En *B. boissieri* se han contado entre 8, 9 y 10 regiones 5S y 6 regiones 25S para las distintas poblaciones de estudio.

Palabras clave: Número cromosómico, tamaño genómico, citometría de flujo, regiones ribosomales, FISH, aloploidie.

ABSTRACT

The genus *Brachypodium* P. Beauv., belonging to the Poaceae family and composed of 20 taxa distributed throughout the world, has received considerable importance since the annual species *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. was selected and other species of the genus as model plants of grasses and monocotyledons. This has allowed advances in the genetic study of temperate cereals and pastures.

Phylogenetic studies can be important to find out what the origins and events have been like the processes of hybridization or polyploidization that many of the species of this genus have experienced.

In this work we will study some cytogenetic characters of two of the perennial species of the genus, which also have the highest levels of ploidy within it: *Brachypodium retusum* (Pers.) Beauv. and *Brachypodium boissieri* Nyman; similar in certain aspects, that previously in other floras have come to be considered as the same, or as a subspecies.

For this, from different populations of the area of the western Mediterranean (France, Spain and Morocco), different cytogenetic characters have been determined: number of chromosomes ($2n$), genomic size ($2C$) and identification of the ribosomal regions 5S and 25S of the DNA using the *In Situ* Fluorescent Hybridization (FISH) technique.

For *Brachypodium retusum*, the number of chromosomes obtained was $2n = 32$ with an average genomic size of 1,7 pg, and $2n = 42$ with a genomic size of 2,3 pg for the different populations studied. In the case of *Brachypodium boissieri*, the number of chromosomes in all study populations was $2n = 46$, with an average genomic size of 3,1 pg.

Regarding the identification of ribosomal regions, for *B. retusum* with $2n = 32$ we have obtained 4 regions 5S and 4 regions 25S, for cases with $2n = 42$ the number has between 5-6 regions 5S and 5 regions 25S. In *B. boissieri* there were between 8, 9 and 10 5S regions and 6 25S regions for the different study populations.

Keywords: Chromosomal number, genomic size, flow cytometry, ribosomal regions, FISH, allopolyploid.

1. INTRODUCCIÓN

Brachypodium P. Beauv. es un género de plantas herbáceas perteneciente a la familia Poaceae compuesto por 20 taxones distribuidos por todo el mundo, de los cuales hay 18 especies (Schippmann 1991; Catalán y Olmstead 2000; Catalán et al., 2012). De acuerdo con la actualización taxonómica más reciente (Catalán et al., 2012; Díaz-Pérez et al., 2018), 3 de ellas son especies anuales y 15 son perennes.

Brachypodium es considerado hoy en día como el único género representativo de la tribu monotípica *Brachypodieae*, que constituye uno de los linajes divergentes intermedios de las gramíneas templadas de la subfamilia *Pooideae* (Catalán et al., 1997; Bouchenak-Khelladi et al., 2008).

La mayoría de las especies son de zonas mediterráneas y euroasiáticas. Cabe destacar algunas de ellas, por ejemplo, *B. distachyon* y *B. retusum* son mediterráneas, *B. rupestre* es un taxón europeo, mientras que *B. pinnatum* y *B. sylvaticum* son especies euroasiáticas. Se han descrito otras dos especies, *B. arbuscula* y *B. mexicanum*; la primera de ellas es endémica de las Islas Canarias, mientras que la segunda crece en América Central y del Sur. También existen datos sobre dos especies de África, *B. bolussii* y *B. flexum* (Catalán y Olmstead, 2000).

Este género ha recibido una atención considerable desde la selección de la especie anual *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. como una planta modelo para el estudio genético de cereales templados y pastos utilizados para biocombustibles (IBI 2010; Catalán et al., 2014; Mur et al., 2011). Estos cereales, como pueden ser el trigo o la cebada, tienen una gran importancia económica.

La elección de esta especie anual se basó en varios atributos cruciales que la convirtieron en un modelo óptimo para los programas avanzados de mejora vegetal, tales como: la posesión de uno de los genomas más pequeños de monocotiledóneas y gramíneas (1C aprox. 0,3 pg, Wolny y Hasterok, 2009), que comprende en su mayoría DNA repetitivo de copia única o baja (IBI, 2010); su ciclo de vida corto, con un mínimo de 6 semanas de semilla a semilla (Garvin et al., 2008; Mur et al., 2011); su autofertilidad, que garantiza la generación de líneas puras dentro de dos ciclos de generación (Vogel et al., 2009); sus altas tasas de germinación tanto en el medio silvestre como en condiciones de invernadero controladas (Garvin et al., 2008; Vogel et al., 2009); y su relación más cercana (Catalán et al., 1997; GPWG, 2001) con las especies de *Triticeae* de importancia económica (*Triticum*

spp., *Hordeum* spp.), lo que le da mayor relevancia en el desarrollo de una amplia gama de análisis comparativos de la expresión de genes y mecanismos reguladores (Mur et al., 2011) y la posibilidad realizar estudios de caracteres de relevancia agronómica.

Además de *B. distachyon*, cabe destacar que recientemente todo el género *Brachypodium*, que contiene taxones caracterizados por sus genomas pequeños y compactos (Mur et al., 2011; Betekhtin et al., 2014), también se considera un candidato ideal para la genómica comparativa de monocotiledóneas.

1.1. Descripción del género *Brachypodium* P. Beauv.

Según *Flora Europaea* (Smith, 1980), el género se describe como plantas perennes o anuales, raramente leñosas, con rizomas a menudo extensamente ramificados. Presentan inflorescencias, un racimo de espiguillas dísticas, alternas, pediceladas. Espiguillas 1(-3) en cada nudo, generalmente con numerosas flores. Glumas desiguales, más cortas que la inflorescencia más baja. Glumas y lemas acuminadas, mucronadas o con un ápice apical recto o débilmente curvado. La palea igual o un poco más corta que la lema, emarginada o truncada, las quillas ciliadas o escabrosas. Ovario peludo en el ápice. Semillas estrechamente elípticas a oblanceoladas e hilo lineal.

De las 10 especies europeas (Schippmann, 1991; Catalán et al., 2015), en este trabajo se estudiarán algunos caracteres citogenéticos de dos de las especies perennes del género: *Brachypodium retusum* (Pers.) Beauv. y *Brachypodium boissieri* Nyman.

Se trata de dos especies similares en ciertos aspectos, que anteriormente en otras floras han llegado a ser consideradas como sinónimos, en el caso de *Flora Europaea* (Smith, 1980) o como una subespecie; *Brachypodium retusum* subsp. *boissieri* en el caso de la Flora Vasculare de Andalucía Oriental (Valdés, B., Talavera, S., y Fernández-Galiano, E., 1987).

A pesar de la buena separación de ambas especies basada en varios caracteres, Smith (1980) y Talavera (1987) no distinguieron *B. boissieri* de *B. retusum* en las floras anteriormente citadas; sin embargo, las características distintivas entre las dos especies se pueden encontrar en la morfología y anatomía de la lámina foliar y menos claramente en la inflorescencia (Schippmann, 1991).

En la mayoría de los parámetros morfológicos, *B. boissieri* tiene valores más bajos que *B. retusum* (longitud del tallo, lámina de la hoja, número de espiguillas) y muestra adaptaciones al hábitat de montaña con sus períodos de vegetación más cortos. Sin embargo, no todas las características son menores en sus valores con la proximidad al nivel del mar (Schippmann, 1991).

1.2. *Brachypodium retusum* (Pers.) P. Beauv.

Descripción morfológica (véase figura 1): Especie perenne. Tallos de 20 – 65 cm. Hoja con el ápice agudo. Parte superior de la lámina foliar normalmente con vellosidad densa. Limbo de la hoja de los brotes no florecidos de 2-7 cm de longitud. Inflorescencia racemosa con (1) 2-4 (7) espiguillas, con 10-18 flores por espiguilla, gluma superior aguda o con una arista de hasta 0,5 mm, arista de la lema de 0,5 -2 mm casi siempre , la sección transversal de la hoja muestra la disposición de los haces vasculares no simétricos y sin una capa de esclerénquima continua por debajo de la epidermis en la parte abaxial de la hoja. Hojas inferiores de las ramas subterráneas prácticamente sin pelos (Schippmann, 1990 y 1991).



Figura 1: Morfología de *B. retusum*. a: Espiguilla, b y c: Cariopsis. Fuente: Schippmann, 1991.

En cuanto a la anatomía foliar, se describen las siguientes características:

Sección de la hoja (véase figura 2): enrollada, hoja de 0,17 a 0,19 mm de espesor, lado superior fuertemente estriado, contorno de las costillas semicirculares, parte inferior plana, sin nervadura central pronunciada, estrechándose hacia los márgenes. Células epidérmicas del lado inferior (parte abaxial) con paredes engrosadas en todos los lados, especialmente las paredes externas gruesas, estomas hundidos en la epidermis en la parte superior (adaxial), entre las costillas hay de 4 a 6 células buliformes, las más grandes aproximadamente 2-4 veces más altas que las otras células epidérmicas. Esclerénquima entre el haz vascular y la superficie inferior (abaxial) de la hoja (Schippmann, 1991).

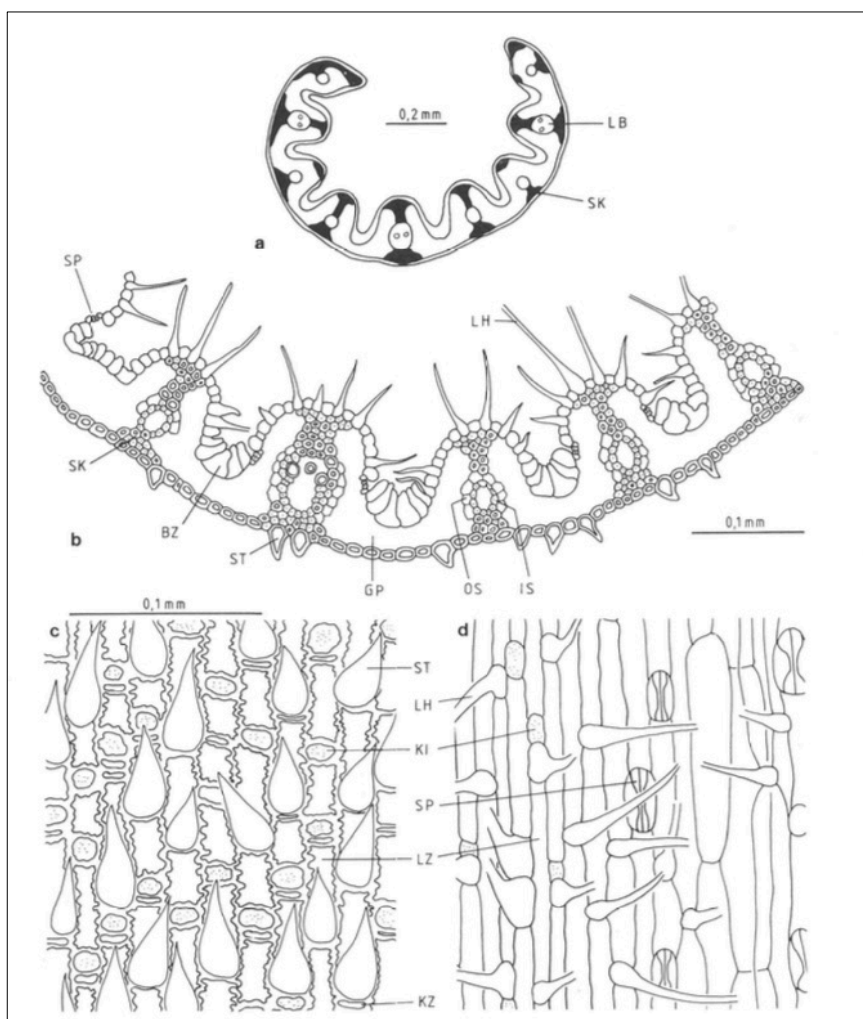


Figura 2: Anatomía de la lámina foliar de *B. retusum*. - a: sección transversal, vista general (tricomas no mostrados). b: sección transversal, sección. c: vista de la epidermis de la superficie abaxial. d: vista de la epidermis de la superficie adaxial. BZ = células buliformes, GP = parénquima básico, IS = vaina del haz interno, KI (punteada) = célula corta, LB = haz vascular, LH = pelo largo, LZ = célula larga, OS = vaina del haz externo, SK = esclerénquima, SP = abertura del estoma, ST = pelo de punta

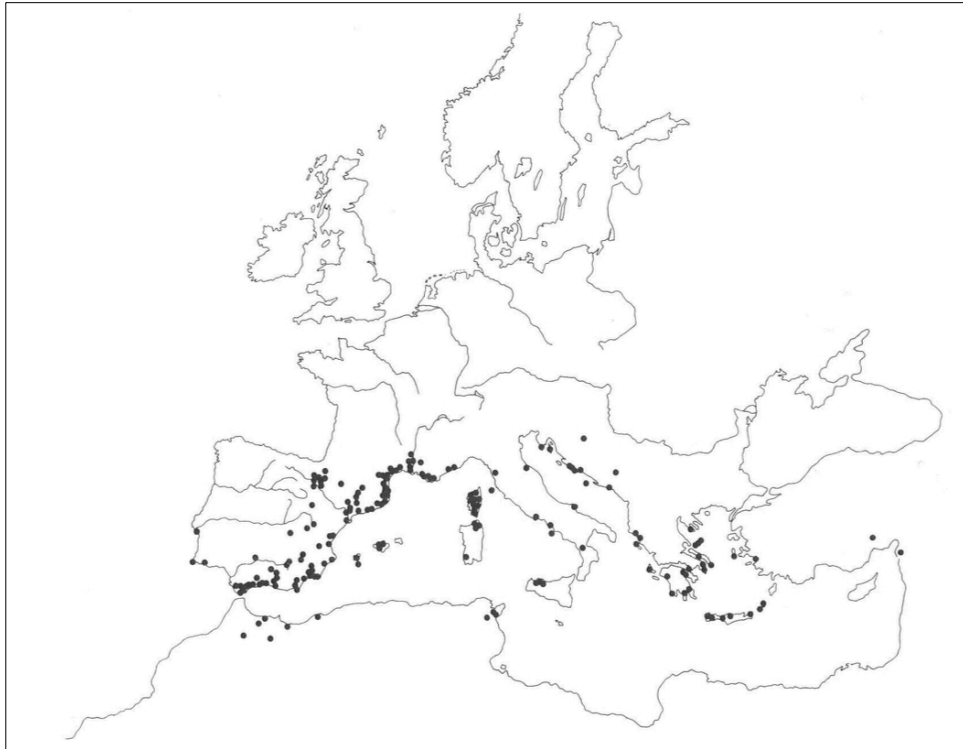


Figura 3: Distribución de *B. retusum*. Fuente: Schippmann, 1991.

B. retusum se encuentra más extendida que *B. boissieri* (véase figura 3); presenta una distribución general en la región Mediterránea, principalmente por el sur de Europa y norte de África. El límite oriental de la distribución de se encuentra en el Egeo y en las áreas costeras de Turquía.

En la Península Ibérica se localiza principalmente en zonas mediterráneas, limitándose a Andalucía, Levante y Valle del Ebro. Por otro lado, se encuentra ausente en las áreas de tono subatlántico del noroeste. En las zonas continentales de España central y Extremadura, la especie es rara. En el este de España, por otra parte, la especie es omnipresente, con la excepción de las tierras secas del sureste de España. En este último, *B. retusum* está aparentemente en su límite seco: como ejemplo, se menciona la Sierra Alhamilla, cerca de Almería, donde la especie crece solo en el borde exterior de las laderas de pequeñas terrazas.

En la costa norte de África, *B. retusum* llega a ser una especie rara, habiendo sido localizada en Marruecos, Argelia y Túnez (Schippmann, 1991).

La especie habita en los pisos meso y supramediterráneo. Se suele localizar en pastizales y claros de matorral sobre suelos dolomíticos, margosos y fisuras de rocas calcáreas. La especie se extiende desde las tierras bajas hasta altitudes de 1100 m y en casos raros hasta 1500 m.

1.3. *Brachypodium boissieri* Nyman

Descripción morfológica (véase figura 4): Especie perenne. Tallos de 8 – 30 cm. Hoja con el ápice obtuso. Parte superior de la lámina foliar normalmente con vellosidad densa. Limbo de la hoja de los brotes no florecidos de 1,2 -3 cm de longitud, racimo con 1 (2) espiguillas, con 6-12 flores por espiguilla, gluma superior sin aristas, obtusa o mucronada, arista de la lema casi siempre de 2-4 mm. La sección transversal de la hoja muestra una disposición simétrica de los haces vasculares con una capa de esclerénquima continua (o interrumpida parcialmente) sobre la epidermis de la cara abaxial (Schippmann 1990 y 1991).

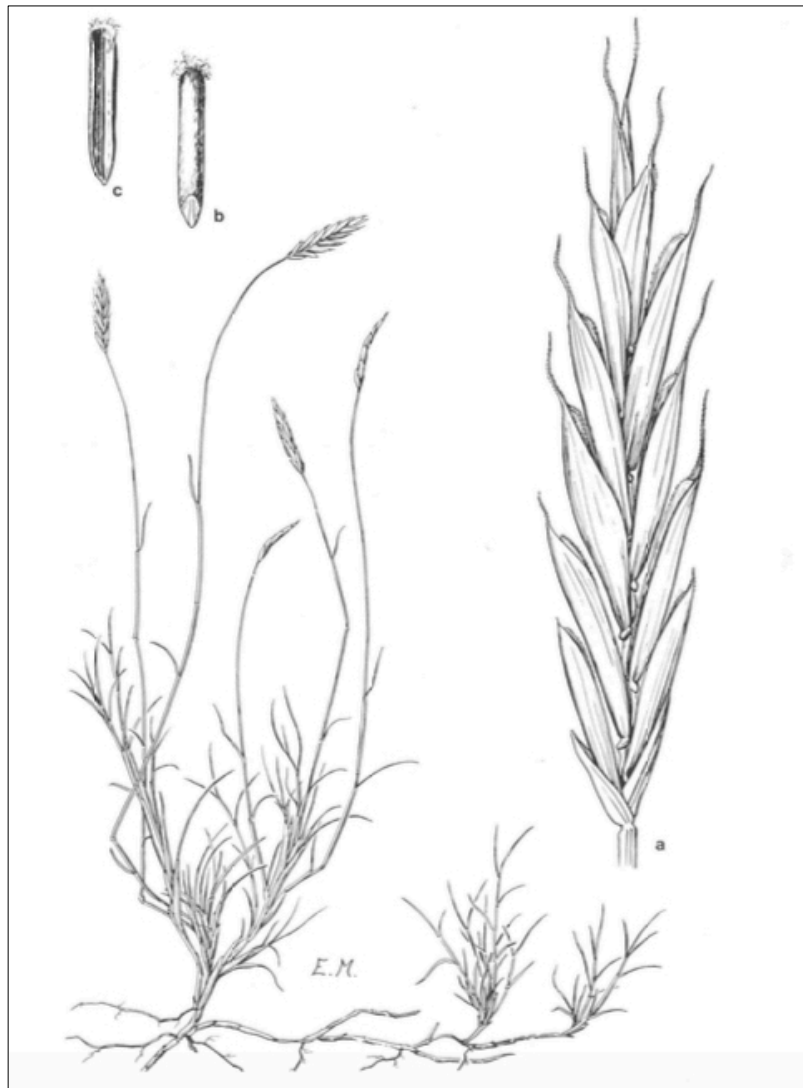


Figura 4: Morfología de *B. boissieri*. a: Espiguilla, b y c: Cariopsis

En cuanto a la anatomía de la sección transversal de la hoja, se describen las siguientes características:

Sección de la hoja (véase figura 5): enrollada, hoja de 0,2 mm de espesor, lado superior fuertemente estriado, contorno de las costillas semicirculares, parte inferior plana, sin nervadura central pronunciada, márgenes redondeados. Células epidérmicas en la parte inferior (abaxial) con paredes engrosadas en todos los lados, especialmente las paredes externas muy engrosadas, estomas apenas incrustados en la epidermis en la parte superior (adaxial) de la hoja. Entre las costillas hay de 3 a 5 células buliformes. Presencia de esclerénquima en la parte inferior del haz vascular. Sobre la epidermis abaxial hay una capa esclerénquimatosa de una sola fila continua o solo ligeramente interrumpida, haz primario conectado con la superficie adaxial a través de un grupo esclerénquimatoso en forma de T, el haz vascular secundario no presenta grupo de células de esclerénquima en forma de T con el lado superior (adaxial) (Schippmann, 1991).

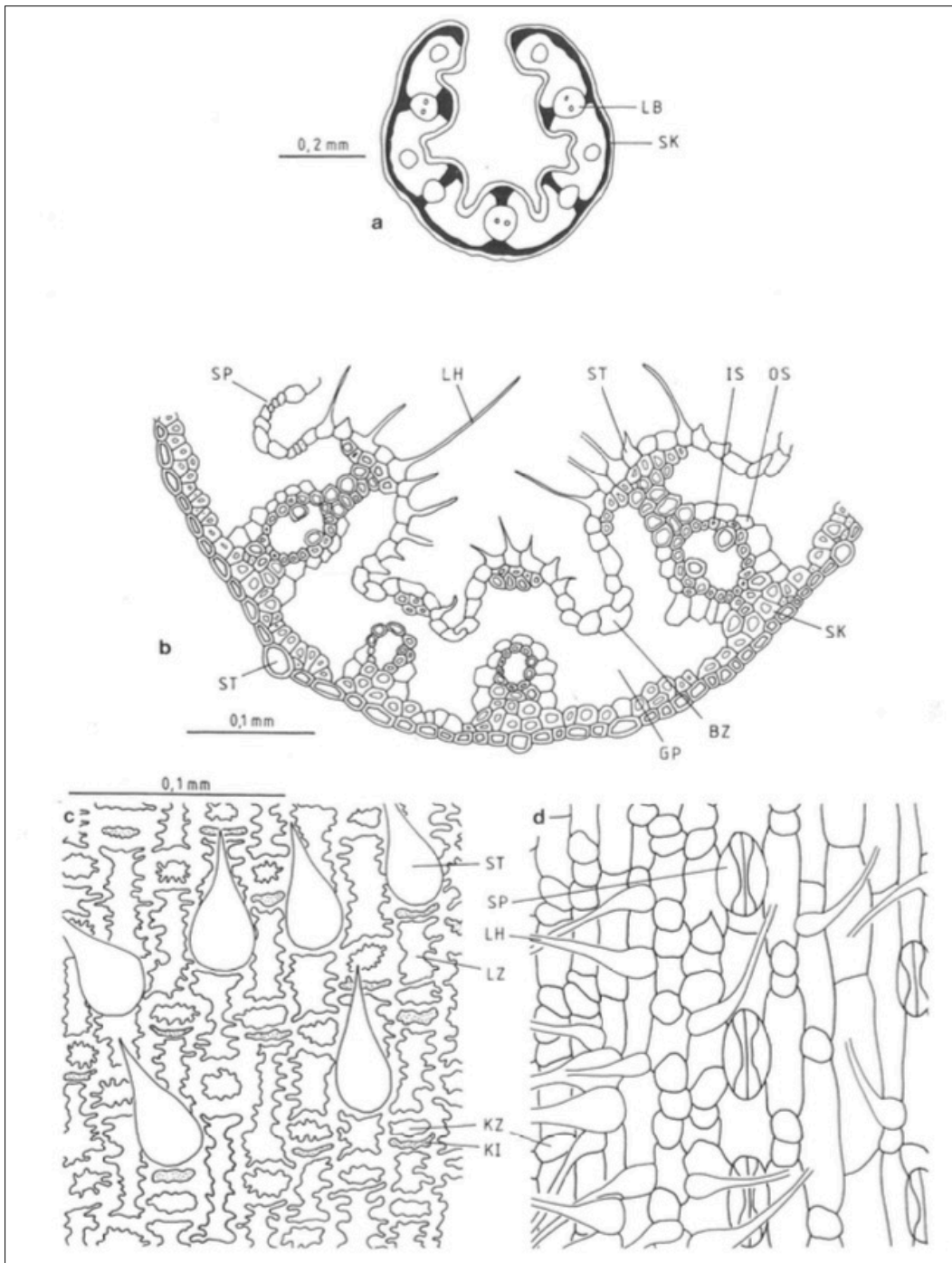


Figura 5: Micromorfología de *B. boissieri*. a: sección transversal, vista general. b: sección transversal. c: vista de la epidermis de la parte abaxial. d: vista de la epidermis del lado adaxial. BZ= células bulliformes o de sostén, GP = parénquima básico, IS = vaina interna esclerenquimática del haz, KZ = célula corta, LB = haz vascular, LH = pelo largo, LZ = célula larga, OS = vaina externa parenquimática del haz, SK = esclerénquima, SP = apertura del estoma, ST = pelo espigado. Fuente: Schippmann, (1991).

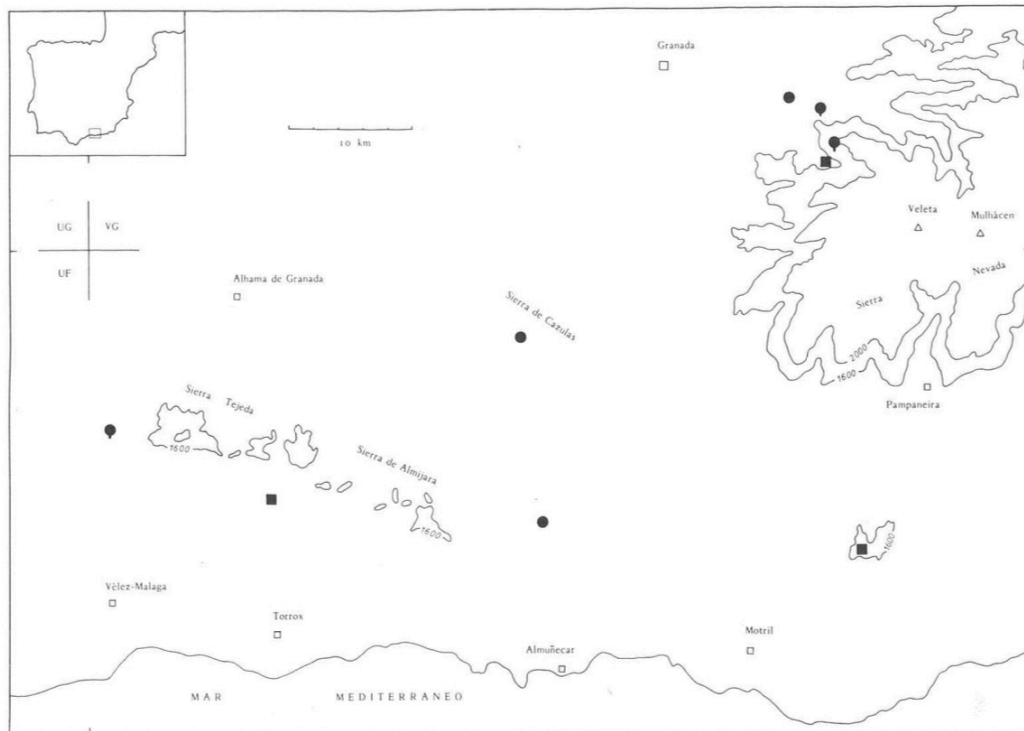


Figura 6: Distribución de *B.boissieri*. Círculos: documentos examinados. Cuadrados: Referencia a la localización insegura. Fuente: Schippmann, 1991.

B. boissieri es un endemismo que presenta una distribución muy reducida (véase figura 6) y aparece únicamente en una pequeña área en la Cordillera Penibética, en las sierras del sudeste entre las provincias de Granada y Málaga. Las poblaciones que se han encontrado se localizaron en Sierra Tejada, Sierra de Almirajara, Sierra de Cázulas y Sierra Nevada (Shippmann, 1990).

Esta especie habita en zonas montañosas entre los 900 y los 2050 msnm. Se presenta principalmente en claros del matorral, sobre suelos dolomíticos y lugares secos.

1.4. Posible relación filogenética entre *Brachypodium retusum* y *Brachypodium boissieri*

En las zonas del Mediterráneo occidental y oriental se dieron los procesos más complejos de hibridación y duplicación del genoma, que generaron el alto nivel de ploidía de los *Brachypodium* alopoliploides, *B. boissieri* y *B. retusum*, (Sancho, R., 2018). Existen estudios previos en los que se ha intentado establecer un posible origen para estas dos especies, como se puede observar en la siguiente figura:

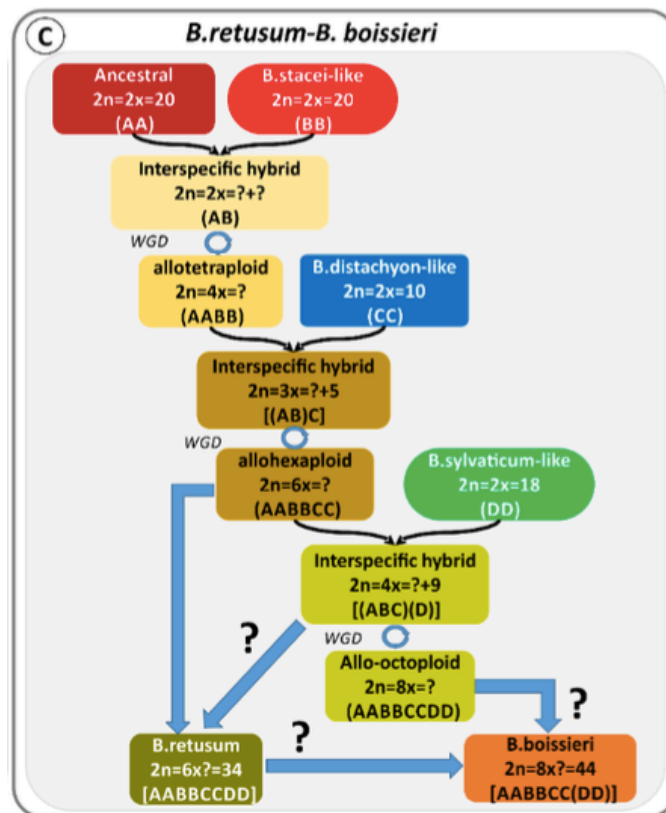


Figura 7: Diagrama para la representación de los posibles orígenes de *B. retusum* y *B. boissieri* basados en datos filogenómicos de RNA-seq y datos GS. Fuente: Sancho, R. (2018).

La reconstrucción de los orígenes de los alopoliploides con niveles altos de ploidía *B. boissieri* y *B. retusum* es compleja debido a la aparente incongruencia entre sus números de cromosomas. Estas dos especies mediterráneas fenotípicamente cercanas muestran grandes conjuntos de subgenomas heterólogos filogenéticamente divergentes. El árbol genético nuclear identifica hasta tres subgenomas (A, B, C) y cuatro (A, B, C, D) en *B. boissieri* y *B. retusum*, respectivamente.

Las dos especies comparten subgenomas A y B ancestrales similares y evolucionaron de manera intermedia, lo que indica una posible ascendencia común. Una sucesión de dos IH (Hibridación) + WGD (Duplicación total del genoma) consecutivos que dan como resultado un posible alohexaploide AABBCC representa el escenario más probable para el origen de su ancestro más reciente. Un IH + WGD adicional que involucre a este antepasado y un genoma D tipo *B. Sylvaticum* recientemente evolucionado habría originado un posible alooctoploide AABBCCDD (Sancho, R., 2018).

1.5. Número cromosómico (2n) de *Brachypodium retusum* y *Brachypodium boissieri*

Un aspecto fundamental que proporciona caracteres de gran importancia taxonómica y que permite la diferenciación de especies dentro de un mismo género, es el número de cromosomas. A pesar de que generalmente este número se mantiene constante dentro de una misma especie, en las plantas son frecuentes los casos en los que varía sin que haya una clara correlación entre esta variación y la variabilidad de los caracteres morfológicos o la de otros tipos de caracteres. Este hecho se conoce con el nombre de disploidía; siendo la definición de esta, un fenómeno en el cual las especies de un género presentan una dotación cromosómica básica diferente.

Existen otros trabajos anteriormente publicados en los que se muestran que las dos especies de estudio, *B. retusum* y *B. boissieri*, presentarían una considerable variación infraespecífica en los números de cromosomas (véase tabla 1).

Tabla 1: Recuentos cromosómicos de las especies estudiadas publicados en artículos anteriores. Los superíndices indican los autores que han realizado dichos conteos. [1: Schippmann, 1991. 2: Schippmann, 1990. 3: Robertson, 1981. 4: Wolny & Hasterok, 2009.]

Especie	2n
<i>B. retusum</i> (Pers.) P. Beauv.	27 ¹ , 28 ² , 31 ² , 32 ² , 36 ³ , 38 ⁴ , 40 ² , 42 ³
<i>B. boissieri</i> Nym.	42 ² , 46 ² , 36 ³

1.6. Análisis del tamaño genómico mediante citometría de flujo

El estudio del tamaño del genoma y su variación ha sido cada vez más importante en muchas áreas de investigación de plantas, incluyendo taxonomía, biosistemática, ecología y biología poblacional. La cantidad de DNA nuclear (valor C) se ha descrito como un importante carácter de biodiversidad, cuyo estudio proporciona un buen elemento biológico con usos prácticos y predictivos (Bennett y Leitch, 2005).

El tamaño genómico de una planta se define como la cantidad de DNA en el genoma holoploide (el conjunto de cromosomas complementarios n , independientemente del grado de poliploidía, aneuploidía, etc) de un organismo, así como en los genomas monoploides constitutivos en poliploides (Greilhuber et al., 2005).

El valor $2C$ se determina al medir el tamaño genómico de una célula somática ($2n$) en fase celular G1. Debido a los problemas que implica el conteo de los cromosomas por su pequeño tamaño, en algunos casos, o las dificultades en el proceso de obtención de meristemas (ó células en mitosis), el cálculo del tamaño genómico ($2C$) permite relacionar éste con el número de cromosomas.

Cabe destacar que el contenido de DNA de una célula varía según la fase en que se encuentra; en fase G0 o G1 el contenido es $2n$ y lo que se determina es $2C$; mientras que en G2 el contenido de DNA se encuentra duplicado y lo que se determina es $4C$.

El análisis mediante citometría de flujo implica la estimación del contenido de DNA y no la determinación microscópica del número de cromosomas; por lo tanto, los términos ploidía y tamaño genómico deben usarse para distinguir entre el análisis de cariotipo y contenido de DNA, respectivamente.

El tamaño genómico también puede calcularse por densitometría, pero la citometría de flujo presenta numerosas ventajas: se trata de una técnica rápida y fiable, la preparación de las muestras usualmente requiere solo unos minutos y no es necesario el uso de reactivos de elevado coste. Por otro lado, las muestras se preparan a partir de unas pocas decenas de miligramos de tejidos vegetales; por lo tanto, el método no es destructivo y es adecuado para el análisis de individuos pequeños (Dolezel et al., 2007). Además, la citometría de flujo es una herramienta muy útil en la identificación de especies próximas con un número de cromosomas similar pero con contenidos de DNA distintos (Dimitrová et al., 1999).

Esta técnica se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. Este láser produce una luz que es utilizada para la excitación de los fluorocromos, que emiten un rayo luminoso de diferente longitud de onda. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula que son recogidos por distintos detectores. Estas señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por un equipo informático (véase figura 8).

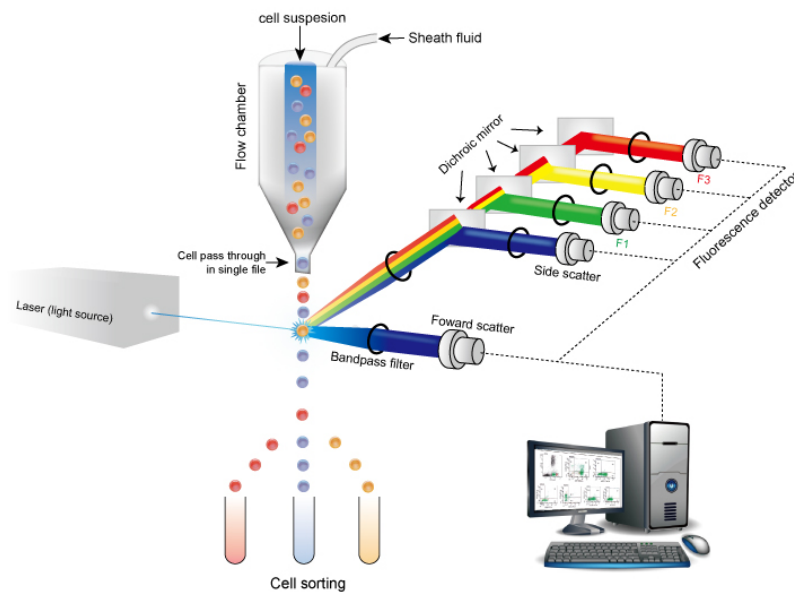


Figura 8: Esquema del funcionamiento de un citómetro de flujo. Fuente: Creative Diagnostics.

Es posible utilizar diversos tipos de fluorocromos, dependiendo de su espectro de emisión y fundamentalmente del tipo de láser con que esté equipado el citómetro de flujo a usar, tales como el yoduro de propidio (IP) o el bromuro de etidio (BrEt).

El resultado obtenido son una serie de histogramas que, en comparación con un patrón estándar de tamaño genómico conocido, hace posible el cálculo del tamaño genómico de la muestra problema. Estos histogramas (véase Anexo 1) presentan una serie de picos o curvas que se ajustan a una distribución normal y que representan el contenido de DNA frente al número de células analizadas.

1.7. Técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Otra de las herramientas que pueden ayudar a determinar las diferencias y el posible origen de las especies que estudiamos es la técnica de la hibridación *in situ* en cromosomas metafásicos.

Esta técnica presenta numerosas aplicaciones, como el estudio del comportamiento cromosómico, la identificación de cromosomas específicos, la detección de secuencias específicas de DNA, el estudio del genoma en híbridos, etc. Por otro lado, trae consigo algunas limitaciones como puede ser por ejemplo la sensibilidad de detección, que dependerá del tamaño de la secuencia de DNA empleada como sonda (Devi, Ko & Seo, 2005; Herrera, 2007).

En este trabajo, utilizando FISH, se detectarán regiones de DNA ribosomal (5S y 25S); estas regiones han sido utilizadas como puntos de referencia en el estudio de la relación cromosómica entre las especies de un género, por ejemplo en *Avena* (Linares et al., 1996), *Hordeum* (Taketa et al., 2005) u *Oryza* (Chung et al., 2008).

El fundamento de esta técnica consiste en la hibridación de sondas o fragmentos de DNA marcados con determinados fluorocromos, sobre el DNA cromosómico de estudio, gracias a la complementariedad existente entre dicha sonda y las regiones de los cromosomas a estudiar. Estas sondas pueden marcarse con moléculas fluorescentes (método directo) o con moléculas no fluorescentes, que serán detectadas posteriormente con anticuerpos fluorescentes (método indirecto).

La detección consiste en la exposición de las preparaciones microscópicas hibridadas con las sondas a luz ultravioleta, provocando la excitación de las moléculas fluorescentes, y como consecuencia la emisión de luz, cuya longitud de onda varía en función del fluorocromo empleado. Dicha emisión es captada por un microscopio de fluorescencia empleando los filtros adecuados a la longitud de onda que emite cada fluorocromo. Seguidamente, mediante la toma de microfotografías monocromáticas (una de cada sonda y otra de los cromosomas teñidos con DAPI) se realiza una superposición de cada imagen y se obtiene una final, que permite ver las regiones marcadas sobre los cromosomas (Herrera, 2007; Nederlof et al., 1989).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Conocer las características citogenéticas de *Brachypodium boissieri* y *Brachypodium retusum* en poblaciones del Mediterráneo occidental determinando diferentes caracteres como son el número cromosómico, el tamaño genómico y las regiones ribosomales.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el número de cromosomas (2n) de *Brachypodium boissieri* y *Brachypodium retusum* de varias poblaciones del Mediterráneo occidental.
- Determinar el tamaño genómico (2C) de los taxones anteriores.
- Relacionar el número de cromosomas y el tamaño genómico de las dos especies estudiadas.
- Identificar y estudiar las diferencias entre las regiones ribosomales 5S y 25S en los cromosomas de *Brachypodium boissieri*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología y el material empleado para el desarrollo de este trabajo se muestran clasificados en distintos apartados ordenados cronológicamente.

3.1. Material vegetal utilizado

Para realizar este estudio se ha trabajado con una colección de semillas y plantas en maceta, recolectadas en distintas poblaciones (véase figura 9). Gran parte de las muestras proceden de España, pero en el caso de *Brachypodium retusum* se cuenta con diversos ejemplares recogidos en Francia y Marruecos. Todos los individuos estudiados se recogen en la tabla 2, además se indica el código asignado a cada uno de ellos, el cual se utilizará para referirse a cada taxón concreto de aquí en adelante.

Tabla 2: Especies con las que se ha trabajado, clasificadas según su procedencia. Fuente: elaboración propia

Código	Especie	Procedencia
B.ret 500	<i>Brachypodium retusum</i>	Var. Pourrières. Ctra de Pourrières a Rians. UTM 31T x: 7210 y: 48228. 367 m. Ladera SW deforestada sobre afloramientos y derrubios de calizas. Leg. J. Ascaso y E. Pérez. pl. 7449jam.
B.ret 501	<i>Brachypodium retusum</i>	Francia: Hérault, Castries. Ctra. D86 entre Cousargues y Baillargües. UTM 31T X: 5763 Y: 48366. 85m. Bosque de <i>Quercus ilex</i> degradado sobre calizas. Leg. J. Ascaso y E. Pérez. pl. 7456jam.
B.ret 504	<i>Brachypodium retusum</i>	Francia: Hérault, Vic la Gardiole. Ctra. D14 entre la Gardiole y La Montagne de la Gardiole. UTM 31T X: 5632 Y:48170. 30 m. Claros de bosque de <i>Quercus ilex</i> sobre calizas. Leg. J. Ascaso y E. Pérez. pl. 7475jam.
B.ret 506	<i>Brachypodium retusum</i>	Francia: Aude. Fontjoncouse. Ctra. D611 près de Ripaud. UTM 31T x: 4862 y: 47654. 75 m. Ladera con <i>Quercus ilex</i> y <i>Pinus halepensis</i> sobre calizas. Leg. J. Ascaso et E. Pérez. pl. 7471jam.
B.ret 507	<i>Brachypodium retusum</i>	Francia: Pyrénées Orientales, Salses le Château. Ctra. D5 entre Rivesaltes y Opoul. UTM 31T X:4893 Y: 47423. 75 m. Ladera con <i>Quercus coccifera</i> y <i>Pinus halepensis</i> . Leg. J. Ascaso et E. Pérez. pl. 7476jam.

Continuación Tabla 2: Especies con las que se ha trabajado, clasificadas según su procedencia.
Fuente: elaboración propia

B.ret 558	<i>Brachypodium retusum</i>	Cataluña: Gerona, Ampurdan: Maçanet de Cabrenys, 42.3728 2.803275, 253 m. Ladera con bosque de <i>Quercus suber</i> . P. Catalán.
B.ret 559	<i>Brachypodium retusum</i>	Huesca: Almunia de San Juan, carretera hacia Azanuy. N41°56'03,60'' O0°15'01,00''. 362 m. ladera de <i>Quercus</i> con musgo fresco. Leg. L.A. Inda UZ-LAIA 28/27.
B.ret 403	<i>Brachypodium retusum</i>	Aragón: Huesca, Sta. Cruz de la Seros, 42°33'09"N 0°40'53"W, 693m, bosque de <i>Quercus ilex</i> . L. Villar y L. A. Inda.
B.ret 405	<i>Brachypodium retusum</i>	Huesca: Bernués, Peña Oroel, 42°28'56"N 0°31'22"W, 935m, prado. L. Villar y L. A. Inda.
B.ret 407	<i>Brachypodium retusum</i>	Aragón: Huesca, Alcubierre, Bco. San Caprasio, 41°44'39"N 0°29'00"W, 702m, Ladera con bosque de <i>Pinus halepensis</i> , <i>Quercus ilex</i> y <i>Juniperus</i> . L. A. Inda
B.ret 561	<i>Brachypodium retusum</i>	Aragón: Zaragoza, Bardenas. Punta Negra (El Sabinar). 30: 639.778, 4659.608. Donación Jesús Cosculluela (Vivero DGA, Ejea de los Caballeros).
B.ret 564	<i>Brachypodium retusum</i>	Aragón: Zaragoza, Ctra. Bujaraloz-Sástago Km 12,3 (A-2105): Laguna de Hoya Piqueros. 41°23'23"N 0°13'59"O. 344 m. Leg. M. Pimentel & L.A. Inda 33/2018.
B.ret 408	<i>Brachypodium retusum</i>	Navarra: Falces, San Esteban. 42°23'56"N 1°48'05"W, 330m, Bosque de <i>Pinus halepensis</i> . L. A. Inda.
B.ret 551	<i>Brachypodium retusum</i>	Andalucía: Málaga: Carretera A366, km 5 entre Ronda y El Burgo. N36°46'29'' O5°05'38''. 830 m. Leg. M. pimentel y L.A. Inda UZ-LAIA 08/17
B.ret 555	<i>Brachypodium retusum</i>	Andalucía: Granada, Sierra de Baza. Carretera de Caniles a Abla (GR810). N37°22'21'' O2°43'05''. 1142 m. Barranco de <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Thymus</i> y <i>Rosmarinus</i> . Leg. M. pimentel y L.A. Inda UZ-LAIA 24/17.
B.ret 556	<i>Brachypodium retusum</i>	Jaén: Sierra de Segura: carretera entre Cortijos Nuevos y Beas de Segura. N38°16'29'' O2°45'29''. Ladera con <i>Pinus nigra</i> y <i>Juniperus oxicedrus</i> . Leg. M. pimentel y L.A. Inda UZ-LAIA 26/17.
B.ret 557	<i>Brachypodium retusum</i>	Andalucía: Cádiz, Embalse de Almodóvar, camino del Puerto de Ojén: El Pedregoso. N36°08'59'' O5°37'39''. 148 m. Leg. M. pimentel y L.A. Inda UZ-LAIA 03/17.

Continuación Tabla 2: Especies con las que se ha trabajado, clasificadas según su procedencia.
Fuente: elaboración propia.

B.ret 451	<i>Brachypodium retusum</i>	Marruecos: El Rif, Talassemtane National Park. 35°07'54"N 5°04'17"W, 1463 m, Bosque de <i>Pinus pinaster</i> , <i>Erica</i> y <i>Ulex</i> sobre suelos dolomíticos. Catalán y Mario Mairal, PC 19.17
B.ret 452	<i>Brachypodium retusum</i>	Marruecos: Rif Mountains, Talembote, Djbel Tazzaot, 35°14'00.2"N 5°17'58.3"W, 1078 m. Limos, <i>Quercus ilex</i> , <i>Quercus coccifera</i> , <i>Pistacia lentiscus</i> . Catalán y Mario Mairal, PC 24.17.
B.bois 9	<i>Brachypodium boissieri</i>	Málaga: Sierra Tejeda, Canillas de Aceituno curva "La Rahige" entre Canillas y Sedella. N36°52'89'' 04°03'49''. 647 m. Leg. M. pimentel y L.A. Inda UZ-LAIA 11/17.
B.bois 10	<i>Brachypodium boissieri</i>	Granada: Sierra Nevada, ladera sur del Dornajo. Afloramiento pedregoso de calizas. N37°06'56'' 03°26'38''. 2000 m. <i>Genista</i> , <i>Quercus</i> . Leg. M. Pimentel y L.A. Inda UZ-LAIA 13/17.
B.bois 13	<i>Brachypodium boissieri</i>	Granada: Sierra Nevada, ladera norte del Dornajo. Ladera del barranco junto a la carretera A395 a 1,5 km del centro de interpretación de Dornajo. N37°07'31'' 03°26'27''. 1750 m. <i>Pinus</i> . Leg. M. Pimentel y L.A. Inda UZ-LAIA 16/17.
B.bois 14	<i>Brachypodium boissieri</i>	Granada: Sierra Nevada, El Purche. Carretera de Monachil, barranco de Haza de los nogales hacia el embalse. <i>Genista</i> , <i>Phlomis</i> , <i>Berberis</i> . Leg. M. pimentel y L.A. Inda UZ-LAIA 19/17.
B.bois 15	<i>Brachypodium boissieri</i>	Granada: Sierra de Huétor, Puerto de la Mora (A92 Granada-Almería): reserva micológica con diferentes coníferas. Ladera con afloramientos calizos. N37°16'22'' 03°27'30''. 1386 m. Leg. M. pimentel y L.A. Inda UZ-LAIA 21/17.



Figura 9: Distribución en el mapa de los individuos estudiados; en color rojo: *B. retusum*, en color azul: *B. boissieri*. Fuente: elaboración propia a partir de Google Maps.

3.2. Obtención de embriones germinados

La obtención de las radículas para conseguir meristemas fue mediante germinación de semillas en placas de Petri y la realización de cultivos hidropónicos a partir de plantas adultas. Los procedimientos llevados a cabo se describen a continuación:

- **Germinación de semillas en placas Petri**

Las semillas, almacenadas en la nevera, fueron colocadas en placas Petri con papel de filtro absorbente y empapado con agua en su interior. Las placas se colocaron en oscuridad a temperatura ambiente.

Una vez que las semillas germinaron (de 3 a 4 semanas aproximadamente), se seleccionaron aquellas que poseían raíces de entre 1-2 centímetros de longitud para la posterior extracción de meristemas.

- **Cultivos hidropónicos**

Dado que la germinación de semillas fue muy baja o no germinaron en el caso de la mayoría de las semillas de *B. retusum*, se realizaron cultivos hidropónicos de todas las especies estudiadas, utilizando disoluciones minerales en lugar de suelo agrícola.

Estos cultivos se llevaron a cabo a partir de macetas de plantas adultas. Para realizar un cultivo, de cada maceta se seleccionaron aproximadamente de 10 a 15 individuos y posteriormente fueron rigurosamente lavados con agua. Los individuos separados y lavados se colocaron uno a uno en unas bases de poliestireno expandido con múltiples orificios preparados para tal fin, de manera que éstos estuvieran en contacto con la disolución.

El medio de cultivo se preparó a partir de una disolución mineral, atendiendo al Medio Sachs (1887), modificado con micronutrientes, compuesto por las siguientes sales:

Tabla 3: Nutrientes empleados para realizar la disolución mineral. Fuente: elaboración propia

Macronutrientes (g/l)	Micronutrientes (mg/l)
KNO ₃ : 1	H ₃ BO ₃ : 0,57
Ca ₃ (PO ₄) ₂ : 0,5	MnCl ₂ · 4H ₂ O: 0,362
MgSO ₄ · 7H ₂ O: 0,5	ZnCl ₂ : 0,022
CaSO ₄ : 0,5	CuCl ₂ · 2H ₂ O: 0,01
NaCl: 0,25	NaMoO ₄ · 2H ₂ O: 0,005
FeSO ₄ : 0,005	EDTA · 2Na · 2H ₂ O: 0,003

La mezcla con los micronutrientes se preparó a parte formada por las correspondientes sales y se guardó a 4°C hasta su posterior uso.

Se disolvió todo en 10 litros de agua destilada y se llevó a una cuba de cultivo hidropónico, la cual se situó en una cámara de cultivo bajo unas condiciones de temperatura adecuadas (22 °C) y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad al día.

Por último, el aporte de oxígeno se realizó a través de burbujeadores que suministraban aire a la disolución mineral para favorecer la oxigenación de las raíces (véase figura 10). Fue necesario la revisión periódica del crecimiento radicular.



Figura 10: Cultivo hidropónico de *Brachypodium boissieri*. Fuente: elaboración propia.

Una vez germinadas (de 3 a 4 semanas), se seleccionaron aquellas raíces que poseían de 1 a 2 centímetros de longitud aproximadamente, para la posterior extracción de meristemos.

- **Cultivos *in vitro***

Otro de los métodos utilizados para la obtención de embriones germinados, dado su bajo índice de germinación, fueron los cultivos *in vitro*. Estos cultivos se realizaron a partir de tallos y semillas de las especies estudiadas, siguiendo una metodología distinta para cada caso.

Preparación de los medios de cultivo para el material vegetal *in vitro*

En primer lugar se prepararon las disoluciones stock, necesarias para realizar los medios de cultivo. La composición utilizada es un medio modificado de Murashige y Skoog (1962) y está formada por los siguientes compuestos:

Stocks de macronutrientes: (Preparados por separado)

- NH_4NO_3 : 157 g/l
- KNO_3 : 190 g/l
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 44 g/l
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 37 g/l
- KH_2PO_4 : 17 g/l

Stock de NaFe · EDTA: (Preparados conjuntamente)

- Na-EDTA · 2H₂O: 3,72 g/l
- FeSO₄ · 7H₂O: 2,78 g/l

Stock de micronutrientes: (Preparados conjuntamente)

- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 1,69 g/l
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,86 g/l
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,0025 g/l
- KI: 0,0830 g/l
- H_3BO_3 : 0,62 g/l
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,025 g/l
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,025 g/l

Stocks de vitaminas: (Preparados por separado)

- Tiamina-HCl: 1 g/l
- Piridoxina-HCl: 1 g/l
- Ácido nicotínico: 1 g/l
- Glicina: 1 g/l
- i-inositol: 0,1 g/l

Stocks de fitohormonas: (Preparados por separado)

- Auxina – IAA: 1 mM
- Citoquinina – BAP: 1 mM

Para preparar 500 ml de medio de cultivo, se vertieron 400 ml de agua destilada en un vaso de precipitados. A continuación, se añadió el volumen correspondiente de cada stock según se trate de medio de germinación (MS0), medio de enraizamiento (ME) y medio de germinación con fitohormonas (MSV1).

Por tanto, las cantidades a añadir en cada medio fueron las siguientes:

Tabla 4: Nutrientes empleados para realizar la disolución mineral. MS0: medio de germinación, ME: medio de enraizamiento, MSV1: medio de germinación con fitohormonas. Fuente: elaboración propia

Stock	MS0	ME	MSV1
NH ₄ NO ₃	10 ml/l	5 ml/l	10 ml/l
KNO ₃	10 ml/l	5 ml/l	10 ml/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10 ml/l	5 ml/l	10 ml/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 ml/l	5 ml/l	10 ml/l
KH ₂ PO ₄	10 ml/l	5 ml/l	10 ml/l
Stock NaFe · EDTA	10 ml/l	10 ml/l	10 ml/l
Stock micronutrientes	10 ml/l	10 ml/l	10 ml/l
Tiamina-HCl	0,4 ml/l	0,4 ml/l	0,4 ml/l
Piridoxina-HCl	0,5 ml/l	0,5 ml/l	0,5 ml/l
Ácido nicotínico	0,5 ml/l	0,5 ml/l	0,5 ml/l
Glicina	2 ml/l	2 ml/l	2 ml/l
i-inositol	0,1 g/l	0,1 g/l	0,1 g/l
Sacarosa	30 g/l	30 g/l	30 g/l
Auxina - IAA	-	-	11,4 ml/l
Citoquinina - BAP	-	-	0,3 ml/l

Una vez preparado cada medio, se añadió agua destilada hasta un volumen cercano al necesario (aproximadamente 480 ml) y se disolvieron todos los componentes utilizando un agitador magnético. Con ayuda de un pH-metro se ajustó el pH a 5,7 utilizando para ello NaOH o HCl.

En una probeta, se enrasó hasta 500 ml con agua destilada y se llevó la disolución a un frasco de vidrio, al cual se le añadieron 7 g de Agar agitando durante unos minutos. Esta disolución se esterilizó en el autoclave.

En una cabina de flujo laminar, se vertieron aproximadamente 20 ml del medio en frascos estériles. Se dejaron solidificar en la cabina, con la tapa apoyada en la parte superior y se cerraron una vez eliminado el vapor. Por último, se etiquetó cada frasco dependiendo del medio utilizado.

Siembra de semillas *in vitro*

Se envolvieron las semillas en una gasa formando un paquete y se sumergieron en agua con lejía (5 g cloro) durante 15 minutos y en agitación.

En campana de flujo laminar, se decantó la lejía dejando únicamente las semillas con la gasa y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril durante dos minutos cada vez.

A continuación, sobre un papel de filtro estéril, se abrió el paquete con las semillas.

Con ayuda de unas pinzas estériles, se cogieron las semillas y se colocaron sobre el medio MS0 (véase figura 11).

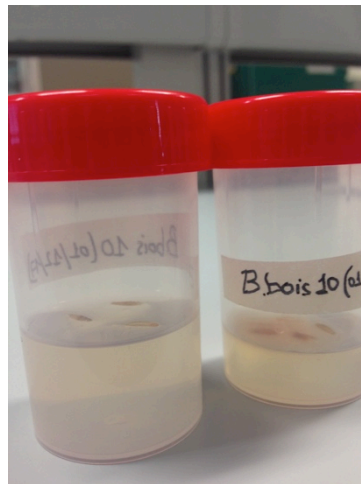


Figura 11: Semillas de *Brachypodium boissieri* colocadas sobre el medio MS0. Fuente: elaboración propia.

Por último, los botes con el medio y las semillas en el interior, se llevaron a una cámara de cultivo con una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Organogénesis a partir de tallo *in vitro*

De cada maceta escogida, se cortaron tallos de aproximadamente 5 cm y se introdujeron en agua con lejía (5 g cloro) durante 20 minutos y en agitación magnética.

En campana de flujo laminar se decantó la lejía y se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril durante 2 minutos cada uno.

Utilizando un bisturí estéril, se cortaron los rizomas de los tallos y se desecharon los extremos.

A continuación, se colocaron los tallos sobre el medio ME y MSV1 (véase figura 12), y por último se llevaron a la cámara de cultivo a temperatura de 25 °C y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

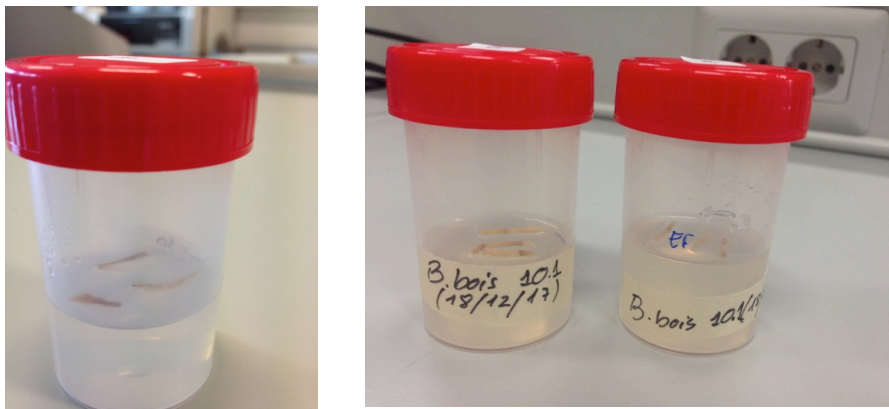


Figura 12: Tallos colocados sobre los medios ME y MSV1. Fuente: elaboración propia

3.3. Obtención de preparaciones microscópicas

La obtención de preparaciones microscópicas con cromosomas en metafase se ha llevado a cabo atendiendo a las directrices generales del protocolo de los autores Jenkins & Hasterok (2007), en una serie de fases que a continuación se describen:

- **Pretratamiento de los ápices radiculares**

Los embriones germinados seleccionados para la obtención de ápices radiculares, o los ápices radiculares obtenidos de los cultivos hidropónicos, se introdujeron durante 24 horas en tubos Falcon de 15 ml con agua a 4 °C en su interior. De esta manera se pretendió detener el proceso mitótico y fomentar una acumulación de células metafásicas en los meristemas, puesto que es en esta fase donde los cromosomas poseen el mayor grado de condensación y pueden ser diferenciados entre sí.

- **Fijación**

Tras el pretratamiento, los embriones fueron extraídos del agua para proceder a su fijación o interrupción rápida de los procesos vitales de los mismos. Para llevar a cabo esta fase se empleó la disolución de Carnoy, formada por metanol y ácido acético glacial, en proporción 3:1 en volumen respectivamente.

Una vez preparada la mezcla, las raíces se introdujeron en esta durante 30 minutos y se mantuvieron en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se renovó la mezcla y se almacenaron de nuevo en oscuridad durante 4 horas. Por último, para su conservación se introdujeron a -20 °C hasta su siguiente uso.

- **Digestión enzimática**

Para la extracción de meristemas, previamente se deben destruir la pared celular y la pectina de las uniones intercelulares, realizando una digestión celular de los ápices radiculares con enzimas.

Para ello se extrajeron primero los embriones germinados almacenados en la disolución de Carnoy y se sumergieron en tampón citrato 10 mM y pH 4,8

El tampón citrato x10 está compuesto por:

- Ácido cítrico monohidratado: 0,84 g
- Citrato trisódico dihidratado: 1,76 g
- Agua destilada: 100 ml

Antes de cada uso fue necesario diluir 10 veces.

Seguidamente, se cortaron los ápices radiculares con un bisturí, y se lavaron de nuevo por separado con tampón citrato 10 mM tres veces durante cinco minutos cada vez.

Tras eliminar el exceso de tampón de los ápices con papel absorbente, se colocaron estos en un bloque de vidrio para microscopio, sumergidos durante 1 hora y 40 minutos en una mezcla enzimática a 37 °C, temperatura óptima a la cual las enzimas digieren la muestra.

Dicha mezcla enzimática está formada por:

- Pectinada de *Aspergillus niger* [4% volumen/volumen final] (Sigma P4716): 0,4 ml
- Celulasa [1% peso/volumen final] Onozuka R-10 (Serva 16419): 0,1 g
- Celulasa [1% peso/volumen final] de *Trichoderma viride* (Sigma C9422): 0,1 g

Todo ello enrasado a 10 ml con tampón citrato 10 mM de pH 4,8 homogeneizado mediante agitación y almacenado a -20 °C en dosis de 1 ml para su uso.

Transcurrido el tiempo en dicha mezcla, se retiró esta y se lavaron los ápices con tampón citrato 10 mM de nuevo, eliminando así restos de la mezcla enzimática y quedando preparados para poder realizar la extracción de los meristemas.

- **Extracción de meristemas**

Tras la digestión, con una pipeta Pasteur se seleccionaron los ápices radiculares inmersos en la disolución tampón citrato y se colocaron sobre un portaobjetos. Se retiró el tampón citrato de los mismos y se vertió una gota de ácido acético glacial al 45% sobre cada ápice, para seguir digiriendo los tejidos externos y facilitar tanto la visualización del meristemas como su extracción.

Mediante la observación a través de una lupa binocular Nikon SMZ800, se retiró la coña de la raíz con ayuda de dos agujas enmangadas y se liberó el tejido meristemático. Con una micropipeta se seleccionó el meristemas y se traspasó a un portaobjetos nuevo, lavado con etanol al 70% (por cada portaobjetos se colocaron de 3 a 4 meristemas).

El tejido meristemático, al estar continuamente de división, alberga gran cantidad de células con cromosomas en metafase, lo que permitirá después obtener preparaciones microscópicas con mayor facilidad que usando otro tejido.

Con los meristemos en el portaobjetos, se colocó encima un cubreobjetos de vidrio de 24x24 mm, previamente lavado con etanol al 70 %, y se le aplicó presión, facilitando la dispersión de los cromosomas.

- **Búsqueda de cromosomas en metafase**

Para la búsqueda de cromosomas se empleó un microscopio de contraste de fase ZEISS AX10-Lab. A1, en el que se observó el portaobjetos preparado anteriormente.

Tras localizar al menos cinco juegos cromosómicos visibles, contables y fuera del núcleo celular, se procedió a marcar los portas seleccionados con el código correspondiente a cada individuo, la calidad de la preparación y los límites del cubreobjetos.

- **Fijación de las preparaciones microscópicas**

Los portaobjetos con preparaciones adecuadas y marcados, se introdujeron en hielo seco (CO₂) inmediatamente después de localizar las células con cromosomas, para evitar que la entrada de aire deteriore y desplace las células presentes en la preparación. Permanecieron en hielo seco alrededor de 45 minutos para permitir la fijación de los cromosomas al portaobjetos.

Se retiró después el cubreobjetos con una cuchilla y con ayuda de una pipeta Pasteur se vertió en la preparación una mezcla de etanol absoluto y ácido acético glacial en proporción 3:1 en volumen respectivamente, subenfriado a -20 °C, para conseguir una mayor fijación de los cromosomas.

Posteriormente, se lavaron los portaobjetos sumergiéndolos en etanol absoluto al 100 % durante 30 minutos en un recipiente de vidrio y en posición vertical.

Una vez extraídos del recipiente, se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche y por último fueron almacenados a 4 °C para su posterior uso.

3.4. Tinción con DAPI para determinar el número cromosómico (2n)

Para la tinción con el marcador fluorescente DAPI (4',6-diamino-2 fenilindol), inicialmente fue necesario preparar la disolución DAPI-Vectashield, el cual se realizó de la siguiente manera:

- Se disolvió 1 mg de DAPI en 10 ml de agua destilada estéril.
- Se hicieron alícuotas de 1 ml y se guardó a -20 °C en oscuridad.
- En un tubo eppendorf se realizó una mezcla compuesta por 2.5 µL de DAPI y 97.5 µL de Vectashield (Vector Laboratories H-1000). Esta mezcla se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

A continuación, los portaobjetos preparados con los cromosomas se sacaron de la nevera y se dejaron secar en oscuridad a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos.

Transcurrido este tiempo se añadieron 9 µL por porta del medio DAPI-Vectashield y se colocó un cubreobjetos de vidrio (24x24 mm) lavado con etanol al 70%, evitando la aparición de burbujas y eliminando el exceso de mezcla presionando con papel de filtro absorbente. Finalmente fueron guardados en oscuridad a 4 °C durante toda la noche.

Visualización

Para la localización de los grupos de cromosomas, se empleó un microscopio de fluorescencia Motic BA410 (véase figura 13).



Figura 13: Microscopio de Fluorescencia. Fuente: elaboración propia

El microscopio de fluorescencia presenta una modalidad DAPI en una longitud de onda de 461 nm, que permite ver en el mismo los cromosomas en color azul.

Con el objetivo de 100x, para el cual fue necesario utilizar una gota de aceite de inmersión, se pudieron localizar con mayor facilidad los grupos de cromosomas.

El microscopio de fluorescencia se encuentra conectado con un ordenador, a través del cual se pudieron realizar fotografías de lo observado en el portaobjetos. Estas fotografías se pudieron observar en el ordenador en blanco y negro. Por último, con ayuda del software Wasabi, se pudo teñir cada imagen en color azul, proporcionando una mayor nitidez, para posteriormente poder realizar correctamente el conteo cromosómico.

3.5. Hibridación in situ Fluorescente (FISH)

3.5.2. Preparación de las sondas de DNA ribosómico

Las sondas complementarias a las regiones ribosómicas que se utilizaron, procedían de *Triticum aestivum*, para la región 5S y de *Arabidopsis thaliana*, para la 25S. Ambas estaban insertadas en clones de *Escherichia coli* (5S: pTa794; 25S: 25S rDNA de *A. thaliana*). Estas

células fueron recibidas de la colección del Departamento de Citología de la Universidad de Silesia en Katowice, Polonia.

Preparación de los medios de cultivo LB (Luria-Bertani) líquido y sólido.

Para el cultivo de *Escherichia coli*, se utilizó el medio de Luria-Bertani modificado (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989).

Para proceder a la preparación del medio sólido y del medio líquido, en primer lugar se elaboraron 500 ml del medio de cultivo, compuesto por:

- Triptona (Digerido pancreático de caseína): 5 g
- Extracto de levadura: 2,5 g
- Cloruro de sodio: 2,5 g

Esta mezcla se traspasó a un vaso de precipitados y se enrasó con agua MQ (agua doblemente destilada) hasta 400 ml, agitando después la preparación con un agitador magnético. Posteriormente se ajustó el pH de la mezcla a 7 con ayuda de ácido clorhídrico o sosa, y se enrasó de nuevo con agua MQ hasta 500 ml, obteniendo así la preparación a partir de la cual se elaboraron después ambos medios.

En dos frascos de Schott, se vertieron por un lado 3 g de agar y 200 ml de la mezcla anterior en uno de ellos para el medio sólido, y 300 ml de mezcla en el segundo para el medio líquido. Después se esterilizaron en autoclave.

El contenido del frasco del medio sólido se vertió sobre placas Petri en campana de flujo laminar y se dejó solidificar. Posteriormente se almacenó a 4 °C.

El contenido del frasco del medio líquido se repartió en tubos Falcon de 50 ml estériles y se conservaron también a 4 °C hasta su posterior uso.

Siembra de bacterias en el medio sólido

Empleando un asa de siembra y las bacterias que contenían las regiones de DNA ribosómico 5S y 25S, se realizó una siembra por agotamiento sobre el medio sólido

contenido en las placas Petri. Finalmente se obtuvieron dos placas con bacterias 5S y otras dos con bacterias 25S.

Las placas se introdujeron en la estufa a 37 °C durante una noche para favorecer el crecimiento de colonias de bacterias .

Siembra de bacterias en el medio líquido

El contenido de los tubos Falcon con el medio líquido, se repartió en cuatro nuevos tubos de 15 ml, dos para cada tipo de bacteria.

Para la realización de la siembra bacteriana se seleccionó una colonia con una punta de micropipeta, y se introdujo en el tubo Falcon correspondiente con el medio líquido. De esta manera, se obtuvieron cuatro tubos Falcon con bacterias sembradas; dos con bacterias 5S y otras dos para 25S.

Los tubos con las puntas de micropipeta en su interior se introdujeron en el agitador orbital (véase figura 14) a 37 °C durante toda la noche.



Figura 14: Agitador orbital. Fuente: elaboración propia

Extracción de DNA

Una vez que las bacterias proliferaron en el medio líquido se procedió a la extracción del DNA.

Para ello, los tubos Falcon con las bacterias en el medio líquido se centrifugaron a 4000 revoluciones por minuto durante 4 minutos a temperatura ambiente para favorecer su precipitación. Posteriormente se retiró el sobrenadante y las puntas de micropipeta quedando así las bacterias precipitadas en el fondo.

La extracción del DNA de las bacterias se realizó empleando el Kit QIAprep Spin Miniprep Kit (50) de QIAGEN. El procedimiento fue el siguiente:

Se cogieron 500 μ l del tampón de ruptura que contenía RNAsas presente en el Kit (tampón 1) y se resuspendieron las bacterias, rompiendo así las paredes celulares de las mismas y el RNA.

El contenido de cada tubo Falcon con las bacterias en suspensión, se traspasó a 2 tubos eppendorf de 1,5 ml. Durante 3 minutos se dejaron incubar permitiendo que el tampón de ruptura hiciera efecto.

Se cogieron 400 μ l del tampón detergente del Kit (Tampón 2) y se vertieron en cada tubo eppendorf. A continuación se agitaron suavemente hasta conseguir que el contenido de los tubos se volviera azul (no más de cinco minutos).

Se añadieron 400 μ l de tampón 3 del Kit para provocar la precipitación del contenido de los tubos agitando suavemente durante 3-4 minutos, hasta que la mezcla se volviera de color blanco. Para detener la reacción se colocaron los tubos en hielo.

Posteriormente se centrifugaron a 13.500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se tomó únicamente el sobrenadante, que es donde se encuentra el DNA que interesa extraer y se traspasó a dos nuevos tubos de 1.5 ml.

A continuación se añadieron 650 μ l de isopropanol y se agitó suavemente durante 1 minuto, para luego centrifugar durante 20 minutos a 13.500 rpm a temperatura ambiente.

Se retiró de nuevo el sobrenadante y se añadieron 500 μl de etanol al 70 %.

Posteriormente se centrifugaron de nuevo los tubos a 13500 rpm durante dos minutos y se retiró el sobrenadante, dejando evaporar el etanol restante.

Por último, se adicionaron 30 μl de buffer EB (10 mM Tris-HCl pH 8,5) en cada tubo y se almacenaron a 4°C durante un día.

Cuantificación del DNA extraído

Empleando un fluorómetro Qubit 3.0 (Life technologies) (véase figura 15), se determinó la concentración de DNA extraído.

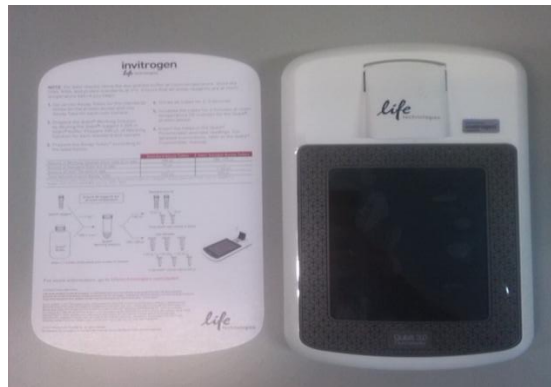


Figura 15: Qubit 3.0 Fluorometer. Fuente: elaboración propia.

Para ello se siguió el protocolo proporcionado por la empresa, realizándose de la siguiente manera:

Se preparó inicialmente una “disolución de trabajo”, formada por los siguientes componentes:

- Reactivo Qubit (disolución presente en el Kit): 1 μl por cada muestra a analizar incluyendo dos estándares.
- Tampón Qubit (disolución presente en el Kit): 199 μl por cada muestra a analizar incluyendo dos estándares.

Los dos estándares, son empleados por el fluorómetro para realizar la recta de calibrado automáticamente, permitiendo después la obtención de la concentración de DNA presente en las muestras de interés. En este caso se escogieron los estándares necesarios para realizar la medición en el modo “Broad range” (2-1000 ng).

A continuación, se prepararon las muestras y los estándares a analizar en tubos proporcionados por el Kit. Se emplearon 4 tubos, a los que se adicionó a cada uno:

- Tubo1: 1µl de la muestra de DNA 5S
- Tubo 2: 1 µl de la muestra de DNA 25S
- Tubo 3: 10 µl de estándar 1
- Tubo 4: 10 µl de estándar 2

Cada uno de ellos se enrasó hasta 200 µl con la disolución de trabajo preparada inicialmente, asegurando que el volumen final fuera el mismo.

Esta mezcla se agitó durante 2 segundos y se dejó 2 minutos en incubación antes de realizar la medida.

Finalmente se introdujeron cada uno de los tubos en el fluorómetro, pudiéndose observar en la pantalla la concentración obtenida.

Marcaje y lavado del DNA extraído

Una vez extraído el DNA de las regiones 5S y 25S, se procedió a su marcaje. Para ello se emplearon dos técnicas diferentes dependiendo del tamaño de las regiones:

- Marcaje por PCR: apto para DNA con un tamaño comprendido entre 0,2-2 Kilopares de bases (Kpb).
- Marcaje por “Nick Translation”: apto para DNA con un tamaño comprendido entre 1-20 ó 100 Kpb.

En relación al tamaño que presentaron ambas regiones extraídas, 5S: 410 pares de bases y 25S: 2,3 Kilopares de bases, se realizó el marcaje de la región 5S por el método de PCR y la región 25S por Nick Translation (Hasterok, Langdon, Taylor & Jenkins, 2002).

Marcaje de la región 5S por PCR

Para realizar el marcaje necesario para 8 preparaciones microscópicas se preparó la mezcla de reacción en un tubo apto para el termociclador de 0.2 ml, obteniéndose finalmente un volumen de 50 μ l. Esta mezcla se formó a partir de los siguientes reactivos:

- Agua MQ estéril: 25.5 μ l
- Buffer x10: 5 μ l
- MgCl₂ (25 mM): 3 μ l
- dATP (2,5 mM): 2 μ l
- dCTP (2,5 mM): 2 μ l
- dGTP (2,5 mM): 2 μ l
- dTTP (2,5 mM): 3,25 μ l
- Primer directo (PVI-M13, 10 μ M): 2 μ l
- Primer reverso (PVII-M13, 10 μ M): 2 μ l
- DNA (30 ng/ μ l): 1 μ l
- Digoxigenina-dUTP (1mM): 1,75 μ l
- Taq: 0,5 μ l

Una vez preparada la mezcla, el tubo se introdujo en un termociclador con el siguiente programa:

94 °C: 1 minuto
94 °C: 40 segundos
55 °C: 40 segundos
72 °C: 1 minuto y 10 segundos
72 °C: 5 minutos
4°C

} Durante 35 ciclos

Posteriormente se almacenó a 4 °C hasta proceder a su lavado.

Lavado de DNA de la región 5S

Una vez marcado el DNA, se procedió a su lavado; para ello se añadió en el tubo la siguiente mezcla:

- Acetato de sodio 3 M (Concentración final V/V: 1/10): 5 µl
- Etanol 100 % frío (-20 °C): 137,5 µl

A continuación se mezcló cuidadosamente el contenido y se dejó durante 30 minutos en el congelador a -80 °C.

Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos y con una micropipeta se retiró el sobrenadante hasta no dejar nada de líquido.

Se vertieron 50 µl de etanol al 70 % frío (-20 °C) y se centrifugó de nuevo a 14000 rpm durante 15 minutos, retirando después el sobrenadante hasta dejar únicamente el precipitado de DNA y dejando evaporar el etanol restante introduciendo el tubo en la estufa durante 15 minutos a 37 °C.

Por último, se añadieron 10 µl de agua MQ y tras agitar suavemente se almacenó a oscuridad durante 12 horas a 4 °C, para asegurar que todo el DNA se resuspendiera.

Marcaje de la región 25S por “Nick Translation”

Para realizar el marcaje necesario para 8 preparaciones microscópicas se preparó la mezcla de reacción en un tubo de 0,2 ml apto para el termociclador, obteniéndose finalmente un volumen de 20 µl. Esta mezcla se formó a partir de los siguientes reactivos:

- dATP (0,4 mM): 2,5 µl
- dCTP: (0,4 mM): 2,5 µl
- dGTP (0,4 mM): 2,5 µl
- dTTP (0,4 mM): 1,67 µl
- DNA (2 µg): 6 µl
- Tetrametil-rodamina-dUTP (1mM): 0,85 µl
- Mezcla de enzimas y buffer: 4 µl

Una vez preparada la mezcla, el tubo se introdujo en un termociclador con el siguiente programa con un único ciclo:

15 °C: 1 hora y 30 minutos

64 °C: 10 minutos

4°C

Posteriormente se almacenó a 4°C hasta proceder a su lavado.

Lavado de DNA de la región 25S

Para lavar el DNA marcado, se añadió en el tubo la siguiente mezcla:

- Acetato de sodio 3 M (1/10): 2 µl
- Etanol 100 % frío (-20 °C): 55 µl

Se mezcló el contenido del tubo y se introdujo durante 30 minutos en el congelador a -80°C.

Transcurrido el tiempo se centrifugó 30 minutos a 14000 rpm y se retiró el sobrenadante con micropipeta hasta no dejar nada de líquido.

Se añadieron 50 µl de etanol al 70% frío a -20 °C y se centrifugó de nuevo a 14000 rpm durante 15 minutos.

A continuación se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se dejó el tubo en la estufa durante 15 minutos a 37 °C para eliminar el etanol restante.

Finalmente se añadieron 10 µl de agua MQ, y tras agitar suavemente se almacenó a 4 °C durante toda la noche, para que el DNA precipitado se resuspendiera.

3.5.2. Realización de FISH (Hibridación Fluorescente *In Situ*)

Preparación de los reactivos

Para la realización de FISH se prepararon una serie de reactivos necesarios que se describen a continuación:

Tampón citrato sódico salino (20xSSC): para su elaboración se disolvieron 175,3 g de NaCl y 88,3 g de citrato de sodio dihidratado en 800 ml de agua destilada estéril. Posteriormente, tras homogeneizar la mezcla, se ajustó el pH a 7 con ácido clorhídrico. Hecho esto, se enrasó hasta un litro con agua destilada estéril y se esterilizó la mezcla en autoclave.

Tampón fosfato sódico salino pH=7 (10xPBS): para realizarlo se prepararon inicialmente dos disoluciones:

-Disolución 1: se disolvieron 8,01 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac) y 36,82 g de NaCl (Panreac) en 450 ml de agua destilada.

-Disolución 2: se disolvieron 1,56 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 8,18 g de NaCl (ambos de Panreac) en 100 ml de agua destilada. Seguidamente se ajustó la disolución 1 hasta conseguir un pH de 7, empleando la disolución 2.

Por último se enrasó la mezcla hasta 500 ml con agua destilada y se esterilizó en autoclave.

Disolución de RNAsa A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$): Se disolvieron 10 mg de RNAsa A (Sigma R-5503) en 1 ml de Tris-HCl 10 mM y 15 mM de NaCl. Se puso a hervir durante 15 minutos y se dejó enfriar. Finalmente se realizaron alícuotas de 20 μl en tubos de 2ml y se guardaron en el congelador a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Para su posterior uso se añadieron a cada tubo 1980 μl de 2xSSC.

Formaldehído, libre de ácido, al 1% en PBS: Para preparar 100 ml se mezclaron 10 ml de 10xPBS con 3 ml de formaldehído al 36 % libre de ácidos (Panreac 131328) y se enrasó hasta 100 mL con agua destilada estéril.

Al tratarse de una disolución inestable se preparó inmediatamente antes de ser utilizada.

Sulfato de dextrano al 50% (w/v): Se disolvieron 2,5 g de sulfato de dextrano (Sigma D8906) en 5 ml de agua destilada estéril calentando a $65\text{ }^\circ\text{C}$.

A continuación, la disolución se esterilizó mediante filtros de 0,22 μm y se guardó en alícuotas de 1ml a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Formamida desionizada: se mezclaron 200 ml de formamida 100% (Sigma F7503) con 10 g de resina de Amberlita (Merk IRN-150). Se agitó la mezcla durante 90 minutos y se filtró con papel de filtro.

Dodecil-Sulfato Sódico al 10 % (SDS 10%; w/v): Para su preparación se disolvieron 10 g de SDS (Sigma L4390) en 100 ml de agua destilada estéril y posteriormente se esterilizó por filtración.

Anticuerpos anti-digoxigenina-FITC: se mezclaron 30 μl de anticuerpo anti-digoxigenina (Roche 11 207 741 910) con 270 μl de leche desnatada bloqueante.

Tween/4xSSC: Se diluyeron 2 ml de Tween 20 (Sigma P2287) en 798 ml de agua destilada estéril y 200 ml de 20xSSC.

Leche desnatada bloqueante: Se disolvieron 2.5 g de leche desnatada en polvo en 40 ml de agua destilada estéril y 10 ml de 20xSSC y llevó a un agitador. A continuación se pasó por filtros de 0.22 μm y guardó en alícuotas de 2 ml a -20 °C.

Medio DAPI-Vectashield: Se disolvió 1 mg de DAPI en 10 ml de agua destilada estéril. Se hicieron alícuotas de 1 ml y se guardó a -20 °C.

Para su posterior uso, se preparó el medio DAPI-Vectashield, para el cual en un tubo eppendorf se realizó una mezcla compuesta por 2,5 μl de DAPI y 97,5 μl de Vectashield (Vector Laboratories H-1000). Esta mezcla se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

Una vez preparados todos los reactivos, se seleccionaron aquellas preparaciones microscópicas con una mayor calidad de visualización de los cromosomas que fueron realizadas anteriormente.

El protocolo seguido para realizar FISH es una modificación del descrito por Jenkins & Hasterok, (2007):

Pretratamiento de los portaobjetos con cromosomas

En primer lugar se añadieron 200 μl de RNAsa A en cada portaobjetos cubriéndolo con un cubre de polietileno y se llevó a incubar en cámara húmeda a 37 °C durante una 1 hora.

Transcurrido este tiempo, se colocaron los portas en una cestilla para lavar con 2xSSC y se lavaron a temperatura ambiente 3 veces durante 5 minutos cada vez, retirando en el primer lavado los cubres de plástico.

A continuación se colocó una cestilla con los portas en formaldehído al 1 % en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.

De nuevo se lavaron con 2xSSC 3 veces durante 5 minutos cada vez.

Por último, se deshidrataron durante 3 minutos en cada disolución de etanol al 70%, 90% y 100% y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Desnaturalización e hibridación

En primer lugar se preparó la mezcla de hibridación, la cual se realizó en tubos eppendorf de 0,5 ml y en oscuridad. La mezcla se compuso de los siguientes reactivos para un portaobjetos:

Tabla 5: Reactivos empleados en la mezcla de hibridación. Fuente: elaboración propia.

Reactivo	µl/portaobjeto
Formamida 100% desionizada	16
Sulfato de dextrano 50% (w/v)	12
20xSSC	4
SDS (10% w/v)	2
DNA bloqueante (DNA de salmón)	2
DNA marcado 5s	2
DNA marcado 25s	2

Una vez preparada la mezcla, se centrifugó durante 30 segundos y se desnaturalizó a 75 °C en el baño seco durante 10 minutos y de nuevo se enfrió sobre hielo otros 10 minutos.

Transcurrido este tiempo se añadieron 38 µl de la mezcla en cada portaobjetos y se cubrió con un cubre de plástico.

Los portas fueron colocados en la placa calefactora de hibridación Boekel 28000 a 70 °C durante 4 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo, se enfriaron los portaobjetos. Para ello, se programó de nuevo la placa a una temperatura de 37 °C y se esperó el tiempo suficiente hasta ser alcanzada.

Por último se almacenaron en cámara húmeda durante 16 horas (toda la noche) a dicha temperatura (37°C), para fomentar la hibridación de las sondas con el DNA de las preparaciones.

Lavado riguroso

Para eliminar el DNA marcado y que no llegó a hibridarse se realizó un lavado en el cual se introdujeron los portaobjetos en 2xSSC dentro de la cesta de lavado a 42 °C, retirando los cubreobjetos de plástico.

Seguidamente, se sumergieron en una disolución de formamida al 10% en 0,1xSSC, dos veces durante cinco minutos cada vez a 42 °C.

Después, se lavaron de nuevo con 2xSSC, tres veces durante tres minutos cada una a 42 °C. Y por último, se sumergieron en 2xSSC tres veces durante tres minutos cada vez a temperatura ambiente.

Inmunodetección de la digoxigenina

Para la detección de la digoxigenina, al tratarse de un reactivo no fluorescente, se necesitó la adición de anticuerpos anti-digoxigenina-FITC, para que estos se unieran a las zonas marcadas con este reactivo, permitiendo así poder observarlas en el microscopio de fluorescencia, ya que la molécula fluorescente es el isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Para ello, inicialmente se realizó un lavado de los portaobjetos durante 5 minutos con Tween/4xSSC a temperatura ambiente. A continuación se escurrieron y se añadieron 250 µl del reactivo bloqueante (leche desnatada) a cada portaobjetos, colocando un cubre de plástico encima y dejando incubar en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente. Antes de utilizar la leche desnatada como bloqueante, esta debe ser centrifugada a 10.000 rpm durante 3 minutos.

Transcurrido este tiempo, se retiró el cubre y se volvió a escurrir por el borde.

Posteriormente se añadieron 38 µl del anticuerpo anti-digoxigenina-FITC y el reactivo bloqueante (leche desnatada) en proporción 1:10 respectivamente.

Se colocaron de nuevo cubres de plástico y se dejó en cámara húmeda a 37 °C durante 1 hora y 20 minutos.

A continuación, se lavaron con Tween/4xSSC tres veces durante ocho minutos cada vez a 37 °C, quitando el cubreobjetos con cuidado en el primer lavado.

A continuación, se deshidrataron los portaobjetos en etanol al 70 %, al 90% y al 100 % durante un minuto en cada alcohol y se dejaron secar en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos aproximadamente.

Para su posterior visualización en el microscopio se añadieron 9 µl por porta del medio DAPI-Vectashield y se colocó un cubreobjetos de vidrio (24x24 mm) lavado con etanol al 70%, evitando la aparición de burbujas y eliminando el exceso de mezcla presionando con

papel de filtro absorbente. Finalmente fueron guardados en oscuridad a 4 °C durante toda la noche.

Visualización

Una vez realizada la técnica FISH, se procedió a su visualización empleando el microscopio de fluorescencia Motic BA410, a través del cual se permitió la localización de los cromosomas y las zonas hibridadas con las sondas.

Tras localizar grupos de cromosomas, estos fueron fotografiados a través del ordenador, en las 3 modalidades distintas que ofrece el microscopio; la primera de ellas en modo DAPI, en una longitud de onda de 461 nm que permite ver los cromosomas en color azul, la segunda de ellas en modo Rodamina, con longitud de onda de 615 nm para ver las regiones 25S en color rojo y por último el modo FITC, a 546 nm para la observación de las regiones 5S en color verde.

Una vez realizadas las tres fotografías, con ayuda del software Wasabi, se asoció cada imagen a la longitud de onda correspondiente y se realizó una superposición de las tres, para poder observar los cromosomas con las dos regiones teñidas al mismo tiempo. Pudiendo así determinar el número de regiones existentes en cada célula de las especies de estudio.

3.6. Determinación del tamaño genómico mediante citometría de flujo

El contenido de DNA de las especies estudiadas, se determinó mediante un dispositivo denominado citómetro de flujo (véase figura 16), de la casa comercial Sysmex, que permite el análisis de las propiedades ópticas (dispersión de la luz y fluorescencia) de partículas que fluyen en una suspensión líquida.

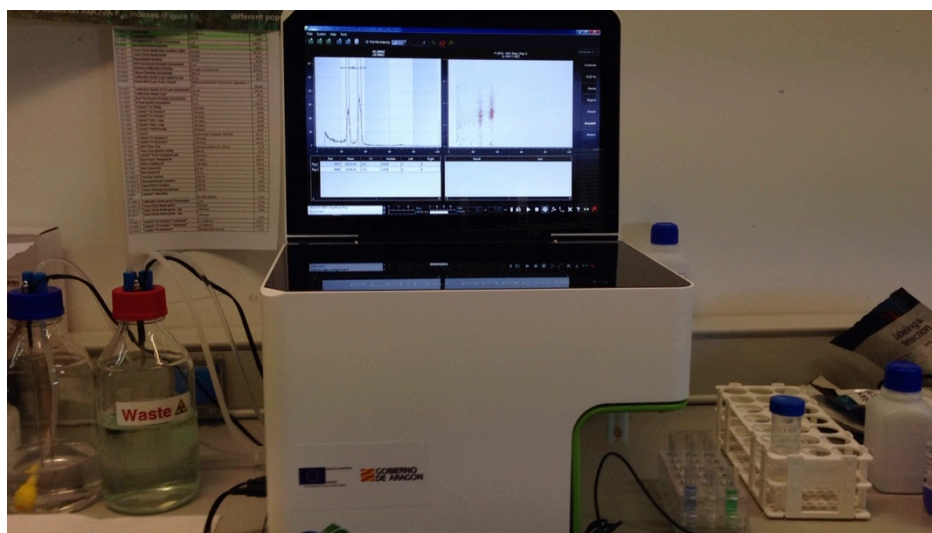


Figura 16: Citómetro de flujo. Fuente: elaboración propia

La interpretación de los resultados que nos ofrece esta herramienta requiere de un estándar de referencia; es decir, una muestra con contenido de DNA nuclear ya conocido. Para las dos especies que se estudian, se ha trabajado con los siguientes tres estándares:

Tabla 6: Estándares o patrones utilizados con un tamaño genómico ya conocido. Los superíndices indican el autor o autores que han determinado dicho tamaño. [1: Dolezel, J., Sgorbati, S. & Lucretti, S., 1992. 2: Sancho, R., 2018] Fuente: elaboración propia.

Especies	2C Contenido de DNA (pg DNA)
<i>Raphanus sativus</i> L.	1,11 ¹
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	1,96 ¹
<i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult. (Taxón Brup. 435)	0,82 ²

Para realizar esta técnica se llevó a cabo el protocolo de Dolezel J, Greilhuber J & Suda J (2007).

Antes de realizar la primera medida con el citómetro, se prepararon los reactivos necesarios:

- Yoduro de Propidio, IP (mg/ml): Para prepararlo se disolvieron 50 mg de yoduro de propidio en 50 ml de agua destilada estéril y se filtró por 0,22 μm . Por último se almacenó en alícuotas de 0,5 ml a -20 °C.
- RNAsa A (mg/ml): Se disolvieron 25 mg de RNAsa A en 25 ml de agua destilada. Se calentó a 90 °C durante 15 minutos para inactivar las DNAsas. A continuación se filtró por 0,22 μm y se guardó en alícuotas de 0,5 ml a -20 °C.
- Buffer Otto I (OTTO, 1990): Para su elaboración se disolvieron 4,2 g de ácido cítrico monohidratado y 1 ml de Tween 20 (P287) en 200 ml de agua destilada estéril. Esta disolución se filtró por 0,22 μm y se almacenó a 4°C.
- Buffer Otto II (OTTO 1990): Se pesaron 28,65 g de $\text{Mn}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ y se disolvieron con 200 ml de agua destilada. Posteriormente se filtró por 0,22 μm y se guardó a temperatura ambiente.

Una vez preparados todos los reactivos, con ayuda de una cuchilla se cortó un trozo de hoja de cada individuo (patrón y especie a estudiar) de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm y se depositaron juntos en una placa petri de vidrio. A continuación se vertieron 500 μl del buffer Otto I.

Posteriormente, con ayuda de la cuchilla se trituroó toda la mezcla de las hojas y el buffer hasta conseguir un reducido tamaño. A continuación, con una micropipeta a la que previamente se cortó la punta, se retiró todo el líquido y se filtró a través de un filtro de 50 μm .

A esta disolución se añadió, también por filtración, una mezcla formada por 900 μl de Otto II, 50 μl de Yoduro de Propidio y 50 μl de RNAsa A. Se dejó durante 3 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se introdujo el tubo con la mezcla en el citómetro para realizar la medición.

En el ordenador aparecerá un histograma con los picos pertenecientes a la muestra y al patrón. El programa proporciona datos de las partículas o núcleos que van pasando, una medida del área del pico y un coeficiente de variación de esa medida.

Estos datos proporcionados e refieren a las partículas limitadas a una región de los picos. Se detiene la medida cuando han pasado al menos 5.000 núcleos en total de manera equitativa entre la muestra y el patrón.

Los picos de los histogramas deben estar bien definidos y con un coeficiente de variación menor a 3. Tras detener la medición se anotan los datos y se guarda el histograma.

Entre medición y medición es necesario realizar un lavado y al finalizar su uso también se realizará un lavado final siguiendo las instrucciones indicadas por el software.

Para el estudio de cada individuo se realizaron dos medidas por día durante tres días seguidos.

4. RESULTADOS

4.1. Métodos de cultivo para la obtención de meristemos

Las semillas recogidas en campo de *Brachypodium retusum* y sembradas en placas de Petri no germinaron, excepto las semillas suministradas por la estación forestal de la DGA en Ejea de los Caballeros (Zaragoza).

En el caso de *Brachypodium boissieri*, la germinación fue mayor, aunque la disponibilidad de semillas fue baja.

Para inducir ápices radiculares a partir de planta viva se procedió a cultivar tallos en cultivos *in vitro* o generarlos en cultivos hidropónicos.

Tras la realización de los cultivos *in vitro*, no se obtuvieron radículas con ninguna de las dos especies. Al cabo de dos semanas únicamente aparecieron algunas colonias de hongos y los tallos se secaron (véase figura 17).

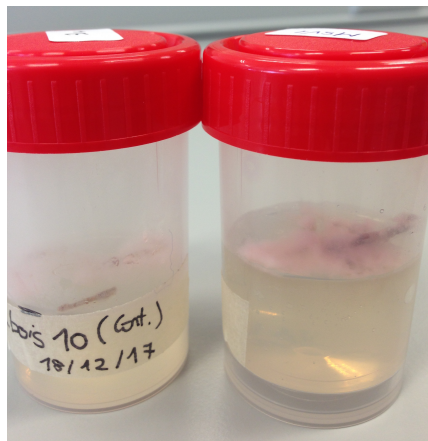


Figura 17: Medios de cultivo contaminados. Fuente: elaboración propia.

Tras la realización de los cultivos hidropónicos se obtuvieron radículas al cabo de aproximadamente entre 2 y 3 semanas tanto para *B. retusum* como para *B. boissieri*, exceptuando algunos casos de *Brachypodium retusum*, B. ret 451, B. ret 506, B. ret 551 y B. ret 558, en los cuales no se llegó a producir el crecimiento de éstas. El número de radículas generado fue bajo, obteniéndose entre 12 y 16 por cada cultivo; debido a esto, se tuvieron que realizar más de un cultivo hidropónico para cada población.

4.2. Número cromosómico y tamaño genómico de *Brachypodium retusum*

Tras la realización del conteo cromosómico y la determinación del tamaño genómico de las especies estudiadas de *Brachypodium retusum* de diferente procedencia, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 7: Número cromosómico (2n) y Tamaño genómico (2C) de las especies de estudio de *Brachypodium retusum*. También se incluye la procedencia de cada individuo. Individuos ordenados de menos a mayor valor de 2C. Fuente: elaboración propia.

Código	Procedencia	Número cromosómico (2n)	Tamaño genómico (2C) pg
B.ret 504	Francia: Hérault, Vic la Gardiole	32	1,669 ± 0,026
B. ret 506	Francia: Aude. Fontjoncouse.	-	1,672 ± 0,014
B.ret 501	Francia: Hérault, Castries.	32	1,673 ± 0,031
B.ret 507	Francia: Pyrénées Orientales, Salses le Château.	32	1,682 ± 0,015
B. ret 452	Marruecos: El Rif, Talembote, Djbel Tazzaot	-	1,708 ± 0,051
B.ret 407	Aragón: Huesca	32	1,715 ± 0,017
B. ret 500	Francia: Var. Pourrières.	-	1,724 ± 0,018
B.ret 559	Aragón: Huesca	32	1,744 ± 0,018
B.ret 558	Cataluña: Gerona	-	1,745 ± 0,042
B.ret 555	Andalucía: Granada	32	1,758 ± 0,013
B.ret 556	Andalucía: Jaén	32	1,765 ± 0,014
B.ret 451	Marruecos: El Rif, Talassemthane National Park.	-	1,779 ± 0,035
B.ret 551	Andalucía: Málaga	-	2,109 ± 0,025
B.ret 561	Aragón: Zaragoza	42	2,362 ± 0,046
B.ret 403	Aragón: Huesca	42	2,373 ± 0,958
B.ret 405	Aragón: Huesca	42	2,386 ± 0,039
B.ret 408	Navarra: Falces	42	2,431 ± 0,033
B.ret 557	Andalucía: Cádiz	42	2,464 ± 0,026
B.ret 564	Aragón: Zaragoza	-	2,473 ± 0,077

En la tabla 7 se puede observar que de todas las muestras estudiadas, el número cromosómico (2n) de los individuos procedentes de España varía entre 2n=32 y 2n=42; mientras que para el caso de los individuos de Francia este número es 2n=32 (véase figura 18). En cuanto al tamaño genómico (2C), el valor suele oscilar entre 1,6 y 1,7 pg para los

individuos que presentan $2n=32$ cromosomas, y entre 2,1 y 2,4 pg para aquellos que presentan $2n=42$ cromosomas. Todos datos los obtenidos con el citómetro de flujo para cada una de las medidas realizadas se encuentran en el Anexo 3.

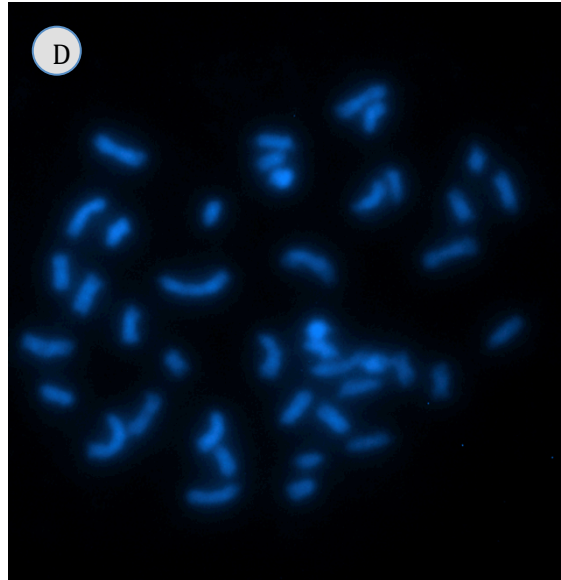
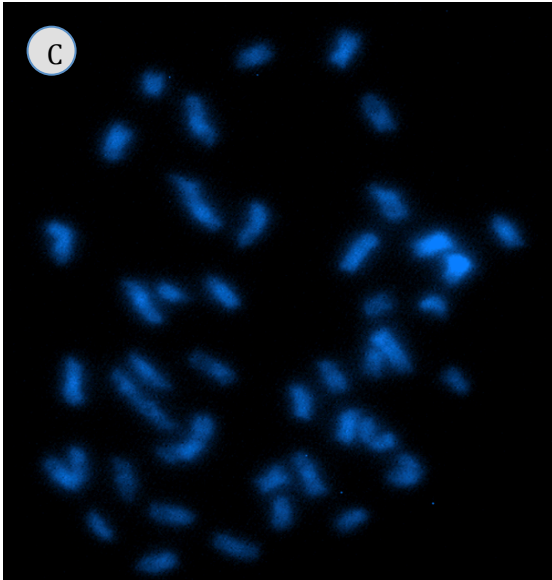
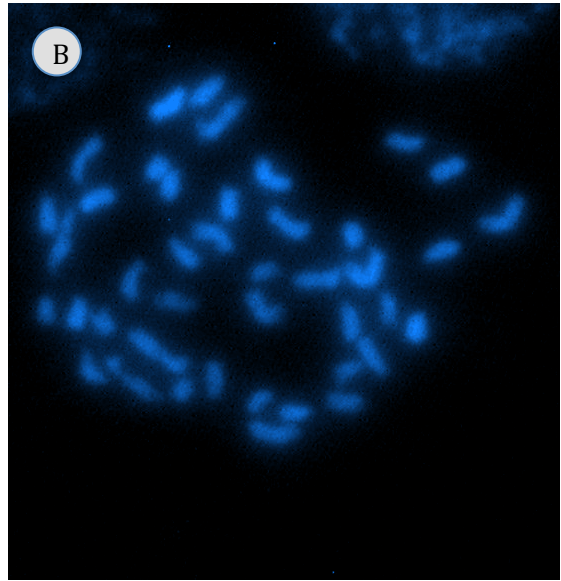
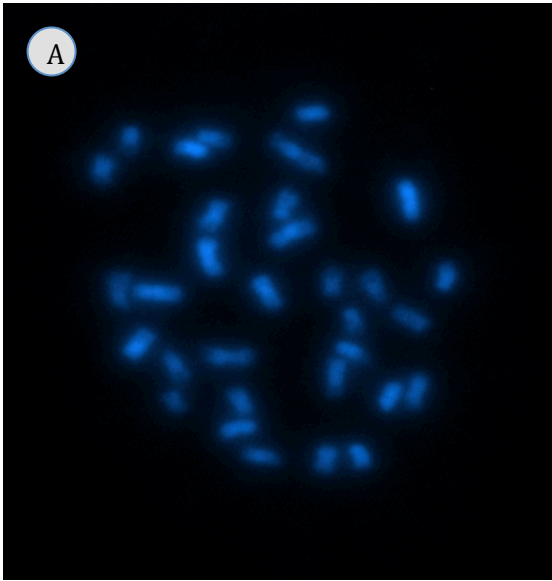
Para comprobar que ambos resultados obtenidos respecto al valor del tamaño genómico en el caso de las poblaciones con $2n= 32$ y $2n=42$ cromosomas son estadísticamente distintos, se ha realizado un Test de t-student a través del software para ordenador Past; esta prueba se utiliza para determinar si dos medias poblacionales son iguales.

Para ello se han utilizado cada una de las seis medidas realizadas para cada muestra con el citómetro de flujo, con sus respectivos valores del tamaño genómico.

Tabla 8: Resultados obtenidos con la prueba de t-student. Fuente: elaboración propia a partir del software Past.

2n=32	2n=42
N: 30	N: 42
Mean: 2,4033	Mean: 1,7152
95% Conf.: 2,3827 - 2,4239	95%Conf.: 1,7017 - 1,7286
Variance: 0,0030467	Variance: 0,001855
Difference between means: 0,68809	
95%conf.interval (parametric): 0,66499 - 0,7112	
95%conf.interval (bootstrap): 0,6651 - 0,7112	
t: 59,396	p (same mean): $1,2556 \times 10^{-61}$
Uneq.var.t: 57,002	p (same mean): $5,2208 \times 10^{-49}$
Monte Carlo permutation;	p (same mean): 0,0001

Siendo N el número de observaciones y Mean las medias obtenidas del tamaño genómico diferenciadas por el valor de $2n$, en la tabla 8 se observa que la probabilidad de que estas medias sean iguales es de $1,2556 \times 10^{-61}$, es decir, un valor que se aleja considerablemente del valor de t de 0,05 (hipótesis nula basada en una distribución normal). A medida que los datos se alejen de este valor, se asume que las medias que se han obtenido son distintas.



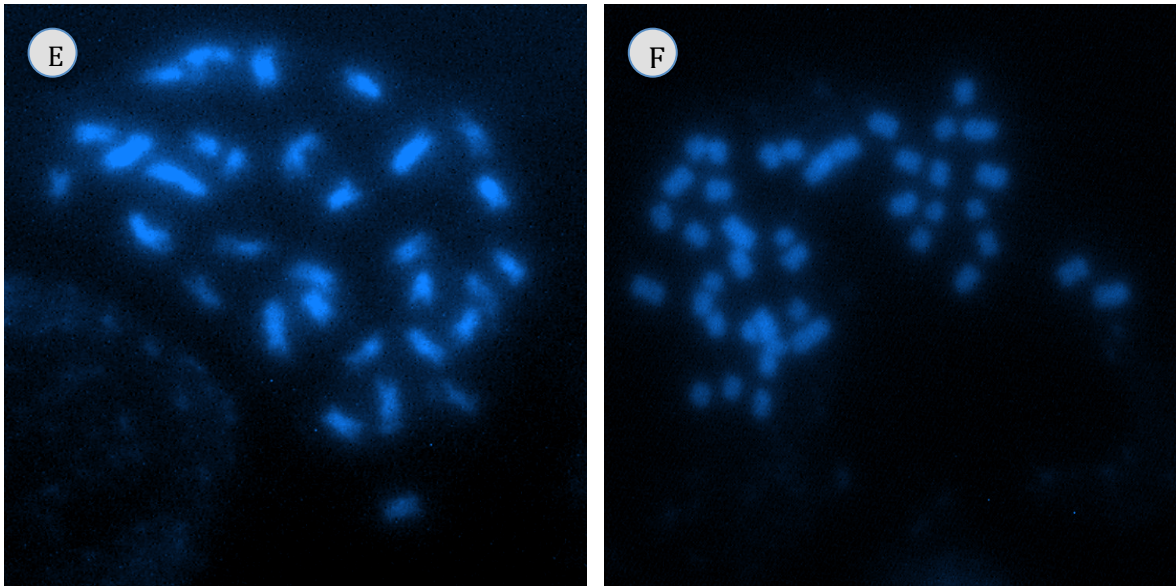


Figura 18: Cromosomas teñidos con DAPI de: A) B.ret 501, procedente de Francia, 2n=32, B) B.ret 403 procedente Huesca, 2n=42, C) B.ret 561, procedente de Zaragoza, 2n=42, D) de B.ret 557, procedente de Cádiz, 2n=42, E) B.ret 555, procedente de Granada, 2n= 32, F) B.ret 408, procedente de Falces (Navarra), 2n=42. Fuente: elaboración propia.

4.3. Determinación de las regiones 5S y 25S en *Brachypodium retusum*

Debido a la escasez de semillas y el bajo éxito en la germinación, la técnica FISH para la determinación de las regiones 25S y 5S se ha podido realizar únicamente en dos individuos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 9: Resumen del conteo de las regiones 25S y 5S en los dos citotipos de *B. retusum* estudiados. Se incluye además la procedencia de cada uno. Fuente: elaboración propia.

Código	Procedencia	2n	Regiones 5S	Regiones 25S
B.ret 507	Francia: Pirénées Orientales, Salses le Château.	32	4	4
B.ret 561	España, Aragón: Zaragoza	42	5-6	5

Como se observa en la tabla 9, en la muestra procedente de Francia, cuyo número cromosómico es 2n=32, se han contado 4 regiones tanto 5S como 25S. Para el caso de la muestra procedente de España, en el cual 2n=42 cromosomas, se han contado entre 5 y 6 regiones 5S y 5 regiones 25S en las distintas pruebas realizadas para cada individuo, por tanto no se establecerá un número fijo para dichas regiones (véase figura 19).

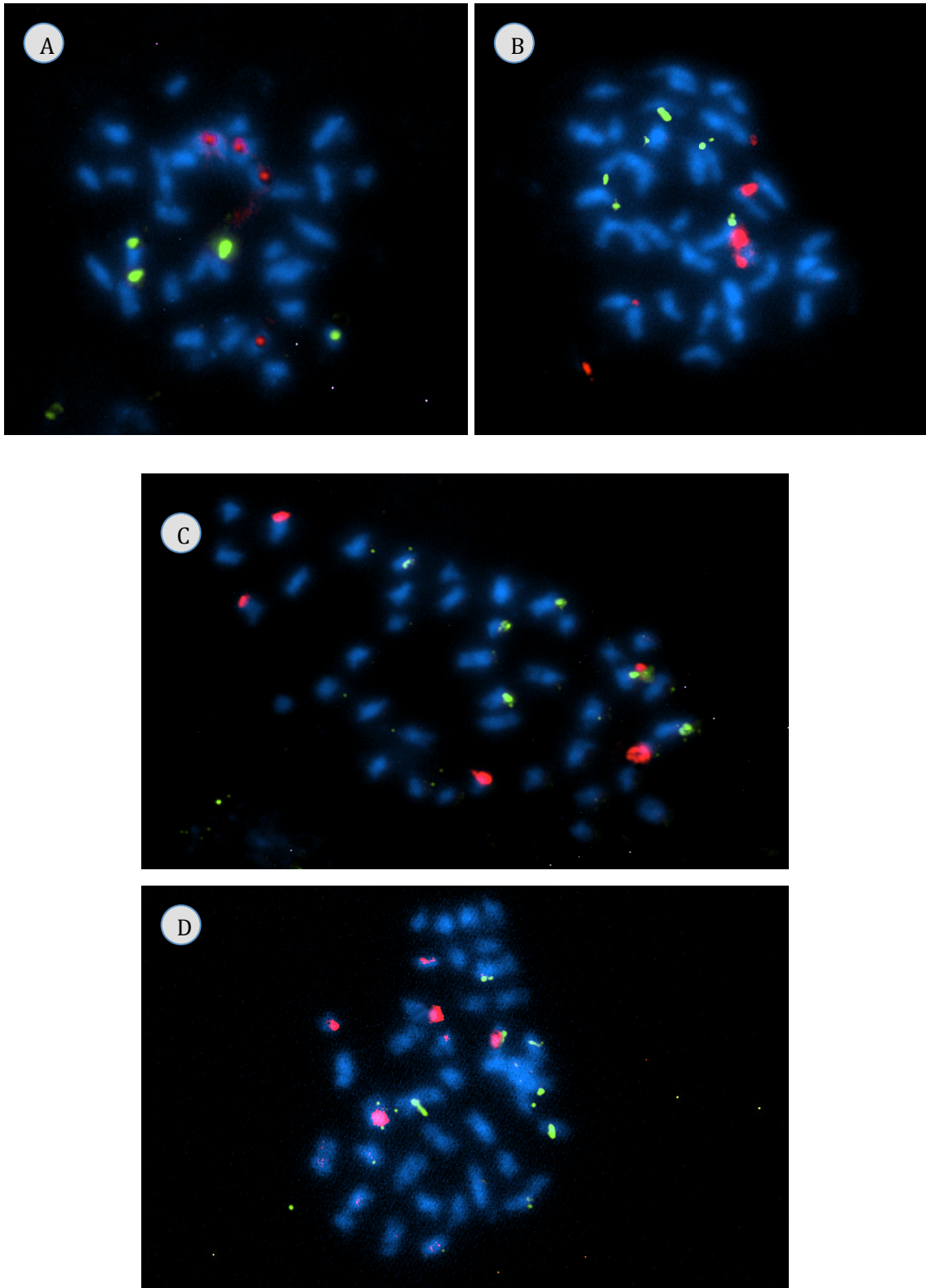


Figura 19: Imágenes de las regiones de DNA ribosómico 25S (en rojo) y 5S (en verde) de: A) *B. ret* 507 procedente de Francia, B), C) y D) *B. ret* 561 procedente de Zaragoza. Fuente: elaboración propia.

4.4. Número cromosómico y tamaño genómico de *Brachypodium boissieri*

En *Brachypodium boissieri*, los resultados obtenidos tras realizar el conteo cromosómico y la determinación del tamaño genómico se muestran a continuación:

Tabla 10: Número cromosómico (2n) y tamaño genómico (2C) de las especies de estudio de *Brachypodium boissieri*. También se incluye la procedencia de cada individuo. Fuente: elaboración propia

Código	Procedencia	Número cromosómico (2n)	Tamaño genómico (2C), pg
B.bois 9	Málaga: Sierra Tejeda	46	3,133 ± 0,074
B.bois 10	Granada: Sierra Nevada, ladera sur del Dornajo	46	3,152 ± 0,040
B.bois 13	Granada: Sierra Nevada, ladera norte del Dornajo.	46	3,116 ± 0,067
B.bois 14	Granada: Sierra Nevada, El Purche	46	3,111 ± 0,030
B.bois 15	Granada: Sierra de Huétor	46	3,149 ± 0,032

En la tabla 10 se observa que de las 5 poblaciones estudiadas, 4 de ellas proceden de Granada y una de Málaga; en las cuales, el número cromosómico es $2n=46$ (véase figura 20). Por otro lado, el tamaño genómico también es el mismo, siendo este de un valor en torno a 3,1 pg. Todos los datos obtenidos con el citómetro de flujo para cada una de las medidas realizadas se encuentran en el Anexo 3.

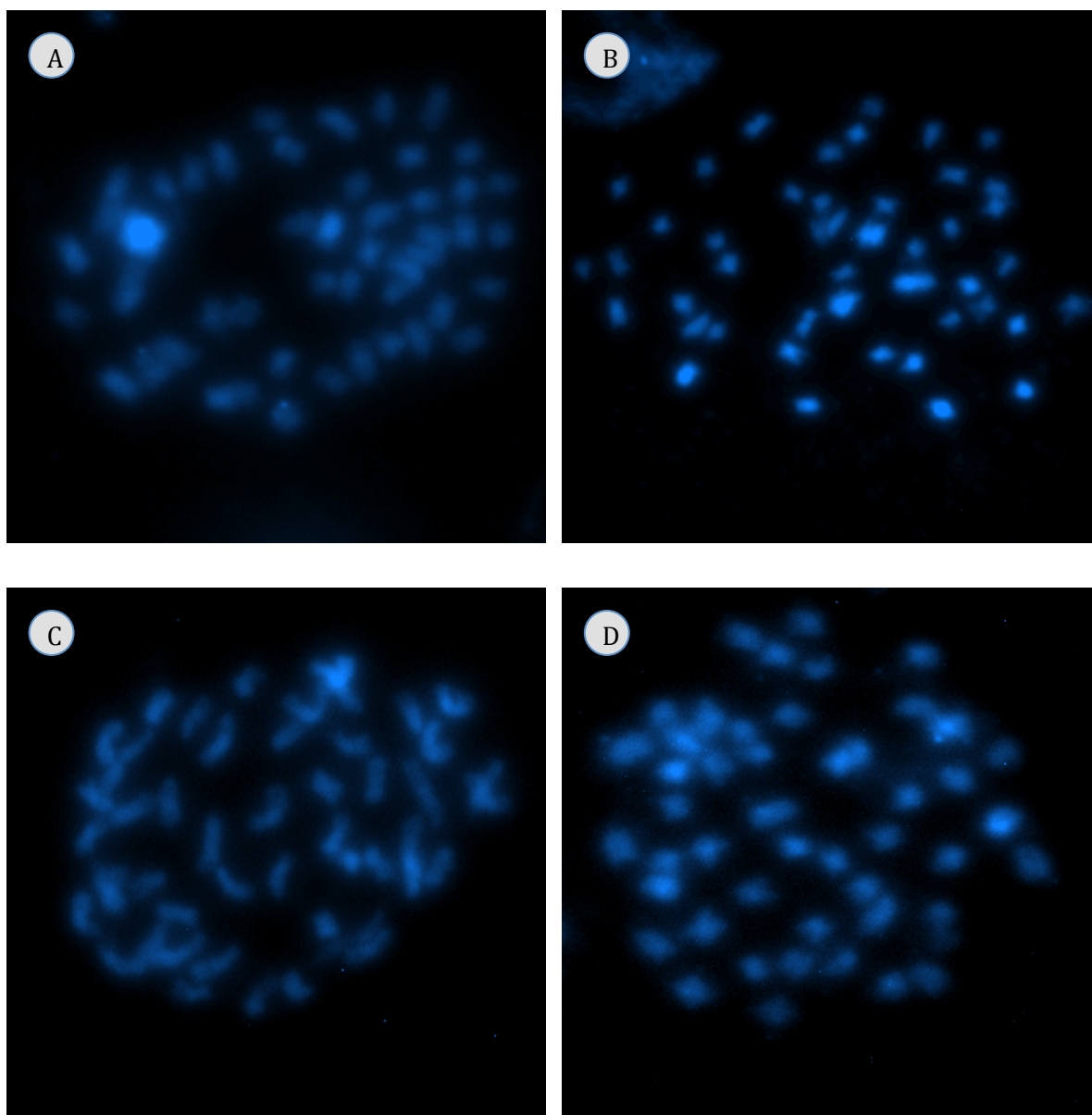


Figura 20: Cromosomas teñidos con DAPI de: A) B.bois 10, procedente de Granada, Sierra Nevada, ladera sur del Dornajo, B) B.bois 13 procedente de Granada, Sierra Nevada, ladera norte del Dornajo, C) B. bois 14, procedente de Granada, Sierra Nevada, D) B.bois 15 procedente de Granada, Sierra de Huétor.
Fuente: elaboración propia.

4.5. Determinación de las regiones 5S y 25S en *Brachypodium boissieri*

En el caso de *Brachypodium boissieri*, los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 11: Resumen del conteo de las regiones 25S y 5S en los individuos de *B. boissieri*. Se incluye además la procedencia de cada uno. Fuente: elaboración propia.

Código	Procedencia	2n	Regiones 5S	Regiones 25S
B. bois 9	Málaga: Sierra Tejeda	46	8-9-10	6
B. bois 10	Granada: Sierra Nevada, ladera sur del Dornajo	46	8-9-10	6
B. bois 13	Granada: Sierra Nevada, ladera norte del Dornajo.	46	8-9-10	5-6
B. bois 15	Granada: Sierra de Huétor,	46	10	6

En cuanto a las regiones ribosomales determinadas para *Brachypodium boissieri*, se puede observar en la tabla 11, que a pesar de los distintos ensayos realizados, el número obtenido ha sido variable; en todas las poblaciones se han contado entre 8, 9 y 10 regiones 5S, excepto en B.bois 15, procedente de Sierra de Huétor que han sido 10.

En cuanto a las regiones 25S, se han contado 6 en todos los casos, exceptuando a B. bois 13 procedente de Sierra Nevada (ladera norte del Dornajo), que han sido entre 5 y 6 (véase figura 21).

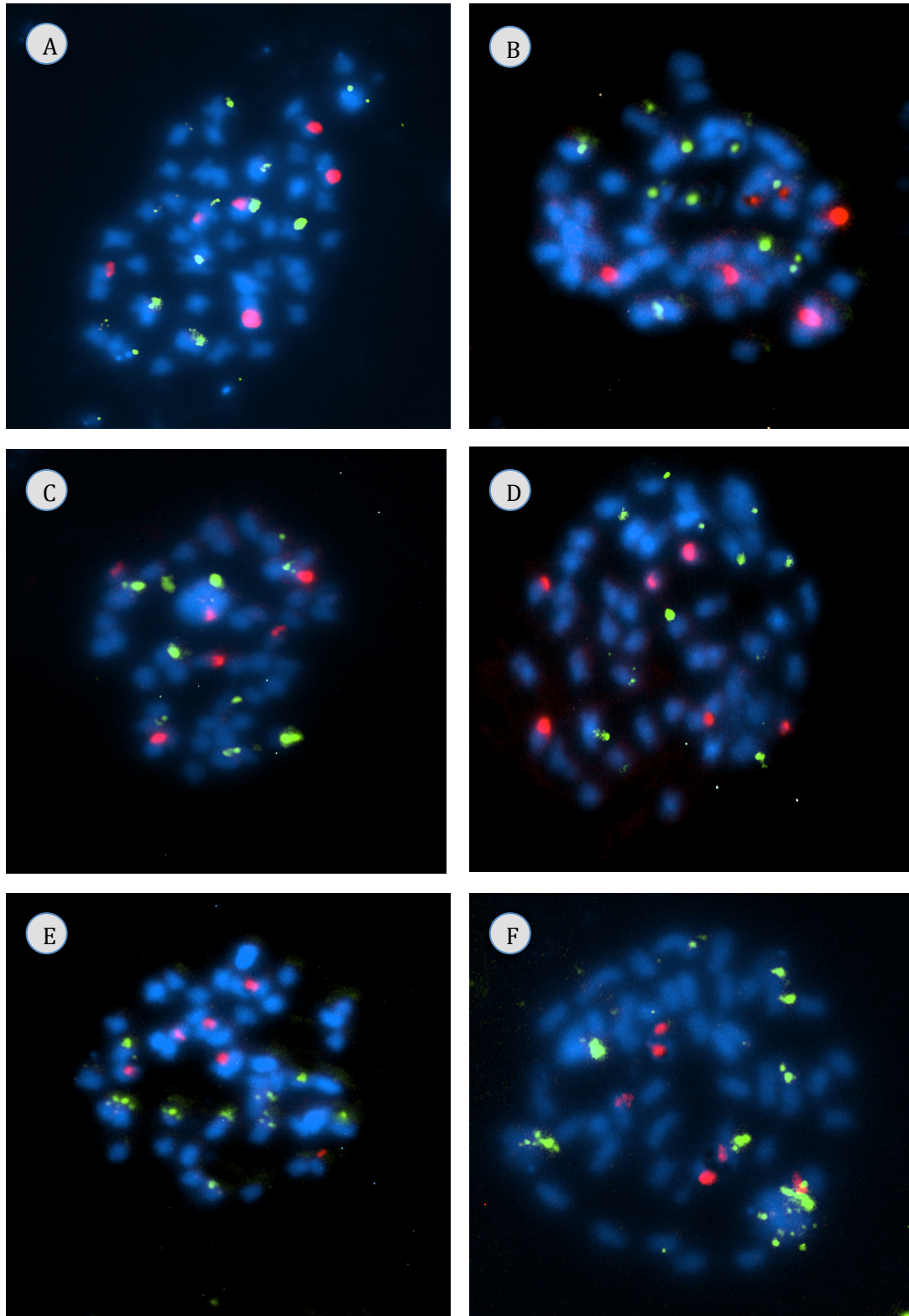


Figura 21: : Imágenes de las regiones de DNA ribosómico 25S (en rojo) y 5S (en verde) de: A) y B) B. bois 10 procedente de Sierra Nevada, ladera Sur del Dornajo, C), D) y E) B.bois 15 procedente de Sierra de Huétor. F) B.bois 13 procedente de Sierra Nevada, ladera Norte del Dornajo. Fuente: elaboración propia.

5. DISCUSIÓN

5.1. Obtención de meristemos

Para la preparación de portaobjetos con cromosomas se ha necesitado obtener meristemos, puesto que se trata de la mejor fuente de células en mitosis. Estos meristemos se obtienen a partir de ápices radiculares, los cuales se pueden conseguir de la germinación de semillas o de la inducción de raíces adventicias en tallos o rizomas.

Tanto *Brachypodium retusum* como *Brachypodium boissieri* son especies perennes que tienen un crecimiento más lento que las anuales de su mismo género. Ambos taxones han presentado unos índices de germinación de semillas muy bajos, especialmente en el caso de *Brachypodium retusum*. Una de las razones de esto, puede deberse a que esta última no produce semillas viables a no ser que en la planta se de un proceso de estrés (comunicación personal, Jesús Cosculluela, DGA). Para el caso de *Brachypodium boissieri*, el número de semillas con el que se ha trabajado ha sido bajo.

Dada la baja o nula tasa de germinación de las semillas de *B. retusum* se optó por provocar su inducción en cultivos *in vitro*, tanto con fitohormonas como sin ellas. No se obtuvieron resultados con las condiciones estándar utilizadas.

Se intentaron generar raíces adventicias a partir de tallos ó rizomas con cultivos hidropónicos. En este caso se obtuvieron mejores resultados, pero debido al lento crecimiento de las plantas perennes (comparado con las anuales), el proceso fue muy lento y sin grandes “cosechas” radiculares, por tanto, fue necesario realizar más de uno para determinadas poblaciones.

5.2. Datos citogenéticos de *Brachypodium retusum*

En cuanto a los resultados obtenidos referentes al número cromosómico de la especie *Brachypodium retusum*, se ha obtenido un valor de $2n=32$ cromosomas para las 2 poblaciones de la región mediterránea de Francia. Este valor coincide con conteos anteriores también realizados esta misma zona Francesa (Méounes, Var), publicado por Khan (1984). Existen también datos de $2n=32$ cromosomas publicados por Robertson (1981) y por otro lado Schippmann (1990) determinó $2n=28$ también en Francia, aunque en su obra no especifica la población exacta.

Para las poblaciones estudiadas de la Península Ibérica, existen casos con variaciones en cuanto al número cromosómico, siendo en todos ellos $2n=32$ ó $2n=42$ cromosomas.

Cabe destacar que en una misma región se han encontrado individuos con ambos números, como puede ser el caso de B.ret 403 ($2n=42$) y B.ret 407 ($2n=32$), dos citotipos procedentes de dos localidades de la provincia de Huesca: Santa Cruz de la Serós y Alcubierre respectivamente.

En el caso de Andalucía, se han estudiado individuos procedentes de varias zonas, obteniéndose unos valores también de $2n=32$ cromosomas, como es el caso de B.ret 555, recogida en Granada y $2n=42$ en el caso de B.ret 551, localizada en Málaga.

En Navarra, se han determinado $2n=42$ cromosomas, un valor que para esta misma zona Schippmann (1990) publicó $2n=40$ cromosomas.

El número $2n=32$ coincide con los estudios previos realizados por Schippmann (1990), en los cuales se trabajó con individuos localizados en Málaga, Zaragoza y Lérida. También $2n=42$ fue determinado por Robertson (1981), pero en este caso en Francia.

Se puede observar que existen discrepancias en cuanto a algunos números cromosómicos determinados por otros autores; en relación a esto, cabe destacar que, Schippmann (1990) menciona en su obra, que los diferentes números de cromosomas de *B. retusum* generalmente se documentaron en la misma solo por unos pocos números de conteos, por tanto, esto explicaría que algunos de los valores podrían cambiar.

En cuanto al tamaño genómico (pg/2C DNA), si se comparan los valores obtenidos de $2n$, con el valor de $2C$, se puede ver que en todos los casos en los que $2n=32$, el tamaño genómico oscila entre 1,6 y 1,7 pg. Por otro lado, para los individuos que han presentado $2n=42$ cromosomas, el tamaño genómico se encuentra en torno a los 2,4 pg.

En estudios anteriormente realizados (Wolny y Hasterok, 2009), existen pocos datos acerca del tamaño genómico de esta especie, únicamente cabe destacar el valor de 2,5 pg para una población de *Brachypodium retusum* procedente de Grecia, cuyo número cromosómico determinado fue de $2n=38$.

En el caso de los dos individuos procedentes de Marruecos, no se ha podido realizar el conteo cromosómico, pero se ha podido determinar el tamaño genómico, cuyos valores oscilan entre 1,6 y 1,7 pg.

Las bajas desviaciones típicas del tamaño genómico que muestran los datos y el número de ensayos realizados para cada población, indican un fiable valor obtenido con el citómetro de flujo, que permitiría relacionar directamente este dato con $2n$.

Dado que existen otros casos en los que no se ha podido determinar el valor de $2n$, se ha realizado un gráfico (ver figura 22), en el que se relaciona el valor del tamaño genómico con el número cromosómico:

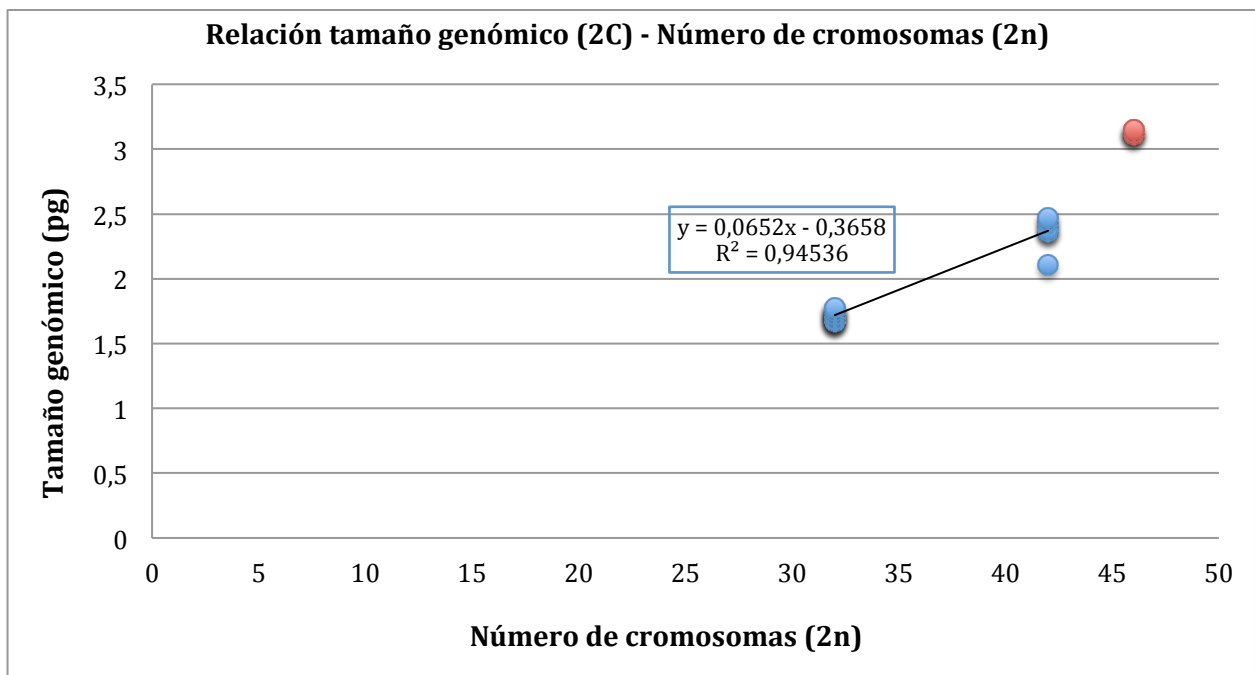


Figura 22: Gráfica de relación del número de cromosomas con el tamaño genómico las dos especies de estudio. Puntos azules corresponden a *B. retusum*, y puntos rojos a *B. boissieri*. Fuente: elaboración propia.

En la figura 22 se observa la recta formada a partir de los valores de $2n$ y tamaño genómico; en las poblaciones de *B. retusum*, el valor del tamaño genómico es directamente proporcional a número de cromosomas, siendo en todos los casos de *B. retusum* una media de 1,7 pg para $2n=32$ cromosomas y 2,4 pg para $2n=42$ cromosomas. Gracias a esto se podría deducir que los dos únicos individuos estudiados procedentes de Marruecos presentan un valor de $2n=32$ cromosomas. Para *B. boissieri* no existe ecuación de la recta, ya que en todos los casos el número de cromosomas es $2n=46$.

En cuanto a las regiones ribosomales 5S y 25S para *B. retusum*, se ha trabajado con dos poblaciones cuyo número cromosómico es distinto; para B.ret 507 (Francia), con $2n=32$ cromosomas, se han obtenido 4 regiones 5S y también 4 regiones 25S. Por otro lado, para B.ret 561 (España) con $2n=42$ cromosomas, se han obtenido entre 5-6 regiones 5S y 5 regiones 25S.

Actualmente, el único estudio realizado sobre *B. retusum* en el que han sido publicados datos acerca estas regiones, es el llevado a cabo por Wolny & Hasterok (2009), en el cual, se han localizado 6 regiones tanto 5S como 25S para el taxón con $2n=38$ cromosomas.

5.3. Datos citogenéticos de *Brachypodium boissieri*

En cuanto a los resultados referentes al número cromosómico de la especie *Brachypodium boissieri*, se ha obtenido un valor de $2n=46$ cromosomas para las 5 poblaciones estudiadas. No existe ningún tipo de variación en función del área de distribución de esta especie en cuanto al número cromosómico, ya que los individuos seleccionados proceden de distintas zonas dentro su reducida área de distribución (Málaga y Granada).

Este valor coincide con los datos publicados por Schippmann (1990), para una muestra procedente de El Purche (Granada). Por otro lado, en esta misma publicación, también se determinaron $2n=42$ cromosomas para un individuo procedente de El Dornajo (Granada), un valor que tras los múltiples ensayos realizados no ha sido resultado del presente trabajo.

En cuanto a los resultados en relación tamaño genómico, en todos los casos del estudio ($2n=46$) se ha obtenido un valor de 3,1 pg. Este valor no ha sido determinado anteriormente por ningún autor, por tanto no puede ser contrastado con otros datos.

Las regiones ribosomales en *B. boissieri* han tenido un valor de entre 8, 9 ó 10 regiones para el caso de las 5S y 6 regiones para las 25S (aunque en algún caso se han contado 5).

Cabe señalar que la determinación de estos valores para *B. boissieri* no había sido realizada anteriormente a este trabajo.

5.4. Posible ploidía y origen de *B. retusum* y *B. boissieri* en base a estos datos citogenéticos

Brachypodium es un género en el que se produce disploidía, es decir, las especies que lo forman tienen diferente número básico (x). Schippmann (1991), en su monografía sobre el género recoge que el número básico de las especies puede ser 5, 7 y 9 aunque también ha sido descrita alguna especie con $2n=16$, como *B. pinnatum*, *B. glaucovirens* (Catalán et al. 2015) y *B. sylvaticum* (Wolny y Hasterok, 2009), de donde x también puede ser 8.

En 2012, Catalán et al. describieron que los diferentes citotipos ($2n=10$, $2n=20$, $2n=30$) de *B. distachyon* podrían ser tres especies diferentes en las que el citotipo de $2n=30$ (*B. hybridum*) era un alopoliploide del de $2n = 10$ (*B. distachyon*) y $2n=20$ (*B. stacei*), así el número básico es $x = 5+10$ y también el diploide *B. stacei* ($2n =20$) tienen de número básico $x = 10$.

La dificultad para el conteo de cromosomas y obtener meristemas, hace que algunos investigadores utilicen el tamaño genómico (GS) para inferir el número cromosómico, y a partir de este valor, la ploidía. Para evitar la ambigüedad en terminología, Suda et al., (2006) propusieron el término de “DNA-ploidy” o ploidía basada en el DNA, que es la estimada a partir del tamaño genómico y no a partir del cariotipo.

La poliploidía se determina a partir del cariograma de los cromosomas, pero en el caso de *Brachypodium* estos son tan pequeños y similares que esto no siempre es posible.

Plantas de diferente ploidía pueden ser comparadas utilizando el tamaño genómico monoploide “valor Cx” (Greilhuber et al., 2005) que consiste en el valor del tamaño genómico ($2C$) dividido por la ploidía. Este valor (Cx), ha sido utilizado en el género *Rosa* L. (Roberts et al., 2008, Yokoya et al., 2000) y en *Festuca* L. (Smarda et al., 2008) y puede variar entre diferentes secciones taxonómicas de un grupo. Estas variaciones pueden sugerir que hay especies formadas por genomas de diferente origen. A continuación se ha realizado una tabla en la que se ha calculado el valor anteriormente descrito (Cx):

Tabla 12: Datos citogenéticos de algunas especies del género *Brachypodium*. Se incluye además el valor del tamaño genómico dividido por la ploidía (1Cx). [1: Suda et al., (2006), 2: Catalán et al., (2012), 3: Wolny y Hasterok (2009)] Fuente: elaboración propia.

Especie	2n	Ploidía	2C, pg	1Cx, pg	DNA-ploidía
<i>B. arbuscula</i> ¹	18	2	0,69	0,34	
<i>B. distachyon</i> ²	10	2	0,63	0,31	
<i>B. stacei</i> ²	20	2	0,56	0,28	
<i>B. hybridum</i> ²	30	4	1,26	0,31	
<i>B. sylvaticum</i> ³	18	2	0,83 – 0,89	0,41 – 0,45	
<i>B. phoenicoides</i> ³	28	4	1,47 – 1,49	0,36 – 0,37	
<i>B. rupestre</i> ³	18	2	0,75 – 0,84	0,37 – 0,42	
<i>B. pinnatum</i> ³	18	2	0,88	0,44	
	28	4	1,46 – 1,57	0,36 – 0,39	
<i>B. retusum</i>	32	¿4?	1,67 – 1,78	0,42 – 0,44	4
		¿6?	1,67 – 1,78	0,28 – 0,29	
	42	¿4?	2,11 – 2,47	0,53 – 0,62	6
		¿6?	2,11 – 2,47	0,35 – 0,41	
		¿8?	2,11 – 2,47	0,26 – 0,31	
	46	¿6?	3,11 – 3,15	0,52	8
¿8?		3,11 – 3,15	0,39		

En las especies analizadas (véase tabla 12) el valor 1Cx varía entre 0,28 y 0,45 pg. El valor medio de los datos publicados es $\bar{x} = 0,36 \pm 0,05$; si suponemos que la distribución de valores es una curva normal, el valor de $\bar{x} \pm 3$ d.s. (desviación estándar) contiene el 99,73% de los datos, así los datos inferiores a 0,21 y superiores a 0,51 quedarán fuera de rango ($0,36 \pm (3 \times 0,05)$).

En la tabla 12, se muestra cómo para las muestras estudiadas de *B. retusum* con $2n = 32$ cromosomas la suposición de que sea tetraploide o hexaploide está dentro de rango. Por otro lado, en *B. retusum* con $2n = 42$ cromosomas la suposición de que sea hexaploide u octoploide está también dentro de rango. En el caso de *B. boissieri* con $2n = 46$ octoploide, también estaría dentro del mismo. Así *B. retusum* ($2n = 32$) podría ser tetraploide, *B. retusum* ($2n = 42$) podría ser hexaploide y *B. boissieri* ($2n = 46$) sería octoploide.

Teniendo en cuenta el número cromosómico ($2n$), el número de regiones ribosomales 5S y 25S y los posibles números básico (x), las posibilidades de producir aloploidos es elevada:

$$B. \textit{retusum} \ 2n = 32 \ (\text{tetraploide}) \quad \left\{ \begin{array}{l} x = 8 + 8 \\ x = 7 + 9 \\ x = 5 + 11 \end{array} \right.$$

$$B. \textit{retusum} \ 2n = 42 \ (\text{hexaploide}) \quad \left\{ \begin{array}{l} x = 8 + 8 + 5 \\ x = 9 + 5 + 7 \end{array} \right.$$

Basándonos en los datos filogenéticos obtenidos por Díaz, et al (2018), se muestra que *B. retusum* $6x$ puede estar formado por genomas procedentes de *B. sylvaticum* $2x$, *B. pinnatum* $2x$ y *B. arbuscula* $2x$. Utilizando esta información, *B. retusum* $4x$ podría ser un aloploide de *B. sylvaticum* y *B. pinnatum* (véase figura 23).

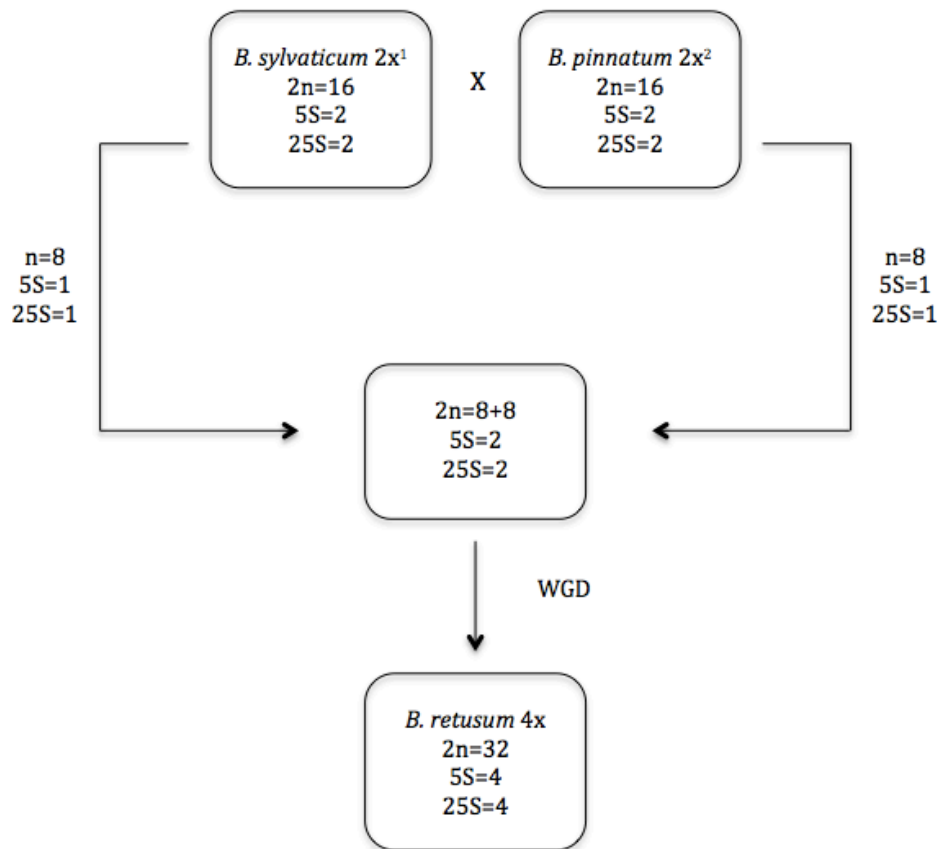


Figura 23: Posible origen de *B. retusum* tetraploide (4x), WGD: Duplicación del genoma. [1: Wolny y Hasterok (2009), 2: Gorgojo (2018)]. Fuente: elaboración propia.

Como se observa en la figura 23, *B. retusum* 4x presenta las regiones ribosomales que producirían debido a la duplicación del genoma de un híbrido de *B. sylvaticum* 2x y *B. pinnatum* 2x, cada uno con 16 cromosomas.

En *B. retusum* 6x podrían haber intervenido *B. sylvaticum* 2x, *B. pinnatum* 2x y un tercer participante; según Díaz (2018), *B. arbuscula* 2x, pero se trata de un endemismo de las islas Canarias y el número cromosómico es de $2n = 18$. Otros investigadores como Wolny y Hasterok (2009) y Sancho (2018), consideraron que además de participantes de “núcleo perenne” debe intervenir un ancestro tipo *B. distachyon*; teniendo en cuenta esto, en la figura 24 se muestra como podría ser posible:

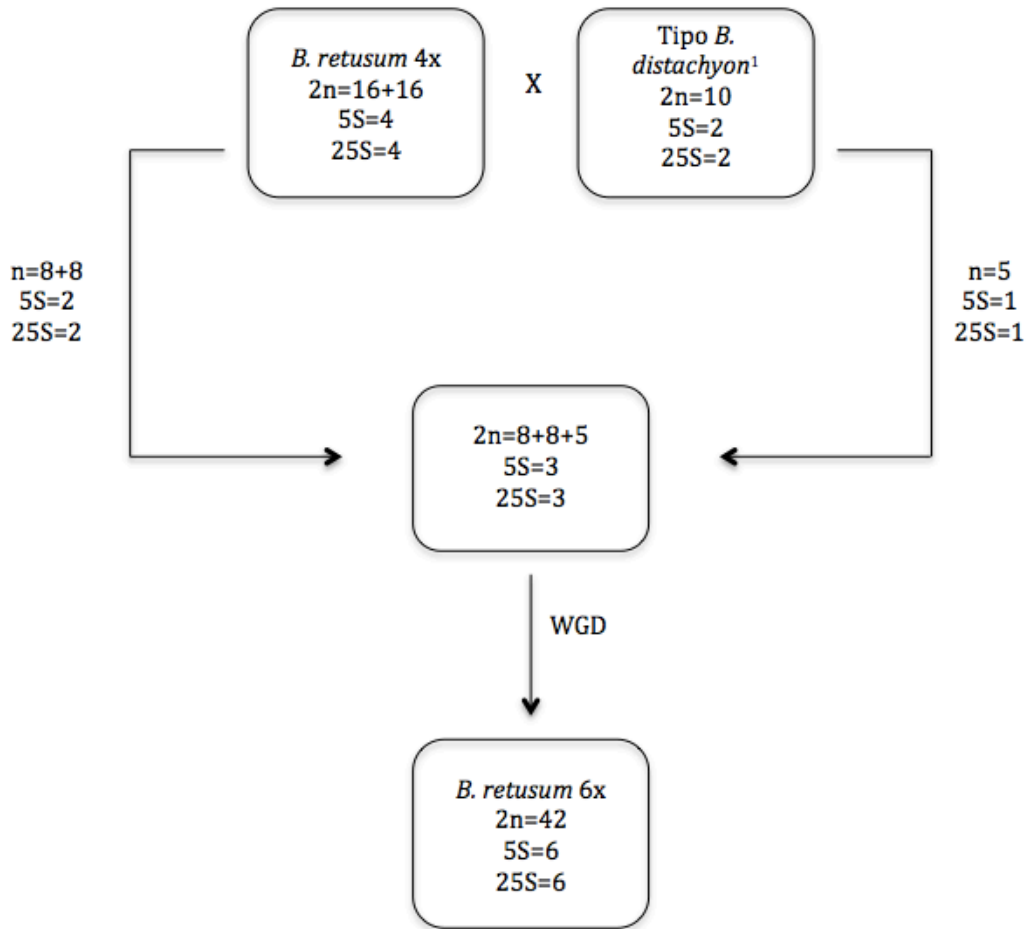


Figura 24: Posible origen de *B. retusum* hexaploide (6x), WGD: Duplicación del genoma. [1: Catalán et al. (2012)] Fuente: elaboración propia.

Como se observa en la figura 24, *B. retusum* 6x muestra unos valores teóricos de 6 regiones 5S y 6 regiones 25S, datos muy cercanos a los obtenidos de FISH en este trabajo (de 5 a 6 regiones 5S y 6 regiones 25S).

Por último, en *B. boissieri*, que puede ser octoploide, pueden haber participado en su formación varios genomas; según Díaz et al. (2018), en la formación de *B. boissieri* han participado un diploide ancestral, *B. distachyon*, y *B. sylvaticum*. Sancho (2018) muestra la presencia de uno o varios ancestros donantes.

Una vez más, en este último apartado, debemos hacer uso del principio de parsimonia usando la explicación más sencilla dado el elevado número de posibilidades (respecto a la variación del número de cromosomas: descenso o aumento de la dispoloidía o respecto al número de regiones en los cromosomas: inserciones y deleciones) e intentar construir el itinerario más sencillo para el origen de *B. boissieri* con los datos que tenemos (véase figura 25).

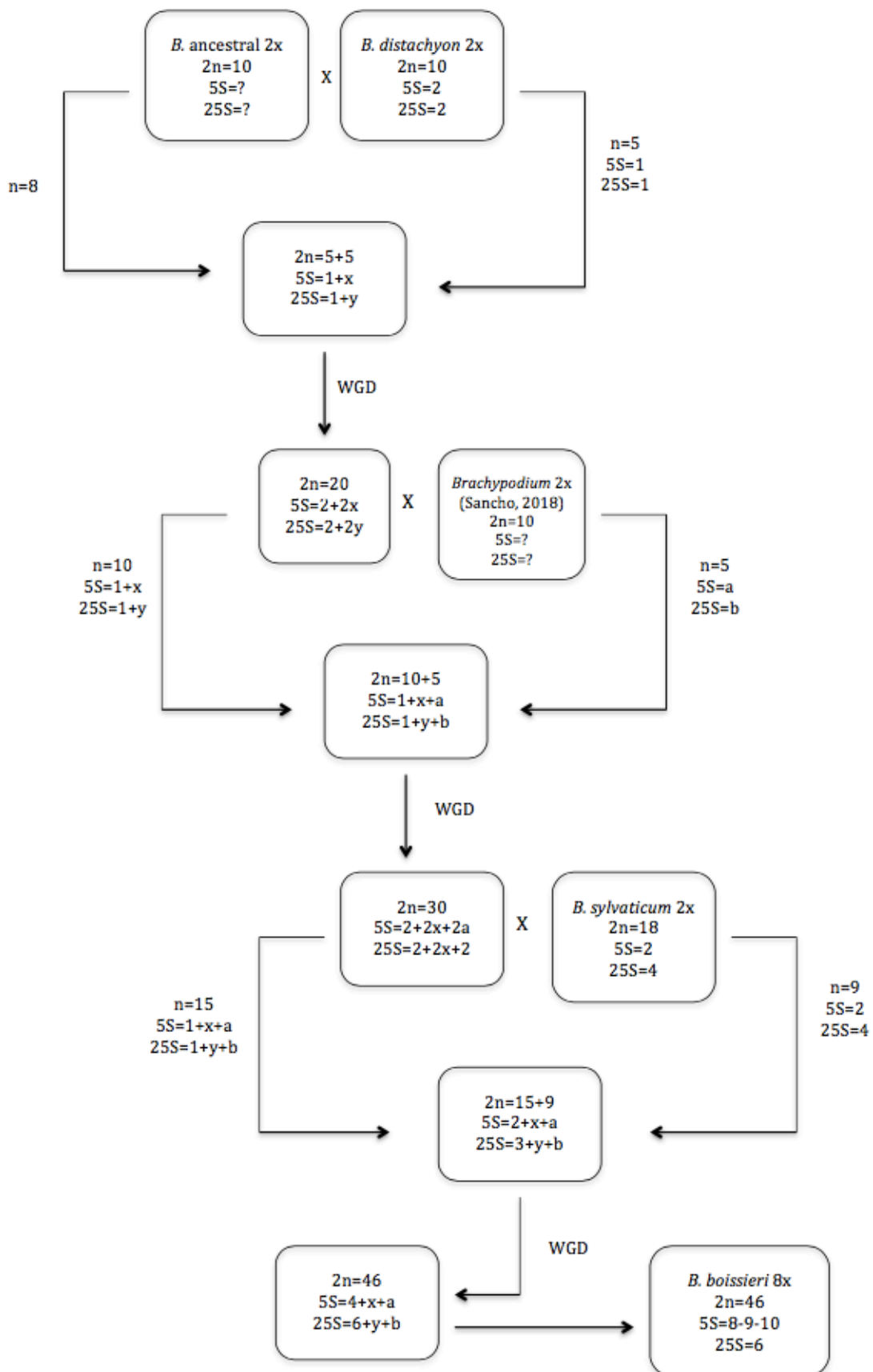


Figura 25: Posible origen de *B. boissieri* octoploide (8x), WGD: Duplicación del genoma. Fuente: elaboración propia.

En la figura 25 se muestra la formación de aloploidos a partir de un *Brachypodium* ancestral diploide ($2n = 10$) y un tipo *B. distachyon* ($2n = 10$). También intervendrían el *Brachypodium* de Sancho (2018), pero con $2n = 10$ y *B. sylvaticum* con $2n = 18$. Basándonos en estas suposiciones, se podría obtener un posible *B. boissieri* con más de 4 regiones 5S y al menos 6 regiones 25S.

6. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- Los distintos individuos de *Brachypodium retusum* del área mediterránea occidental (muestreados en Francia, España y Marruecos) presentan dos números cromosómicos distintos, siendo estos $2n=32$ y $2n=42$ cromosomas.
- Las distintos números cromosómicos aparecidos no siguen una distribución geográfica específica.
- *B. retusum* muestra un valor del tamaño genómico de 1,7 pg/2C, que se corresponde con los individuos que presentan un número cromosómico de $2n=32$, y un valor de 2,4 pg/2C, correspondiente a los individuos con un número cromosómico de $2n=42$.
- *Brachypodium boissieri* presenta un único número cromosómico en toda su área de distribución (Málaga y Granada), siendo este $2n=46$ cromosomas.
- *B. boissieri* muestra un valor del tamaño genómico de 3,1 pg en todos los casos, siendo en todos ellos el número cromosómico de $2n=46$.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bennett, M.D., Leitch, J.I. (2005) Nuclear DNA Amounts in Angiosperms: Progress, Problems and Prospects, *Annals of Botany*, 95: 45–90.
- Betekhtin, A., Jenkins, G., & Hasterok, R. (2014) Reconstructing the Evolution of *Brachypodium* Genomes Using Comparative Chromosome Painting. *PLoS ONE*, 9.
- Bouchenak-Khelladi, Y., Salamin, N., Savolainen, V., Forest, V., Van der Bank, M., Chase, M.W., et al. (2008) Large multi-gene phylogenetic trees of the grasses (Poaceae): progress towards complete tribal and generic level sampling. *Mol Phylogenet Evol*, 47: 488–505.
- Catalán, P., Müller, J., Hasterok, R., Jenkins, G., Mur, L.A., Langdon, T., Betekhtin, A., Siwinska, D., Pimentel, M., & López-Alvarez, D. (2012) Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Annals of Botany*, 109: 385–405.
- Catalán, P., Kellogg, E.A., & Olmstead, R.G. (1997) Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 8: 150–166.
- Catalán P., López-Álvarez D., Díaz-Perez A., Sancho R., & López-Herránz M^a L. (2015) Phylogeny and Evolution of the Genus *Brachypodium*. En J. Vogel (Ed), *Genetics and Genomics of Brachypodium*, 9 - 38.
- Catalán, P. & Olmstead, R.G. (2000) Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P. Beauv. (Poaceae) from combined sequences of chloroplast *ndhF* gene and nuclear ITS. *Plant Systematics and Evolution*, 220: 1–19.
- Catalán, P., Chalhoub, B., Chochois, V., Garvin, D.F., Hasterok, R., Manzaneda, A.J., Mur, L.A.J., Pecchioni, N., Rasmussen, S.K., Vogel, J.P., & Voxeur, A. (2014) Update on the genomics and basic biology of *Brachypodium*. *Trends in Plant Science*, 19: 414–418.
- Chung M. C., Lee Y. I., Cheng Y. Y., Chou, Y. J., Lu, C. F. (2008) Chromosomal polymorphism of ribosomal genes in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 745 – 753.

- Devi, J., Ko, J. M., & Seo, B. B. (2005) FISH and GISH: Modern cytogenetic techniques. *Indian Journal of Biotechnology*, 4: 307–315.
- Díaz-Pérez, A., López-Álvarez, D., Sancho, R., Catalán, P. (2018) Reconstructing the origins and the biogeography of species' genomes in the highly reticulate allopolyploid-rich model grass genus *Brachypodium* using minimum evolution, coalescence and maximum likelihood approaches. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127: 256-271.
- Dimitrová, D., Ebert, I., Greilhuber, J., Kozhuharov, S. (1999) Karyotype constancy and genome size variation in Bulgarian *Crepis foetida* s. l. (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 217: 245-257.
- Dolezel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2: 2233-2244.
- Dolezel, J., Sgorbati, S., & Lucretti, S. (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 625–631.
- Garvin, D.F., Gu, Y.Q., Hasterok, R., Hazen, S.P., Jenkins, G., Mockler, T.C., Mur, L.A.J., & Vogel, J.P. (2008) Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Crop Science*, S69–S84.
- Gorgojo, R., (2018) Displodía en *Brachypodium pinnatum* y *Brachypodium rupestre*. Trabajo Fin de Grado, EPS Huesca. Universidad de Zaragoza.
- GPWG. The Grass Phylogeny Working Group (2001) Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Ann Mo Bot Gard*, 88:373–457.
- Greilhuber, J., Dolezel, J., Lysak, M., & Bennet, M., (2005) The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms 'Genome Size' and 'C-Value' to describe Nuclear DNA Contents. *Annals of Botany*, 95: 255–260, 2005
- Hasterok, R., Langdom, T., Taylor, S., & Jenkins, G. (2002) Combinatorial labelling of DNA probes enables multicolour fluorescence in situ hybridisation in plants. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 40(3): 319–323.

- Herrera, J. C. (2007) La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana*, 25 (1): 26–35.
- International Brachypodium Initiative (IBI). 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 463: 763 - 8.
- Jenkins, G., & Hasterok, R. (2007) BAC “landing” on chromosomes of *Brachypodium distachyon* for comparative genome alignment. *Nature Protocols*, 2: 88–98.
- Khan, M.J. (1984) Biosystematics studies in *Brachypodium* (Poaceae). Tesis Doctoral. University of Leicester.
- Linares C., Gonzalez J.M., Ferrer E. & Fominaya A. (1996) The use of double fluorescence in situ hybridization to physically map the positions of 5S-rDNA genes in relation to the chromosomal location of 18S-5.8S-26S rDNA and a C genome specific DNA sequence in the genus *Avena*. *Genome*, 39: 535 - 542.
- Mur, L.A.J., Allainguillaume, J., Catalán, P., Hasterok, R., Jenkins, G., Lesniewska, K., Thomas, I., & Vogel, J. (2011) Exploiting the *Brachypodium* tool box in cereal and grass research. *New Phytologist*, 191, 334–347.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Natarajan, G. (1978) IOPB Chromosome number reports LXII. *Tacon*, 27: 526-528.
- Nederlof, P. M., Robinson, D., Abuknesha, R., Wiegant, J., Hopman, a H., Tanke, H. J., & Raap, a K. (1989) Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry*, 10(1): 20–27.
- Otto, F. (1990) DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman HA, Darzynkiewicz (eds.). *Methods in Cell Biology*, 33: 105-110.
- Roberts, A.V., Gladis, Th., Brumme, H. (2008). DNA amounts of roses (*Rosa* L.) and their use in attributing ploidy leveles. *Genetics and genomics*, 28: 61-71.
- Robertson, I. H. (1981) Chromosome numbers in *Brachypodium* Beauv. (Gramineae). *Genetica* 56: 55-60.

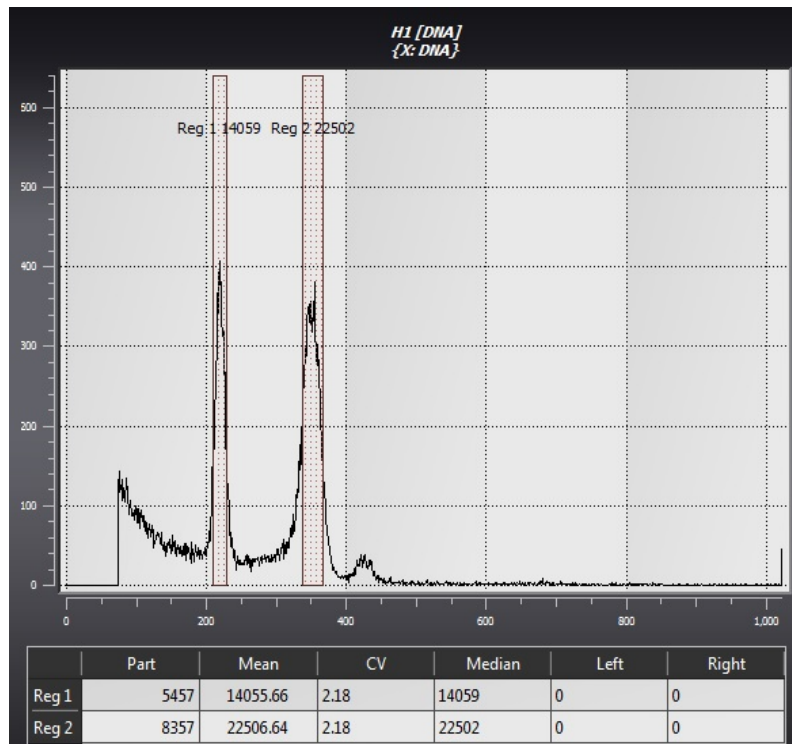
- Sachs, J.V. (1887) Lectures on Physiology of Plants. *Claredon Press*, Oxford.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, & T. Maniatis. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sancho, R., (2018) Genome annotation, comparative genomics and evolution of the model grass genus *Brachypodium* (Poaceae). Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza.
- Schippmann, U. (1990) *Brachypodium boissieri*. An endemic grass species of southern Spain. *Lagascalia*, 15: 179–188
- Schippmann, U. (1991) Revision der europäischen Arten der Gattung *Brachypodium* Palisot de Beauvois (Poaceae). *Boissiera*, 45: 249 pp.
- Šmarda, P., Bures, P., Horová, L., Foggi, B., Rossi, G. Genome size and GC content evolution of *Festuca*: ancestral expansion and subsequent reduction. *Annals of Botany*, 101(3): 421–433.
- Smith, P. M. (1980). *Brachypodium*. in: T. G. Tutin & al. (Hrsg.), *Flora Europaea* 5, S: 189-190, Cambridge University Press, Cambridge.
- Suda, J., Krahulcoa, A., Travnicek, P., Krahulec, F. (2006) Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. *Taxon*, 55: 447-450
- Taketa, S., Ando, H., Takeda, K., Ichii, M., & Von Bothmer, R. (2005) Ancestry of American polyploid *Hordeum* species with the I genome inferred from 5S and 18S-25S rDNA. *Annals of Botany*, 96: 23–33.
- Talavera, S. (1987). *Brachypodium*. In: B. Valdés & al. (Hrsg.), *Flora vascular de Andalucía Occidental* 3. S: 369-372.
- Valdés, B. (1997). Cap 5. Caracteres taxonómicos: citología y citogenética. En Izco et al. 1998. *Botánica*. Ed. Mcraw-Hill. Interamericana. Pág: 133 – 139.
- Valdés, B., Talavera, S., & Fernández-Galiano, E. (1987) *Flora Vascular de Andalucía Oriental*, 3 volúmenes.: 280-282

- Vogel, J.P., Tuna, 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 biology*, 9: 88.
- Wolny, E. & Hasterok, R. (2009) Comparative cytogenetic analysis of the genomes of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. *Annals of Botany*, 104: 873–881.
- Yokoya K, Roberts AV, Mottley J, Lewis R. Brandham PE (2000) Nuclear DNA amounts in roses. *Annals of Botany* 85: 557-561.

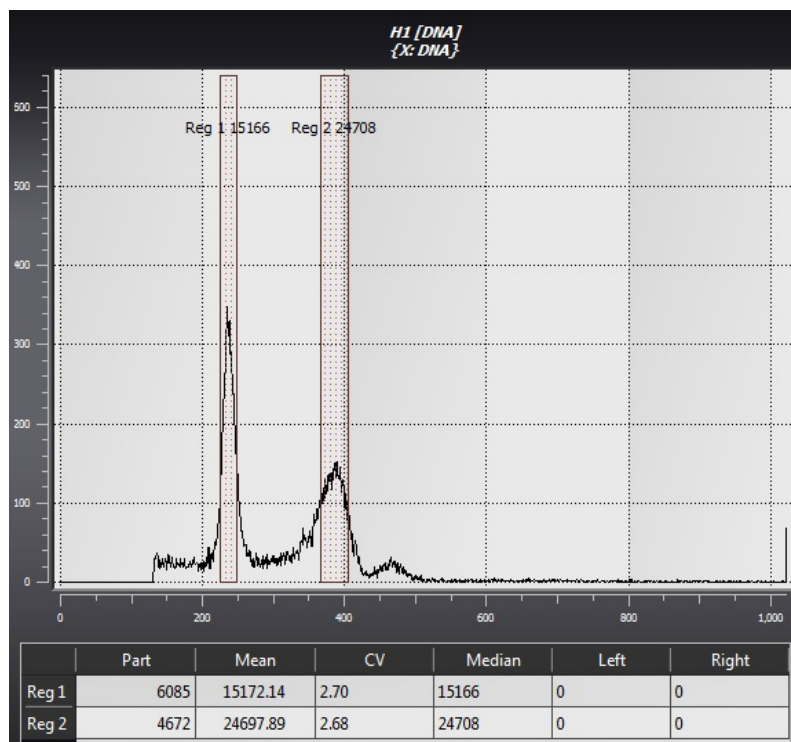
8. ANEXOS

8.1. Anexo 1: Histogramas obtenidos mediante el citómetro de flujo en la determinación del tamaño genómico.

a) Histograma correspondiente a B. ret 451 (*Brachypodium retusum* procedente de Marruecos).



b) Histograma correspondiente a B.bois 15 (*Brachypodium boissieri* procedente de Sierra de Huétor, Granada).



8.2. Anexo 2: Tablas con los datos obtenidos mediante el citómetro de flujo en la determinación del tamaño genómico.

Tabla 13: Datos obtenidos para *Brachypodium retusum*

muestras/standard (ST)	núcleos	núcleos (ST)	media	media (ST)	CV	CV (ST)	pg/2C	pg/2C (ST)	Promedio	Desviación Estándar
Bret407-2 (1)/Raphanus	2534	6613	21273,27	13762,92	2,62	3	1,72	1,11	1,715	0,017
Bret407-2 (2)/Raphanus	3818	5793	21520,62	13694,89	2,51	2,87	1,74	1,11		
Bret407-2 (3)/Raphanus	7672	5675	20891,23	13568,5	3,07	2,9	1,71	1,11		
Bret407-2 (4)/Raphanus	5257	5572	20902,44	13595,09	3,09	2,94	1,71	1,11		
Bret407-2 (5)/Raphanus	6731	5440	21372,25	13778,48	3,06	2,41	1,72	1,11		
Bret407-2 (6)/Raphanus	7389	9948	22375,06	14675,07	2,18	2,73	1,69	1,11		
Bret405-1 (1)/L.sculentum	3285	6278	27274,58	22561,3	2,08	2,56	2,37	1,96	2,386	0,039
Bret405-1 (2)/L.sculentum	2446	9338	28112,47	22891,79	1,78	2,7	2,41	1,96		
Bret405-1 (3)/L.sculentum	3059	5531	28107,23	23112,22	2,67	2,48	2,38	1,96		
Bret405-1 (4)/L.sculentum	3354	6316	26074,74	21843,18	2,74	2,77	2,34	1,96		
Bret405-1 (5)/L.sculentum	4595	5847	25748,02	21337,92	2,28	2,27	2,37	1,96		
Bret405-1 (6)/L.sculentum	2454	8810	24352,8	19471,95	2,35	2,71	2,45	1,96		
Bret403-2 (1)/L.sculentum	2243	5143	27099,29	22618,54	2,25	2,44	2,35	1,96	2,373	0,058
Bret403-2 (2)/L.sculentum	3189	7604	27340,6	22998,85	2,01	2,85	2,33	1,96		
Bret403-2 (3)/L.sculentum	2883	6873	27209,54	22608,77	2,11	2,46	2,36	1,96		
Bret403-2 (4)/L.sculentum	9154	5717	26990,78	22645,09	2,9	2,86	2,34	1,96		
Bret403-2 (5)/L.sculentum	8186	6886	25195,74	20752,93	2,79	2,57	2,38	1,96		
Bret403-2 (6)/L.sculentum	9354	7478	31157,56	24563,06	1,88	2,27	2,49	1,96		
Bret408 (1)/L.sculentum	5526	12244	26418,87	21257,13	2,43	2,43	2,44	1,96	2,431	0,033
Bret408 (2)/L.sculentum	4651	6886	26604,8	21760,19	2,69	2,61	2,40	1,96		
Bret408 (3)/L.sculentum	5220	4616	28047,97	23054,94	2,53	2,25	2,38	1,96		
Bret408 (4)/L.sculentum	4255	5497	28913,39	23018,29	2,27	2,37	2,46	1,96		
Bret408 (5)/L.sculentum	4095	6287	24787,5	19848,58	2,82	2,65	2,45	1,96		
Bret408 (6)/L.sculentum	3101	6810	24855,94	19788,99	2,97	2,79	2,46	1,96		
Bret551-2 (1)/Brup435	3455	2798	24649,59	9705,39	2,68	3,49	2,08	0,82	2,109	0,025
Bret551-2 (2)/Brup435	10734	2870	24053,64	9165,34	2,9	2,98	2,15	0,82		
Bret551-2 (3)/Brup435	4478	3007	24407,17	9459,77	2,18	2,99	2,12	0,82		
Bret551-2 (4)/Brup435	4649	2926	17544,27	6843,66	2,16	2,69	2,10	0,82		
Bret551-2 (5)/Brup435	5833	4015	17504,73	6889,96	2,36	2,87	2,08	0,82		
Bret551-2 (6)/Brup435	4257	2179	24730,59	9564,2	1,61	2,78	2,12	0,82		
Bret551-2 (7)/Brup435	4679	2913	24702,7	9707,56	1,72	2,53	2,09	0,82		
Bret555-1 (1)/Raphanus	5390	4985	17964,38	11341,18	2,64	2,66	1,76	1,11	1,758	0,013
Bret555-1 (2)/Raphanus	5777	5120	18060,21	11379,62	2,86	3,1	1,76	1,11		
Bret555-1 (3)/Raphanus	5248	4859	19800,54	12382,04	2,5	2,55	1,78	1,11		
Bret555-1 (4)/Raphanus	5838	5347	19785,2	12486,06	2,41	2,48	1,76	1,11		
Bret555-1 (5)/Raphanus	3855	4708	19104,73	12226,53	2,25	2,91	1,73	1,11		
Bret555-1 (6)/Raphanus	3093	4019	19803,31	12484,81	2,43	2,65	1,76	1,11		
Bret556-1 (1)/Raphanus	6011	4089	17439,77	11025,9	2,42	2,76	1,76	1,11	1,765	0,014
Bret556-1 (2)/Raphanus	5596	4887	18154,23	11369,1	2,14	2,72	1,77	1,11		
Bret556-1 (3)/Raphanus	8366	2343	21482,09	13461,17	2,56	2,34	1,77	1,11		
Bret556-1 (4)/Raphanus	7181	3744	22600,02	14398,96	2,23	2,62	1,74	1,11		
Bret556-1 (5)/Raphanus	3540	4281	17137,68	10737,28	2,27	2,69	1,77	1,11		
Bret556-1 (6)/Raphanus	4790	3008	18769,91	11713,24	2,28	2,79	1,78	1,11		

Bret411-6 (1)/Brup435	3367	2709	42535,59	20074,2	1,39	1,85	1,74	0,82		
Bret411-6 (2)/Brup435	3603	2269	42886,11	20295,66	1,75	2,34	1,73	0,82		
Bret411-6 (3)/Brup435	4063	2146	18909,33	8985	2,27	2,46	1,73	0,82		
Bret411-6 (4)/Brup435	4037	2530	20019,44	9423,44	1,7	2,3	1,74	0,82	1,721	0,026
Bret411-6 (5)/Brup435	4564	3734	21067,37	10052,98	2,33	2,68	1,72	0,82		
Bret411-6 (6)/Brup435	5697	3028	18847,69	9255,2	1,69	2,49	1,67	0,82		
Bret 557-3 (1)/Brup435	2917	4030	30915,87	10216,86	2,03	2,51	2,48	0,82		
Bret 557-3 (2)/Brup435	7972	9293	31541,07	10561,62	2,13	2,64	2,45	0,82		
Bret 557-3 (3)/Brup435	3380	2157	26742,49	9016,44	1,83	2,74	2,43	0,82		
Bret 557-3 (4)/Brup435	3099	2346	27371,95	9177,33	1,5	2,75	2,45	0,82	2,464	0,026
Bret 557-3 (5)/Brup435	3966	2063	22772,85	7534,31	1,83	2,7	2,48	0,82		
Bret 557-3 (6)/Brup435	3212	2504	25118,7	8244,61	1,11	2,05	2,50	0,82		
Bret558-3 (1)/Raphanus	2801	3467	20174,4	12769,88	1,93	2,28	1,75	1,11		
Bret558-3 (2)/Raphanus	3886	3397	20687,6	12799,23	2,22	2,35	1,79	1,11		
Bret558-3 (3)/Raphanus	4522	2810	19466,32	12288,58	1,88	2,11	1,76	1,11		
Bret558-3 (4)/Raphanus	3723	4808	19390,75	12214,69	2,5	2,63	1,76	1,11	1,745	0,042
Bret558-3 (5)/Raphanus	6114	3230	22152,55	14717,37	2,39	2,43	1,67	1,11		
Bret558-3 (6)/Raphanus	3406	2519	18872,39	12094,18	2,01	2,38	1,73	1,11		
Bret559-2 (1)/Raphanus	2775	6548	19229,49	12072,5	2,12	2,51	1,77	1,11		
Bret559-2 (2)/Raphanus	2082	5782	18078,83	11438,43	2,47	2,43	1,75	1,11		
Bret559-2 (3)/Raphanus	2482	4757	18893,68	11960,51	2,36	2,09	1,75	1,11		
Bret559-2 (4)/Raphanus	3473	3040	19801,78	12598,3	2,09	2,21	1,74	1,11	1,744	0,018
Bret559-2 (5)/Raphanus	2636	3029	16815,01	10800,38	2,71	2,06	1,73	1,11		
Bret559-2 (6)/Raphanus	3203	3829	16870,46	10898,5	2,25	2,17	1,72	1,11		
Bret500-5 (1)/Raphanus	3038	3333	19308,79	12270,15	1,93	2,29	1,75	1,11		
Bret500-5 (2)/Raphanus	3028	3742	19731,22	12677,75	2,3	1,99	1,73	1,11		
Bret500-5 (3)/Raphanus	6582	5160	21696,13	14223,74	2,37	2,54	1,69	1,11	1,724	0,018
Bret500-5 (4)/Raphanus	2683	3036	19322,77	12443,86	1,95	2,21	1,72	1,11		
Bret500-5 (5)/Raphanus	4042	3370	16915,18	10927,86	1,94	2,41	1,72	1,11		
Bret500-5 (6)/Raphanus	4441	3324	17188,15	10989,36	2,11	2,14	1,74	1,11		
Bret 451-3 (1)/Raphanus	10083	5616	23067,93	14082,38	2,4	2,64	1,82	1,11		
Bret 451-3 (2)/Raphanus	6207	2336	21880,88	13911,46	2,35	2,29	1,75	1,11		
Bret 451-3 (3)/Raphanus	7359	2887	21208,84	13508,36	2,36	2,18	1,74	1,11		
Bret 451-3 (4)/Raphanus	8531	5876	22331,27	14066,32	2,27	2,44	1,76	1,11	1,779	0,035
Bret 451-3 (5)/Raphanus	11660	3026	22890,1	14214,55	2,45	2,7	1,79	1,11		
Bret 451-3 (6)/Raphanus	17046	5899	23470,7	14313,02	2,47	2,6	1,82	1,11		
Bret 501-3 (1)/Raphanus	3848	2686	21123,87	14166,56	2,2	2,44	1,66	1,11		
Bret 501-3 (2)/Raphanus	2890	4607	20933,74	14193,13	2,14	2,6	1,64	1,11		
Bret 501-3 (3)/Raphanus	7441	3909	20112,4	13509,08	2,69	2,37	1,65	1,11	1,673	0,031
Bret 501-3 (4)/Raphanus	4747	4879	19640,82	13042,64	2,66	2,52	1,67	1,11		
Bret 501-3 (5)/Raphanus	7520	6288	21732,88	14113,14	2,47	2,64	1,71	1,11		
Bret 501-3 (6)/Raphanus	8611	4012	21324,81	13847,39	2,57	2,34	1,71	1,11		
Bret 504-1 (1)/Raphanus	6570	4793	21078,17	14214,54	2,34	2,6	1,65	1,11		
Bret 504-1 (2)/Raphanus	7344	3364	21393,65	14406,6	2,38	2,33	1,65	1,11		
Bret 504-1 (3)/Raphanus	10973	5880	22103,86	14363,7	2,27	2,29	1,71	1,11	1,669	0,026
Bret 504-1 (4)/Raphanus	10384	5234	22269,05	15023,9	2,44	2,51	1,65	1,11		
Bret 504-1 (5)/Raphanus	6829	3851	21323,9	14033,65	2,21	2,68	1,69	1,11		
Bret 504-1 (6)/Raphanus	7019	5194	21692,72	14326,8	2,32	2,76	1,68	1,11		

Bret 506-1 (1)/Raphanus	7879	4523	22631,32	15104,31	2,55	2,46	1,66	1,11		
Bret 506-1 (2)/Raphanus	7174	2644	22295,51	14911,86	2,43	2,48	1,66	1,11		
Bret 506-1 (3)/Raphanus	7127	4572	21769,21	14423,69	2,3	2,33	1,68	1,11	1,672	0,014
Bret 506-1 (4)/Raphanus	5218	5812	21826,39	14612,86	2,23	2,07	1,66	1,11		
Bret 506-1 (5)/Raphanus	7479	2516	22253,06	14599,14	2,38	2,46	1,69	1,11		
Bret 506-1 (6)/Raphanus	9491	3094	22104,66	14578,14	2,26	2,54	1,68	1,11		
Bret 507-4 (1)/Raphanus	6461	3983	22622,64	14962,1	2,13	2,56	1,68	1,11		
Bret 507-4 (2)/Raphanus	8110	5824	22437,01	14773,87	2,41	2,44	1,69	1,11		
Bret 507-4 (3)/Raphanus	6781	4805	19722,29	13079,38	2,31	2,65	1,67	1,11	1,682	0,015
Bret 507-4 (4)/Raphanus	7383	4641	21146,08	14060,58	2,39	2,49	1,67	1,11		
Bret 507-4 (5)/Raphanus	6021	5133	21204,03	14075,6	2,32	2,61	1,67	1,11		
Bret 507-4 (6)/Raphanus	12874	6163	21945,68	14247,35	2,07	2,46	1,71	1,11		
Bret452-4 (1)/Raphanus	3143	13495	20880,79	13201,68	2,18	2,99	1,76	1,11		
Bret452-4 (2)/Raphanus	1207	15704	21289,42	13282,78	1,76	2,74	1,78	1,11		
Bret452-4 (3)/Raphanus	3185	17768	20298,49	13603,18	2,96	2,9	1,66	1,11	1,708	0,051
Bret452-4 (4)/Raphanus	4178	11457	20737,02	13902,16	2,3	3,34	1,66	1,11		
Bret452-4 (5)/Raphanus	4572	12967	19971,55	13060,14	2,83	3,06	1,70	1,11		
Bret452-4 (6)/Raphanus	4862	23199	21113,03	13749,96	2,98	2,81	1,70	1,11		
Bret564(1)/Raphanus	4490	9928	30776,63	13283,75	2,4	2,98	2,57	1,11		
Bret564(2)/Raphanus	2995	11031	31122,03	13546,17	1,99	3,36	2,55	1,11		
Bret564(3)/Raphanus	2789	7302	31191,15	14589,04	1,95	2,77	2,37	1,11	2,473	0,077
Bret564(4)/Raphanus	3299	4252	29491,88	13525,81	2,05	3,27	2,42	1,11		
Bret564(5)/Raphanus	3389	7567	30490,9	13649,34	2,16	2,81	2,48	1,11		
Bret564(6)/Raphanus	3553	6980	30206,33	13725,89	2,5	2,84	2,44	1,11		
Bret561(1)/Brup435	6034	9146	26424,82	8907,09	2,67	2,96	2,43	0,82		
Bret561(2)/Brup435	5206	5132	26307,98	9044,4	2,71	2,98	2,39	0,82		
Bret561(3)/Brup435	3119	5220	23363,22	8296,31	2,91	2,89	2,31	0,82	2,362	0,046
Bret561(4)/Brup435	3697	5078	24667,73	8720,11	2,35	2,96	2,32	0,82		
Bret561(5)/Brup435	4020	5356	24303,66	8487,8	2,62	2,29	2,35	0,82		
Bret561(6)/Brup435	3617	5731	24199,5	8355,12	2,38	2,29	2,38	0,82		

Tabla 14: Datos obtenidos para *Brachypodium boissieri*. Fuente: elaboración propia.

muestras/standard (ST)	núcleos	núcleos (ST)	media	media (ST)	CV	CV (ST)	pg/2C	pg/2C (ST)	Promedio	Desviación estándar
Bbois15-1 (1)/L.sculentum	7200	8524	24292,3	15369,95	2,74	2,65	3,10	1,96	3,149	0,032
Bbois15-1 (2)/L.sculentum	5529	6430	25129,77	15406,61	3,28	2,63	3,20	1,96		
Bbois15-1 (3)/L.sculentum	5454	6806	24816,02	15424,49	2,44	3,08	3,15	1,96		
Bbois15-1 (4)/L.sculentum	7836	5891	25189,83	15620,35	3,03	2,85	3,16	1,96		
Bbois15-1 (5)/L.sculentum	3661	8071	28541,79	17793,28	2,82	2,58	3,14	1,96		
Bbois15-1 (6)/L.sculentum	3338	8795	28301,9	17670,31	2,82	2,84	3,14	1,96		
Bbois10-1 (1)/L.sculentum	5075	8374	25465,52	15549,48	2,93	3,08	3,21	1,96	3,152	0,040
Bbois10-1 (2)/L.sculentum	5935	4946	25296,28	15773,35	2,94	2,94	3,14	1,96		
Bbois10-1 (3)/L.sculentum	4590	5095	28607,55	17658,92	2,75	2,77	3,18	1,96		
Bbois10-1 (4)/L.sculentum	3482	5808	29181,35	18063,46	2,75	2,62	3,17	1,96		
Bbois10-1 (5)/L.sculentum	2591	6290	26549,27	16690,35	2,8	2,19	3,12	1,96		
Bbois10-1 (6)/L.sculentum	2781	4978	25685,27	16242,03	2,42	2,28	3,10	1,96		
Bbois13-1 (1)/L.sculentum	3690	3629	23916,2	15525,66	1,78	1,91	3,02	1,96	3,116	0,067
Bbois13-1 (2)/L.sculentum	4799	6811	24124,52	15538,02	1,68	1,9	3,04	1,96		
Bbois13-1 (3)/L.sculentum	6979	11236	28335,95	17662,04	2,37	2,26	3,14	1,96		
Bbois13-1 (4)/L.sculentum	4740	8410	28797,31	17897,09	2,58	2,57	3,15	1,96		
Bbois13-1 (5)/L.sculentum	5521	5421	27217,05	16819,89	2,38	2,26	3,17	1,96		
Bbois13-1 (6)/L.sculentum	3019	5654	27989,92	17346,18	2,68	2,67	3,16	1,96		
Bbois14-1 (1)/L.sculentum	7501	5676	28805,72	18279,31	2,8	2,57	3,09	1,96	3,111	0,030
Bbois14-1 (2)/L.sculentum	4886	6542	29010,87	18233,16	2,23	2,36	3,12	1,96		
Bbois14-1 (3)/L.sculentum	4539	4008	28057,98	17456,2	2,67	2,69	3,15	1,96		
Bbois14-1 (4)/L.sculentum	4417	7020	28139,08	17566,66	2,33	2,55	3,14	1,96		
Bbois14-1 (5)/L.sculentum	6505	5584	25526,92	16276,89	2,34	2,2	3,07	1,96		
Bbois14-1 (6)/L.sculentum	5098	3372	26780,31	16964,25	2,58	2,09	3,09	1,96		
Bbois3 (1)/L.sculentum	1286	3101	32738,49	19673,89	2,99	2,65	3,26	1,96	3,236	0,072
Bbois3 (2)/L.sculentum	1683	3816	24802,6	14856,76	3,03	2,57	3,27	1,96		
Bbois3 (3)/L.sculentum	2827	7403	24838,17	14636,62	2,78	2,89	3,33	1,96		
Bbois3 (4)/L.sculentum	3824	10324	25302,51	15001,35	2,84	2,81	3,31	1,96		
Bbois3 (5)/L.sculentum	3365	6732	25838,12	15736,84	2,94	2,89	3,22	1,96		
Bbois3 (6)/L.sculentum	4237	6206	25848,44	15646	2,96	2,93	3,24	1,96		
Bbois3 (7)/L.sculentum	2860	7498	29201,95	18335,39	2,7	2,71	3,12	1,96		
Bbois3 (8)/L.sculentum	3088	7879	28595,04	17806,54	2,76	2,57	3,15	1,96		
Bbois9 (1)/L.sculentum	5654	7164	26203,85	16086,71	2,58	2,52	3,19	1,96	3,133	0,074
Bbois9 (2)/L.sculentum	5066	9282	26866,22	16802	2,02	2,01	3,13	1,96		
Bbois9 (3)/L.sculentum	3760	5421	23929,07	14794,51	2,28	2,42	3,17	1,96		
Bbois9 (4)/L.sculentum	8066	4487	23946,65	14627,9	2,29	2,42	3,21	1,96		
Bbois9 (5)/L.sculentum	3210	7885	24375,18	15832,83	1,9	2,44	3,02	1,96		
Bbois9 (6)/L.sculentum	5066	7503	24372,12	15540,78	1,93	2,28	3,07	1,96		