

Universidad de Alcalá

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS CITOGENÉTICO-MOLECULAR DE LA
DINÁMICA, ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE
SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS (SSRs) EN
ESPECIES SILVESTRES Y CULTIVADAS DEL GÉNERO
*HORDEUM***

Alejandro Carmona Calderón

DIRIGIDA POR:

Dr. Nicolás Jouve de la Barreda
Dra. Ángeles Cuadrado Bermejo
Dr. Alfredo de Bustos Rodríguez

2014

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad de España correspondiente a los proyectos (AGL 2012-34052) y (AGL 2009-10373), así como a la beca FPI (BES-2010-036656).

A la memoria de mi padre, Fernando Carmona.

Después de cuatro años de trabajo para llegar hasta aquí hay mucha gente a la que me gustaría dar las gracias.

En primer lugar agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad de España por la financiación de los proyectos y a la Universidad de Alcalá por los medios aportados para completar mi formación predoctoral.

Quería agradecer al Dr. Nicolás Jouve. Durante la carrera no tuve el placer de tenerle como profesor, pero siempre había oído buenas opiniones sobre su gran conocimiento y capacidad para transmitirlo. Ahora puedo sumarme a esas opiniones. Además personalmente siempre ha mostrado hacia mí un trato impecable respondiendo a mis requerimientos inmediatamente y con total solvencia. Por todo ello y por el esfuerzo que ha volcado en esta tesis, muchas gracias.

A la Dra. Angeles Cuadrado y el Dr. Alfredo de Bustos. Por todo lo que me han enseñado y el gran esfuerzo y la increíble cantidad de trabajo que han dedicado a esta tesis. Desde el punto de vista profesional son unos extraordinarios científicos y personalmente siempre me han ofrecido un trato excelente. Por ello quería dejar en estas líneas constancia de mi agradecimiento.

A todos los doctores y personal del Departamento de Genética de la Universidad de Alcalá que han convivido conmigo en el día a día del laboratorio: Dra. Esther Ferrer, Dra. Araceli Fominaya, Dr. Juan González, Dra. Ángeles Bernardo, nuestra secretaria Chelo (siempre de buen humor y siempre con la solución para cualquier problema). Y muy especialmente a la técnico Eva Friero, por el trabajo que ha aportado a esta tesis pero más aún por su compañerismo, ánimos y alegría que tanto se agradecen en el duro día a día; y a la Dra. Yolanda Loarce por dispensarme siempre un trato muy cariñoso, atento y por sus valiosos consejos, tanto personales como para el *Southern*!!

Por último quería agradecer al Dr. Michael Schmid y a todo su equipo del Departamento de Genética Humana de la Universidad de Würzburg en Alemania por su cálido acogimiento, su exquisito trato y todo el conocimiento que me transmitió en los meses que tuve la suerte de estar allí.

En un ámbito personal quería agradecer a toda mi familia en general y en particular a mi hermano Gaspar y mi cuñada Irene, mis familiares mas heavys; y por supuesto a mi sobrino Fernando que nació durante la elaboración de esta tesis y desde ese día es la alegría de la familia (y que cuando sea más mayor y lea esto va a alucinar).

Y muy especialmente a mis padres, Juani y Fernando, dos personas que han dado todo por mi hermano y por mí. Nos inculcaron el valor del esfuerzo y el trabajo, y es por ello que esta tesis es también el fruto de su lucha. Os quiero muchísimo.

También un agradecimiento muy cariñoso a mi tía Clara y mi tía Maruja.

A Marta le tendría que escribir una tesis entera de agradecimientos, desde que se presentó la posibilidad de hacer el doctorado estuvo animándome y apoyándome y así hasta hoy, aguantándome un día tras otro y convirtiendo mis agobios y quebraderos de cabeza en cariño y chistes de los que solo nos reímos nosotros. *Si supieran que escribí la tesis y nos dio tiempo a salir a cenar...* Qué suerte tengo de estar a tu lado.

Y como no a todos mis amigos con quienes tan buenos momentos he compartido ¡y espero que sean muchos más!.

Alejandro Carmona Calderón

ABREVIATURAS

BAC	Cromosoma artificial de bacteria
CCD	Dispositivo de carga acoplada
Cy3	Cianina
cv.	Cultivar
DAPI	Diamidino-2-fenilindol
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GISH	Hibridación <i>in situ</i> genómica
HSW	Tampón de lavado de alta astringencia
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LB	Caldo de lisogenia Luria-Bertani
ND-FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente no desnaturalizante
NGS	Secuenciadores de nueva generación
OD	Densidad óptica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Temperatura ambiente
ssp.	Subespecie
SDS	Dodecil sulfato sódico
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth (con represor de catabolitos)
SSC	Tampón salino citrato sódico
SSR	Secuencia simple repetida
TAE	Tris + acetato + ácido etilendiaminotetraacético
TE	Tris + ácido etilendiaminotetraacético
Tm	Temperatura de fusión

1. INTRODUCCIÓN (1)

1.1. Clasificación, Ecología y Geografía del género *Hordeum* (3)

1.2 Importancia del género *Hordeum* (4)

1.3. Taxonomía y Filogenia (6)

1.4. Estudios citogenéticos en el género *Hordeum* (9)

1.5 El genoma de *H. vulgare* y el ADN repetitivo (11)

1.6. Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSRs) (12)

2. OBJETIVOS (15)

3. MATERIALES Y MÉTODOS (19)

3.1. Material vegetal (21)

3.2. Sondas utilizadas (23)

3.3. Técnicas citogenéticas (24)

3.3.1. *Obtención de preparaciones cromosómicas* (24)

3.3.2. *FISH (Hibridación in situ con Fluorescencia)* (25)

3.3.3. *GISH (Hibridación in situ Genómica)* (26)

3.3.4. *ND-FISH (Hibridación in situ Fluorescente No Desnaturalizante)* (26)

3.3.5. *Microscopía de fluorescencia e imágenes* (27)

3.4. Técnicas moleculares (27)

3.4.1 *Extracción de ADN* (27)

3.4.2. *Ensayos de Southern Blot* (28)

3.4.3. *Selección de clones BAC con grandes regiones de SSRs* (29)

3.4.4. *Aislamiento del ADN de los BACs y análisis de fragmentos de restricción* (30)

3.4.5. *Clonación de fragmentos de ADN* (31)

3.4.6. *Selección de colonias bacterianas mediante el método de Toothpick y aislamiento de ADN plasmídico* (32)

3.4.7. *Secuenciación de fragmentos con grandes regiones de SSRs (33)*

4. SSRs y DIVERSIDAD CROMOSÓMICA EN Y ENTRE LAS LAS ESPECIES DE *HORDEUM* CON GENOMIO H: *H. VULGARE* L. Y *H. BULBOSUM* L. (35)

4.1. Introducción (37)

4.2. Resultados (38)

4.2.1. *Localización cromosómica de SSRs en H. vulgare (38)*

4.2.2. *Localización cromosómica de SSRs en H. bulbosum (42)*

4.2.3. *Organización molecular de los SSRs (45)*

4.3. Discusión (47)

4.3.1. *SSR como marcadores cromosómicos mediante ND-FISH (47)*

4.3.2. *Estructura molecular de los SSRs (48)*

4.3.3. *ND-FISH y SSRs para evaluar la diversidad citogenética de la cebada (49)*

4.3.4. *Citogenética y relaciones entre especies (50)*

4.3.5. *Tendencias evolutivas seguidas por los SSRs durante la especiación (51)*

4.4. Anexos (52)

5. SSRS Y CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA XU DE *HORDEUM*: NUEVAS PERSPECTIVAS EN LA EVOLUCIÓN DEL COMPLEJO *H. MURINUM* (57)

5. 1. Introducción (59)

5. 2. Resultados (60)

5.2.1. *Nivel de ploidía en H. murinum (60)*

5.2.2. *Análisis cariotípico del citotipo diploide de H. murinum (62)*

5.2.3. *Identificación cromosómica y diversidad cariotípica en las formas tetraploides de H. murinum (64)*

5.2.4. *Identificación de los tres subgenomas presentes en el citotipo hexaploide (68)*

5.2.5. *Comportamiento meiótico de los cromosomas (62)*

5.3. Discusión (73)

5.3.1. *Identificación de los cromosomas de H. murinum (73)*

5.3.2. *El origen de los poliploides en el complejo H. murinum (74)*

5.3.3. *Remodelación genómica y poliploidía (75)*

5.3.4. *Taxonomía del complejo H. murinum (76)*

6. SSRs Y CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA XA DE *HORDEUM*: NUEVOS DATOS EN LA HISTORIA EVOLUTIVA DE *H. MARINUM* (79)

6.1. Introducción (81)

6.2. Resultados (82)

6.2.1. *Análisis cariotípico de ssp. marinum (83)*

6.2.2. *Análisis cariotípico del citotipo diploides de ssp. gussoneanum (85)*

6.2.3. *Caracterización de los dos subgenomas presentes en tetraploides (88)*

6.3. Discusión (91)

6.3.1. *Identificación cromosómica y análisis cariotípico (91)*

6.3.2. *Sobre el origen de los poliploides en H. marinum (93)*

6.3.3. *Relaciones filogenéticas en H. marinum (94)*

6.3.4. *Tendencias evolutivas de las secuencias de DNA repetitivo durante la especiación de H. marinum (95)*

6.3.5. *Taxonomía del complejo H. marinum (97)*

7. SSRs Y EL GENOMA I DE *HORDEUM*. LA COMPLEJA HISTORIA EVOLUTIVA DE *H. BRACHYANTHERUM* (99)

7.1. Introducción (101)

7.2. Resultados (103)

7.2.1. *Caracterización cromosómica de ssp. californicum (103)*

7.2.2. *Caracterización cromosómica de H. roshevitzii (105)*

7.2.3. Caracterización cromosómica del citotipo tetraploide de *ssp. brachyantherum* (107)

7.2.4. Caracterización cromosómica del citotipo hexaploide de *ssp. brachyantherum* (111)

7.3. Discusión (114)

7.3.1. Relaciones filogenéticas entre *ssp. californicum* y *H. roshevitzii* (114)

7.3.2. Sobre el origen del citotipo tetraploide de *ssp. H. brachyantherum* (116)

7.3.3. Diversidad cromosómica entre los citotipos tetraploides de *ssp. brachyantherum* (118)

7.3.4. Sobre el origen de los hexaploides de *ssp. H. brachyantherum* (120)

7.3.5. Taxonomía del complejo *H. brachyantherum* (122)

8. ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN MOLECULAR DE AGRUPACIONES DE SSRs (125)

8.1. Introducción (127)

8.2. Resultados (128)

8.2.1. Identificación de clones BAC de cebada ricos en repeticiones ACT (129)

8.2.2. Selección de fragmentos de restricción ricos en ACT (129)

8.2.3. Análisis de la estructura molecular (131)

8.3. Discusión (134)

8.3.1. Dificultad en la clonación y secuenciación de secuencias ricas en microsatélites (134)

8.3.2. Organización molecular de regiones ricas en microsatélites (137)

9. CONCLUSIONES (139)

10. REFERENCIAS (143)

11. ANEXOS (157)

1. Introducción

1.1. Clasificación, Ecología y Geografía del género *Hordeum*

El género *Hordeum* pertenece a la tribu *Triticeae* la cual incluye además de la cebada cultivada, *H. vulgare ssp. vulgare*, algunos de los cereales más importantes desde el punto de vista agronómico como el trigo y el centeno. Está compuesto por aproximadamente 31 especies (45 taxones). Con un número básico de $x=7$ cromosomas, el género está integrado por especies

diploides ($2n=14$), como *H. vulgare*, tetraploides ($2n=4x=28$) y hexaploides ($2n=6x=42$). Además, algunas especies incluyen citotipos con distinto nivel ploídico. Por ejemplo, las especies *H. murinum* y *H. brachyantherum* integran subespecies y/o citotipos que representan los tres niveles de poliploidía (Bothmer et al. 1995, Petersen y Seberg 2003, Blattner 2009).



Figura 1.1. Morfología característica del género *Hordeum*.

Las especies de *Hordeum*, diferenciadas principalmente por la morfología de la espiga, se caracterizan por presentar en cada nodo de la inflorescencia tres espiguillas, siendo las laterales normalmente estériles (Fig. 1.1).

La hipótesis más aceptada sitúa el origen de *Hordeum* en el Mioceno (hace entre 23 y 7 millones de años) en el oeste de Eurasia, en la región del Creciente Fértil, desde el levante Mediterráneo y el valle del Nilo en Egipto hasta el Golfo Pérsico, incluyendo las cuencas de los ríos Tigris y Éufrates. Posteriormente se distribuyó sobre todo el Hemisferio Norte, América del Sur y Sudáfrica (Bothmer et al. 1995, Blattner 2009).

Según su hábito de crecimiento las especies de *Hordeum* pueden ser anuales, incluyendo formas tanto de invierno como de verano, aunque la mayoría son perennes. En las especies anuales predomina la autofecundación aunque algunas pueden ocasionalmente realizar polinización cruzada. Existen algunas especies alógamas obligadas mientras que otras lo son a un nivel no tan estricto. Se distribuyen principalmente en áreas templadas aunque también se encuentran en regiones subtropicales (América del Sur) o regiones de clima frío (Patagonia, Alaska, Canadá y Norte del Asia más oriental). Su hábitat es preferentemente abierto, en estepas y praderas a lo largo de arroyos y zanjas, también se encuentran en suelo salados, en zonas secas o en altitudes elevadas (hasta por encima de los 4500 metros en los Andes y el Himalaya) (Bothmer et al. 1995). Los cuatro centros de diversidad del género (Fig. 1.2) se localizan y expanden desde el sudoeste de Asia, Asia central, oeste de Norteamérica y América del Sur, siendo este último el centro de diversidad de especies más activo con 16 especies nativas (Blattner et al. 2010).

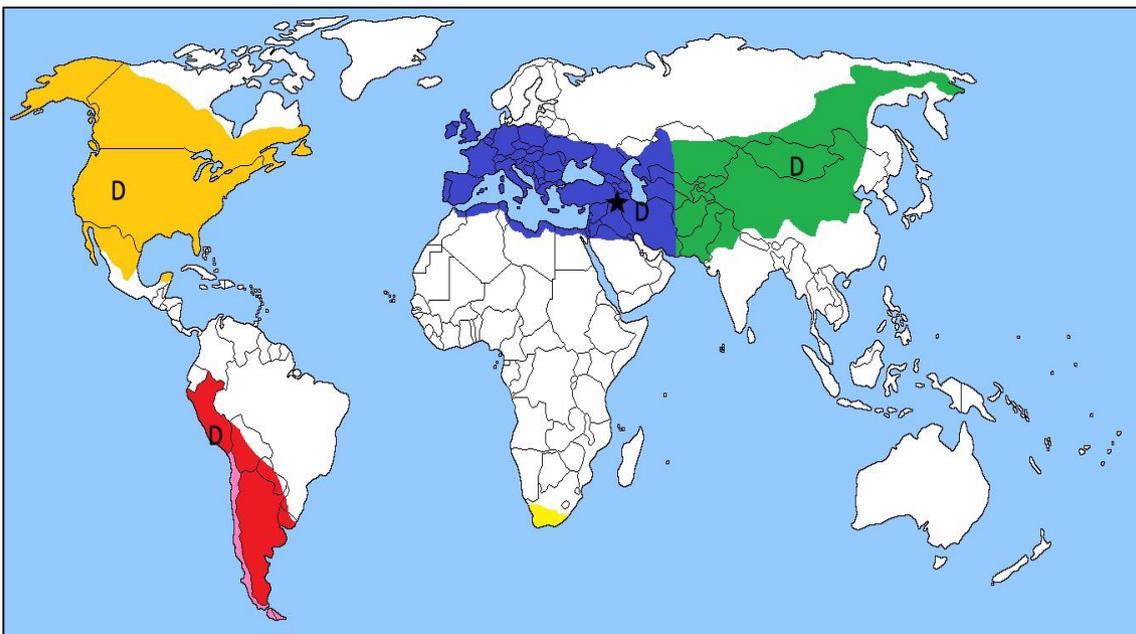


Figura 1.2. Distribución del género *Hordeum*. La estrella indica el origen y la letra D los centros de diversidad. La distribución geográfica del género se indica utilizando el mismo código de colores utilizado en la figura 1.4.

1.2. Importancia del género *Hordeum*

La cebada es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial tras el maíz, arroz y trigo, superando en extensión los 49 millones de hectáreas y los 132 millones de toneladas. Los datos para España en 2012 fueron de 2.6 millones de hectáreas cultivadas y una producción de 5.9 millones de toneladas (FAO, 2012). Caracterizada por crecer en condiciones de estrés por

humedad, sequia o sobre suelos pobres, el cultivo de cebada ofrece un rendimiento notable en ambientes donde otros cereales como el trigo no podrían sobrevivir, lo que le otorga una importancia extraordinaria como fuente esencial de alimento en países pobres. En países más desarrollados destaca principalmente su uso histórico en la elaboración de malta y en menor medida como alimento para ganado en forma de pienso o forraje. Actualmente existe un interés por el consumo humano pues recientes estudios han descrito que el grano de cebada contiene un porcentaje significativamente alto de fibra y polisacáridos en su pared celular. La incorporación de estos elementos en la dieta está relacionado con una reducción notable del riesgo de padecer enfermedades como la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares y cáncer de colon, de gran incidencia en sociedades modernas (Collins et al. 2010).

Es igualmente relevante el potencial que representan las formas silvestres de cebada al ser reserva de diversidad genética en la que encontrar genes a implementar en el cultivo tanto de la propia cebada como de otras especies de *Triticeae*, como por ejemplo el trigo panadero. En relación a la capacidad de introducir en la cebada cultivada genes provenientes de cebadas silvestres, estas han sido divididas en tres categorías: *H. vulgare ssp spontaneum*, que representa el acervo genético primario, al no existir barreras biológicas en la transferencia de genes; *H. bulbosum*, que representa el acervo genético secundario y muestra una buena capacidad para el cruzamiento, aunque operan ciertos factores de esterilidad y los híbridos poseen una fertilidad baja y por último, el acervo genético terciario está integrado por el resto de las especies de *Hordeum* con las que se pueden obtener híbridos, aunque estériles, utilizando técnicas de rescate de embriones (Bothmer et al. 1995).

Dado el interés agronómico del género y por tanto el interés por conocer su diversidad genética y clarificar su filogenia, *Hordeum* es uno de los géneros mejor caracterizados tanto desde el punto de vista de la genética clásica como de la citogenética y la genética molecular. Dada la sintenia y colinearidad existentes entre géneros próximos, *H. vulgare* por su condición diploide, autógena y a su gran facilidad para ser cruzada ha sido elegida especie modelo para el estudio genético, genómico y citogenético de la tribu *Triticeae* (Mayer et al. 2011). Además, *Hordeum* representa un material excelente para investigar en plantas la remodelación genómica durante la evolución de los poliploides ya que aproximadamente la mitad del taxón es poliploide e incluye autoploides y aloploides con distintos niveles ploídicos.

1.3. Taxonomía y Filogénia

La taxonomía del género ha sufrido grandes cambios a lo largo del tiempo. Una de las primeras clasificaciones del género *Hordeum*, basada en criterios puramente morfológicos, fue realizada por Linneo en su obra clásica *Specie Plantarum* (Linneo 1753). Posteriormente, Nevski basándose en criterios como el ciclo vital, reclasificó el género (Nevski et al. 1941). En los años 60 el creciente interés por la mejora de cultivos y el potencial de las especies silvestres como fuente para lograr esta mejora llevó al estudio de cruzamientos, fertilidad de polen y semillas y viabilidad de híbridos (Rajhathy y Morrison 1959 y 1962, Liu y Schooler 1965, Subrahmanyam 1978, Bothmer y Jacobsen 1986). A raíz de estos estudios comenzaron a definirse los diferentes genomios existentes en la tribu *Triticeae* y a realizarse clasificaciones incluyendo como criterios además características cromosómicas. Löve basándose, entre otros datos, en la constitución genómica de las especies y similitudes en patrones de bandeo-C (heterocromatina constitutiva), dividió el género en dos: el género *Hordeum* L. (con *H. vulgare* L. como único miembro) y el género *Cristesion* (que incluía a todas las demás especies) (Löve 1984). Dewey, también basándose en análisis cariológicos, apoyó esta clasificación pero incluyó en el género *Hordeum* a la especie *H. bulbosum* L. (Dewey 1984). No obstante la clasificación más seguida hasta la actualidad ha sido la que establecieron Bothmer y Jacobsen en 1985, quienes retomaron la visión clásica de *Hordeum* como un único género e identificaron cuatro secciones, *Hordeum*, *Anisolepis*, *Stenostachys* y *Cristesion*, atendiendo fundamentalmente a criterios morfológicos. Aunque Bothmer y colaboradores mantienen esta clasificación en su última revisión del género, establecieron nuevas relaciones filogenéticas apoyándose en los datos obtenidos a partir del análisis de los apareamientos cromosómicos en híbridos interespecíficos. Así, en *Hordeum* existirían al menos cuatro genomios básicos designados por letras: **I** (*H. vulgare* y *H. bulbosum*), **Y** (*H. murinum*), **X** (*H. marinum*) y **H** (el resto de especies del género) (Bothmer et al. 1995). Posteriormente, el genomio **Y** pasó a denominarse **Xu** y el genomio **X** a **Xa** (Wang et al. 1996). Una vez establecidas las homeologías entre los cromosomas de trigo y de cebada se propuso usar el término **H** para la cebada cultivada (Linde-Laursen et al. 1997) y por lo tanto se intercambiaron los nombres de los genomios **H** e **I**. En este trabajo emplearemos la nomenclatura actualmente más aceptada: **H** (*H. vulgare* L. y *H. bulbosum* L.), **Xu** (*H. murinum*), **Xa** (*H. marinum*) e **I** (el resto de especies del género) (Fig. 1.3).

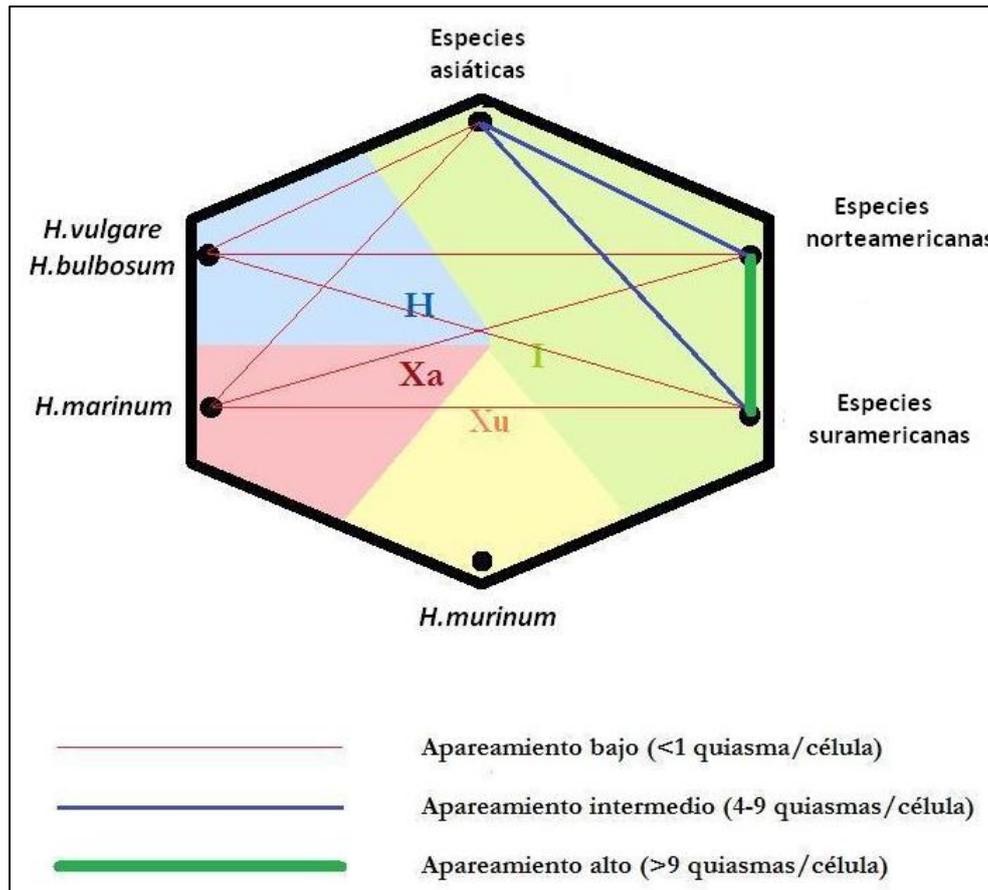


Figura 1.3. Esquema de apareamientos meióticos entre diferentes especies diploides de *Hordeum*. Modificación realizada a partir de Bothmer et al. (1995) indicando los cuatro genomas básicos siguiendo la nomenclatura actual.

En las últimas décadas, los numerosos trabajos llevados a cabo en *Hordeum* analizando diferentes tipos de secuencias, tanto del genoma de cloroplastos como del ADN nuclear han aportado datos interesantes en relación a la filogenia del género (Fig. 1.4). En general, los árboles filogenéticos separan las especies diploides de *Hordeum* en cuatro grupos coincidiendo con la constitución genómica determinada citogenéticamente (e.g. Doebley et al. 1992, Komatsuda et al. 1999, Nishikawa et al. 2002, Petersen y Seberg 2003, Jacob y Blattner 2006). Por el contrario, cuando en las filogenias moleculares se incluyen especies/citotipos poliploides los resultados son contradictorios y difíciles de interpretar, en parte por el desconocimiento del origen auto- o alopoloide de la mayoría de los poliploides. Así, distintos estudios dependiendo del tipo de marcadores moleculares o secuencias analizadas (e.g. repetidas, genes de copia única nucleares o de cloroplastos), criterios elegidos a la hora de confeccionar los árboles filogenéticos, el número de individuos por taxón o la diversidad de especies analizadas, aportan resultados contradictorios que hacen que la filogenia de *Hordeum*

y el origen de los poliploides siga siendo objeto de debate después de más de 50 años de intenso estudio.

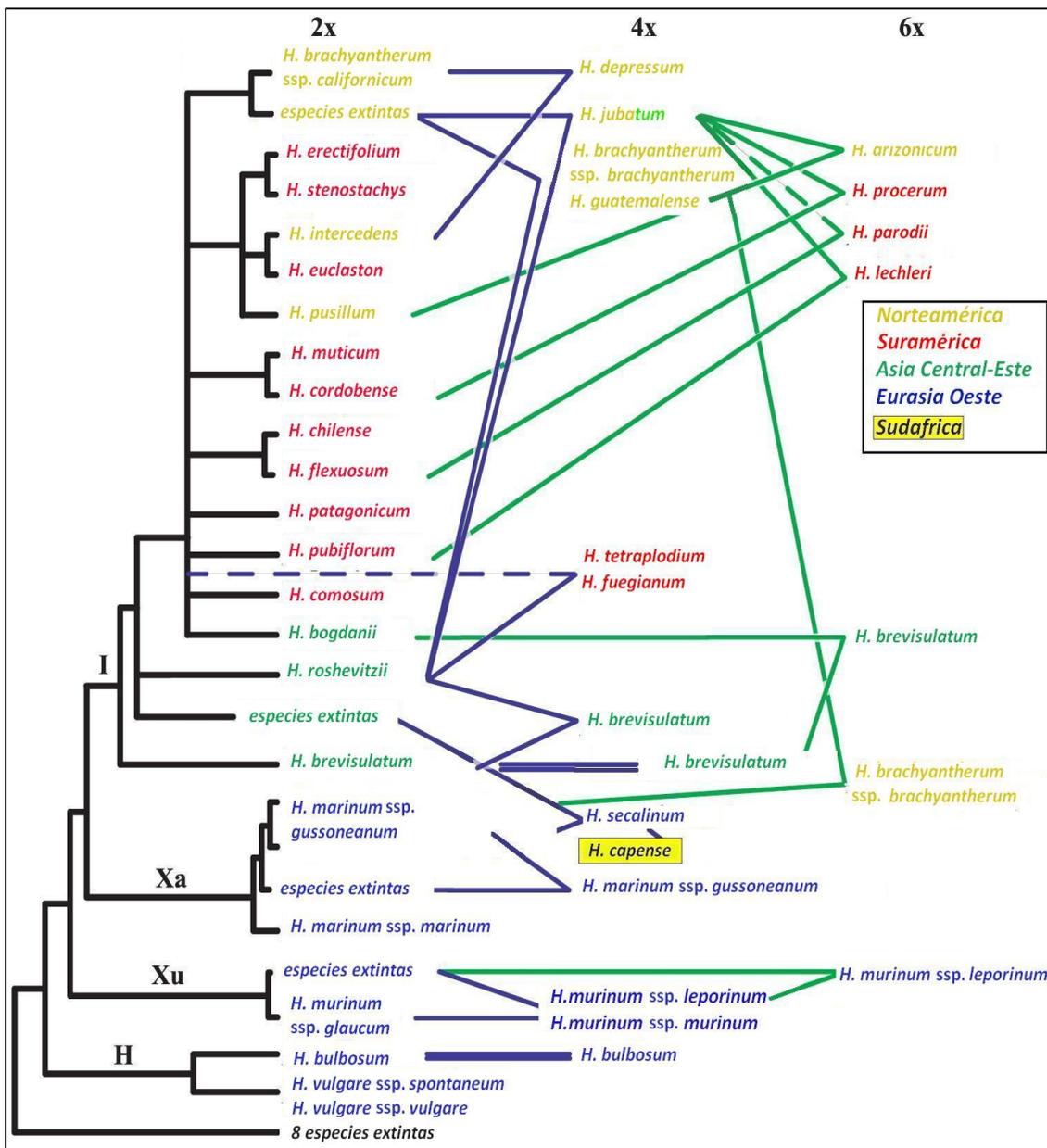


Figura 1.4. Esquema de las supuestas relaciones filogenéticas de los diferentes citotipos existente en el género *Hordeum*, modificado de Brassac et al. (2012). La distribución geográfica del género se indica utilizando el mismo código de colores utilizado en la figura 1.2.

En este trabajo, para la denominación de las especies/subespecies analizadas se ha utilizado la clasificación propuesta por Bothmer et al. (1995), como generalmente se sigue utilizando por parte de la mayoría de los taxónomos, mejoradores y genetistas. No obstante, el interés por establecer una taxonomía que refleje las relaciones filogenéticas ha hecho que en los últimos años se hayan llevado a cabo varias reclasificaciones del género. Así, Petersen y

Seberg en 2003 proponen una nueva clasificación delimitando cuatro secciones: *Hordeum*, *Sibirica*, *Stenostachys* y *Critesion* (Fig. 1.5). En la última revisión del género, avalado por numerosos estudios moleculares, Blattner en 2009 reclasifica *Hordeum* en cuatro secciones monofiléticas: *Hordeum*, *Trichostachys*, *Marina* y *Stenostachys* integradas por las especies con genomas **H**, **Xu**, **Xa**, e **I** respectivamente. Además establece una nueva sección *Nodosa* integrada por tres taxones que combinan los genomioms **Xa** e **I**, cuyo valor taxonómico debido a su origen polifilético es objeto de debate (Petersen et al. 2011). Es significativo que después de varias décadas de debate y controversia sobre el valor de los cromosomas y genomioms como criterio taxonómico en *Hordeum*, actualmente se da un valor relevante a los mismos.

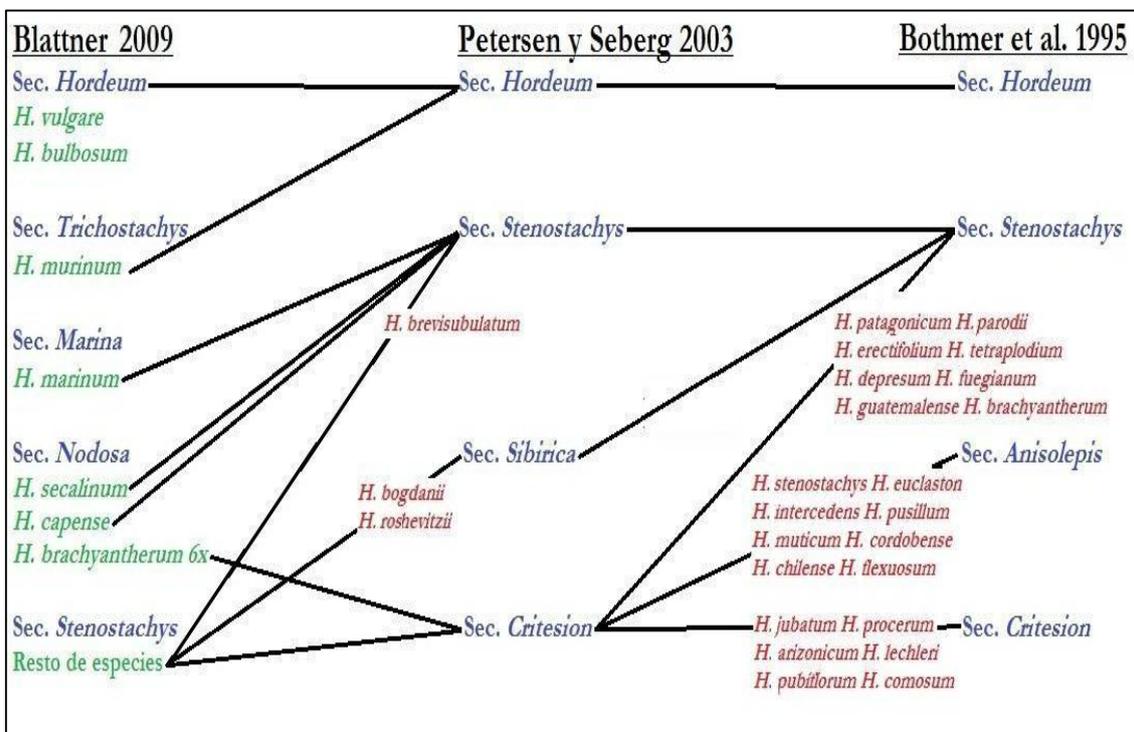


Figura 1.5. Esquema representando las relaciones entre las clasificaciones del género *Hordeum* llevadas a cabo en las últimas décadas.

1.4. Estudios citogenéticos en el género *Hordeum*

Los cariotipos en general de todas las especies de *Hordeum*, caracterizados inicialmente en la década de los 60 en base a su morfología, son bastante simétricos con cromosomas predominantemente metacéntricos y relativamente grandes (Rajhathy y Morrison 1962 y 1964). Los cromosomas, siguiendo una nomenclatura clásica en base a una numeración del 1 al 7, se ordenan en los cariotipos de mayor a menor tamaño, situando los cromosomas satelizados al final. Durante la década de los 70 y 80, los numerosos trabajos llevados a cabo

con las técnicas de bandeo-C en la mayoría de la especies, permitieron un análisis cromosómico más completo del género. Las similitudes o diferencias inter- e intraespecíficas en los patrones de distribución de las bandas han sido utilizados como criterio para formular

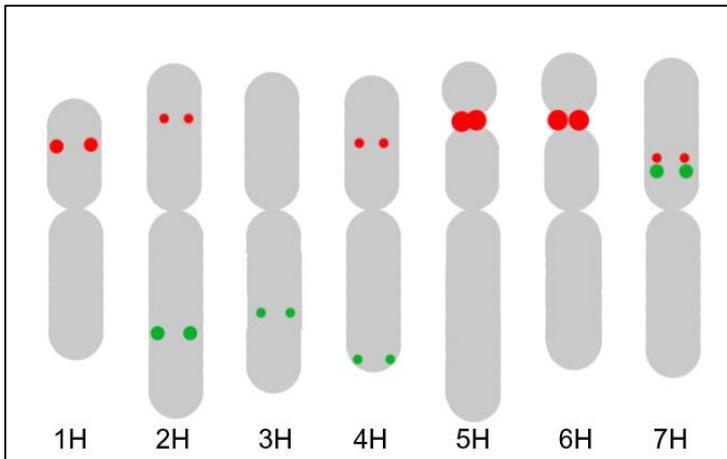


Figura 1.6. Esquema mostrando la localización física de los genes ribosomales 5S (verde) y 45S (rojo). Esto permite la identificación de los siete cromosomas de *H. vulgare*.

hipótesis sobre posibles relaciones entre especies y determinar el origen auto- o alopoloide de los citotipos poliploides (ver revisión Linde-Laursen et al. 1992). En cebada la distribución de las bandas-C, localizadas mayoritariamente en regiones pericentroméricas, permite la distinción de los siete cromosomas aunque el patrón similar de algunos de sus

cromosomas hace difícil la identificación individualizada de aquellos que presentan tamaño y morfología parecida. Así, la identificación inequívoca e individualizada de todos los cromosomas de cebada no fue posible hasta la década de los 90, con la introducción de las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas para ADN repetitivo. La figura 1.6 esquematiza como la combinación de sondas para los genes ribosomales del 5S y 45S en *H. vulgare* permite la identificación de todos sus cromosomas (Leitch y Heslop-Harrison 1992 y 1993). Tras el análisis comparativo de los distintos mapas genéticos dentro de la tribu *Triticeae* se pone de manifiesto que los cromosomas de cebada, denominados del 1 al 7 según la nomenclatura clásica, muestran correspondencia con los cromosomas de los grupos de homología de trigo, 7, 2, 3, 4, 1, 6 y 5 respectivamente, pasándose a denominarse por tanto del 1H al 7H (revisión Linde-Laursen et al. 1997).

Además de las ribosomales, han sido clonadas otras sondas de la propia cebada u otras especies de *Triticeae* principalmente de naturaleza repetitiva, habiéndose utilizado para la caracterización del genoma de la cebada mediante FISH (ver revisión Houben y Pickering 2009). Las mismas sondas se han utilizado con éxito para caracterizar los cromosomas/genomas de las especies silvestres (de Bustos et al. 1996, Taketa et al. 1999, 2009). No obstante, exceptuando las especies diploides silvestres más utilizadas en mejora como por ejemplo *H. bulbosum* (Pickery et al. 2005) y *H. chilense* (Cabrera et al. 1995), el genoma de la mayoría de las especies silvestres de *Hordeum*, especialmente las formas

poliploides, están poco caracterizado a nivel cromosómico. Al contrario que en *H. vulgare* donde las sondas ribosomales permiten la caracterización de todo el complemento cromosómico, en las especies diploides silvestres estas sondas identifican como máximo 2 o 3 pares de cromosomas (Taketa et al. 1999a y 2001), no obstante aportan una información muy valiosa para redefinir los grupos taxonómicos dentro de los genomios, apoyando los análisis e hipótesis filogenéticos y permitiendo establecer algunas posibles homeologías (Taketa et al. 2005).

Las técnicas de hibridación *in situ* genómica (GISH), que han resultado muy útiles para identificar los cromosomas de las especies parentales en multitud de híbridos y poliploides, aplicadas al género *Hordeum* han permitido la detección del genoma **Xa** de *H. marinum* en las especies tetraploides *H. secalinum* y *H. capense*, y en el citotipo hexaploide de *H. brachyantherum* (Taketa et al. 1999b y 2009). Sin embargo, no ha sido posible distinguir grupos de cromosomas en el resto de alopoloides analizados, cuyos subgenomas representarían variaciones del mismo genoma básico (Ourari et al. 2011).

1.5 El genoma de *H. vulgare* y el ADN repetitivo

Al contrario que otras plantas modelo como *Arabidopsis* o arroz, el gran tamaño del genoma de cebada (5.1 Gb) es altamente complejo. Contiene algo más de 26.000 genes que se organizan formando islas génicas, separadas por largos tramos de ADN repetitivo que en conjunto suponen más de un 84% del genoma (Rostoks et al. 2002). Recientemente se ha publicado el primer borrador de su secuencia con los resultados obtenidos por el *International Barley Sequencing Consortium* (IBSC) presentando un mapa físico de 4.9 Gb de los cuales 1.13 Gb están secuenciados. No obstante, en relación a la fracción de ADN repetitivo, exceptuando los elementos móviles (transposones y retrotransposones) que están relativamente bien caracterizados, el mayor porcentaje corresponde a las familias de ADN repetido en tándem, clasificadas normalmente en función del tamaño de la unidad de repetición, pero aun muy poco caracterizadas (Meyer et al. 2012).

Actualmente las plataformas de secuenciación masiva NGS (*Next-generation Sequencing*) permiten realizar varios millones de lecturas a la vez, pero la longitud de estas es relativamente corta, entre 50-150 pb. Cuando las repeticiones son más largas que la longitud de cada lectura, los programas informáticos que se utilizan no son capaces de alinearlas por lo que se crean lagunas (*gaps*) o alineaciones complejas e incorrectas debido a que secuencias

similares o idénticas se encuentran localizadas en otras zonas del genoma. Por lo tanto, aunque las actuales técnicas de secuenciación masiva permiten obtener grandes cantidades de secuencias en poco tiempo, sigue persistiendo el problema de alinear las secuencias de ADN repetitivo (Treange 2012). En cebada, como en la mayoría de los genomas de organismos modelo “totalmente” secuenciados, no existe información suficiente con respecto a la estructura y organización molecular de las extensas regiones donde se acumula este tipo de ADN repetido, que siguen siendo los “agujeros negros” de los genomas (Hoskins et al. 2007, Cuadrado y Jouve 2011).

1.6. Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSRs)

Los microsatélites o SSRs son secuencias repetidas en tándem, donde la unidad de repetición está formada por no más de seis nucleótidos. En cebada, como en todos los eucariotas, representan un porcentaje muy importante de la fracción del ADN repetido del genoma (Tautz y Renz 1984, Morgante y Olivieri 1993). Entre sus características destaca su gran ubicuidad y abundancia a lo largo de los genomas tanto en regiones codificantes como no codificantes, y sobre todo su alto polimorfismo en el número de unidades que se repiten, lo que hace que presenten una gran variabilidad tanto intra como interespecífica. Estas características junto con la codominancia y alta reproducibilidad han hecho que, una vez conocida la secuencia que flanquea el microsatélite para el diseño de cebadores, sean los marcadores moleculares más utilizados en multitud de análisis genéticos: mapas de ligamiento de alta densidad, *fingerpringting*, estudios evolutivos, etc. (Schlotterer 2004). La utilidad de estos marcadores en cebada se ha visto confirmada en numerosos trabajos (e.g. Becker y Heum 1995, Ramsay et al. 2000, Li et al. 2003). Aunque normalmente el número de repeticiones varía entre 3 a 100 veces, en algunos organismos pueden organizarse en tándem formado largos tramos de varios centenares de miles de unidades de repetición y por lo tanto susceptibles de ser localizados fácilmente con las técnicas de hibridación *in situ* (Schmidt y Heslop-Harrison 1996, Cuadrado y Schwarzacher 1998).

A pesar de su éxito como marcadores genéticos y su amplia utilización en las últimas tres décadas se desconocen muchos aspectos sobre la naturaleza de los microsatélites, sobre todo en lo que se refiere a los microsatélites que forman parte de las grandes regiones de ADN repetido, en parte porque la información que se dispone sobre la distribución de los SSRs a nivel cromosómico tanto en plantas como animales es escasa. Actualmente, la facilidad que

supone la utilización de SSRs como sondas en experimentos de hibridación *in situ* ha abierto la posibilidad de analizar de forma sencilla su presencia en cualquier especie (Cuadrado y Jouve, 2010) y por lo tanto aportar información clave en relación con su origen, organización, estructura, función y evolución (e.g. Morgante 2002, Cuadrado y Jouve 2008, Sonah y Deshmukh 2012).

H. vulgare, es sin duda alguna una de las especies donde los SSRs están mejor caracterizadas a nivel cromosómico proporcionando un modelo para su estudio. Sus centrómeros además de ser ricos en retroelementos son ricos en el microsatélite AG (Hudakova et al. 2001, Cuadrado y Jouve 2007b) mientras que la heterocromatina pericentromérica está compuesta por una secuencia satélite rica en repeticiones GAA (Pedersen et al. 1996). Además, al menos en la variedad de cebada cv. Plaisant la mayoría de los SSRs con trinucleótidos como unidad de repetición forman grandes clústeres detectables a nivel cromosómico, lo que permite la caracterización de todos y cada uno de sus siete cromosomas en base a los mapas físicos generados (Cuadrado y Jouve 2007a). Si estos mapas físicos fuesen especie dependientes, estos marcadores cromosómicos podrían utilizarse para definir el genoma de *H. vulgare*. Este tipo de análisis llevado a cabo en las especies silvestres podría permitir caracterizar los restantes genomas de *Hordeum* y establecer homologías/homeologías entre sus cromosomas, aportando una información muy relevante en relación a la filogenia del género y la identificación de las especies diploides implicadas en el origen de sus poliploides.

2. Objetivos

En este trabajo se aborda el estudio de los SSRs de los genomas del género *Hordeum* desde una perspectiva citológica y molecular utilizando como modelo la especie *H. vulgare* ssp. *vulgare*. Se evalúa su posible utilización como marcadores cromosómicos en relación con el análisis de la diversidad en una amplia colección de variedades cultivadas y especies silvestres afines del género *Hordeum*. Se analiza la idoneidad de distintos SSRs para caracterizar los distintos genomas descritos en *Hordeum* en relación con la filogenia del género y el origen de los poliploides. Esto permitiría evaluar las tendencias sufridas por distintos SSRs durante la diversificación de las especies y la remodelación genómica posiblemente sufrida tras los procesos de poliploidización. Dadas las limitaciones metodológicas actuales en relación con la secuenciación de regiones enriquecidas en SSRs, es necesario poner a punto técnicas que permitan su caracterización. Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos.

1. Caracterizar la diversidad citogenética de cuatro SSRs y su organización molecular en variedades cultivadas de *H. vulgare* ssp. *vulgare* y varias líneas de *H. vulgare* ssp. *spontaneum* y los dos citotipos de *H. bulbosum* (2x y 4x) con el fin de evaluar a nivel cromosómico la utilización de los SSRs como marcadores del genoma **H**.
2. Identificar SSRs como marcadores cromosómicos para caracterizar el genoma **Xu** de *Hordeum* analizando una muestra representativa de accesiones de *H. murinum* abarcando todas las subespecies (ssp. *glaucum*, ssp. *murinum* y ssp. *leporinum*) y citotipos (2x, 4x y 6x).
3. Identificar SSRs como marcadores cromosómicos para caracterizar el genoma **Xa** de *Hordeum* analizando una muestra representativa de accesiones de *H. marinum* incluyendo todas las subespecies (ssp. *marinum* y ssp. *gussoneanum*) y citotipos (2x y 4x).
4. Identificar SSRs como marcadores cromosómicos para caracterizar *H. brachyantherum* y por tanto el genoma **I** de *Hordeum*, analizando todas sus subespecies (ssp. *californicum* y ssp. *brachyantherum*) y citotipos (2x, 4x, y 6x).
5. Estudiar la organización molecular y estructura de regiones del genoma de cebada enriquecidas en repeticiones ACT, a partir del análisis de su secuencia.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

Se eligieron individuos que representaran todos los genomios y citotipos del género *Hordeum*. Representando a las especies del genomio **H** se seleccionaron muestras de 12 cultivares mejorados de *Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*, siete accesiones silvestres de *H. vulgare* L. ssp. *spontaneum* y cuatro accesiones de *H. bulbosum* (2x y 4x). Representando a las especies del genomio **Xu** se utilizó material representativo de todas las subespecies y citotipos del complejo *H. murinum*, incluyendo siete accesiones de diferente origen geográfico y niveles de ploidía (2x, 4x y 6x). Para caracterizar las especies del genomio **Xa** se seleccionaron seis accesiones representativas de las dos subespecies y citotipos de *H. marinum* (2x y 4x). Por último, en representación de las especies del genoma **I** se analizaron seis accesiones incluyendo todas las subespecies y citotipos (2x, 4x y 6x) de *H. brachyantherum*. Además se incluyeron dos accesiones de *H. roshevitzii*.

Las variedades de cebadas cultivadas fueron proporcionadas por la Dra. Alba Farré del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (UdL-IRTA) de Lérida. El material silvestre se solicitó al Banco de Germoplasma en el Leibniz-institut für planzaengenetik und kulturplnazenforchung (IPK) de Gatersleben (Alemania). Todo el material se sembró en campo para su multiplicación (Fig. 3.1). El material utilizado se indica con detalle en la Tabla 3.1.



Figura 3.1. Espigas de *H. marinum* ssp. *gussoneanum* (a) y *H. murinum* ssp. *murinum* (b).

Cultivar	Ploidía	Tipo	Carreras	País de Origen	Procedencia varietal
<i>Hordeum vulgare</i> L. ssp. <i>vulgare</i> (Genoma H)					
Alexis	2x	Primavera	2	Alemania	St. 1622d5 x Trumpf
Barberousse	2x	Invierno	6	Francia	Ager x [W.259-711 x (Hatif x Ares)]
Beka	2x	Primavera	2	Francia	BethgeXIII x Kneifel
Dobla	2x	Invierno	6	Francia	Union x Nympe
Gaelic	2x	Invierno	2	Francia	Marinka x (Flika x Lada)
Golden Promise	2x	Primavera	2	Reino Unido	Maythorpe (Mutante de rayos gamma)
Graphic	2x	Primavera	2	Reino Unido	Casino x Dandy
Hispanic	2x	Invierno	2	Francia	Mosar x (Flika x Lada)
Morex	2x	Invierno	6	EEUU.	Cree x Bonanza
Orria	2x	Invierno	6	Méjico/España	{(Api x Kristina) x M66.85} x Sigfrido's) x 79w40762
Plaisant	2x	Invierno	6	Francia	Ager x Nympe
Triumph	2x	Primavera	2	Alemania	Diamant x 14029-64/6
Accesión	Ploidía	País de origen	Nombre científico		
<i>Hordeum vulgare</i> L. ssp. <i>spontaneum</i> (Genoma H)					
HOR2680	2x	Irán	<i>H. spontaneum</i> K. Koch var. <i>spontaneum</i>		
HOR4873	2x	Turkmenistán	<i>H. spontaneum</i> K. Koch		
HOR4894	2x	Turkmenistán	<i>H. spontaneum</i> K. Koch var. <i>spontaneum</i>		
HOR8538	2x	EEUU	<i>H. spontaneum</i> K. Koch var. <i>spontaneum</i>		
HOR8543	2x	EEUU	<i>H. spontaneum</i> K. Koch var. <i>ischnatherum</i> (Coss.)Thell.		
HOR22052	2x	Israel	<i>H. spontaneum</i> K. Koch		
HOR22053	2x	Israel	<i>H. spontaneum</i> K. Koch var. <i>spontaneum</i>		
<i>Hordeum bulbosum</i> L. (Genoma H)					
BCC2061	2x	Italia	<i>H. bulbosum</i> L.		
GRA1094	4x	Georgia	<i>H. bulbosum</i> L. ssp. <i>bulbosum</i>		
GRA1154	2x	Italia	<i>H. bulbosum</i> L. ssp. <i>nodosum</i> (L.) Baum		
GRA1193	4x	Tajikistan	<i>H. bulbosum</i> L. ssp. <i>bulbosum</i>		
<i>Hordeum murinum</i> L. (Genoma Xu)					
BCC2002	2x	Tunez	<i>H. murinum</i> L. ssp. <i>glaucum</i> (Steud.) Tzvelev		
BCC2007	4x	España	<i>H. murinum</i> L. ssp. <i>leporinum</i> (Link) Arcang.		
GRA1021	4x	Italia	<i>H. murinum</i> L. ssp. <i>leporinum</i> (Link) Arcang.		
GRA1144	4x	Francia	<i>H. murinum</i> L. ssp. <i>leporinum</i> (Link) Arcang.		
GRA1183	6x*	Armenia	<i>H. murinum</i> L. ssp. <i>murinum</i>		
GRA2735	4x*	Portugal	<i>H. murinum</i> L. ssp. <i>glaucum</i> (Steud.) Tzvelev		
GRA2894	4x	España	<i>H. murinum</i> L. ssp. <i>murinum</i>		
<i>Hordeum marinum</i> Huds. (Genoma Xa)					
BCC2001	2x	Grecia	<i>H. marinum</i> Huds. ssp. <i>marinum</i>		
GRA963	2x	España	<i>H. marinum</i> Huds. ssp. <i>marinum</i>		
GRA1078	2x	Italia	<i>H. marinum</i> Huds. ssp. <i>marinum</i>		
BCC2011	4x	Turquía	<i>H. marinum</i> ssp. <i>gussoneanum</i> (Parl.) Thell.		
BCC2012	2x	Bulgaria	<i>H. marinum</i> ssp. <i>gussoneanum</i> (Parl.) Thell.		
GRA1077	2x	Italia	<i>H. marinum</i> ssp. <i>gussoneanum</i> (Parl.) Thell.		
<i>Hordeum brachyantherum</i> Nevski (Genoma I)					
BCC2045	4x	EE UU (California)	<i>H. brachyantherum</i> Nevski ssp. <i>brachyantherum</i>		
BCC2046	6x**	EE UU (California)	<i>H. brachyantherum</i> Nevski ssp. <i>brachyantherum</i>		
BCC2050	4x	EE UU (Alaska)	<i>H. brachyantherum</i> Nevski ssp. <i>brachyantherum</i>		
BCC2056	4x	Canadá (Newfoundland)	<i>H. brachyantherum</i> Nevski ssp. <i>brachyantherum</i>		
BCC2057	2x	EE UU (California)	<i>H. brachyantherum</i> Nevski ssp. <i>californicum</i> (Cov. & Steb.) Both. & al.		
BCC2058	2x	EE UU (California)	<i>H. brachyantherum</i> Nevski ssp. <i>californicum</i> (Cov. & Steb.) Both. & al.		
<i>Hordeum roshevitzii</i> Bowden (Genoma I)					
BCC2015	2x	China	<i>H. roshevitzii</i> Bowden		
BCC2069	2x	Rusia	<i>H. roshevitzii</i> Bowden		

Tabla 3.1. Lista de las especies de *Hordeum* analizadas. (*) En desacuerdo con el nivel de ploidía esperado. (**) Alohexaploide con un subgenoma Xa.

3.2. Sondas utilizadas

En la Tabla 3.2 se recogen algunos detalles de las sondas utilizadas en este trabajo entre las que se incluyen clones, oligonucleótidos sintéticos y ADN genómico.

Sonda	Descripción		Hibridación <i>in situ</i>	<i>Southern Blot</i> (Tm)
Oligonucleotidos sintéticos marcados en 5' y 3' con				
(AG) ₁₀	Biotina o Digoxigenina		ND-FISH	54.3 °C
(AAC) ₅	Biotina o Digoxigenina		ND-FISH	36.2 °C
(AAG) ₅	Biotina o Digoxigenina		ND-FISH	36.2 °C
(ACT) ₅	Biotina o Digoxigenina		ND-FISH	36.2 °C
(ATC) ₅	Biotina o Digoxigenina		ND-FISH	36.2 °C
(CCCTAAA) ₃	Dyr547		ND-FISH	
	Familias de Secuencias Repetidas y distribución cromosómica	Clonadas de (referencias)		
pAs1	En tándem intersticiales y subteloméricas	<i>Aegilops tauschii</i> Coss. (Rayburn y Gill 1986)	FISH	
pHch950	Dispersa por los cromosomas	<i>H. chilense</i> Roem. & Schult. (Hueros et al. 1993)	FISH	
pSc119.2	En tándem generalmente subteloméricas	<i>Secale cereale</i> L. (Bebrook et al. 1980)	FISH	
pTa71	ADN ribosomal 45S en loci discretos	<i>Triticum aestivum</i> L. (Gerlach y Bedbrook 1979)	FISH	
pTa794	ADN ribosomal 45S en loci discretos	<i>Triticum aestivum</i> L. (Gerlach y Dyer 1980)	FISH	
ADN genómico				
<i>H. marinum ssp. gussoneanum</i>			GISH	
<i>H. roshevitzii</i>			GISH	
<i>H. brachyantherum ssp. californicum</i>			GISH	

Tabla 3.2. Listado de sondas utilizadas en hibridación *in situ* y *Southern blot*.

En los experimentos de ND-FISH y *Southern blot* se utilizaron cinco oligonucleótidos basados en SSRs: (AG)₁₀, (AAC)₅, (AAG)₅, (ACT)₅ y (ATC)₅ marcados con biotina o digoxigenina. Además se utilizó el oligonucleótido (CCCTAAA)₃ marcado con Dy547 (rojo) para detectar repeticiones teloméricas (Tel.). Todos estos oligonucleótidos estaban marcados en sus dos extremos (Isogen Life Science).

En los experimentos de FISH se utilizaron cinco plasmidos con insertos de secuencias repetidas obtenidos de distintas especies de la tribu *Triticeae* conteniendo: pTa71 y pTa794 la secuencia de los genes ribosomales 18S-5.6S-26S (a partir de ahora 45S) y 5S de *Triticum aestivum*, respectivamente; pSc119.2, una secuencia repetida en tándem de *Secale cereale* (familia de 120 bp de centeno); pAs1, una secuencia repetida en tándem de *Aegilops tauschii* (familia Afa) y por último pHch950, una secuencia repetitiva y dispersa derivada de *Hordeum*

chilense. Estas sondas se marcaron indistintamente con biotina o digoxigenina mediante PCR según protocolos estándar, descritos en de Bustos et al. (1996), exceptuando pTa71 en el que se utilizó la técnica de *nick-translation* siguiendo el protocolo del kit Bionick (Invitrogen) para marcar con biotina y del kit DigRoche (Roche) para marcar con digoxigenina.

Por último, como sondas en los experimentos de GISH se utilizó el ADN genómico de *H. brachyantherum* ssp. *californicum*, *H. roshevitzii* y *H. marinum* ssp. *gussoneanum* marcados con digoxigenina utilizando el kit de marcaje por *nick-translation* DigRoche de la casa comercial Roche.

3.3. Técnicas citogenéticas

3.3.1. Obtención de preparaciones cromosómicas

Las preparaciones cromosómica se realizaron utilizando meristemos de raíces o anteras previamente fijadas en etanol-ácido acético (3:1).

Las raíces se obtuvieron de plántulas recién germinadas y excepcionalmente de plantas crecidas en macetas en invernadero. Para ello, se estimuló la germinación de las semillas en papel de filtro húmedo durante 24 horas (h), a 25°C. Posteriormente se mantuvieron a 4°C durante 72 h antes de ser de nuevo devueltas a 25°C durante 24 h con el fin de sincronizar las divisiones celulares. Las raíces de aproximadamente 1.5 cm se cortaron y se introdujeron en tubos Eppendorf con agua destilada y mantenidas en hielo picado durante 24 h antes de su fijación.

Para la obtención de meiocitos, se seleccionaron espigas de plantas mantenidas para su desarrollo en invernadero. Se seleccionaron anteras y se procedió a la búsqueda de células madre de esporas en meiosis, concretamente en metafase I. Para ello de cada una de las flores se seleccionó una sola antera para su observación al microscopio de contraste de fases. Si se confirmó la presencia de metafases se fijaron las otras dos.

Para la obtención de preparaciones cromosómicas (raíces y anteras) el material fijado y conservado a 4°C hasta su utilización se lavo con una solución amortiguadora de citrato/citrato sódico (pH 4.8). Posteriormente se realizó un tratamiento enzimático con una mezcla de celulasa y pectinasa tal como se describe en Schwarzacher et al. (1989). Finalizado el tiempo de digestión, aproximadamente una hora a 37°C y volver a lavar el material con la solución

amortiguadora, se realizaron las preparaciones sumergiendo el material en una gota de ácido acético al 45% sobre el portaobjeto y se aplastó (*squash*) con ayuda de un cubreobjetos. Las preparaciones se congelaron con anhídrido carbónico. Tras la congelación, se retiraron los cubreobjetos con ayuda de un bisturí y se dejaron secar al aire.

3.3.2. FISH (Hibridación *in situ* con Fluorescencia)

Los clones utilizados como sondas se hibridaron siguiendo el protocolo FISH descrito en de Bustos et al. (1996). Previamente a la hibridación, las preparaciones se trataron con ARNasa, añadiendo 100 µl de una dilución 1:100 en 2xSSC (0.3M NaCl, 0.03M citrato de sodio) durante 1 h a 37°C. A continuación se lavaron en 2xSSC y seguidamente se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% durante 10 minutos (min), en agitación y a temperatura ambiente (RT). Se repitió el lavado en 2xSSC durante 10 min en agitación y a RT. Después se deshidrataron sumergiéndolas consecutivamente durante 5 min en etanol al 70% y al 100% y finalmente se secaron al aire.

Como mezcla de hibridación se empleó una solución de 2XSSC que contenía 50% de formamida, 10% de dextrano, 0.033% de SDS y a la que se añadió 50-100 ng de sonda por preparación. Esta mezcla se desnaturalizó en un bloque caliente a 70°C durante 10 min y se dejó en hielo al menos 5 min antes de proceder a la hibridación. Se procedió a la hibridación, añadiendo 30 µl de la mezcla de hibridación a cada preparación, en un termociclador programable, con los siguientes ciclos (5 min a 75 °C, 2 min a 55°C, 30 seg a 50°C, 1 min a 45°C, 2min a 42°C, 5 min a 40°C y 5 min a 38°C). Acto seguido se dejaron toda la noche a 37°C en cámara húmeda.

Para proseguir con los lavados posthibridación y la detección se utilizó el protocolo descrito en Cuadrado y Jouve (1994). En este caso la digoxigenina se detectó añadiendo 50µl de una solución 1:50 de un anticuerpo conjugado con FITC (verde) (Roche Applied Science) y la biotina con una solución 1:300 de streptavidina conjugado con Cy3 (rojo) (Sigma) incubando las preparaciones durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. A partir de aquí el resto de pasos se realizaron en oscuridad. Tras realizar un nuevo lavado en 4xSSC/0.2% Tween²⁰ durante 10 min a RT se tiñeron los cromosomas con 30 µl de DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) durante 15 min a RT tras lo cual se enjuagaron en 4xSSC/0.2% Tween²⁰ y definitivamente se montaron añadiendo solución *antifade* (Vector Laboratories) entre el porta y el cubreobjetos.

Las preparaciones seleccionadas para ser rehibridadas, en experimentos sucesivos de hibridación *in situ* (FISH o ND-FISH), se lavaron en 4xSSC/0.2% Tween²⁰ (tras separar manualmente el cubreobjetos) durante al menos 30 min a RT para eliminar el marcaje y tras una breve inmersión en 2xSSC se deshidrataron en etanol (70% y al 100%, 5 min cada uno). Finalmente se secaron al aire.

3.3.3. GISH (Hibridación *in situ* Genómica)

La técnica GISH se llevo a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior para FISH utilizando clones como sondas, con la diferencia de que en este caso se utilizo como sonda y agente bloqueante ADN genómico de distintas especies y en distintas proporciones dependiendo del supuesto origen del material poliploide analizado.

Para analizar el citotipo tetraploide de *H. marinum* se utilizó como sonda ADN marcado de la ssp. *gussoneanum* y como agente bloqueante ADN de la ssp. *marinum* en un ratio de 1:50. Para analizar el citotipo tetraploide de *H. brachyantherum*, se utilizó ADN marcado de la ssp. *californicum* y ADN de *H. roshevitzii* indistintamente como sonda y bloqueante en distintas proporciones (1:50-1:300). Para analizar la ssp. *brachyantherum* 6x, el ADN de la ssp. *gussoneanum* se utilizó como sonda sin ADN genómico bloqueante. Las condiciones en las que se llevo a cabo la hibridación fueron las mismas descritas para FISH.

3.3.4. ND-FISH (Hibridación *in situ* Fluorescente No Desnaturalizante)

Se realizó ND-FISH siguiendo el protocolo descrito en Cuadrado y Jouve (2010). Para ello se añadió a cada preparación 30µl de una solución de 2xSSC conteniendo 2pm de oligonucleótido. Se incubó durante 2 h a 24°C en una cámara húmeda. Las preparaciones se lavaron en 4xSSC/0.2% Tween²⁰ en agitación durante 10 min a RT. La detección de biotina y digoxigenina, la posterior tinción con DAPI y el montaje definitivo de preparaciones se realizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado de FISH.

Las preparaciones seleccionadas para ser rehibridadas, en experimentos sucesivos de hibridación *in situ* (ND-FISH o FISH), se lavaron y se deshidrataron como ha sido descrito en el apartado FISH.

3.3.5. Microscopía de fluorescencia e imágenes

Las preparaciones fueron examinadas utilizando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiophot. Las imágenes para biotina/Cy3, Dyr547, digoxigenina/FITC y DAPI fueron tomadas por separado utilizando su respectivo filtro y un dispositivo CCD de captura de imágenes (Nikon DS). La localización de las señales en relación a la tinción DAPI se resolvió fusionando imágenes de la misma célula, incluso obtenidas en distintos experimentos de hibridación, utilizando el *software* Adobe Photoshop, empleando solamente aquellas funciones que aplican igualmente para todos los píxeles. Este mismo *software* se utilizó para confeccionar los cariotipos.

3.4. Técnicas moleculares

3.4.1. Extracción de ADN

El ADN se aisló a partir de hojas jóvenes siguiendo el método descrito por Sharp et al. (1988). Para ello, el material vegetal se congeló en nitrógeno líquido y se pulverizó en un mortero. A continuación se añadió 1 ml de tampón de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8, SDS al 2% y proteinasa K 100 µg/ml) por cada 100mg de tejido, dejándose en incubación a 50°C durante 30 min.

Pasado este tiempo se realizaron dos extracciones consecutivas: en la primera se añadió a la muestra ½ volumen (vol) de fenol y ½ vol de cloroformo, mezclándolos suavemente hasta conseguir una distribución homogénea. Seguidamente se centrifugó la muestra durante 10 min a 10.000 rpm a 4°C y después se extrajo la fase sobrenadante descartando el resto. En la segunda extracción se repitió el mismo procedimiento pero únicamente añadiendo 1 vol de cloroformo a la fase recuperada. Seguidamente los ácidos nucleicos fueron precipitados al añadir 2 vol de etanol absoluto frío (-20°C), lavando a continuación con etanol al 70%. Una vez eliminado el alcohol, el precipitado obtenido se dejó secar al aire y fue finalmente resuspendido en TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8).

Posteriormente, la muestra fue tratada con la enzima ARNasa para eliminar el ARN presente. Para ello se incubó la muestra con la enzima (100 µg/ml) durante 30 min a 37°C y posteriormente se añadió proteinasa K (100 µg/ml) y SDS (0.5%) dejándose a 50°C durante 1 h. A continuación se repitieron las dos extracciones con fenol/cloroformo, precipitando el ADN con etanol absoluto frío y acetato sódico 0.3 M. Por último se lavó el ADN con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en un vol apropiado de TE.

3.4.2. Ensayos de *Southern Blot*

Para la realización de los ensayos de *Southern blot* se partió de ADN (12.5 µg en el caso del genómico, 5 µg en el caso de clones) que fue digerido con diferentes endonucleasas de restricción utilizando 3 unidades (U) de enzima por µg de ADN (Tabla 3.3). La digestión se realizó a la temperatura correspondiente de cada enzima. El ADN digerido se separó por electroforesis entre 14 y 16 h en un gel de agarosa al 0.8% en tampón TAE (40 mM Tris-HCl pH 8, ácido acético 0.11%, EDTA 1mM pH 8) aplicando un voltaje de 1 voltio/cm de gel.

Enzima	Temperatura	Diana (5' ---- 3')	Casa comercial
<i>AluI</i>	37°C	AGCT TCGA	Roche
<i>BamHI</i>	30°C	CGATCC CCTAGG	Takara
<i>EcoRI</i>	37°C	GAATTC CTTAAG	Roche
<i>HindIII</i>	37°C	AAGCTT TTCGAA	Roche
<i>RsaI</i>	37°C	GTAC CATG	Roche
<i>SacI</i>	37°C	GAGCTC CTCGAG	Takara
<i>SmaI</i>	30°C	CCCGGG GGGCCC	Takara
<i>TaqI</i>	65°C	TTCGA AGCT	Takara

Tabla 3.3. Enzimas de restricción empleadas.

Los geles fueron teñidos con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio durante al menos 30 min. El exceso de bromuro de etidio se eliminó lavando el gel con agua ultra-pura durante 15 min, y se dejó exponiendo en un transiluminador con luz ultravioleta durante 2 min. La transferencia del ADN a la membrana se realizó primero sumergiendo el gel durante 30 min en solución de desnaturalización (0.4M NaOH y 0.6M NaCl) y después en solución de neutralización (0.5M Tris HCl pH7.5, 1.5M NaCl) durante otros 30 min. A continuación el gel se puso en contacto con una membrana de nylon (Biodyne, Pall Corporation) y se realizó la transferencia durante toda la noche mediante el uso de solución de transferencia (25mM NaPO₄ pH 6.5).

Al día siguiente la membrana se lavó en 2xSSC y se expuso a un pulso de luz ultravioleta en un Spectrolinker XL-1000 UV Crosslinker (Spectronics corporation) secándose a continuación durante 1 h y 30 min en una estufa a 90°C. Una vez transferida, la membrana se hibridó sucesivamente con sondas diferentes. Como sondas se emplearon oligonucleótidos marcados con digoxigenina (Isogen Life Science) siendo estos hibridados a 5°C por debajo de su T_m (Tabla 3.2). Previamente a la hibridación, la membrana fue prehibridada en 10ml de solución de hibridación (5xSSC, 0.02% SDS, 0.01% LSS y 0.3% de agente de bloqueo de Roche) durante 4 h a 5°C por debajo de la T_m de cada oligo (Tabla 3.2). Pasado el tiempo de prehibridación se eliminó la solución y se añadieron 10 ml de solución de hibridación con 10 pmoles de sonda, dejándolo en incubación durante toda la noche. Tras la hibridación la membrana se lavó mediante su pasó por una serie de soluciones de manera consecutiva y siempre en agitación: los primeros dos lavados se realizaron a RT utilizando el tampón HSW (0.15 X SSC, 0.1% SDS) durante 5 min cada uno. A continuación se lavó de nuevo dos veces en ese mismo tampón durante 15 min pero a la temperatura de hibridación. El siguiente paso consistió en poner la membrana en remojo durante 1 min en tampón 1 (0.01M Tris-HCl pH 7.5 y 0.15M NaCl) a RT y bloquear la membrana mediante su incubación en tampón 2 (tampón 1 + 0.2% agente de bloqueo) durante 30 min también a RT. Tras ello, la membrana se incubó durante 30 min en tampón 2 con anticuerpo antidigoxigenina (Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche) en proporción 1:500. A continuación se hicieron dos lavados de 15 min en tampón 1 y un lavado de 5 min en tampón 3 (0.1M Tris HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl). Tras pasar por todas estas soluciones, la membrana se incubó en oscuridad durante 1 min en el sustrato CDP-Star (Roche) disuelto en tampón 3 en proporción 1:500. La membrana fue finalmente embolsada y expuesta a una película sensible a la luminiscencia química (High performance chemiluminescence film, GE Healthcare) durante diferentes intervalos de tiempo al cabo de los cuales la película fue revelada.

Tras cada hibridación el marcaje se eliminó hirviendo la membrana en HSW durante 5 min en agitación, dejándose la membrana en 2XSSC lista para otra hibridación para poder ser utilizada en hibridaciones sucesivas.

3.4.3. Selección de clones BAC con grandes regiones de SSRs

Para el estudio de la organización molecular de grandes regiones de microsatélites se realizó una selección de clones BAC a partir de la librería HVVMRXALLhB (Tabla 3.4) obtenida en el

Centre National de Resources Genomiques Vegetales (CNRGV, Francia). Los clones ricos en grandes tramos de microsatélites fueron identificados en el CNRVG a partir de la hibridación de macroarrays correspondientes con filtros de alta densidad en los que se habían depositado la colección de clones BAC.

Librería de BACs para <i>Hordeum vulgare</i>	
Código internacional	HVVMRXALLhB
Género	<i>Hordeum</i>
Especie	<i>H. vulgare</i>
Ecotipo	Morex
Tamaño del genoma	5000 Mb
Equivalencia del genoma	1.5 X
Tamaño medio de inserto	110.0 Kb
Enzima de restricción	<i>HindIII</i>
Bacteria transformada	DH10B
Vector	pIndigoBAC-5
Antibiótico selectivo	Cloranfenicol
Número de clones	50304

Tabla 3.4. Datos de la librería de BACs utilizada para la selección de clones.

La hibridación fue realizada siguiendo el protocolo estándar del CNRVG utilizando el oligonucleótido (ACT)₅ como sonda a una temperatura de hibridación de 31.2°C. Tras la hibridación, los resultados fueron obtenidos de forma automática mediante la utilización de un escáner de radioactividad (PhosphorImager). La selección de los clones se realizó en función de la señal obtenida tras la hibridación del macroarray, utilizando para ello un programa automático de análisis de señales (High Density Filter Reader).

3.4.4. Aislamiento del ADN de los BACs y análisis de fragmentos de restricción

Para el aislamiento del ADN, las bacterias que contenían los clones BACs fueron sembradas en placas con medio LB (1% NaCl, 1% Triptona, 0.5% extracto de levadura) y agar (1.5%) suplementado con el antibiótico cloranfenicol (6.25 mg/l) dejándolas crecer a 37°C durante toda la noche. Seguidamente se seleccionaron colonias individuales que fueron mantenidas a 37°C durante 4 o 5 h en 5 ml de medio LB con cloranfenicol (6.25 mg/l). A partir de este cultivo inicial, se inoculó 1 l de LB con cloranfenicol (6.25 mg/l) y se dejó incubando a 37°C durante toda la noche hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0.6-0.8 OD a 600 nm.

Para el aislamiento del ADN se utilizó el kit de purificación Nucleo Bond Xtra BAC, (Machenery-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación los fragmentos se analizaron mediante *Southern Blot*.

3.4.5. Clonación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de restricción que resultaron positivos para (ACT)₅ fueron aislados y purificados. Para ello se recortaron las bandas de agarosa correspondientes a cada fragmento obtenidas tras la electroforesis purificándose el ADN mediante el uso del kit de extracción de ADN desde gel UltraClean Gel Spin DNA extraction kit, (MOBio Laboratories) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

Una vez aislados, los fragmentos de ADN se clonaron en el vector plasmídico pBlueScript (Promega). Para ello, primero se digirió el vector con la misma enzima de restricción utilizada para generar los fragmentos a clonar (1U de enzima/ μ g de ADN del vector). A continuación la reacción fue purificada usando el Kit High Pure PCR product purification kit (Roche) y el vector fue defosforilado con la enzima Shrimp alkaline phosphatase (USB) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Al final de dicha reacción la mezcla fue de nuevo purificada con el mismo kit. La ligación del vector con los fragmentos se llevó a cabo utilizando el kit de ligación DNA ligation Kit Mighty Mix (Takara), siguiendo las indicaciones del protocolo suministrado en el kit. Normalmente se ligaron 25 fmoles del vector con 75 fmoles de fragmento en un vol de 10 μ l incubando a 16°C durante 1 h. Seguidamente la mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes (*Escherichia Coli* cepa DH5 α) mediante la aplicación de un choque térmico.

Las células competentes para la transformación por choque térmico se obtuvieron previamente a partir de una colonia aislada de *E. coli* DH5 α la cual se utilizó para inocular un cultivo de 10 ml de medio SOB (2%Triptona, 0.5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 5mM MgSO₄, 5mM MgCl₂). El cultivo fue incubado a 37°C en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se utilizaron 2ml del cultivo crecido para inocular 100 ml de medio SOB fresco que fueron puestos a crecer a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.8 OD a 600 nm, momento en el que se paró el crecimiento del cultivo dejándolo en hielo durante 10 min antes de centrifugarlo a 2500 rpm durante 10 min a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante el precipitado fue disuelto en 33 ml del tampón RFI (30mM KAc pH 7.5, 100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 10mM CaCl₂, 15% glicerol ajustado a pH 5.8 con ácido acético 0.2M)

dejándose 15 min en hielo. A continuación se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones anteriores y se volvió a eliminar el sobrenadante. Seguidamente se añadieron 4 ml del tampón RFI (10mM MOPS pH 6.8, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% Glicerol ajustado a pH 6.8 con NaOH). Se dejó de nuevo reposar en hielo durante 15 min y se hicieron alícuotas de 200 µl que se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

Para la transformación por choque térmico, la mezcla de ligación fue añadida a una alícuota de células competentes dejándola enfriar en hielo durante al menos 15 min. Pasado este tiempo se procedió a la aplicación del choque térmico para lo cual se incubaron las células en un baño a 42°C durante 90 seg pasados los cuales se dejaron 3 min en hielo. A continuación se añadió 800µl del medio SOC (medio SOB suplementado con glucosa 20mM) en el cual crecieron las células a 37°C durante 1 h. Seguidamente se sembró una alícuota (100-200µl) de las bacterias transformadas en placas de agar LB suplementadas con el antibiótico de selección, X-Gal (20 mg/l) e IPTG (50 mg/l), lo que permite identificar colonias bacterianas en las que se han introducido plásmidos recombinantes, dejándolas crecer a 37°C durante toda la noche.

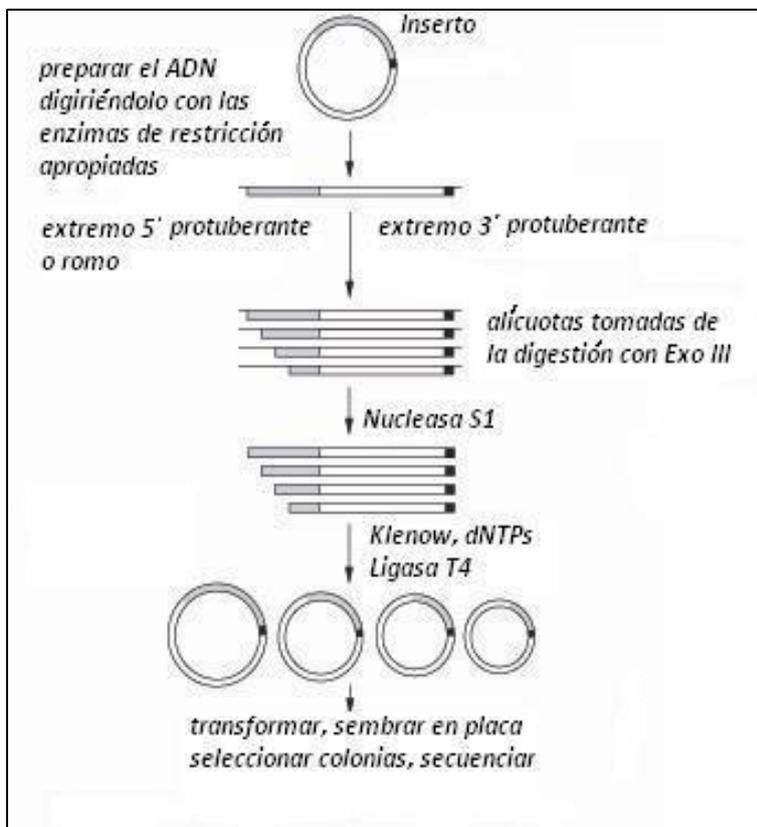
3.4.6. Selección de colonias bacterianas mediante el método de *Toothpick* y aislamiento de ADN plasmídico

La selección de las colonias bacterianas obtenidas tras la transformación y portadoras del clon deseado se realizó estimando el tamaño del vector presente en cada clon mediante la técnica de *Toothpick*. Para ello cada colonia seleccionada fue aislada y disuelta simultáneamente en 30 µl del tampón *Toothpick* (0.05N NaOH, 5mM EDTA pH 8, 0.25% SDS, 7% ficol, 0.01% azul de bromofenol) y en 1 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección para su crecimiento a 37°C. La colonia disuelta en el tampón *Toothpick* fue incubada posteriormente a 65°C durante 20 min pasados los cuales se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en tampón TAE. Los clones seleccionados se sembraron en 5 ml de medio LB a 37°C suplementado con antibiótico, utilizando como inóculo el cultivo de 1 ml donde fue disuelta la colonia. A partir de este cultivo se obtuvo el ADN de los clones utilizando un kit de purificación High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para verificar que el fragmento clonado contuviera regiones ricas en microsatélites, el ADN plasmídico obtenido de cada clon fue analizado mediante *Southern Blot* utilizando como sonda el oligonucleótido (ACT)₅.

3.4.7. Secuenciación de fragmentos con grandes regiones de SSRs

La primera parte de la secuencia de los fragmentos clonados fue obtenida utilizando los cebadores presentes en el vector de clonación. Se utilizó un equipo de secuenciación automática ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 313 (Applied Biosystems, Life Technologies). A partir de ahí, el resto de la secuencia fue obtenida de dos maneras distintas en función de la complejidad de cada fragmento. Cuando fue posible, el fragmento fue secuenciado completamente mediante el diseño consecutivo de cebadores. Para ello, sobre cada secuencia obtenida se diseñaron y sintetizaron nuevos cebadores (Invitrogen Custom Primers, Life Technologies) que fueron utilizados para una nueva secuenciación. Este proceso se repitió hasta que se cubrió la longitud completa del fragmento. Las lecturas para cada fragmento se analizaron y alinearon utilizando el *software* Contig Express.



En los casos en que no fue posible el diseño de cebadores, la secuencia completa se obtuvo mediante el método de delecciones unidireccionales seriadas de cada fragmento por medio de la enzima exonucleasa III (Exo III), para lo cual se utilizó el kit Erase a Base System (Promega Corporation) (Fig. 3.2).

Figura 3.2. Esquema del método de delecciones unidireccionales seriadas.

Se partió de 15 µg de ADN de cada clon los cuales fueron digeridos consecutivamente con dos enzimas de restricción una que generó un extremo protuberante en 3' (*SacI*) que impide la acción de la exonucleasa y otra que dejó un extremo romo en 5' (*SmaI*) que permite la degradación con la exonucleasa. Estas reacciones fueron purificadas con el kit comercial High Pure PCR product purification kit (Roche) y el ADN plasmídico doblemente digerido se incubó a 37°C en una mezcla que contenía 400 unidades de Exo III, la cual elimina alrededor de

400 nucleotidos por minuto. Las deleciones seriadas fueron obtenidas tomando alícuotas a intervalos de 1 min hasta completar el tamaño del inserto. Cada alícuota se trató posteriormente con la enzima Nucleasa S1 durante 30 min siguiendo las indicaciones del kit. Tras la inactivación de esta última, entre 40-60 ng ADN de cada alícuota fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% para comprobar que las deleciones seriadas se habían producido de la forma esperada. Todas las alícuotas obtenidas fueron purificadas con el kit comercial High Pure PCR product purification kit (Roche) y tratadas con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y una mezcla de dNTPs para la reparación de los extremos. El último paso consistió en la ligación de los extremos para la circularización del ADN. Cada alícuota fue luego transformada en *E. coli* (cepa DH5 α) seleccionando los clones producidos con los tamaños apropiados mediante ensayo *Toothpick*. Cada uno de estos clones fue secuenciado en un equipo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 3130 utilizando cebadores presentes en el vector. Las lecturas para cada fragmento se analizaron y alinearon utilizando el *software* Contig Express.

4. SSRs y caracterización del genoma H de *Hordeum*. Diversidad cromosómica en y entre *H. vulgare* L. y *H. bulbosum* L.

El contenido de este capítulo se corresponde con la publicación: Cytogenetic diversity of SSR motifs within and between *Hordeum* species carrying the H genome: *H. vulgare* L. and *H. bulbosum* L. **Carmona A**, Friero E, de Bustos A, Jouve N, Cuadrado A (2013) *Theoretical and Applied Genetics* 126:949-961

Parte de los resultados se han presentado en formato poster en el XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Genética celebrado em Murcia en 2011. El uso de Secuencias Simples Repetidas en la caracterización cromosómica de la cebada y las especies silvestres de *Hordeum* utilizadas en su mejora. **Carmona A**, Friero E, de Bustos A, Jouve N, Cuadrado A. Libro de resúmenes. PS78.

4.1. Introducción

Una de las características más importantes de los microsatélites o SSRs como marcadores moleculares es su alto grado de polimorfismo. Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado si el elevado grado de diversidad molecular de los SSRs se refleja también a nivel cromosómico y/o genómico ni su posible contribución a la divergencia entre poblaciones y especies. A tal fin, *H. vulgare*, que posee una gran abundancia de clústeres de diferentes SSRs constituye un buen modelo para el estudio de la dinámica de la distribución de los SSRs a nivel cromosómico (Cuadrado y Jouve, 2007a).

El genoma H de *Hordeum*, está presente en la cebada cultivada *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* (a partir de ahora cebada) y en su progenitor silvestre la ssp. *spontaneum* (a partir de ahora cebada silvestre). Ambas subespecies son muy parecidas morfológicamente, pueden cruzarse y sus híbridos son totalmente fértiles (Molina-Cano et al. 2005, Terzi et al. 2001). La ssp. *vulgare* ha sido cultivada desde tiempos antiguos en la región Mediterránea, Etiopía, sur de Asia, y Japón. Actualmente su cultivo se extiende por todas las áreas templadas del mundo. La distribución natural de la ssp. *spontaneum* abarca Grecia, Egipto, Oriente Medio y sur de Asia).

Igualmente se considera que *H. bulbosum* L., la especie más cercana a *H. vulgare sensu lato* posee el genoma H. La cebada bulbosa es una especie perenne y alógama obligada. Se distribuye por la región Mediterránea y Oriente Medio y presenta citotipos diploides y tetraploides ($2n=2x=14$ y $2n=4x=28$) (Bothmer et al. 1995). Esta especie ha sido muy utilizada como donador de genes de resistencia para mejorar algunas variedades de cebada (Scholz y Wehling 2009).

Con el objeto de evaluar la diversidad citogenética de los SSRs, se han analizado cuatro de estos marcadores que se han seleccionado por su diferente patrón de localización cromosómica, previamente descrita mediante FISH en el cultivar cv. Plaisant. En concreto se han estudiado repeticiones de AG, localizadas en los centrómeros; AAG, preferentemente asociada a heterocromatina pericentromérica; ATC, especialmente abundante en el cromosoma 4H y ACT, distribuida en regiones intercalares en los cromosomas 2H, 3H, 4H, 5H y 6H (Cuadrado y Jouve 2007a y b). No obstante, para la localización de los SSRs en este trabajo se ha utilizado ND-FISH, un método que permite de forma rápida y eficiente la detección de regiones cromosómicas enriquecidas en este tipo de secuencias repetidas (Cuadrado y Jouve 2010).

Los objetivos específicos de este capítulo han sido: 1) Caracterizar la diversidad citogenética de estos motivos SSRs en 12 variedades de cebada cultivada (de dos o seis carreras, de primavera o invierno, para malteo o forrajeras) representativas de esta especie (incluyendo el cultivar cv. Morex genotipo de referencia en los proyectos de secuenciación del genoma de cebada); 2) Extender la caracterización a siete accesiones de cebada silvestre con el fin de establecer un mapa físico consenso para estos SSRs, que permita definir el genoma de *H. vulgare sensu lato*; 3) Incluir en el análisis citotipos diploides y tetraploides de *H. bulbosum*, lo que podría ayudar a clarificar las relaciones existente entre las distintas especies/citotipos que integran el genoma H de *Hordeum* y 4) Analizar la organización molecular de los SSRs mediante *Southern blot*.

4.2. Resultados

4.2.1. Localización cromosómica de SSRs en *H. vulgare*

La figura 4.1 muestra la localización cromosómica de (AG)₁₀, (AAG)₅, (ACT)₅ y (ATC)₅ en preparaciones cromosómicas de varias líneas que representan el material analizado de ambas subespecies de *H. vulgare*. Los Anexos 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4 muestran la distribución de las cuatro sondas en el total de las 19 variedades/accesiones investigadas. Para la identificación individualizada de los cromosomas, se comparó el mapa físico obtenido con los patrones previamente descritos en cv. Plaisant (Cuadrado y Jouve 2007a).

La sonda (AG)₁₀ reveló señales de hibridación muy intensas en los centrómeros de todos los cromosomas en todos los cultivares de cebada analizados (Fig. 4.1a y Anexo 4.1a-l). Además, en todos los cultivares se observaron señales de intensidad débil en la región subtelomérica del brazo largo de un par de cromosomas. La rehibridación con la sonda (ACT)₅ permitió identificarlo como el cromosoma 4H. La distribución de (AG)₁₀ en todas las accesiones de *H. spontaneum* analizadas fue idéntico al de la cebada cultivada (Fig. 4.1b y Anexo 4.1m-s).

(AAG)₅ produjo el patrón más rico en señales de hibridación. Las más intensas se observaron en la región pericentroméricas de todos los cromosomas. Pese al similar patrón observado entre cromosomas morfológicamente parecidos, los siete cromosomas de cada línea se identificaron inequívocamente analizando buenas metafases (Fig. 4.1c y Anexo 4.2a-l). No se observaron diferencias entre los cromosomas homólogos de plantas del mismo cultivar pero sí entre cultivares, aunque con patrones similares. Para analizar estos polimorfismos y

facilitar la comparación entre cromosomas homólogos se confeccionaron los cariotipos de cada variedad seleccionándolos a partir de las metafases mostradas en el Anexo 4.2 (Fig. 4.2). Como se observa los cariotipos son parecidos pero existen diferencias, especialmente en relación con el número de bandas observadas en el brazo cromosómico 3HL. Este brazo cromosómico en algunos cultivares como Plaisant o Morex presenta dos bandas en comparación con la banda única observada en los cultivares Dobla, Golden Promise y Triumph. En el cv. Orria no se observó ninguna señal intensa en 3HL.

El mapa físico de (AAG)₅ obtenido en las distintas accesiones analizadas de *H. vulgare* ssp. *spontaneum* fue muy similar al obtenido en las variedades cultivadas (Fig. 4.1d y Anexo 4.2m-s). Igualmente, se detectó polimorfismo al comparar los cariotipos de este material, especialmente en los brazos de los cromosomas 3HL y 5HL (Fig. 4.2). No se observó heterocigosidad para la presencia/ausencia o variación en intensidad de las señales de (AAG)₅ entre individuos dentro de las accesiones de cebada silvestre, excepto en la accesión HOR22053 que mostró segregación para una translocación recíproca implicando a los cromosomas 5H y 7H. De este modo se supone se han originado dos nuevos cromosomas 5HS.5HL-7HL y 7HS.7HL-5HL, resultando más metacéntricos y submetacéntricos que los cromosomas 5H y 7H originales, respectivamente (Fig. 4.1g y Anexo 4.2s). Este cambio en la morfología indicaba que los tamaños de los fragmentos translocados involucrados en la translocación recíproca son de tamaños diferentes.

La sonda (ACT)₅ generó un patrón rico en señales intercalares de diferente intensidad similar en todas las líneas, tanto cultivadas como silvestres (Fig. 4.1e-f y Anexo 4.3). El patrón característico de señales en cada cromosoma permitió la identificación de todos los pares cromosómicos. No se observó ninguna variación entre cromosomas homólogos o entre plantas de la misma variedad cultivada. Sin embargo, a pesar de la coincidencia general de los patrones de hibridación, se observaron diferencias cuantitativas y cualitativas. Se confeccionaron los cariotipos de las 12 variedades de cebada y de las siete accesiones de cebadas silvestres a partir de las metafases mostradas en el Anexo 4.3. Este análisis permitió establecer los polimorfismos existentes en relación a la presencia/ausencia y/o intensidad de las señales de hibridación (Fig. 4.2). El estudio detallado reveló varias señales polimórficas. Por ejemplo, solo algunos genotipos mostraron las bandas intersticiales en el brazo 5HL y las bandas terminales en el satélite del brazo 6HS. Destacó la ausencia de la señal localizada en posición distal en el brazo 4HL de algunas accesiones silvestres. La sonda (ACT)₅ permitió confirmar la translocación 5H/7H observada en algunas plantas de la accesión HOR22053.

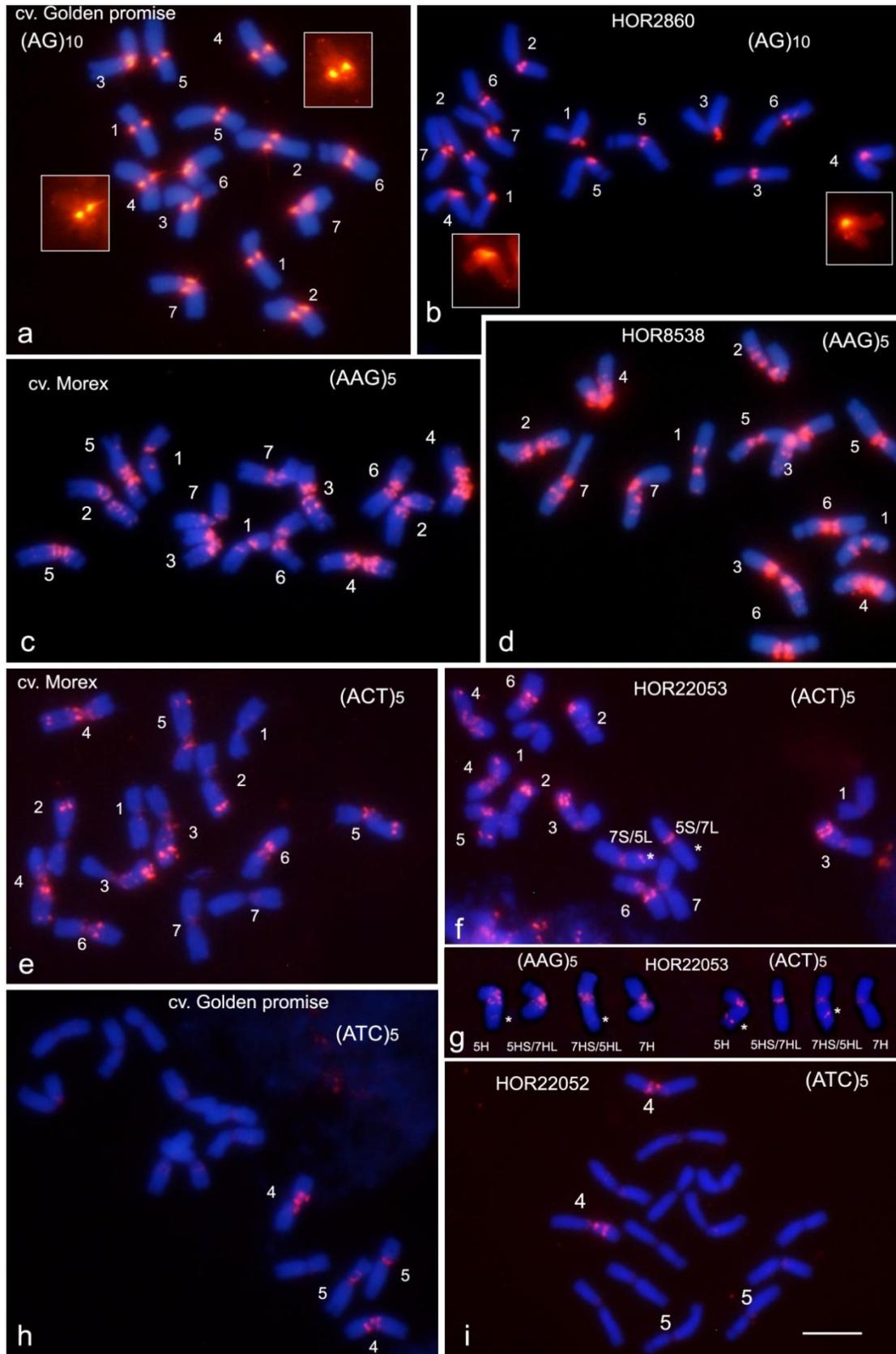


Figura 4.1. Metafases de algunas variedades de *H. vulgare* ssp. *vulgare* (izquierda) y accesiones de la ssp. *spontaneum* (derecha) hibridadas con las sondas indicadas. La identificación cromosómica (1-7) de acuerdo con Cuadrado y Jouve (2007a). En los insertos en a y b están amplificadas las señales (AG)₁₀ para mostrar las subteloméricas observadas en 4HL. En g se muestran los cromosomas implicados en la tranlocación recíproca detectada en la accesión HOR22053; los hibridados con (ACT)₅ seleccionados de la metafases mostrada en f y con (AAG)₅ de la metafase mostrada en el Anexo 2f. Barra de escala= 10µm.

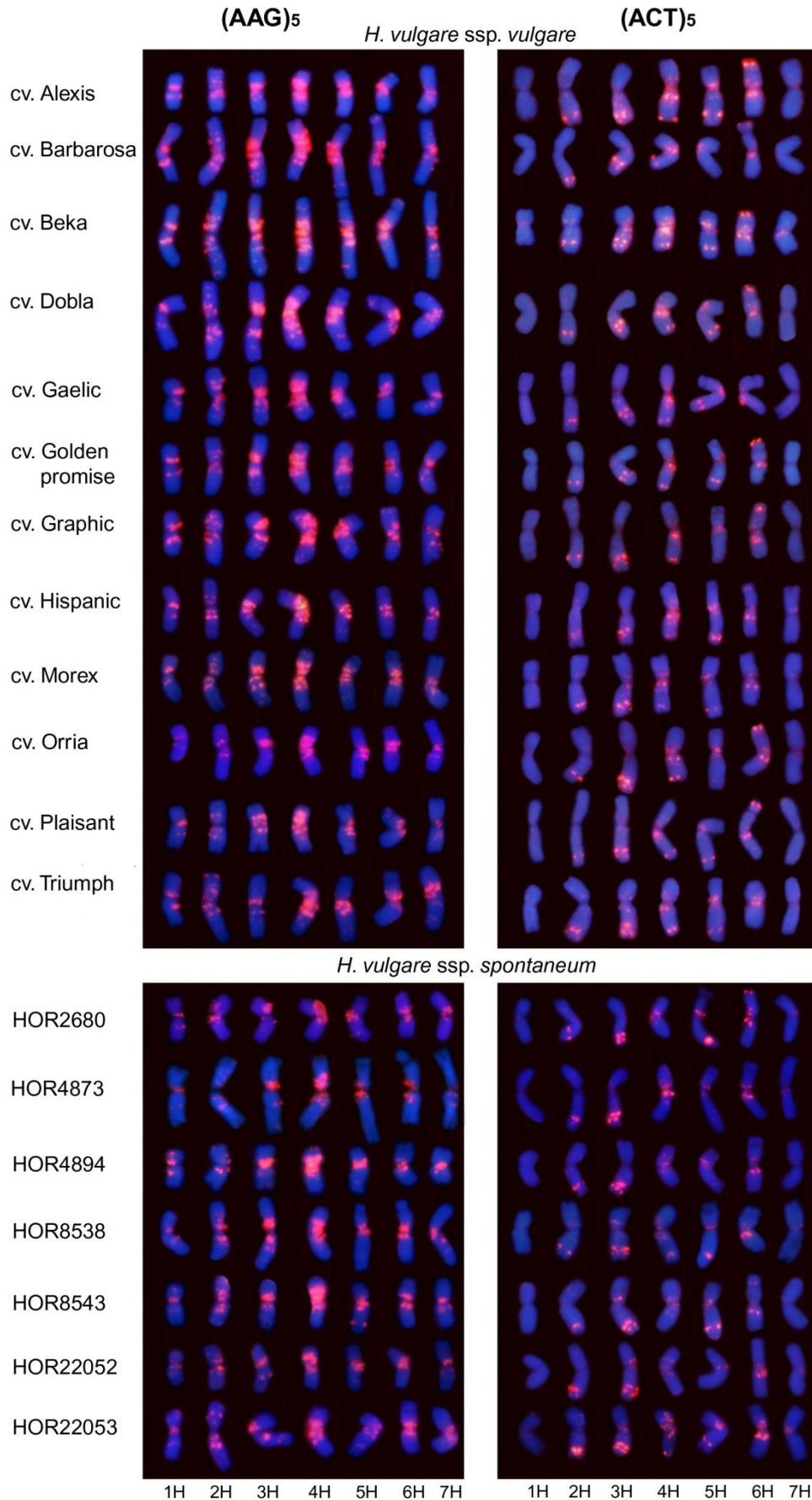


Figura 4.2. Cariotipos $(AAG)_5$ y $(ACT)_5$ de todas las variedades/accesiones analizadas de *H. vulgare*. Arriba las variedades de la *ssp. vulgare* en orden alfabético; abajo las accesiones de la *ssp. spontaneum* en orden numérico. Los cromosomas (1H-7H) hibridados con $(AAG)_5$ y $(ACT)_5$ fueron seleccionados de las metafases mostradas en los Anexos 2 y 3, respectivamente.

El uso de la sonda (ACT)₅ en combinación con la morfología de los cromosomas resultó suficiente para distinguir los siete pares de cromosomas en todas las cebadas (cultivadas y silvestres) de manera rápida y sencilla, a pesar del polimorfismo observado. Dada la utilidad de (ACT)₅ como marcador cromosómico, se realizó un ideograma que muestra el mapa físico de este SSR el cual podría utilizarse como referente para la identificación de los cromosomas de *H. vulgare sensu lato* (Fig. 4.3).

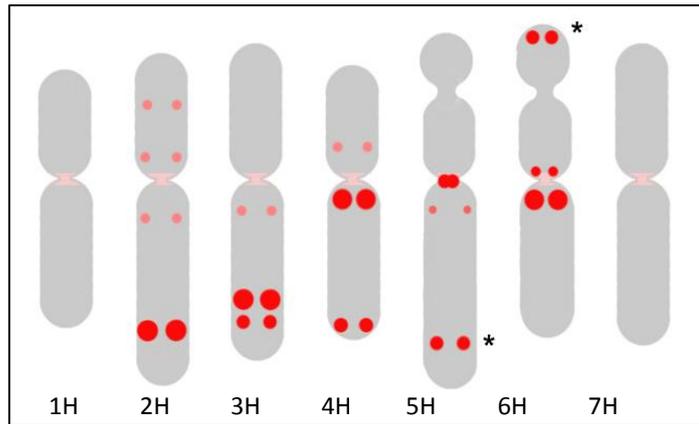


Figura 4.3. Diagrama del patrón de distribución de (ACT)₅ en cromosomas de *H. vulgare*. Las señales intensas observadas en todas las líneas se han pintado en rojo. Los asteriscos indican sitios polimórficos no observados en algunas variedades/accesiones. Señales débiles e inconsistentes observadas en algunos genotipos se muestran en rosa.

Finalmente, tras realizar ND-FISH con (ATC)₅, se observó que todas las variedades de cebada y accesiones de la cebada silvestre mostraban un patrón similar (Fig. 1h-i), coincidente con el observado previamente en el cv. Plaisant cuando se realizó FISH con la sonda (CAT)₅ (Cuadrado y Jouve 2007a). Las repeticiones ATC se agruparon principalmente en regiones pericentroméricas del cromosoma 4H (Fig. 1h-i y Anexo 4.4).

4.2.2. Localización cromosómica de SSRs en *H. bulbosum*

Se piensa que *H. bulbosum* es la especie más cercana a *H. vulgare*. Esta es la razón por la cual se extendió el análisis de la distribución cromosómica de SSRs, realizada para las dos subespecies de *H. vulgare*, a cuatro accesiones de la ssp. *bulbosum* [dos con 2n=14 (BCC2061 y GRA1154) y dos con 2n=28 (GRA1094 y GRA1193)]. Las líneas tetraploides revelaron un patrón que correspondía con la duplicación cromosómica de las formas diploides, de acuerdo con la naturaleza autoploide supuesta para el citotipo tetraploide de la ssp. *bulbosum* (Fig. 4.4). Para la búsqueda de cromosomas homeólogos de *H. vulgare* y *H. bulbosum*, se identificaron los cromosomas de *H. bulbosum* (1H^b-7H^b) en las accesiones diploides. Para ello, tras realizar ND-FISH con las sondas de SSRs, se realizó FISH con tres sondas (pTa794, pTa71 y pSc 119.2) cuyo patrón de localización había sido correctamente establecido en dos accesiones diploides de *H. bulbosum* (Pickering et al. 2006). Los únicos cromosomas fácilmente identificados fueron el

5H^b (con genes 5S en su brazo corto) y el satelizado 6H^b (con genes 45S en la constricción secundaria del brazo corto). En contraste, las señales obtenidas con la sonda pSc119.2, localizada en posiciones subteloméricas en los brazos cromosómicos 3H^bL, 4H^bL, 6H^bS y 7H^bL en los genotipos analizados por Pickering et al. (2006), resultaron polimórficas entre los individuos analizados de las accesiones estudiadas en este trabajo y por tanto inútiles como marcadores físicos en la identificación de estos cromosomas (Fig. 4.4a₂). Las únicas señales bien definidas e intensas que dieron un patrón de distribución distintivo en los cromosomas de *H. bulbosum* se observaron con (AAG)₅. Las señales se localizaron básicamente en regiones pericentroméricas. También aparecieron unas pocas señales débiles en otras localizaciones cromosómicas (bandas intercalares y subteloméricas) (Fig. 4.4a₁ y e-g). El patrón obtenido con la sonda (AAG)₅, comparándolo con los ideogramas de Bando-C realizados por Linde-Laursen et al. (1992) como referencia, permitió la identificación individualizada de todos los cromosomas en las accesiones diploides (Fig. 4.4a₁-a₂). La comparación de los cariotipos (AAG)₅ de las dos accesiones diploides (BBC2061 y GRA1154) permite detectar fácilmente los polimorfismos en cuanto a las variaciones del tamaño de las bandas y/o presencia/ausencia de señales de hibridación (Fig. 4.4a₁, e, f y h). En los citotipos tetraploides tan solo fueron identificados los cromosomas 5H^b y 6H^b (Fig. 4.4g-i).

Para el resto de SSRs solo fue posible distinguir alguna señal de poca consistencia e intensidad. Por ejemplo, solo se pudieron observar señales (AG)₁₀ localizadas cerca del centrómero de los cromosomas 1H^b y 2H^b (Fig. 4.4a) en la accesión BCC2061 tras largos tiempos de exposición en la captación de imágenes y en buenas preparaciones cromosómicas. En las cuatro accesiones analizadas, las señales de (ATC)₅ se localizaban principalmente cerca de los centrómeros de algunos cromosomas. Además, se observó en un cromosoma de la accesión GRA1154, identificado como 2H^b, una señal polimórfica intercalar (Fig. 4.4b). Se identificaron diferencias en la presencia/ausencia e intensidad de las señales entre accesiones e incluso entre cromosomas homólogos dentro del mismo genotipo (Fig. 4.4b-c). Por último todos los cromosomas de *H. bulbosum* analizados mostraron señales de hibridación con (ACT)₅ exclusivamente cerca de los centrómeros, observándose un claro polimorfismo en la intensidad de las señales entre las accesiones estudiadas y entre cromosomas individuales de las mismas líneas (Fig. 4.4d).

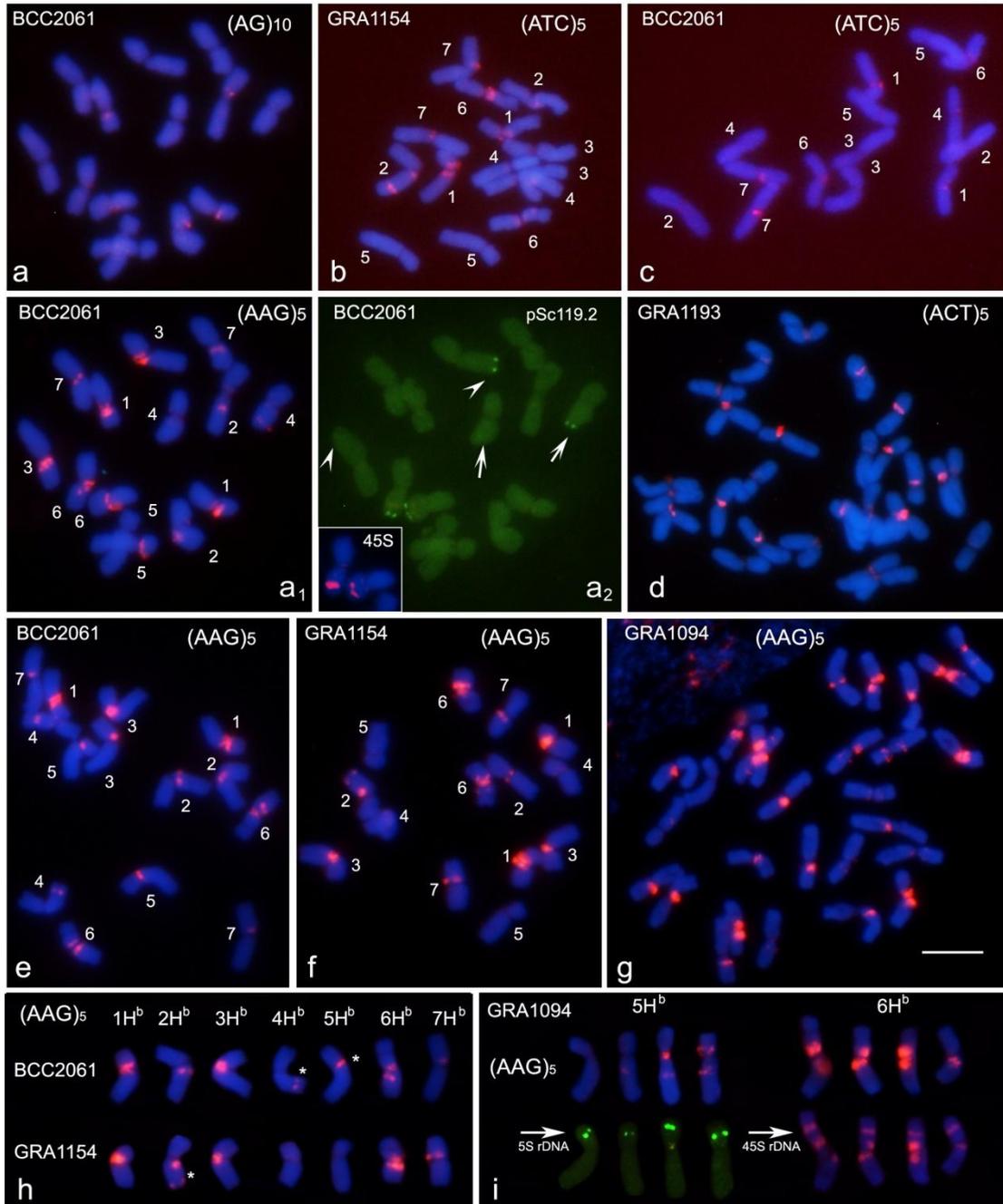


Figura 4.4. Hibridación *in situ* en metafases de dos accesiones diploides (BCC2061 y GRA1154) y dos tetraploides (GRA1094 y GRA1193) de *H. bulbosum* con las sondas indicadas. Las sondas pSc119.2, pTa794 (5S) y pTa71 (45S) se utilizaron para la identificación cromosómica, de acuerdo con Pickering et al. (2006). En **a-a₂**, la misma metafase tras ND-FISH con (AG)₁₀ (**a**) rehibridada con (AAG)₅ (**a₁**) y nuevamente rehibridada mediante FISH con las sondas pSc119.2 y pTa71 (recuadro), en verde y rojo respectivamente (**a₂**); las flechas y puntas de flecha apuntan los brazos cromosómicos 3HL y 4HL, respectivamente, para ilustrar el polimorfismo observado con pSc119.2. En **h** los cariotipos (AAG)₅ de las dos accesiones diploides. Los cromosomas (1H^b-7H^b) de BCC2061 fueron seleccionados de la metafase mostrada en **e** y los de GRA1154 de la mostrada en **f**. Los asteriscos indican las señales polimórficas observadas en y entre los individuos de cada genotipo. Por ejemplo, comparar los homólogos 4H^b en **a₁** y **e**, o los homólogos 2H^b y 5H^b en **f** y **a**. En **i** se muestran los cromosomas 5H^b (izquierda) y 6H^b (derecha) seleccionados de la metafase mostrada en **g**, los cuales fueron rehibridados con pTa794 (5S) y pTa71 (45S) para su correcta identificación; destacar el elevado grado de variación observado en la distribución de los SSRs al comparar homólogos. Barra de escala= 10µm.

4.2.3. Organización molecular de los SSRs

Se estudió la organización molecular de los clústeres de SSRs observadas por hibridación *in situ* mediante *Southern blot*, utilizando ADN genómico extraído de un único individuo de cada una de las 23 accesiones analizadas a nivel cromosómico. Este ADN se digirió utilizando por separado las enzimas de restricción *AluI* y *RsaI*, para posteriormente ser hibridado con sondas SSRs marcadas con digoxigenina. Ambas enzimas actúan en blancos específicos de cuatro pares de bases que no generan corte dentro de las cuatro secuencias SSRs analizadas, lo que permite aislar fragmentos completos de repeticiones de AG, AAG, ACT y ATC con un mínimo de secuencias flanqueantes. Como se observa en los geles de agarosa tras la separación del ADN genómico digerido, la mayoría de los fragmentos son de pequeño tamaño (Fig. 4.5).

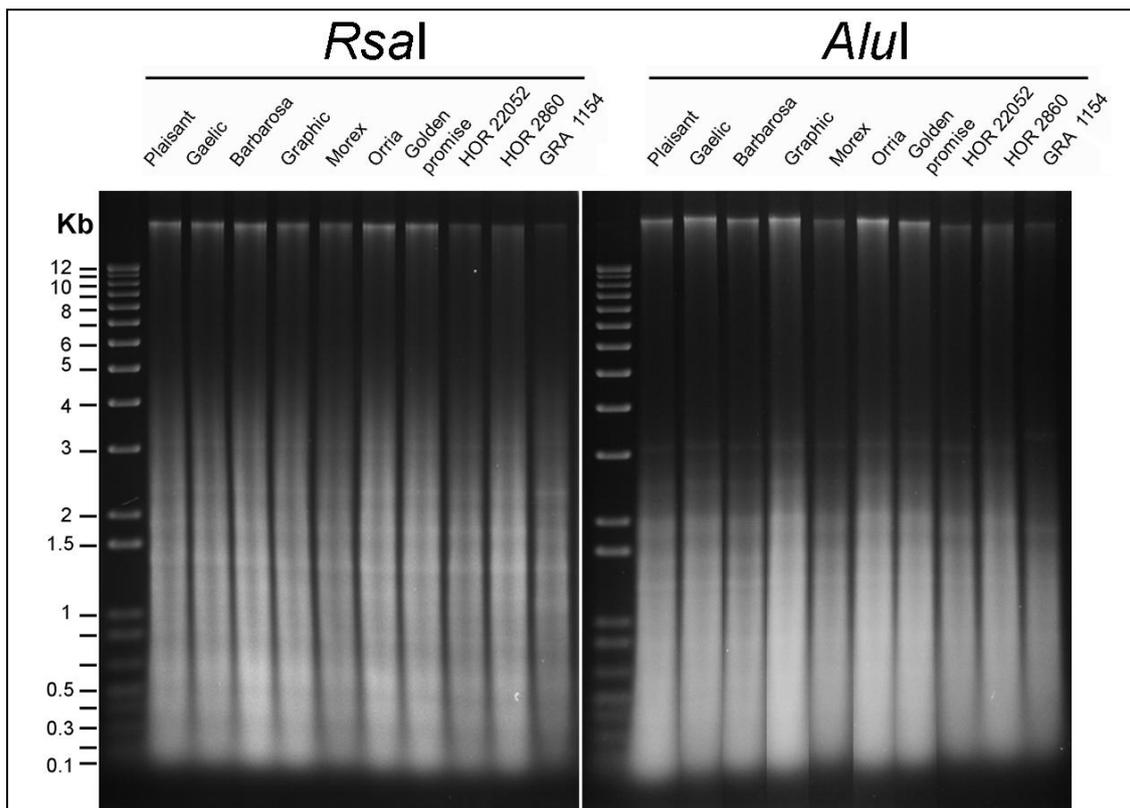


Figura 4.5. Imágenes de los geles mostrando las digestiones del ADN genómico con *RsaI* (izquierda) y *AluI* (derecha) con muestras representativas de *H. vulgare* ssp. *vulgare*, (cvs. Plaisant, Gaelic, Barbarosa, Graphic, Morex, Orria y Plaisant), *H. vulgare* ssp. *spontaneum* (HOR22062 y HOR2860) y *H. bulbosum* (GRA1154). Los tamaños del marcador de peso molecular se dan en kb.

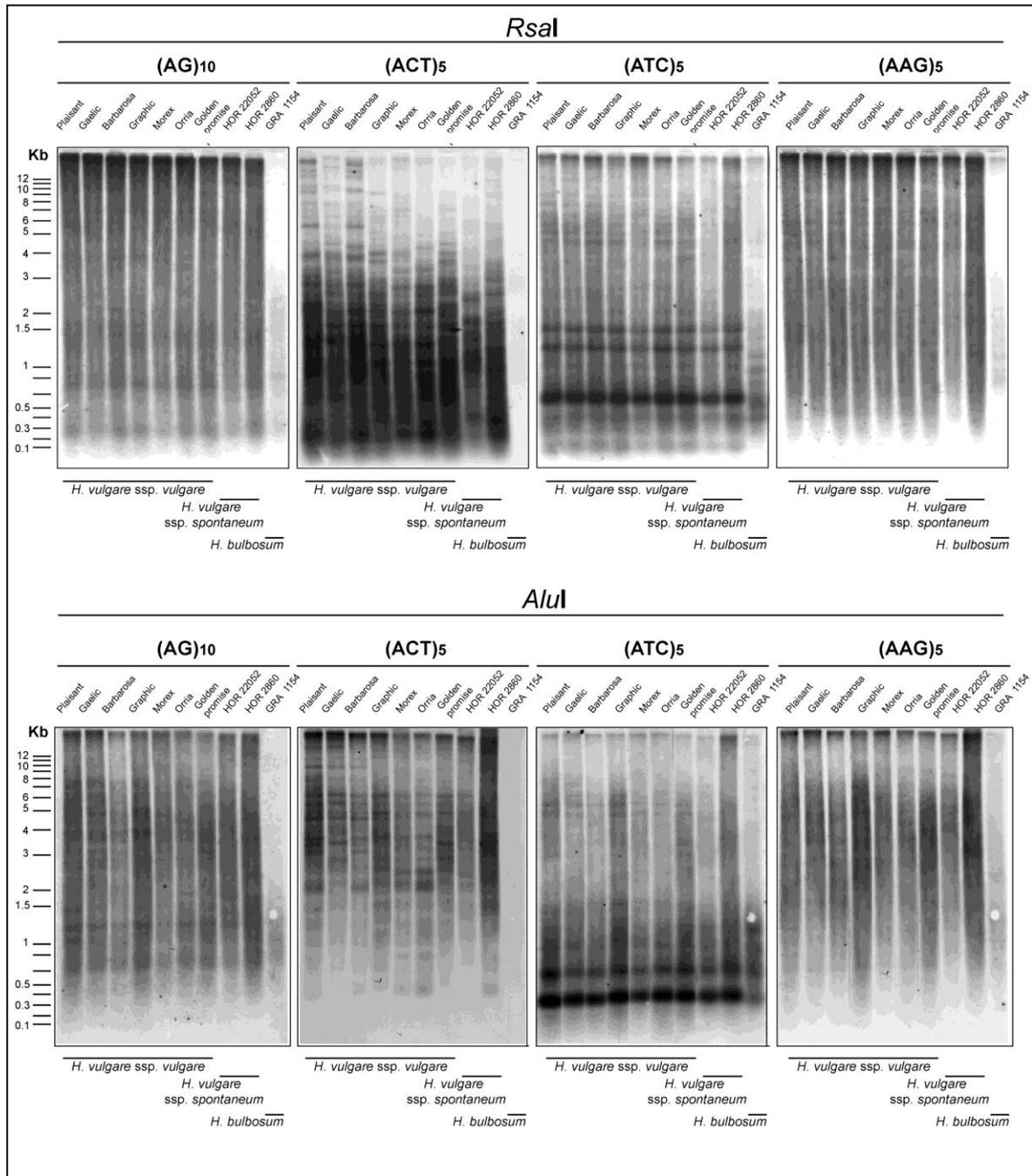


Figura 4.6. Resultados de los experimentos *Southern Blot* con muestras representativas de *H. vulgare ssp. vulgare*, (cvs. Plaisant, Gaelic, Barbarosa, Graphic, Morex, Orria y Plaisant), *H. vulgare ssp. spontaneum* (HOR22062 y HOR2860) y *H. bulbosum* (GRA1154). Los tamaños del marcador de peso molecular se dan en kb. Los paneles muestran las correspondientes membranas hibridadas sucesivamente con las sondas indicadas.

La figura 4.6 muestra los resultados del *Southern Blot*. Los patrones de hibridación detectados, independientemente de la enzima de restricción usada o de la sonda SSR empleada, revelaron similitudes en términos de abundancia y tamaño de fragmentos en todas las líneas correspondientes las dos subespecies de *H. vulgare*. Estos patrones variaron

significativamente de aquellos observados en las cuatro accesiones de *H. bulbosum*, siendo estos últimos similares entre ellos. Los patrones de hibridación más fuertes obtenidos con las muestras de ADN provenientes de *H. vulgare* fueron más intensos que aquellos obtenidos con *H. bulbosum*. Las diferencias en la intensidad de señal fueron menos patentes con la sonda (ATC)₅. Se observaron diferencias notables al comparar los patrones de las cebadas cultivadas y silvestres. (AG)₁₀ y (AAG)₅ generaron un rastro continuo a lo largo del carril con algunas bandas más fuertes incluyendo fragmentos de alto peso molecular. Esto indica la existencia de largos segmentos de estos SSRs. (ACT)₅ y (ATC)₅ revelaron múltiples bandas bien definidas a lo largo de un rango de pesos moleculares que difieren significativamente entre las digestiones de *AluI* y *RsaI*. En el caso particular de (ATC)₅ las bandas fueron especialmente intensas y constantes en todas las cebadas analizadas.

4.3. Discusión

4.3.1. SSR como marcadores cromosómicos mediante ND-FISH

Los motivos SSRs han ayudado a incrementar notablemente el número de marcadores físicos disponibles para la caracterización de los cromosomas de la cebada en los últimos años, aportando una mejora con respecto al uso de los genes ribosomales (45S y 5S) y otras sondas de ADN repetitivo específicas para cebada o para la tribu *Triticeae*, que han sido las normalmente utilizadas desde el desarrollo de las técnicas de hibridación *in situ* (revisado en Houben y Pickering 2009). La técnica de FISH permite la visualización de regiones ricas en repeticiones de SSRs (Pedersen et al. 1996, Cuadrado y Jouve 2007, Kato 2011). Sin embargo, en este trabajo se ha empleado para su detección una variante de la técnica FISH, la técnica de ND-FISH, que resulta más sencilla, rápida y eficiente que cualquier otro método de FISH anteriormente empleado para localizar SSRs a nivel cromosómico (Cuadrado y Jouve 2010, 2011). Se confirma la efectividad de esta técnica como lo demuestra el hecho de que en todos los cultivares/accesiones de cebada se detectó una señal distal en 4HL con (AG)₁₀ (Fig. 4.1a-b) no detectada anteriormente mediante la utilización de técnicas convencionales de FISH en el cv. Plaisant (Cuadrado y Jouve 2007a), demostrando además la mayor sensibilidad que aporta la técnica de ND-FISH.

La sonda (ACT)₅ por su patrón de distribución de señales discretas en posiciones concretas de cada cromosoma permitió la fácil identificación de todos los cromosomas en las 19 variedades/accesiones de *H. vulgare* analizadas. La distribución de los clústeres ACT, como

se muestra en la figura 4.3 proporciona un mapa físico de referencia, que puede ser muy útil como base para anclar otras secuencias en cualquier variedad de cebada. Otra aplicación práctica es la detección de material ajeno o reestructuraciones cromosómicas en líneas mejoradas. De hecho en este trabajo se ha identificado la presencia de una translocación recíproca en la accesión HOR22053, implicando los brazos largo de los cromosomas 5H y 7H, mediante la reordenación/identificación de las marcas de referencia generadas con la sonda (ACT)₅ en estos cromosomas.

Aunque algunos SSRs analizados no permiten la identificación de todos los cromosomas de cebada pueden resultar útiles en otras situaciones. Por ejemplo, la localización especie-específica de las repeticiones AG en los centrómeros de *H. vulgare* puede proporcionar un modo para distinguir fácilmente los cromosomas de cebada en híbridos entre *H. vulgare* x *H. bulbosum* y su seguimiento posterior durante el proceso de eliminación de los cromosomas uniparentales en estos híbridos (Sanel et al. 2011).

Por el contrario, los SSRs aquí analizados en *H. bulbosum* resultaron poco valiosos como marcadores cromosómicos. No son observables en los cromosomas de esta especie regiones especialmente ricas en AG y ATC. Las repeticiones ACT, localizadas exclusivamente en posiciones centroméricas, y AAG, que resultaron altamente polimórficas (intra e intervarietalmente), resultaron poco informativas en la identificación individualizada de sus cromosomas. Por otra parte, dada la existencia de gran abundancia de agrupaciones de SSRs en *Triticeae* (Cuadrado y Schwarzacher 1998, Cuadrado et al. 2008), otras sondas SSRs, con repeticiones de otros motivos, podrían generar más información sobre los cromosomas de *H. bulbosum*.

4.3.2. Estructura molecular de los SSRs

Para producir señales de hibridación *in situ* consistentes en cromosomas metafásicos como las observadas en el presente trabajo se requiere una región de ADN de una extensión suficiente de kilobases como secuencia diana en el cromosoma. No obstante, esto no significa que las dianas deban de ser largos tramos ininterrumpidos de SSRs. Los resultados obtenidos del análisis de *Southern blot* revelaron el mismo patrón de distribución de fragmentos con repeticiones AG y AAG, el cual difería notablemente de los fragmentos con repeticiones ACT y ATC. De hecho, el rastro de fragmentos observado con (AG)₁₀ y (AAG)₅ probablemente refleje la íntima asociación de estos SSRs con retrotransposones y otros elementos repetitivos

dispersos (Ramsay et al. 1999). Entre las 19 variedades/accesiones de *H. vulgare* se observaron claras diferencias en el tamaño de los fragmentos de ACT, correlacionándose con el polimorfismo observado a nivel cromosómico mediante ND-FISH con la sonda (ACT)₅. Además, no se detectaron diferencias patentes con respecto al patrón de la sonda ATC entre las muestras de ambas subespecies de *H. vulgare*, de acuerdo con el invariable patrón observado tras la hibridación *in situ*. La presencia de fragmentos de ADN intensamente marcados con pesos moleculares que van desde los 0.3 kb hasta las 1.5 kb sugirió que las agrupaciones de ATC están organizadas en grupos de repeticiones de tamaño más reducido que a su vez forman parte de estructuras repetitivas más complejas, y que estos están conservados tanto en la cebada cultivada como en la silvestre.

4.3.3. ND-FISH y SSRs para evaluar la diversidad citogenética de la cebada

Uno de los principales objetivos de los biólogos evolutivos y mejoradores es la detección de la diversidad genética. A lo largo de las últimas dos décadas la diversidad genómica en cebada, incluyendo sus parientes silvestres, ha sido evaluada analizando fundamentalmente diferentes marcadores moleculares, incluyendo los SSRs (Saghai-Maroo et al. 1994, Casas et al. 1998). La diversidad citogenética de la cebada ha sido estudiada empleando el Bando-C (Friebe y Gill 1994, Taketa et al. 2009). Sin embargo, no se ha llevado a cabo ningún estudio citogenético sobre diversidad basado en la presencia y extensión de SSRs a nivel cromosómico. Desafortunadamente, al trabajar con plantas, la técnica de FISH puede ser laboriosa. Además para muchas especies no existen sondas adecuadas que generen unos patrones diagnósticos para la identificación cromosómica. La información de diversidad citogenética es por lo tanto pobre, incluso para especies cuya caracterización cromosómica es de especial interés (Schneider et al. 2003, Albert et al. 2010).

Los resultados aquí descritos en relación con la distribución cromosómica de (AG)₁₀ y (ATC)₅, muestra que esos SSRs no son apropiados como marcadores cromosómicos para evaluar diversidad citogenética en cebada. Sin embargo, cada genotipo puede ser distinguido basándonos en el patrón *in situ* si utilizamos (AAG)₅ y (ACT)₅, observándose una amplia variabilidad cromosómica entre las dos subespecies de *H. vulgare*. Este trabajo demuestra que la técnica ND-FISH y el uso de SSRs como marcadores suponen una herramienta excelente para analizar cromosomas al resultar un método muy reproducible y por lo tanto una técnica que puede ser usada en diferentes laboratorios. Por otra parte, las diferencias en la intensidad de

la señal obtenidas en diferentes laboratorios a partir de oligonucleótidos de la misma longitud (y por lo tanto con la misma cantidad de marcaje) tan solo puede reflejar diferencias en el tamaño de la secuencia diana. El protocolo de ND-FISH podría suministrar una mejor opción que los protocolos convencionales de hibridación *in situ* para examinar la diversidad citogenética de colecciones de germoplasma (por ejemplo, la *Barley Core Collection*).

El análisis de los cariotipos con (AAG)₅ y (ACT)₅ revela la diversidad citogenética entre cultivares de cebada con características agronómicas similares, o en el caso de la cebada silvestre entre accesiones correspondientes a poblaciones cercanas geográficamente. También se observaron diferencias al comparar cariotipos de cultivares de cebada estrechamente relacionados, por ejemplo, los cvs. Dobra y Plaisant, los cuales comparten el cv. Nympe como uno de los parentales. Los resultados revelan que no existe un mayor parecido entre los cariotipos de las variedades comerciales de *H. vulgare ssp. vulgare* ni entre las accesiones de *H. vulgare ssp. spontaneum*, que si se comparan variedades/accesiones pertenecientes a distintas subespecies de *H. vulgare*. De hecho, estas subespecies fueron indistinguibles en términos de sus patrones de distribución de los SSRs analizados. Estos resultados coinciden con la interfertilidad observada entre las formas silvestres y cultivadas, reforzando la idea de que ambas formas pertenecen a la misma especie.

4.3.4. Citogenética y relaciones entre especies

H. vulgare y *H. bulbosum* comparten el genomio H definido por estudios clásicos de citología basados en apareamientos cromosómicos en híbridos, morfología cromosómica y patrones de Bando-C (Linde-Laursen et al. 1997). Igualmente, los resultados de investigaciones moleculares basadas en distintos tipos de secuencias sugieren que *H. vulgare* y *H. bulbosum* tiene un origen monofilético, constituyendo un grupo que se separó en etapas tempranas del resto de especies de *Hordeum* (Bothmer y Jacobsen 1985, Blattner 2009, Terasawa et al. 2012). Sin embargo, los resultados de este trabajo parecen demostrar la existencia de diferencias sustanciales en la abundancia y distribución de las repeticiones de AG, AAG, ACT y ATC entre los cromosomas de *H. vulgare* y *H. bulbosum*. Esto parece contradecir la supuesta estrecha relación genómica existente entre ambas especies. Más bien, estos datos coinciden con investigaciones citogenéticas que utilizando otras secuencias repetitivas de ADN como marcadores cromosómicos específicos han sugerido una menor relación (Xu et al. 1999, Svitashv et al. 1994, de Bustos et al. 1996). Incluso asumiendo que *H. vulgare* y *H. bulbosum*

tengan un origen monofilético y que su separación se produjo posteriormente en un momento evolutivo más o menos temprano (Blattner 2009), los resultados de este trabajo reabren la discusión sobre si estas especies tienen una naturaleza genómica común o si por el contrario representan dos grupos genómicos distintos, los cuales deberían recibir distintas denominación como ya ha sido previamente propuesto (Shcherban y Vershinin 1992, Svitashv et al. 1994).

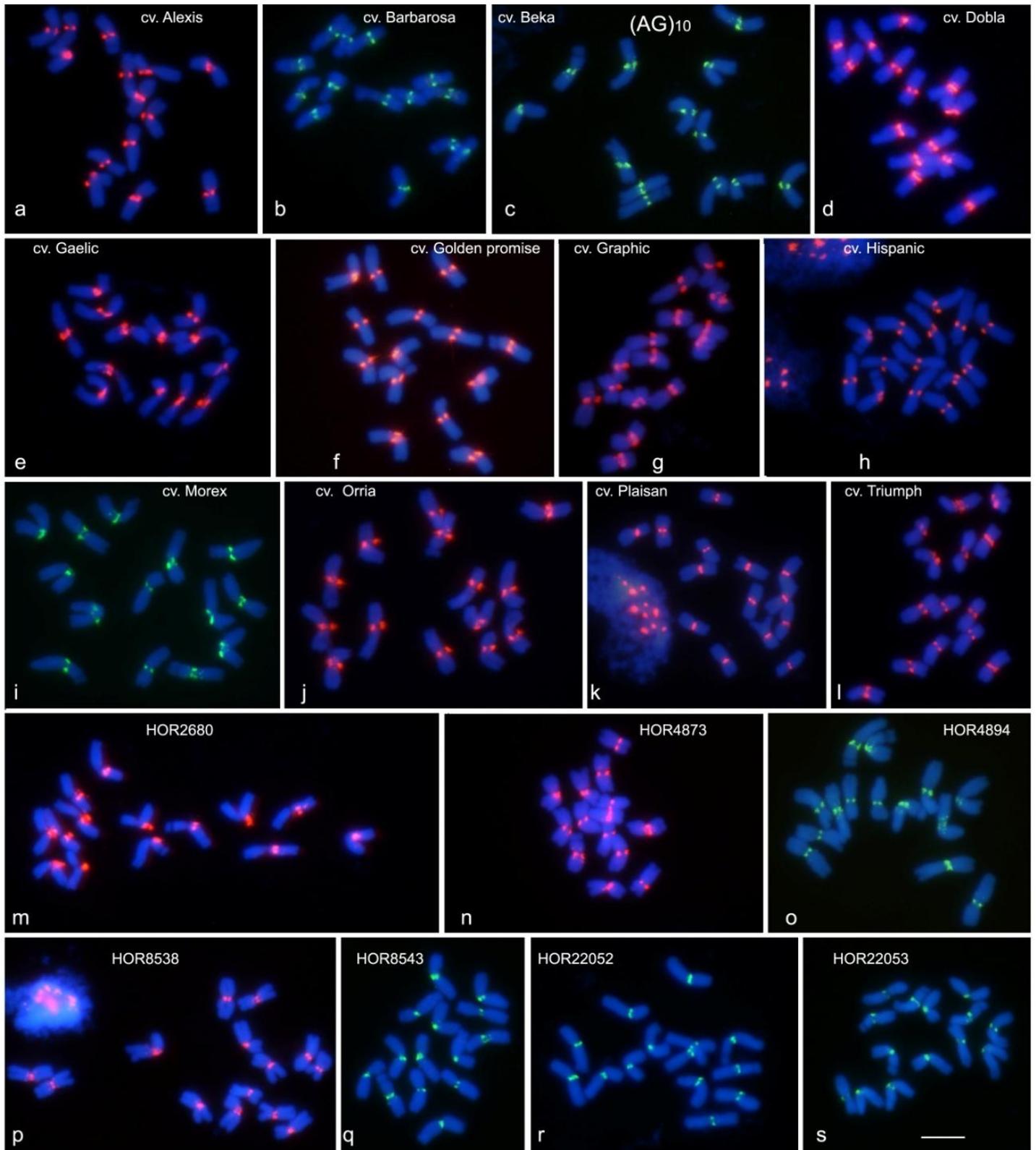
4.3.5. Tendencias evolutivas seguidas por los SSRs durante la especiación

Los cambios observados en la cantidad y distribución de las distintas familias de ADN repetitivo que integran el genoma de una especie son demostrativos de la importancia de la remodelación genómica durante la evolución y la especiación. Sin embargo son poco conocidos los mecanismos moleculares mediante los cuales los genomas cambian y tampoco se sabe si estos cambios están sujetos a selección (Plohl et al. 2002). A nivel cromosómico, los mismos clústeres integrados por repeticiones AG y ATC observados en la ssp. *vulgare* son detectados en los cromosomas de la ssp. *spontaneum*, lo que sugiere que ya estaban presentes en el genoma ancestral del que derivan ambos taxones, y que por tanto serían anteriores a la domesticación de la cebada a partir de la ssp. *spontaneum* hace unos 10.000 años en la zona del Creciente Fértil (Badr et al. 2000). Por el contrario los clústeres formados por repeticiones ACT y AAG presentan un patrón de distribución cromosómica similar pero no idéntico, evidenciando polimorfismo para la presencia/ausencia de señales de hibridación. Esto sugiere que las repeticiones de estas secuencias están más predisuestas a ser amplificadas o eliminadas tanto en las variedades cultivadas como en las formas silvestres relacionadas.

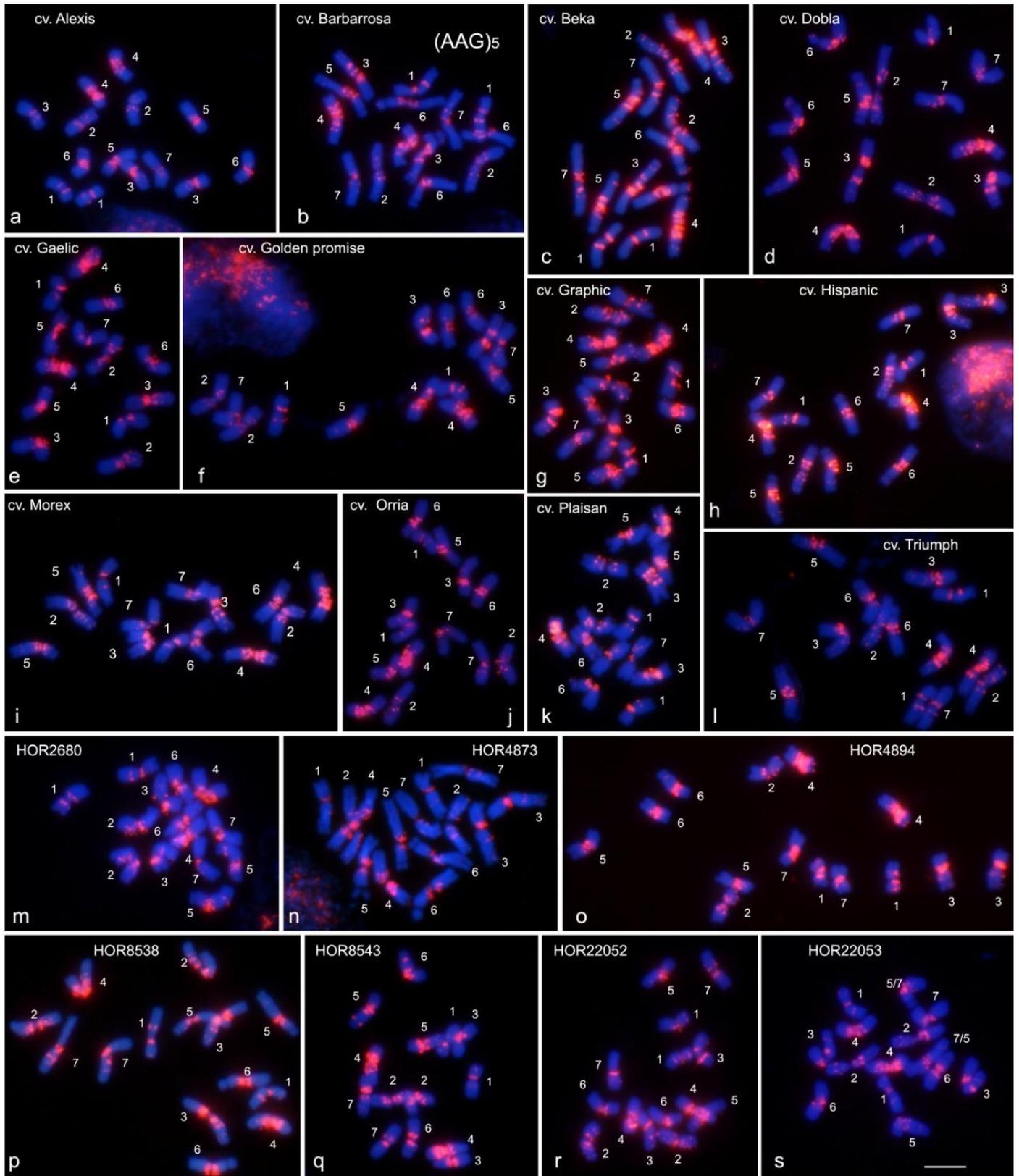
Es de señalar que *H. bulbosum* difiere de *H. vulgare* en la abundancia de los cuatro SSRs analizados. Por ello, es razonable asumir que las agrupaciones específicas de determinados SSRs han sufrido o una masiva amplificación en el linaje de *H. vulgare*, o una eliminación en el de *H. bulbosum*, después de que ambas especies se separaran de su ancestro común. Un fenómeno similar ha sido observado en otras gramíneas. Por ejemplo, en el género *Secale*, donde se ha observado una amplificación de los clústeres de AAG y AAC en centeno cultivado tras la divergencia de *S. sylvestre* (Cuadrado y Jouve 2002).

4.4.4. Anexos

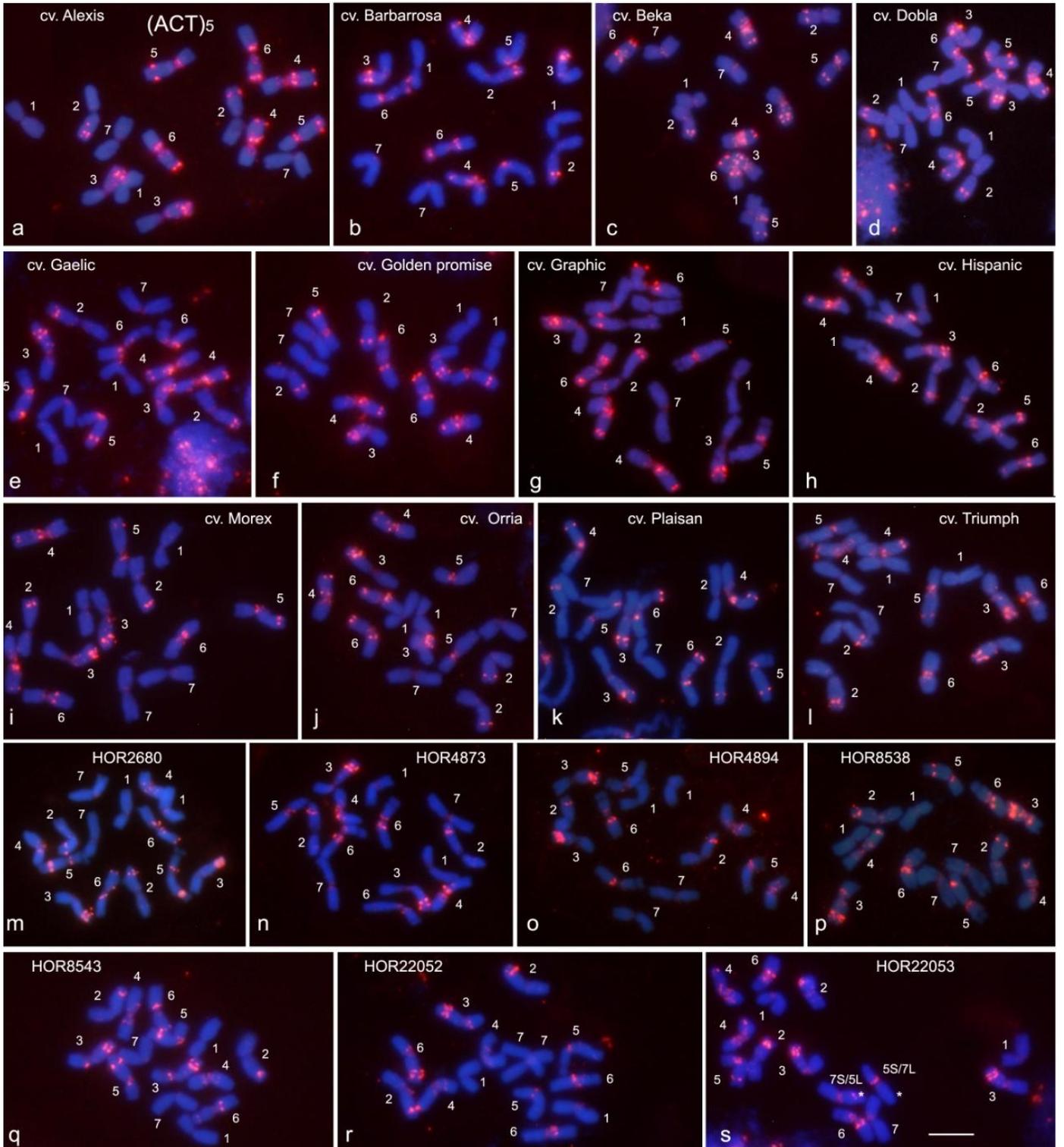
A continuación se muestran las figuras anexas correspondientes a este capítulo:



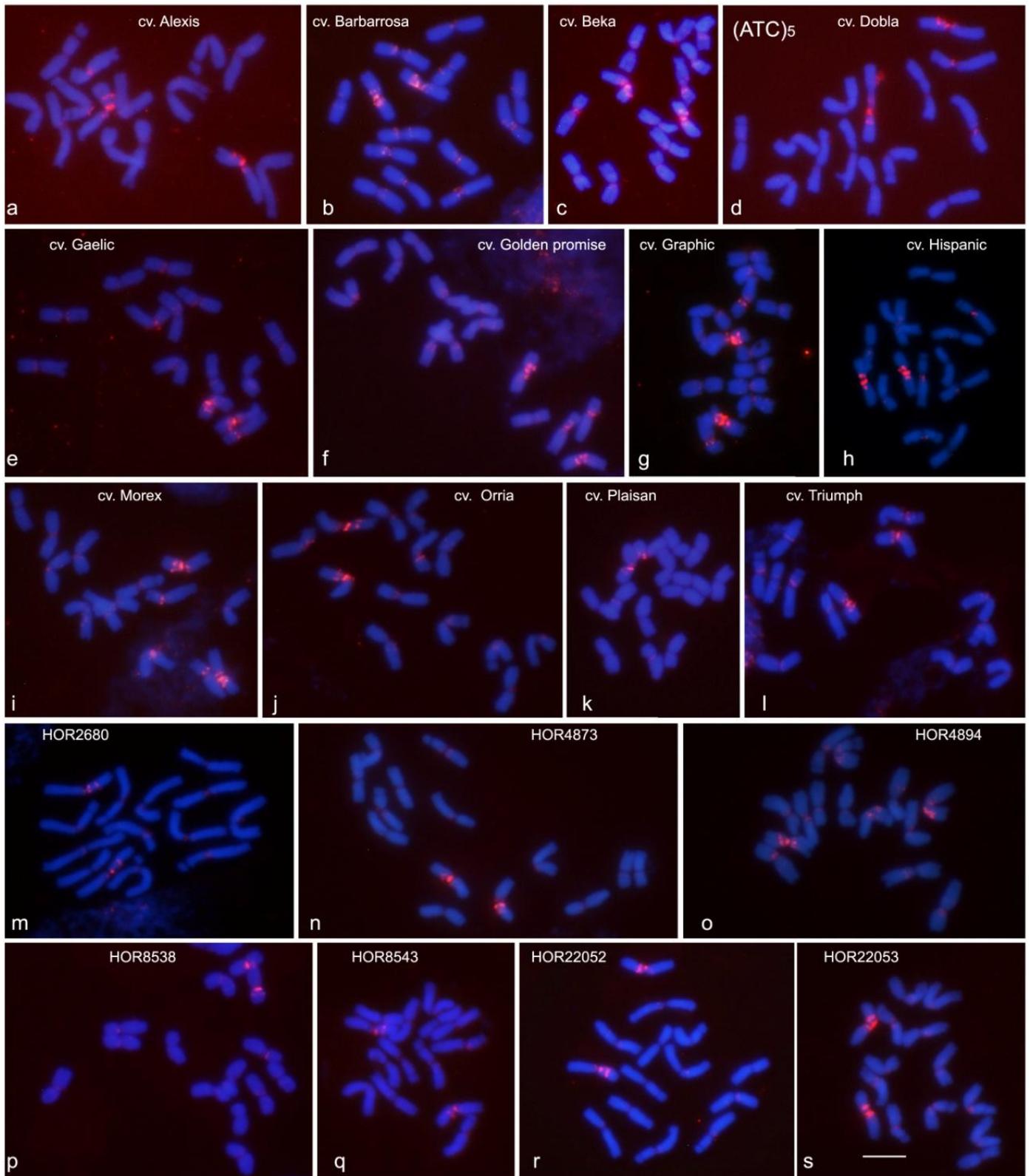
Anexo 4.1. Metafases mostrando la distribución cromosómica de (AG)₁₀ en todas las variedades de *H. vulgare* ssp. *vulgare* (a-i) y accesiones de *H. vulgare* ssp. *spontaneum* (m-s) analizadas. Barra de escala = 10 μ m.



Anexo 4.2. Metafases mostrando la distribución cromosómica de (AAG)₅ en todos los cultivares de *H. vulgare* ssp. *vulgare* (a-i) y líneas de *H. vulgare* ssp. *spontaneum* (m-s) analizadas. La identidad de los cromosomas (1-7) se indica en cada panel. Destacar que en s se muestra la metafase de un individuo heterocigoto para la translocación recíproca (5S/7L y 7S/5L) detectada en la accesión HOR22053. Barra de escala = 10 μ m.



Anexo 4.3. Metafasas mostrando la distribución cromosómica de (ACT)₅ en todos los cultivares de *H. vulgare ssp. vulgare* (a-i) y líneas de *H. vulgare ssp. spontaneum* (m-s) analizadas. La identidad de los cromosomas (1-7) se indica en cada panel. Destacar que en s se muestra la metafase de un individuo heterocigoto para la translocación recíproca (5S/7L y 7S/5L) detectada en la accesión HOR22053. Barra de escala = 10 µm.



Anexo 4.4. Metafases mostrando la distribución cromosómica de (ATC)₅ en todos los cultivares de *H. vulgare ssp. vulgare* (a-i) y accesiones de *H. vulgare ssp. spontaneum* (m-s) analizadas. Barra de escala = 10 μ m.

5. SSRs y caracterización del genoma Xu de *Hordeum*. Nuevas perspectivas en la evolución de *H. murinum* L.

El contenido de este capítulo se corresponde con la publicación: Chromosomal characterization of the three subgenomes in the polyploids of *Hordeum murinum* L.: New insight into the evolution of this complex. Cuadrado A, [Carmona A](#), Jouve N (2013). PLoS One. 8(12): e81385.

Los resultados se han presentado en formato comunicación oral en el VII Seminario de Citogenética celebrado en Pontevedra en 2012. SSRs, cromosomas y taxonomía de *Hordeum murinum* con citotipos di-, tetra- y hexaploides. [Carmona A](#), Jouve N, Cuadrado A. Libro de resúmenes pg. 18.

5. 1. Introducción

La poliploidización es un proceso muy importante en la evolución de muchos grupos de plantas (Van de Peer et al. 2009). Ciertamente ha jugado un papel muy importante en la diversificación del género *Hordeum*. Sin embargo, pese a los numerosos estudios realizados, es incierto el origen por auto- o alopoloidía de la mayoría de las especies y de sus correspondientes citotipos. Este desconocimiento, contribuye a que no exista un consenso en el tratamiento taxonómico de los citotipos poliploides, la mayoría incluidos junto con citotipos diploides de la misma especie.

Entre las especies silvestres de *Hordeum*, el complejo *murinum* está integrado por las subespecies/citotipos con genoma **Xu**. *Hordeum murinum* L. (cebadilla, cebada bastarda ó cola de zorro entre otros) posee tres subespecies: *H. murinum* ssp. *glaucum* (Steud.) Tzvelev ($2n=2x=14$); *H. murinum* ssp. *murinum* ($2n=4x=28$) y por último, *H. murinum* ssp. *leporinum* (Link) Arcang., que presenta dos formas poliploides ($2n=4x=28$ y $2n=6x=42$). *Hordeum murinum* L. es una especie anual de invierno, principalmente autógama. El hábitat natural de estas especies son las costas y cauces arenosos de ríos aunque a día de hoy se localiza en casi todos los lugares donde hay actividad humana. La ssp. *murinum* se distribuye por el norte y este de Europa, desde el Atlántico hasta el Cáucaso y no suele alcanzar la región Mediterránea. Por el contrario la ssp. *glaucum* se localiza en las regiones Mediterráneas y Oriente Medio. La ssp. *leporinum* llega hasta el suroeste de Asia, con una distribución preferente de las formas tetraploides en Afganistán y las hexaploides en Turquía e Irán (Bothmer et al. 1995).

Durante muchos años se ha mantenido el debate si las formas poliploides de *H. murinum* son auto- o alopoloides (e.g. Rajhathy y Morrisson 1962, Linde-Laursen et al. 1989, Bothmer et al. 1987, Jahan et al. 1992, Blattner 2006). Durante la meiosis los poliploides se comportan como verdaderos alopoloides, ya que se forman exclusivamente bivalentes. No obstante se ha propuesto que serían autoploides con un mecanismo muy fuerte de diploidización (Bothmer et al. 1988). Numerosos análisis filogenéticos han apoyado con fuerza la hipótesis del origen alopoloide (de Bustos et al. 2006, Tanno et al. 2010, Ourari et al. 2011, Brassac et al. 2012). Recientemente, Jacob y Blattner (2010) en un exhaustivo análisis filogenético utilizando conjuntamente marcadores moleculares AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), secuencias de clones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosomal, una secuencia nuclear del gen de la topoisomerasa 6 (TOPO 6), seis microsatélites y una secuencia de copia única de cloroplastos (trnL-F), llegaron a la conclusión de que la ssp. *glaucum*, junto con otro progenitor diploide probablemente extinto en la actualidad y

pertenecientemente al mismo grupo (genoma **Xu**), originaron las formas tetraploides. Estas, tras hibridar con un tercer progenitor diploide, filogenéticamente muy emparentado, y duplicar sus cromosomas habría dado origen a las formas hexaploides de la ssp. *leporinum*. Para profundizar en el conocimiento de la constitución genómica del complejo *H. murinum* es imprescindible llevar a cabo análisis citogenéticos que permitan la discriminación de los cromosomas en las distintas subespecies/citotipos (Blattner 2009). Si las formas diploides están implicadas en el origen de los tetraploides sus cromosomas deberían estar presentes en ellos. Lo mismo ocurriría en el caso de que los tetraploides hayan originado las formas hexaploides. No obstante, la técnica de GISH, tan resolutiva para caracterizar la naturaleza híbrida o alopoloide de muchas especies, no ha permitido demostrar el origen alopoloide del complejo *murinum* (Ourari et al. 2011).

En este trabajo se han analizado siete accesiones de *H. murinum* representando todas las subespecies y citotipos con el objetivo de caracterizar a nivel cromosómico el genoma **Xu** de *Hordeum*, determinar la posible existencia de distintos subgenomas, y en su caso determinar la implicación de los distintos citotipos en el origen de los poliploides. En concreto se pretende: 1) Identificar marcadores tipo SSR analizando la distribución, mediante ND-FISH, de los oligonucleótidos (AG)₁₀, (AAC)₅, (AAG)₅, (ACT)₅, (ATC)₅, y (CCCTAAA)₃; 2) Analizar el patrón de distribución mediante FISH de cinco clones: pTa71, pTa794, pSc119.2, pAs1 y pHch950, previamente utilizadas en los citotipos 2x y 4x de *H. murinum* (de Bustos et al. 1996, Taketa et al. 1999, Ourari et al. 2011), lo que en combinación con los marcadores SSRs posibilitaría la identificación cromosómica/genómica de cada accesión; 3) Analizar la diversidad en y entre la ssp. *murinum* y las formas tetraploides de la ssp. *leporinum*, lo que permitiría aclarar en gran medida las relaciones filogenéticas existentes entre estas taxa y su posible implicación en el origen de las formas hexaploides; 4) Estudiar el apareamiento cromosómico durante la metafase I en tetraploides, con el fin de analizar en detalle los bivalentes formados y 5) Analizar las posibles remodelaciones genómicas que podrían haber ocurrido tras los procesos de poliploidización.

5. 2. Resultados

5.2.1. Nivel de ploidía en *H. murinum*

Entre las accesiones analizadas se encontraron todos los citotipos previamente descritos para el complejo *murinum*. Una accesión, BCC2002, resultó ser diploide ($2n=2x=14$); cinco

accesiones tetraploides ($2n=4x=28$): BCC2007, GRA1021, GRA1144, GRA2735 y GRA2894; y una hexaploide ($2n=6x=42$), GRA1183 (Tabla 3.1). Aunque, para cinco de las siete accesiones investigadas el número de cromosomas se corresponde con el esperado, de acuerdo con su clasificación taxonómica, la accesión GRA2735, que venía clasificada como *ssp. glaucum*, por el banco que proporcionó las semillas, resultó tener $2n=28$ cromosomas en lugar de los $2n=14$ esperados. Además, la accesión GRA1183, supuestamente *ssp. murinum*, resultó tener $2n=42$ cromosomas en lugar de los $2n=28$ que se esperaban. Para confirmar la clasificación taxonómica del material analizado en este trabajo, se hizo una siembra en campo de individuos de todas las accesiones y se procedió a su identificación morfológica siguiendo las claves propuestas por Bothmer et al (1995). Estas claves se basan fundamentalmente en distintos caracteres florales. Así la *ssp. murinum* se diferencia de la *ssp. glaucum* y la *ssp. leporinum* por poseer espiguillas centrales sésiles en lugar de pediceladas. La *ssp. leporinum*, que tiene espiguillas laterales más grandes que la central, se diferencia de la *ssp. glaucum* por la ausencia en esta última de este carácter.

La accesión GRA2735 mostró una morfología típica de la *ssp. glaucum*, incluyendo anteras con puntos morados (Fig. 5.1). Esta accesión representa la primera población descrita con citotipo tetraploide perteneciente a la *ssp. glaucum*. Por otro lado, la accesión GRA1183, supuestamente *ssp. murinum*, mostró las características propias de la *ssp. leporinum* (espiguilla central pedicelada más corta que las espiguillas laterales) lo que le correspondía por su condición hexaploide, tratándose por tanto de un error en la clasificación en el Banco de Germoplasma del que procede.



Figura 5.1. Espiguillas y anteras de la accesión tetraploide GRA2735 mostrando las características distintivas de la *ssp. glaucum*. a) Espiguilla central con pedicelo más larga que las laterales. b) Las tres anteras de una espiguilla central mostrando los puntos morados característicos de esta subespecie.

5.2.2. Análisis cariotípico del citotipo diploide de *H. murinum*

La figura 5.2 muestra los patrones distintivos de hibridación obtenidos con varias sondas repetitivas en metafases mitóticas de la accesión BCC2002.

El análisis de FISH empleando la sonda pTa71 reveló cuatro señales en las constricciones secundarias de dos pares de cromosomas satelizados (Fig. 5.2a). Uno de esos pares también mostraba una señal con la sonda pTa794 en una posición más proximal (Fig. 5.2d). Además, pTa794 hibridó en el brazo corto de otro par cromosómico en posición distal (Fig. 5.2d y j). De este modo, la utilización combinada de las dos sondas ribosomales permite distinguir fácilmente tres pares de cromosomas (Fig. 5.2k, fila superior). La sonda pAs1 mostró un patrón de señales similar entre los diferentes cromosomas, haciendo muy difícil la identificación individual de los mismos (Fig. 5.2f). Con la sonda pSc119.2 no se observó ninguna señal.

El patrón más claro y rico en señales de hibridación se obtuvo con la sonda (AAG)₅, la cual permitió distinguir sin ambigüedades los siete pares de cromosomas homólogos (Fig. 5.2e). (AAC)₅ produjo un patrón similar pero con menor capacidad diagnóstica (Fig. 5.2h). La mayoría de las señales de AAC colocalizaron con las de AAG en las regiones pericentroméricas. Con (AG)₁₀ se observaron señales bien definidas e intensas próximas a los centrómeros de cuatro pares de cromosomas (Fig. 5.2c). En contraste los oligonucleótidos (ATC)₅ (Fig. 5.2b) y (ACT)₅ (Fig. 5.2g) solo generaron señales de baja intensidad y por tanto de poca utilidad como marcadores diagnósticos. Finalmente, aparte de las señales esperadas para la sonda telomérica, en el extremo de todos los brazos cromosómicos, se observó un clúster de repeticiones de la secuencia telomérica intersticial en un par de cromosomas satelizados que mostraban además señales de hibridación con ambas sondas ribosomales (pTa71 y pTa794) (Fig. 5.2i-j).

Una vez analizados los patrones de hibridación para cada sonda de forma independiente, se realizaron experimentos de hibridación múltiple combinando sondas de dos en dos, las cuales fueron detectadas simultáneamente con distinto fluorocromo, re-hibridando sucesivamente (FISH o ND-FISH) las mismas preparaciones (por ejemplo, Fig. 5.2a-f). Esto permitió una caracterización muy detallada de los siete pares de cromosomas homólogos. Con esta información se construyeron los cariotipos ordenando los cromosomas (A-G) en orden decreciente de longitud, colocando el cromosoma satelizado al final, siguiendo la

nomenclatura clásica usada para denominar los cromosomas en las especies pertenecientes a la tribu *Triticeae*, con las que todavía no se han establecido grupos de homeología (Fig. 5.2k).

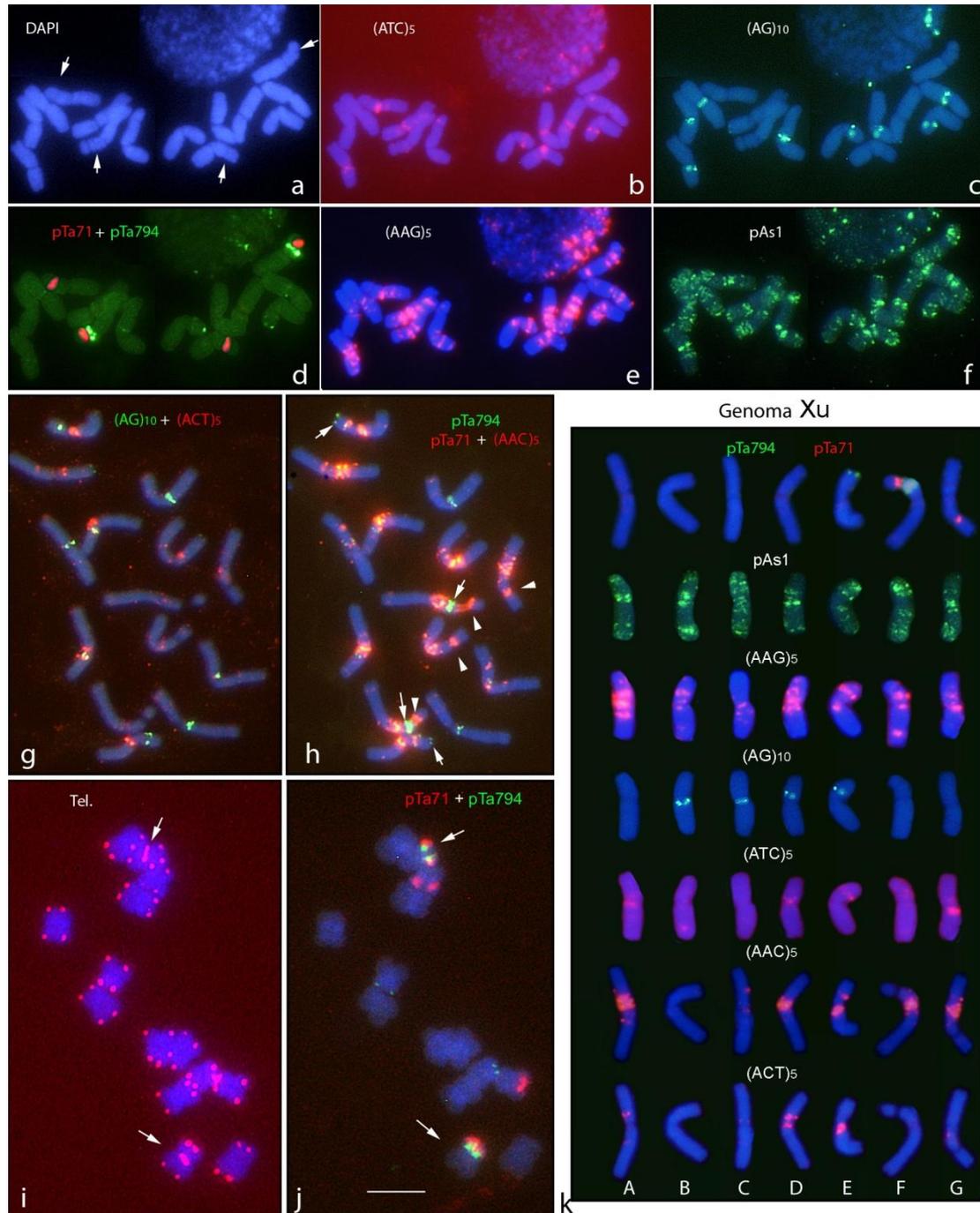


Figura 5.2. Hibridación *in situ* múltiple en tres metafases (paneles a-f; g-h e i-j, respectivamente) de la accesión diploide BCC2002 de *H. murinum* con las sondas indicadas. Algunos paneles muestran las imágenes fusionadas para facilitar la visualización de las señales *in situ* con respecto a la tinción DAPI (azul) (a). En a las flechas apuntan a los dos pares de cromosomas satelizados. En h las flechas y cabezas de flecha señalan la localización de los genes ribosomales 5S y 45S, respectivamente. En i y j las flechas señalan al par de cromosomas con señales teloméricas intersticiales. En k los cariotipos confeccionados con cromosomas seleccionados de las metafases mostradas en g-h (fila superior y las dos inferiores) y a-f (el resto de filas). Barra de escala = 10 µm.

5.2.3. Identificación cromosómica y diversidad cariotípica en las formas tetraploides de *H. murinum*

La figura 5.3 muestra los diferentes patrones de hibridación obtenidos en metafases mitóticas de cinco accesiones tetraploides (BCC2007, GRA1021, GRA1144, GRA2735 y GRA2894) que representan a las tres subespecies de *H. murinum*.

En todas las accesiones tetraploides, la sonda pHch950 hibridó de modo disperso en siete pares de cromosomas (Fig. 5.3a y f). Con la sonda ribosomal pTa71 se detectaron seis señales intensas en la constricción secundaria de tres pares de cromosomas satelizados. Además, se localizaron dos señales de menor intensidad en el brazo largo del par cromosómico metacéntrico de menor tamaño (Fig. 5.3g). También se detectaron seis señales con la sonda pTa794, de las que las cuatro más intensas corresponden a dos pares de cromosomas satelizados (Fig. 5.3g). Con la sonda telomérica, aparte de las señales esperadas en los extremos de los cromosomas, se localizaron señales intersticiales en una de las dos parejas de cromosomas satelizados mostrando (como en los diploides) señales con las sondas pTa71 y pTa794 (Fig. 5.3g-h).

La sonda pSc119.2 generó una serie de señales subteloméricas de diferente intensidad, que variaron de cuatro (en dos pares de cromosomas en las accesiones GRA1021 y BCC2007), a diez (en cuatro pares de cromosomas en la accesión GRA2894) (compárese las Fig. 5.3b y e). Esto es una prueba de la diversidad existente entre las accesiones tetraploides para la presencia/ausencia de esta secuencia repetitiva. Igualmente, (AG)₁₀ mostró señales bien definidas de diferente intensidad en diferentes regiones cromosómicas (desde el centrómero hasta una posición subtelomérica) en cinco o seis pares de cromosomas, dependiendo de la accesión analizada (Fig. 5.3a).

La sonda pAs1 reveló un patrón rico en señales de hibridación en todos los brazos cromosómicos, pero no permitió la identificación individual de todos los cromosomas (Fig. 5.3d y f). No obstante, los 14 pares de cromosomas fueron fácilmente identificados en base al patrón de bandas obtenidas con la sonda (AAG)₅ (Fig. 5.3c-e y Fig. 5.4a). La sonda (AAC)₅ colocalizó generalmente con (AAG)₅ pero el patrón que genera las repeticiones AAC resultó menos diagnóstico, que el obtenido con (AAG)₅ para la identificación cromosómica (Fig. 5.3b). Finalmente, como en la accesión diploide analizada, no se observó ninguna señal diagnóstica para (ATC)₅ o (ACT)₅.

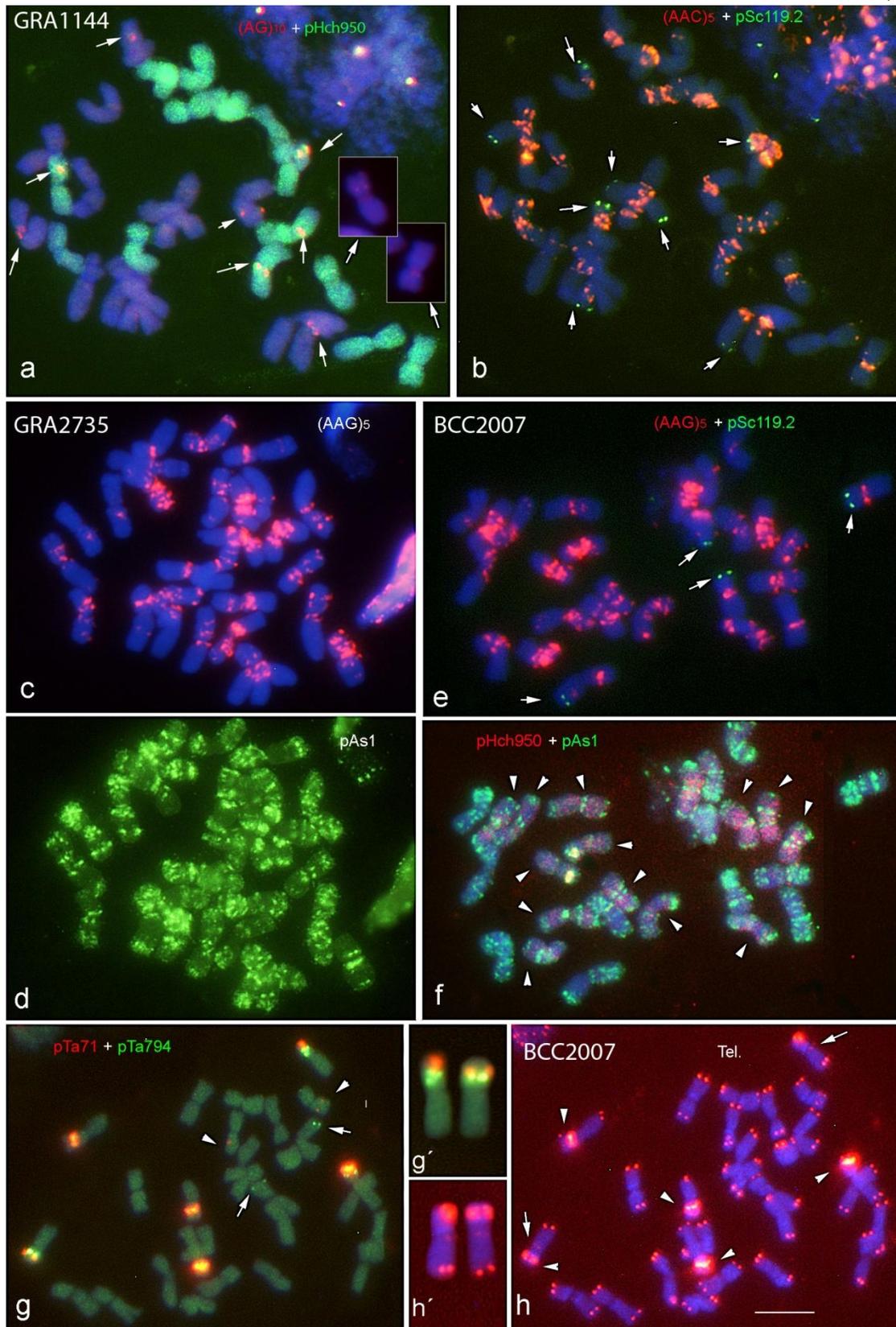


Figura 5.3. Hibridación *in situ* múltiple en metafases de las accesiones GRA1144 (a-b), GRA2735 (c-d) y BCC2007 (e-h) ilustrando los patrones obtenidos con las sondas indicadas en los citotipos tetraploides de *H. murinum*. En a las flechas apuntan a señales (AG)₁₀; el par con señales más débiles se muestra en los recuadros. En b y en e las flechas apuntan a señales pSc119.2. En f las cabezas de flecha apuntan a los 14 cromosomas marcados con pHch950. En g las flechas y cabezas de flecha apuntan a las señales más débiles observadas con pTa794 y pTa71, respectivamente. En h las flechas y cabezas de flecha apuntan a las repeticiones teloméricas intersticiales y las señales más fuertes derivadas de pTa71, respectivamente (ver g). El par de cromosomas satelizados con señales pTa71, pTa794 y secuencias teloméricas intersticiales es ampliado en g' y en h'. Barra de escala = 10 μ m.

Los resultados obtenidos con la sonda pHch950 fueron particularmente importantes para identificar los cromosomas de los dos subgenomas presentes en las accesiones tetraploides (Fig. 5.3 a y f). La sonda pHch950 marcó siete pares de cromosomas, los cuales fueron analizados en detalle con las sondas pTa71, pTa794 y (AAG)₅. Con la excepción de la pareja de cromosomas no satelizados, que mostraban secuencias ribosomales 45S, los restantes cromosomas mostraron tamaños, morfología y patrones de hibridación similares a los caracterizados en la accesión diploide (comparar Fig. 5.2k y Fig. 5.4a). Esto permitió identificar a estos cromosomas como pertenecientes al subgenoma **Xu**. En consecuencia se ordenaron los cromosomas en los cariotipos siguiendo el criterio empleado en la accesión diploide. El par sin homólogo equivalente en los diploides se identificó como G. El mapa físico que generaron las sondas mostró grandes similitudes entre la accesión diploide analizada de la *ssp. glaucum* y el subgenoma **Xu** de las tetraploides (comparar Fig. 5.2k y Fig. 5.4b), aunque se encontraron algunas diferencias menores entre el subgenoma **Xu** y el genoma de las diploides (por ejemplo, la sonda pTa794 no mostró ninguna señal en los cromosomas E de las tetraploides). Es de destacar que el par de cromosomas satelizados de este subgenoma mostró señales de hibridación con ambas sondas ribosomales y el clúster telomérico intersticial, al igual que los cromosomas satelizados F del citotipo diploide (comparar Figs. 5.2j y 5.3g-h).

Una vez que se estableció la identidad de los cromosomas pertenecientes al subgenoma **Xu**, se caracterizaron los restantes cromosomas. Para identificar los cromosomas de este subgenoma, que difieren significativamente en los patrones de hibridación para el conjunto de sondas analizadas de los cromosomas pertenecientes al (sub)genoma **Xu**, se utilizó provisionalmente el símbolo **Xv**. Entre los cromosomas de los subgenomas **Xu** y **Xv**, se pudieron establecer algunas relaciones de homeología. Los dos pares de cromosomas satelizados: cromosoma F (el cual, como el cromosoma F del citotipo diploide y del subgenoma **Xu** de tetraploides, porta ambos genes ribosomales) y G (el cual, como el cromosoma G de la accesión diploide presenta un satélite en el brazo largo) (Fig. 5.3g). Los restantes cromosomas del subgenoma **Xv** (A-E) se ordenaron en orden decreciente de tamaño. Sin embargo, no se pudo establecer ninguna homeología entre estos cromosomas y sus equivalentes en el subgenoma **Xu**.

Finalmente, (AAG)₅ permitió diferenciar fácilmente los 14 pares de cromosomas y en combinación con los patrones de hibridación de las restantes sondas (Fig. 5.3 e-f) facilitó el análisis de la diversidad citogenética existente entre las accesiones (Fig. 5.4a). La accesión GRA2894, que fue la que mostró el mayor número de señales de hibridación con las sondas

pSc119.2 y (AG)₁₀ entre las tetraploides analizadas, fue elegida para representar a los cariotipos de las formas tetraploides basados en las sondas pTa71, pTa794, pAs1, pSc119.2 y (AG)₁₀ (Fig. 5.4b). Los resultados se resumen en la Tabla 5.1.

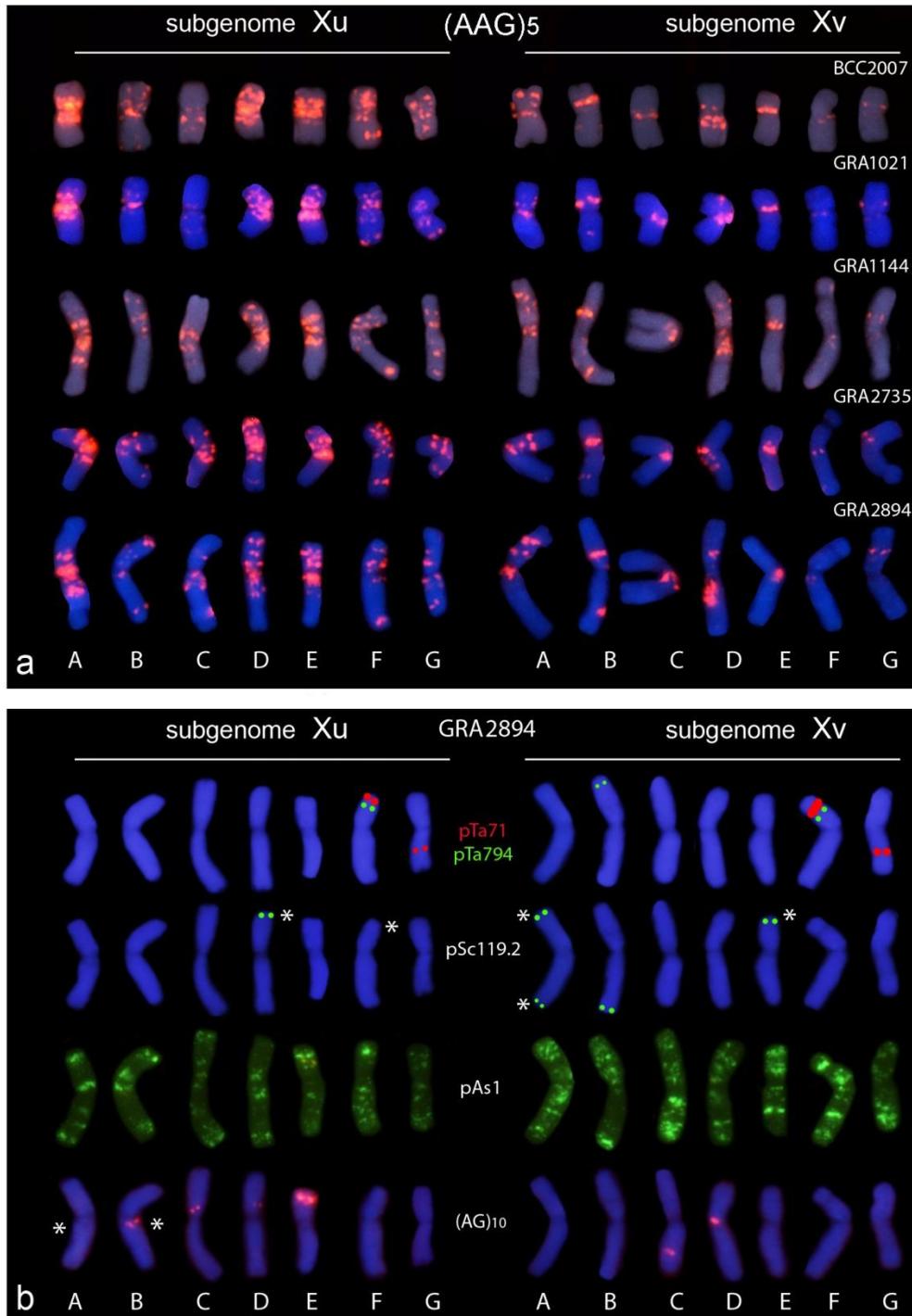


Figura 5.4. Cariotipos: a) de las cinco accesiones analizadas con (AAG)₅. Los cromosomas de cada cariotipo fueron elegidos de la misma metafase. Por ejemplo, la Fig. 6.3c y e muestra las metafases de las accesiones GRA2735 y BCC2007, respectivamente. **b) de GRA2894 para las sondas indicadas.** Indicar que las señales obtenidas con pTa71, pTa794 y pSc119.2 están pintadas sobre cromosomas teñidos con DAPI. Los asteriscos indican sitios polimórficos (presencia/ausencia) observados entre las accesiones tetraploides, como se recoge en los datos presentados en la Tabla 5.1.

ACCESIÓN Subespecie	SONDAS											
	pTa71			pTa794			pSc119.2			(AG) ₁₀		
BCC2002 <i>glaucum</i>	Xu			Xu			Xu			Xu		
	FS			ES						BL		
	GL			FS						CS		
										DS		
										ES		
BCC2007 <i>leporinum</i>	Xu	Xv		Xu	Xv		Xu	Xv		Xu	Xv	
	FS	FS		FS	BS			BL		CS	CL	
	GL	GL			FS			ES		DS	DS	
										ES		
GRA1021 <i>leporinum</i>	FS	FS		FS	BS		FS	BL		CS	CL	
	GL	GL			FS					DS	DS	
										ES		
GRA1144 <i>leporinum</i>	FS	FS		FS	BS		FS	AL		CS	CL	
	GL	GL			FS			BL		DS	DS	
								ES		ES		
GRA2735 <i>glaucum</i>	FS	FS		FS	BS			AL		AL	CL	
	GL	GL			FS			BL		CS	DS	
								ES		DS		
										ES		
GRA2894 <i>murinum</i>	FS	FS		FS	BS		DS	AS		BL	CL	
	GL	GL			FS			AL		CS	DS	
								BL		DS		
								ES		ES		
GRA1183 <i>leporinum</i>	Xu	Xv	Xw	Xu	Xv	Xw	Xu	Xv	Xw	Xu	Xv	Xw
	FS	FS	FS	FS	BS	FS	FL	AS		BL	CL	AS
	GL	GL	GL		FS			AL		CS	DS	BL
								ES		DS		CL
								GS		ES		DS
												EL
												FS

Tabla 5.1. Localización física de cuatro sondas usadas para la caracterización cromosómica del complejo *H. murinum*. Genomas (Xu, Xv y Xw). Cromosomas (A – G). Brazos (S=corto[short], L=largo[long]).

5.2.4. Identificación de los tres subgenomas presentes en el citotipo hexaploide

La figura 5.5 muestra el patrón de hibridación diferencial obtenido utilizando siete sondas en cromosomas metafásicos en la accesión hexaploide GRA1183. Se realizaron cariotipos para mostrar los patrones de distribución de las sondas más significativas (Fig. 5.6).

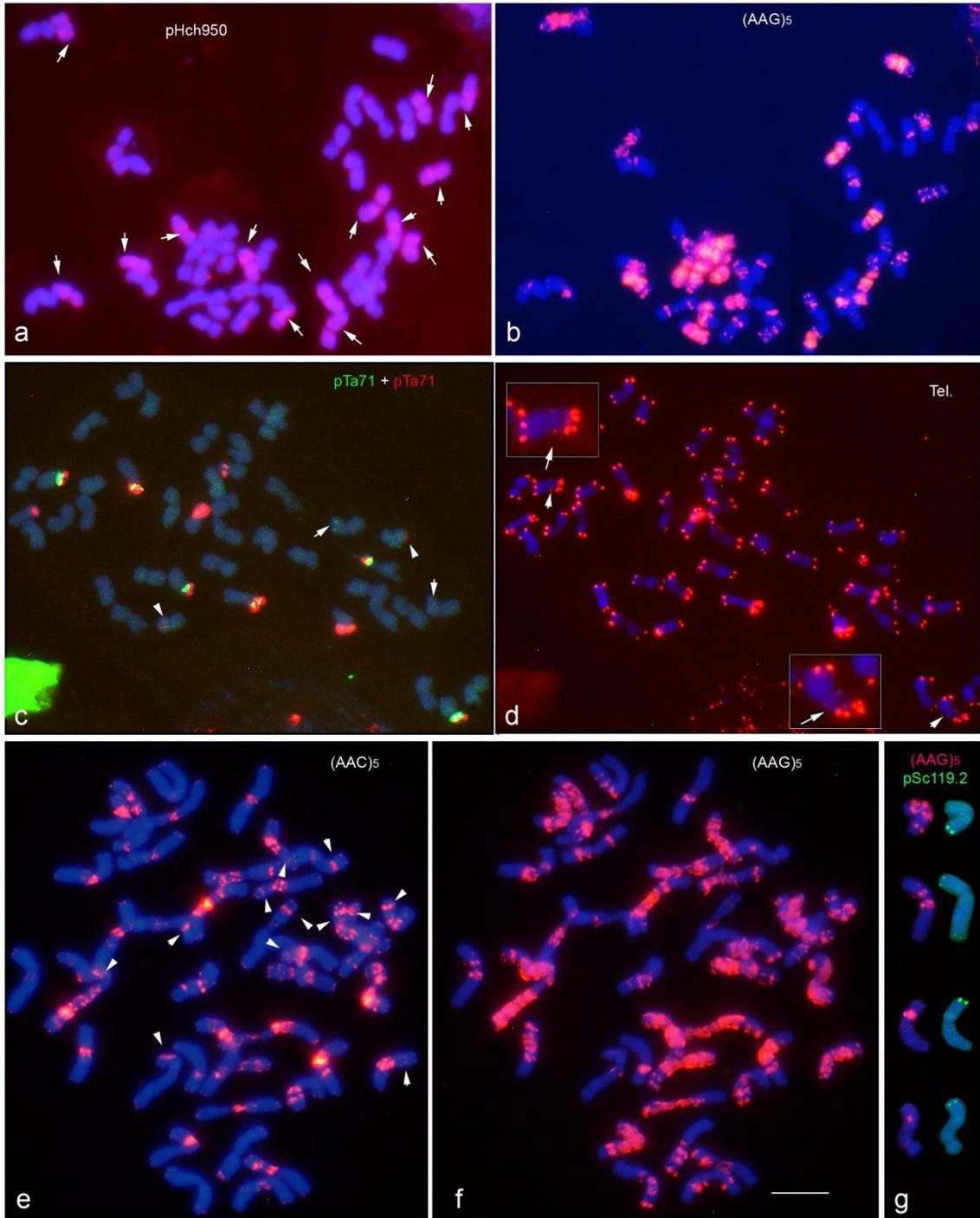


Figura 5.5. Hibridación *in situ* con las sondas indicadas en tres metafases (paneles a-b; c-d y e-g, respectivamente) de la accesión hexaploide GRA1183. Cada panel muestra las imágenes fusionadas para facilitar la visualización de las señales de hibridación con respecto a la tinción DAPI (azul). En **a** las flechas apuntan a los 14 cromosomas marcados con pHch950. En **c** las flechas y cabezas de flecha apuntan los señales más débiles obtenidas con las sondas ribosomales pTa794 y pTa71, respectivamente. En **d** las flechas apuntan a repeticiones teloméricas intersticiales (ampliado en los recuadros). En **e** las cabezas de flecha indican señales de derivadas de la hibridación previa con pTa71. En **g** se muestran los cuatro cromosomas que mostraron señales con pSc119.2 pertenecientes a la metafase mostrada en **e-f**. Barra de escala = 10 μ m.

Se diferencian siete pares de cromosomas que muestran señales de hibridación dispersas con la sonda pHch950 (Fig. 5.6a) al igual que en las accesiones tetraploides. La sonda pTa71 reveló 10 señales intensas en la constricción secundaria de cinco pares de cromosomas satelizados. También se observaron dos señales menores con pTa71 en una pareja de cromosomas pequeños y bastante metacéntricos (Fig. 5.6c). Se detectaron ocho señales con la sonda pTa794, de las que las seis más fuertes se observaron en tres pares de cromosomas satelizados (Fig. 5.6c). Como en los taxones diploides y tetraploides, hay un par de cromosomas satelizados (portando ambos genes ribosomales) que presentan señales teloméricas intersticiales (Fig. 5.6d).

La distribución cromosómica de la sonda pAs1 coincidió con la observada en las formas diploides y tetraploides, aunque resultó en la accesión hexaploide mucho más difícil la diferenciación individual de todos los cromosomas por presentar mas cromosomas de tamaño, morfología y patrones de hibridación similares (Fig. 5.6). Con la sonda pSc119.2 únicamente se observaron diez señales de hibridación localizadas en regiones subtelo méricas de cuatro pares cromosómicos (Fig. 5.5g).

Una vez más, entre los SSRs analizados, el patrón más rico en señales de hibridación se obtuvo con la sonda (AAG)₅ (Fig.5.5b y f). Las señales de (AAC)₅ coincidieron principalmente con agrupaciones de repeticiones AAG, aunque algunos cromosomas que se mostraron muy ricos en señales (AAG)₅ resultaron no tener señales equivalentes con (AAC)₅ (Fig. 5.5e-f). Al igual que en las accesiones diploides y tetraploides, no se observó ninguna señal consistente ni con los oligonucleotidos (ACT)₅ ni con (ATC)₅. Finalmente, se observaron señales discretas con (AG)₁₀ en diferentes localizaciones en 12 pares de cromosomas (Fig. 5.6).

Para caracterizar los subgenomas presentes en el citotipo hexaploide se siguió la misma estrategia empleada para la caracterización de los subgenomas de las accesiones tetraploides. En primer lugar, se analizaron en detalle los siete pares de cromosomas identificados con pHch950 tras rehibridaciones sucesivas con las sondas pTa71, pTa794 y (AAG)₅. Fue muy significativo que este grupo de cromosomas mostrara la misma morfología y patrones de hibridación que los cromosomas pertenecientes al subgenoma **Xu** de las accesiones tetraploides. Por otro lado, los 14 pares de cromosomas restantes, los cuales no mostraron hibridación con la sonda pHch950, fueron fácilmente separados en dos grupos de siete pares de cromosomas cada uno. De hecho siete pares de cromosomas mostraban en conjunto una morfología y patrones de hibridación, para las distintas sondas utilizadas para su caracterización, similar a los cromosomas del subgenoma **Xv** presente en las accesiones

tetraploides. Los siete cromosomas fueron fácilmente identificados comparando en detalle los patrones de hibridación (Fig. 6.6b). El otro grupo, integrado por cromosomas que mostraban un patrón especialmente muy rico en señales $(AAG)_5$, fue designado con el símbolo **Xw** (Fig. 6.7). Las sondas pTa794 y pTa71 permitieron identificar en el subgenoma **Xw** a un par de cromosomas satelizados que mostraban ambos genes ribosomales en posiciones similares a los que mostraron los cromosomas F pertenecientes a los subgenomas **Xu** y **Xv**, y por lo tanto fueron designados con la misma letra. De la misma manera, el otro par de cromosomas satelizado fue identificado como el par G (Fig. 6.6c). Los restantes cromosomas pertenecientes al subgenoma **Xw** (A-E) se ordenaron en los cariotipos en base al tamaño cromosómico. Una vez más, no se pudieron establecer homeologías entre estos cromosomas y los de los subgenomas **Xu** y **Xv**.

Finalmente se llevó a cabo la identificación de los cromosomas que mostraron señales con las sondas $(AG)_{10}$ y pSc119.2 tras su rehibridación con $(AAG)_5$ (Fig. 5.5g). Los cromosomas con señales $(AG)_{10}$ pertenecían a los tres subgenomas. Es significativo que las señales observadas en los cromosomas de los subgenomas **Xu** y **Xv** coincidían con las observadas en los respectivos cromosomas de las accesiones tetraploides. Es de destacar que, al igual que en la accesión diploide (genoma **Xu**) en la hexaploide no se observó ninguna señal con la sonda pSc119.2 en los cromosomas pertenecientes al subgenoma **Xw** (Fig.5.6, Tabla 5.1).

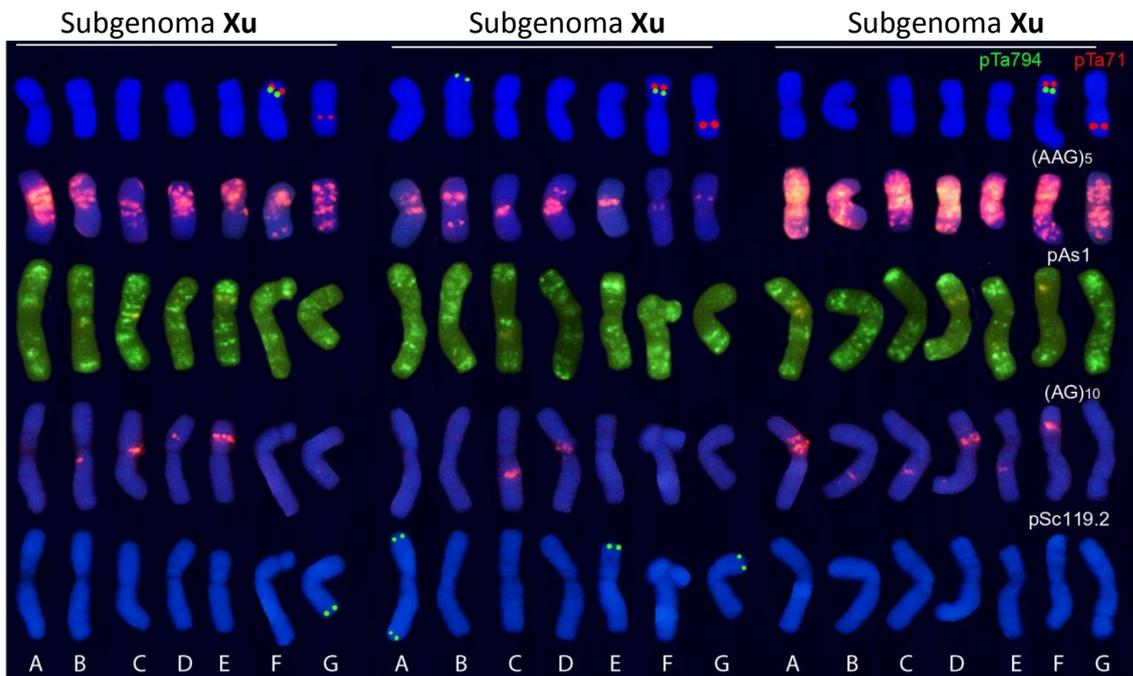


Figura 5.6. Cariotipos de la accesión hexaploide GRA1183 con las sondas indicadas. Los cromosomas escogidos para confeccionar los distintos cariotipos fueron elegidos de la misma metafase; por ejemplo, de la metafase mostrada en la Fig. 5.6b se seleccionaron los cromosomas hibridados con $(AAG)_5$. Destacar que las señales pTa71, pTa794 y pSc119.2 están pintadas sobre los cromosomas teñidos con DAPI.

5.2.5. Comportamiento meiótico de los cromosomas

Una vez establecido el mapa físico de los cromosomas mitóticos de cada una de las accesiones tetraploides analizadas fue posible llevar a cabo un análisis detallado, en células madre de polen, del comportamiento meiótico de sus cromosomas en metafase I. Mediante experimentos secuenciales (FISH y ND-FISH) utilizando combinaciones de sondas se pudo identificar inequívocamente los bivalentes. Como se muestra en la figura 5.7 solo se formaban bivalentes (principalmente tipo anillo). No se observaron univalentes ni asociaciones multivalentes. En todas las accesiones tetraploides, los bivalentes solo implicaban cromosomas homólogos (**Xu-Xu** y **Xv-Xv**), con independencia del grupo taxonómico al que pertenecen.

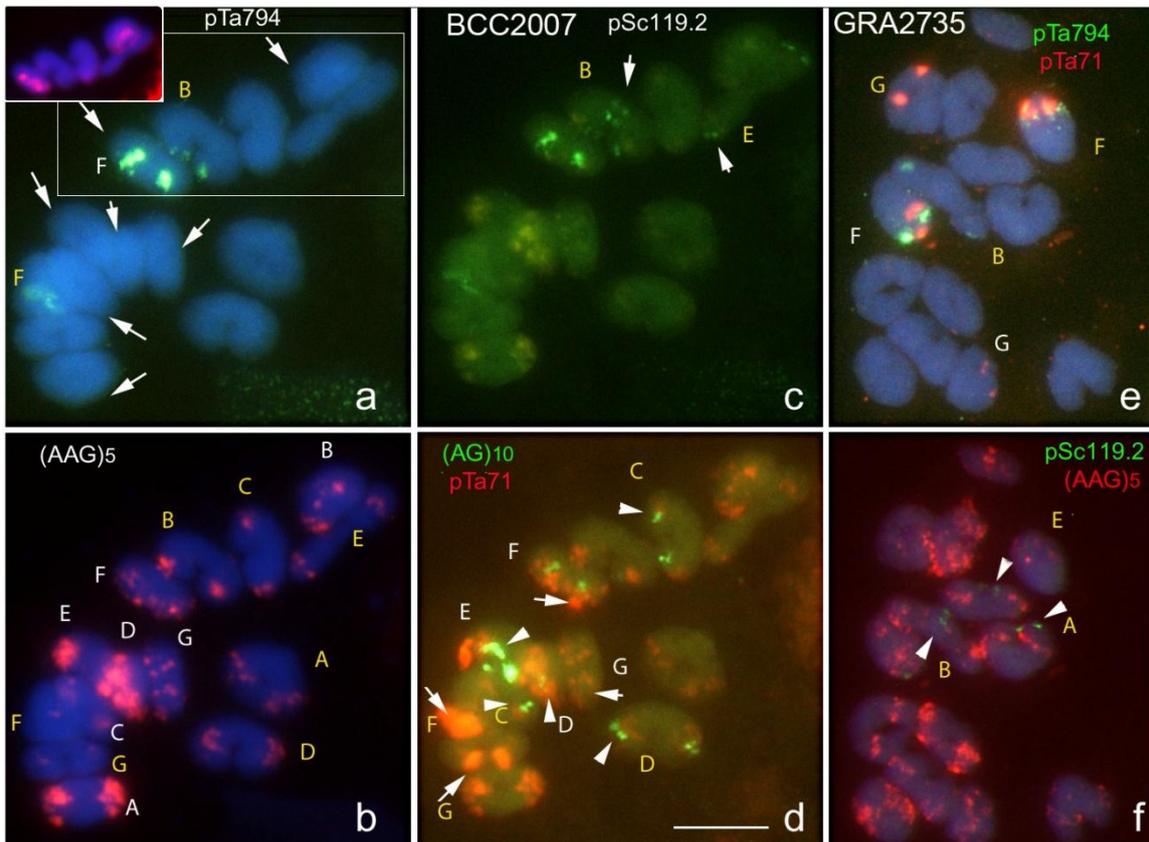


Figura 5.7. Microfotografías mostrando metafases I de la meiosis de las accesiones tetraploides BCC2007 (a-d) y GRA2735 (e-f) hibridados con las sondas indicadas. La identidad de los bivalentes **Xu-Xu** y **Xv-Xv** se indica en letras blancas y amarillas, respectivamente. En **a** las flechas apuntan a los siete bivalentes marcados con pHch950 (algunos de ellos destacados en el recuadro). En **c** las flechas señalan los bivalentes que mostraron señales pSc119.2. En **d** las flechas y cabezas de flecha señalan las señales obtenidas con las sondas (AG)₁₀ y pTa71, respectivamente. En **f** las cabezas de flecha apunta a señales pSc119.2. Barra de escala = 10µm.

5.3. Discusión

5.3.1. Identificación de los cromosomas de *H. murinum* L.

Un paso importante para entender la estructura y evolución del genoma de una especie es la discriminación inequívoca de sus cromosomas. En este trabajo se demuestra por primera vez que es posible la identificación individualizada de cada par de cromosomas presente en todas las subespecies/citotipos de *H. murinum*. Al igual que en estudios previos, los cinco clones utilizados como sondas (pTa71, pTa794, pAs1, pHch959 y pSc119.2) fueron insuficientes para la identificación fiable de la mayoría de los cromosomas (de Bustos et al. 1996, Ourari et al. 2011, Taketa et al. 2000). Sin embargo, el patrón de distribución de varios SSRs resultó muy diagnóstico en su identificación. De hecho, el uso de (AAG)₅, fue suficiente para distinguir fácilmente todos los cromosomas de manera individual. El uso de una única sonda para la identificación cromosómica facilita la localización física de otras secuencias en experimentos de hibridación *in situ*. Con la excepción de (ACT)₅ y (ATC)₅ (que no fueron eficientes como marcadores cromosómicos), las sondas SSRs usadas en este trabajo permitieron establecer un mapa físico saturado con abundantes señales diagnósticas distribuidas a lo largo de todos los brazos cromosómicos en todas las subespecies/citotipos de *H. murinum*.

Está bien documentado que varios miembros de la tribu *Triticeae* muestran locus 5S en el brazo corto de los cromosomas pertenecientes al grupo de homeología 5 (por ejemplo, trigo, centeno y *H. bulbosum*), mientras los genes 45S están comúnmente agrupados en posiciones concretas de los cromosomas pertenecientes a los grupos de homeología 5 y 6 (por ejemplo en cebada y *H. chilense*) (e.g. Cuadrado y Jouve 1994, Cabrera et al. 1995, Pickering et al. 2006). En base a la localización de estos loci ribosomales, los cromosomas F y G pertenecientes a los tres subgenomas (**Xu**, **Xv** y **Xw**) deberían ser asignados respectivamente a los grupos de homeología 5 y 6. Estas supuestas homeologías habrían de ser demostradas mediante un análisis de conservación de grupos sintéticos en estudios posteriores. Ya que se pueden identificar los cromosomas de *H. murinum* en bivalentes meióticos, aplicando FISH y ND-FISH, la aplicación de estas técnicas para analizar el apareamiento en híbridos de *H. murinum* con *H. vulgare* permitiría avanzar en el conocimiento de estas relaciones, de forma similar al estudio de las homeologías en *H. bulbosum* tras analizar sus híbridos con *H. vulgare* (Pickering et al. 2006).

5.3.2. El origen de los poliploides en el complejo *H. murinum*

La posibilidad de distinguir grupos de siete pares de cromosomas tanto en las formas tetraploides como en las hexaploides ha resultado muy importante en relación con el debatido origen de las formas poliploides de *H. murinum*. En este trabajo se demuestra que los cromosomas presentes en el citotipo diploide de la ssp. *glaucum* muestran una morfología y patrones de hibridación *in situ* muy similar al grupo de cromosomas que hibridan con la sonda pHch950 en los citotipos tetraploide y hexaploide. Esto apoya la idea de que la ssp. *glaucum* es el donante diploide del subgenoma **Xu** presente en los poliploides de *H. murinum* lo que corrobora la suposición de Rajhathy y Morrison (1962) quienes, basándose en estudios de meiosis, afirman que uno de los subgenomas presente en la ssp. *murinum* proviene ssp. *glaucum*.

No se conoce casi nada sobre la posible identidad del progenitor no-*glaucum*. Recientes filogenias moleculares han indicado que los progenitores diploides involucrados en el origen de los poliploides debieron pertenecer, junto con la ssp. *glaucum*, al mismo grupo de especies originado tras la separación de sus parientes más próximos, es decir del grupo formado por *H. vulgare* y *H. bulbosum* (Tanno et al. 2010, Brassac et al. 2012, Ourari et al. 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo reflejan que hay diferencias sustanciales en la cantidad y distribución de determinadas secuencias repetidas entre los subgenomas presentes en los poliploides. Así, incluso asumiendo que los genomios **Xu**, **Xv** y **Xw** tienen un origen monofilético, su separación de un ancestro común debió haber ocurrido en una etapa relativamente temprana. El análisis cromosómico detallado de otras formas diploides de *Hordeum* y especies de *Triticeae* emparentadas podría dar nuevas pistas sobre la identidad de los progenitores donantes de los subgenomas **Xv** y **Xw**, o apoyar la hipótesis sugerida por Jakob y Blattner (2010) de que estos genomas provienen de especies diploides de *Hordeum* hoy extintas.

Independientemente de la identidad de los parentales donadores de los cromosomas no-*glaucum*, a la vista de los resultados aquí presentados, la especie donante del subgenoma **Xv** debería haber sido común a todas las formas tetraploides, con independencia de la subespecies a la que pertenezcan, es decir *glaucum*, *murinum* o *leporinum*. De hecho solo se han observado mínimas diferencias al comparar cariotipos de las cinco accesiones tetraploides, pese al significativo número de sondas utilizadas en este trabajo. Más aun, los patrones de los cromosomas pertenecientes a los subgenoma **Xu** y **Xv** en el citotipo hexaploide son básicamente idénticos a los cromosomas correspondientes presentes en los tetraploides,

indicando un origen común y poca divergencia genómica tras la adicción del tercer subgenoma **Xw**.

5.3.3. Remodelación genómica y poliploidía

La alopoloidía ha sido un mecanismo importante en la rápida evolución genómica de los miembros de *Triticeae* (Ozkan y Feldman 2009, Shaked et al. 2001, Han et al. 2005). El trabajo aquí presentado aporta datos interesantes sobre la coevolución de los subgenomas **Xu**, **Xv** y **Xw** tras los procesos de poliploidización. En general, los cromosomas pertenecientes al mismo subgenoma en los diferentes niveles de ploidía son muy similares, sugiriendo que no se han producido importantes alteraciones cariotípicas tras la poliploidización. Solo el cromosoma G del subgenoma **Xu** presente en los poliploides parece no tener un equivalente en el citotipo diploide. Esto coincide con análisis previos en la ssp. *glaucum* que indican que entre sus 14 cromosomas solo se observan dos pares de cromosomas satelizados, aquí nombrados F y G, (Taketa et al. 2000; Fig. 6.2k), mientras que solo un par de cromosomas satelizados (F) estaría presente en el subgenoma **Xu** de las poliploides (de Bustos et al. 1996, Ourari et al. 2011). La reorganización genómica tras la poliploidización podría haber conducido al reemplazo del cromosoma satelizado G observado en los diploides (con fuerte señal de hibridación con pTa71) por el pequeño cromosoma metacéntrico observado en las formas tetraploides y hexaploides, que pese a no mostrar satélite presenta señales menos intensas con la sonda pTa71. La delección de genes 45S explicaría perfectamente esta diferencia, ya que tanto la delección como la inactivación de genes ribosomales es una característica común frecuentemente observable tanto en híbridos como en poliploides de tribu *Triticeae*.

En alopoloides también son comunes las translocaciones intergenómicas. Un ejemplo de esto es la translocación cíclica que implica a los cromosomas 4A, 5A y 7B del trigo (Naranjo 1990). En este análisis, no se han observado translocaciones. No obstante y a diferencia de los resultados obtenidos en el citotipo diploide, el cual no muestra señales con pSc119.2 (Taketa et al. 2000, Gupta et al. 1989), se observaron señales subteloméricas con esta sonda en un cromosoma perteneciente al subgenoma **Xu** en tres accesiones tetraploides y en la accesión hexaploide. Esto podría sugerir la presencia de una translocación terminal o tal vez una remodelación cromosómica mediada por transposición tras la alopoloidización. La presencia de señales pSc119.2, en la misma localización del cromosoma F perteneciente al subgenoma **Xu** en dos accesiones pertenecientes a la ssp. *leporinum* (de Italia y Francia) pudiera indicar un

origen ancestral común de estas poblaciones. En contraste, las repeticiones teloméricas intersticiales observadas en el cromosoma F pertenecientes al subgenoma **Xu**, invariablemente encontradas en las siete accesiones aquí analizadas, sugiere que este reordenamiento cromosómico es una característica ancestral del genoma **Xu**. La intersticialización de secuencias teloméricas habría ocurrido antes de la diversificación de *H. murinum* pero después de la separación de los genomas **Xu** y **H**, ya que en *H. vulgare* no se han descrito señales teloméricas intersticiales (Cuadrado et al. 2009).

5.3.4. Taxonomía del complejo *H. murinum*

El complejo *H. murinum* es probablemente uno de los grupos más y mejor estudiados del género *Hordeum*. Sin embargo, el tratamiento taxonómico en *H. murinum* siempre ha sido controvertido. Aunque es generalmente aceptada la división de *H. murinum* en tres subespecies –*glaucum*, *murinum* y *leporinum* (Bothmer y Linde-Laursen 1995)- sus diferencias geográficas y ecológicas han llevado a algunos autores a proponer su tratamiento como especies separadas: *H. glaucum* Steudel, *H. murinum sensu stricto* y *H. leporinum* Link (Smith 1972, Baum y Bailey 1990). Otro problema del complejo es el estatus taxonómico de las diferentes formas citológicas de la ssp. *leporinum*, las cuales no están reconocidas como taxones diferentes al no presentar rasgos morfológicos que permitan diferenciarlas (Bothmer et al. 1995). Un resultado inesperado de este trabajo fue la presencia de 28 cromosomas en la accesión GRA2735, caracterizada como ssp. *glaucum* en la información aportada por el banco de semillas y posteriormente confirmado en este trabajo. Este es la primera vez que se describe una forma tetraploide de la ssp. *glaucum*. Además ha quedado patente que algunas accesiones como GRA1183 pueden estar mal clasificadas.

Los cariotipos presentados en este trabajo muestran como el grado de similitud observable entre las tres accesiones tetraploides pertenecientes a la ssp. *leporinum* no es mayor que si se comparan con las accesiones tetraploides clasificadas taxonómicamente como ssp. *glaucum* y ssp. *murinum*. Esto coincide con numerosos estudios filogenéticos que son incapaces de separar los citotipos tetraploides de las subespecies *leporinum* y *murinum*. De hecho, análisis poblacionales previos analizando varias características morfológicas, tanto cuantitativas como cualitativas, y diferentes tipos de marcadores moleculares no han sido capaces de revelar diferencias entre poblaciones tetraploides clasificadas como taxones diferentes (Giles y Lefkovitch 1986, Baum y Bailey 1990, Savova-Bianchi et al. 2002, El-Rabey et al. 2002). Para

explicar estos resultados se han propuesto diferentes opciones. Algunos autores sugieren que las diferentes subespecies formarían una clina morfológica continua fuertemente correlacionada con variables bioclimáticas (Ourari et al. 2011). Otros proponen la existencia de híbridos entre las subespecies *murinum* y *leporinum* (El-Rabey et al. 2002), por lo que que la separación de estos taxones debe de haber ocurrido recientemente (Jakob y Blatter 2010). Los resultados aquí expuestos sugieren que todas las formas tetraploides del complejo *murinum* deberían ser incluidas dentro de la misma especie. A la vista de estos resultados, parece cuestionable el tratamiento taxonómico de *H. murinum* basado exclusivamente en criterios morfológicos y se sugiere tratar al complejo *H. murinum* como tres especies de acuerdo con su nivel de ploidía: la diploide *H. glaucum* (genoma **Xu**), la tetraploide *H. murinum* (genoma **XuXv**) y la hexaploide *H. leporinum* (genoma **XuXvXw**).

6. SSRs y caracterización del genoma Xa de *Hordeum*. Nuevos datos en la historia evolutiva de *H. marinum* Huds.

El contenido de este capítulo se corresponde con la publicación: The evolutionary history of sea barley (*Hordeum marinum*) revealed by comparative physical mapping of repetitive DNA. **Carmona A**, Frierio E, de Bustos A, Jouve N, Cuadrado A (2013). *Annals of Botany* 112:1845-1855.

Los resultados se han presentado en formato poster en la 19th International Chromosome Conference celebrado en Bologna (Italia) en 2013. On the origin of tetraploids *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum*. **Carmona A**, de Bustos A, Jouve N, Cuadrado A. Libro de resúmenes pg. 126.

6.1. Introducción

Las cebadas marinas constituyen el grupo de especies de *Hordeum* con genoma **Xa**. Son especies anuales y autógamas generalmente confinadas a vegas salinas, pantanos costeros o de interior, lechos de río, terrenos baldíos y pastizales. Taxonómicamente se reconocen como una única especie, *Hordeum marinum* Huds., incluyendo dos subespecies. La diploide *H. marinum* ssp. *marinum* ($2n=2x=14$) y *H. marinum* ssp. *gussoneanum* con citotipos diploides ($2n=2x=14$) y tetraploides ($2n=4x=28$). La subespecie *marinum* es nativa de la región Mediterránea, especialmente de la zona oeste. De los dos citotipos que presenta la ssp. *gussoneanum*, el diploide se distribuye principalmente en la zona este del Mediterráneo y el suroeste asiático, mientras que el tetraploide se distribuye principalmente entre Turquía y Afganistán (Bothmer et al. 1995). Las formas diploides de estas dos subespecies coexisten a lo largo de la región Mediterránea siendo de morfología claramente distinguible. Sin embargo no existen rasgos morfológicos que distingan las formas diploides y tetraploides de la ssp. *gussoneanum*, por lo que actualmente no son reconocidas como taxones diferentes (Bothmer et al. 1995).

La presencia de este grupo de cebadas silvestres, que han llegado a colonizar incluso Australia, es un buen indicador de suelos en proceso de salinización. Su interés, desde el punto de vista agronómico reside en su gran tolerancia a altas concentración de sales y condiciones de estrés hídrico. Desde que se obtuvieron los primeros anfigenomas trigo-*H. marinum* (Colmer et al. 2005), las cebadas marinas se vienen utilizando en distintos programas de mejora con el objetivo de introducir genes relacionados con estas características en distintas variedades de trigo.

Las relaciones evolutivas dentro de este grupo son a día de hoy imprecisas. Incluso existe controversia sobre el origen polifilético o monofilético del grupo, en parte por los conflictos que existen entre las filogenias moleculares derivadas del análisis de secuencias del genoma de cloroplastos y las que incluyen el análisis del genoma nuclear (Blattner 2009, Petersen et al. 2011). Tras décadas de debate, sigue habiendo muchas dudas sobre el origen auto- o aloploiploide del citotipo tetraploide de la ssp. *gussoneanum*. Durante muchos años han sido considerados autoploides en base a estudios citogenéticos (Bothmer et al. 1989, Linde-Laursen et al. 1992) y, aunque algunas filogenias moleculares siguen apoyando este origen (Jakob et al. 2007), recientes análisis moleculares parecen apoyar la hipótesis de un origen aloploide. No obstante, mientras algunos de estos últimos estudios sugieren que el citotipo tetraploide de la ssp. *gussoneanum* se habría originado por hibridación entre formas

diploides de las subespecies *gussoneanum* y *marinum* (Kakeda et al. 2009, Blattner 2009), otros indican que una especie diploide (desconocida o extinta), pero no la ssp. *marinum* habría intervenido en el origen (Komatsuda et al. 2001, Brassac et al. 2012).

El objetivo de este capítulo ha sido caracterizar el genoma **Xa** de *Hordeum* y aportar nuevos datos sobre la historia evolutiva de *H. marinum*. Si la ssp. *marinum* y formas diploides de la ssp. *gussoneanum* hubieron estado implicadas en el origen de las formas tetraploides sus cromosomas deberían estar presente en estas. Para poder demostrar esta hipótesis se han seleccionado cinco accesiones representando todas las subespecies y citotipos de *H. marinum*. En concreto se pretende: 1) Identificar marcadores cromosómicos tipo SSRs analizando la distribución, mediante ND-FISH, de los oligonucleótidos (AG)₁₀, (AAC)₅, (AAG)₅, (ACT)₅, y (ATC)₅, algunos de los cuales, como se ha mostrado en los capítulos anteriores, resultaron muy útiles en la caracterización de los cromosomas de otras especies de *Hordeum*; 2) Combinar los marcadores diagnósticos tipo SSRs con cuatro clones: pTa71, pTa794, pSc119.2, y pAs1, cuyos patrones de distribución FISH, según de Bustos et al. (1996), permiten discriminar entre subespecies y 3) Analizar a nivel cromosómico la diversidad en y entre las subespecies y si es posible establecer relaciones de homología entre sus cromosomas, lo que permitiría aportar nuevos datos sobre las relaciones existentes entre ellas.

6.2. Resultados

6.2.1. Análisis cariotípico de la ssp. *marinum*

La figura 1 muestra los patrones diferenciales de hibridación *in situ* obtenidos con las sondas pTa71, pTa794, pSc119.2, pAs1, (AAC)₅, (AAG)₅, (ACT)₅ y (ATC)₅ en cromosomas metafásicos de tres accesiones de la ssp. *marinum* (BCC2001, GRA963 y GRA1078).

La sonda pTa71 mostró señales específicas únicamente en la constricción secundaria del par de cromosomas satelizado en las tres accesiones. La sonda pTa794 reveló dos pares de señales de hibridación comunes en las tres accesiones. Se observó un locus para los genes ribosomales 5S en el par de cromosomas satelizados, en ocasiones manifestado como un par de señales de hibridación muy próximas. Se localizó además otro locus en posición distal en el brazo largo de cromosomas más pequeños y metacéntricos. Además, en la accesión GRA963 se observó un par extra de señales débiles 5S en el brazo largo de otro par de cromosomas metacéntricos (Fig. 6.1a).

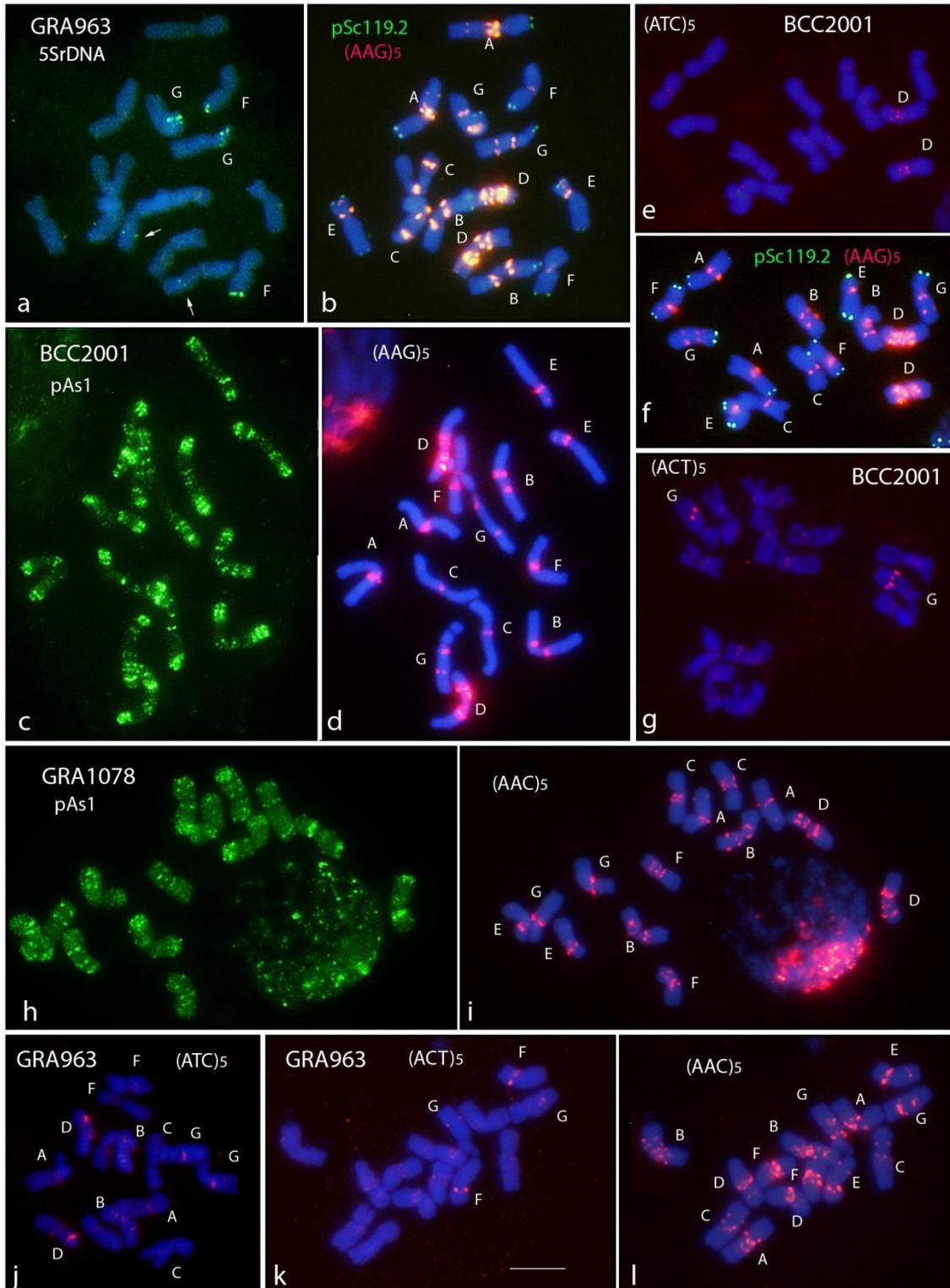


Figura 6.1. Hibridación *in situ* múltiple con las sondas indicadas en metafases somáticas de tres accesiones de la *ssp. marinum*: GRA963 (a-b y j-l), BCC2001 (c-g) y GRA1078 (h-i). Varios paneles muestran imágenes fusionadas para facilitar la visualización de señales de hibridación (verde y rosa/rojo con sondas marcadas con digoxigenina y biotina, respectivamente) con respecto a la tinción DAPI (azul). En algunos paneles, con letras, se indica la identidad de los cromosomas. Las flechas en **a** indican el par de cromosomas que presenta un locus intersticial para los genes 5S. Barra de escala = 10 μ m.

La sonda pSc119.2 generó señales subteloméricas de diferente intensidad en número variable desde 14 [en cuatro pares de cromosomas en la accesión BCC2001 y seis pares de cromosomas en la accesión GRA963 (Fig. 6.1b)] hasta 16 señales (en cinco pares de cromosomas en la accesión GRA1078). Estos resultados indican la existencia de diversidad entre las accesiones de la *ssp. marinum* en relación con la presencia/ausencia de esta secuencia repetida en determinadas localizaciones cromosómicas. Por otro lado, la sonda pAs1 reveló un patrón muy rico en señales de hibridación de diferente intensidad, distribuidas a lo largo de la longitud de todos los brazos cromosómicos, especialmente concentradas en las regiones subteloméricas. Dado que algunos cromosomas muestran patrones muy parecidos con esta sonda, la identificación individual de los mismos resultó difícil. Sin embargo, en líneas generales existe una mayor similitud en el patrón de distribución de pAs1 entre las accesiones BCC2001 y GRA1078, que entre cualquiera de estas y la accesión GRA963 (comparar Fig. 6.1c y h).

No se observó ningún clúster de repeticiones AG en los cromosomas de la *ssp. marinum* tras hibridar con (AG)₁₀, incluso aumentando los tiempos de exposición en la captura de las imágenes. Las sondas (ACT)₅ (Fig. 6.1g y k) y (ATC)₅ (Fig. 6.1e y j) mostraron en general señales de intensidad tan débil que no resultaban de utilidad como marcadores cromosómicos. Por lo tanto no se intentó caracterizar su patrón de hibridación *in situ* en detalle. En contraste, (AAG)₅ y (AAC)₅ revelaron un patrón rico e intenso de señales, especialmente localizadas en la región pericentromérica (Fig. 6.1b, d, f, i y l) pero característico de cada pareja de cromosomas homólogos. La posibilidad de identificar de forma rápida y sencilla los siete pares cromosómicos con (AAG)₅ permitió caracterizar en detalle el patrón de hibridación de cada una de las restantes sondas y el establecimiento de relaciones de homología entre los cromosomas de las diferentes accesiones en experimentos de hibridación múltiple incluyendo esta sonda.

La figura 6.2 muestra los cariotipos de las tres accesiones. Continuando con criterios clásicos los cromosomas, designados con letras (A-G), fueron ordenados en los cariotipos en orden decreciente de su longitud, colocando el cromosoma satelizado al final. No se detectó polimorfismo entre los individuos de la misma accesión. Por el contrario, la comparación de los cariotipos permitió analizar la diversidad cariotípica observada entre las tres accesiones estudiadas de la *ssp. marinum* en relación con la presencia/ausencia y/o intensidad de las señales polimórficas obtenidas con algunas de las sondas analizadas.

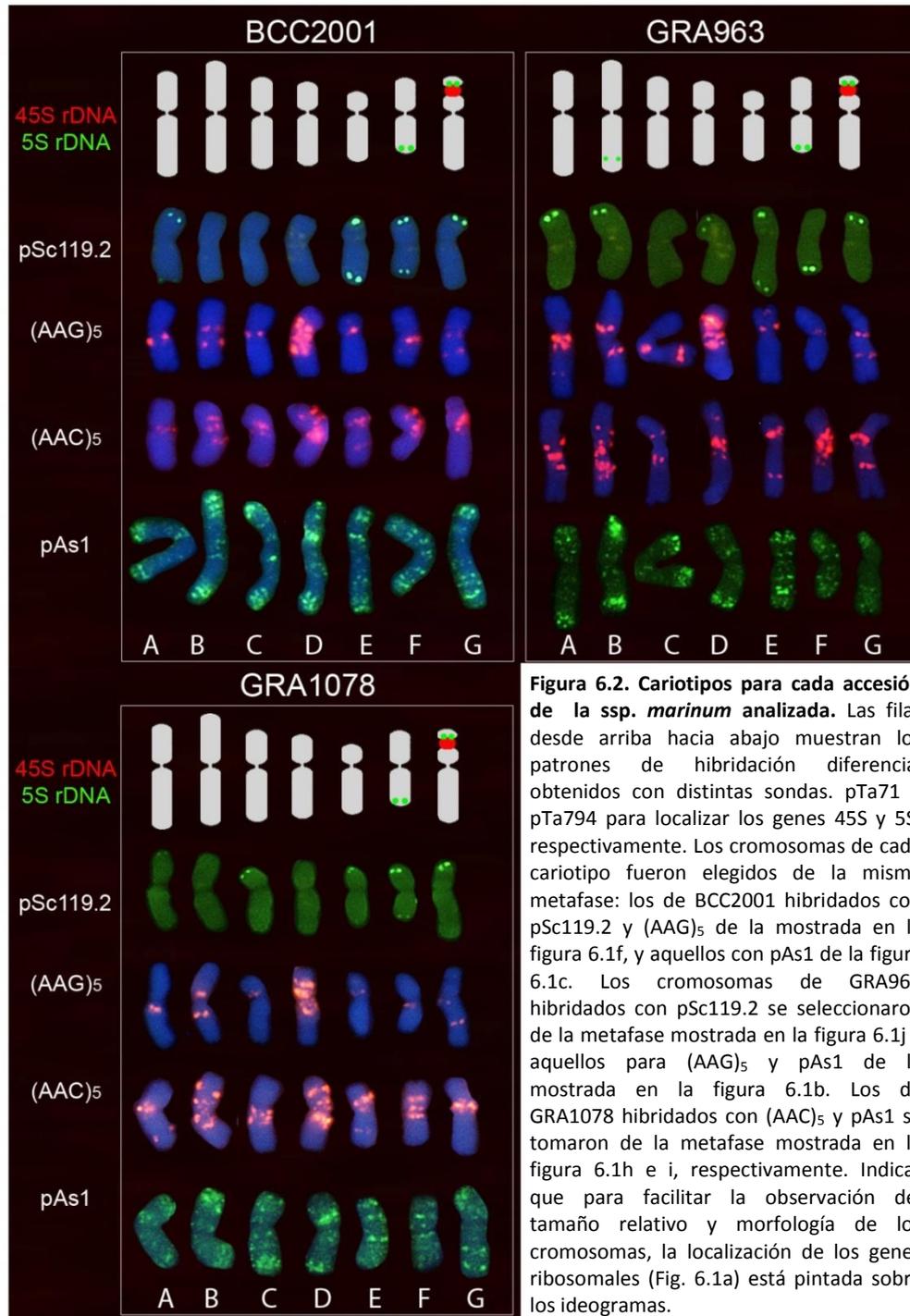


Figura 6.2. Cariotipos para cada accesión de la *ssp. marinum* analizada. Las filas desde arriba hacia abajo muestran los patrones de hibridación diferencial obtenidos con distintas sondas. pTa71 y pTa794 para localizar los genes 45S y 5S, respectivamente. Los cromosomas de cada cariotipo fueron elegidos de la misma metafase: los de BCC2001 hibridados con pSc119.2 y (AAG)₅ de la mostrada en la figura 6.1f, y aquellos con pAs1 de la figura 6.1c. Los cromosomas de GRA963 hibridados con pSc119.2 se seleccionaron de la metafase mostrada en la figura 6.1j y aquellos para (AAG)₅ y pAs1 de la mostrada en la figura 6.1b. Los de GRA1078 hibridados con (AAC)₅ y pAs1 se tomaron de la metafase mostrada en la figura 6.1h e i, respectivamente. Indicar que para facilitar la observación del tamaño relativo y morfología de los cromosomas, la localización de los genes ribosomales (Fig. 6.1a) está pintada sobre los ideogramas.

6.2.2. Análisis cariotípico del citotipo diploide de la *ssp. gussoneanum*

Se llevo a cabo análisis cariotípico de dos accesiones diploides de la *ssp. gussoneanum* (BCC2012 y GRA1077) combinando las mismas sondas utilizadas para caracterizar la *ssp. marinum*, lo que permitió identificar individualmente todos sus cromosomas (Fig. 6.3).

Como en la *ssp. marinum*, solo el par de cromosomas satelizados mostró señales 45S. También coincidiendo con la *ssp. marinum* se identificaron dos loci 5S, uno en el satélite y el otro en la parte distal del brazo largo del par de cromosomas metacéntricos más pequeños. Un tercer locus, sin equivalente en la *ssp. marinum*, se localizó en el extremo del brazo largo del par de cromosomas satelizados (Fig. 6.3a y g). pSc119.2 se localizó principalmente en posiciones subtelméricas, en cuatro pares de cromosomas. Además y contrastando con la *ssp. marinum*, el par de cromosomas más submetacéntricos mostraba en su brazo largo una señal intersticial (Fig. 6.3c). Como en la *ssp. marinum*, pAs1 producía un patrón rico en señales de distinta intensidad, si bien este resultó muy similar en varios cromosomas morfológicamente iguales haciendo complicada la identificación individualizada de los mismos (Fig. 6.3b).

ND-FISH con la sonda (AG)₁₀ no produjo ninguna señal definida (Fig. 6.3h). Las sondas utilizadas para localizar regiones cromosómicas ricas en repeticiones ACT y ATC generaron señales poco definidas, incluso de menor intensidad que en las accesiones analizadas de la *ssp. marinum* (Fig. 6.3d, i y j). Al igual que en la *ssp. marinum*, (AAC)₅ produjo un patrón rico de señales de hibridación, aunque algunos cromosomas mostraban patrones similares entre sí lo que dificulta su identificación. El mapa físico obtenido tras la hibridación con (AAG)₅ generó el patrón más claro en señales diagnósticas, permitiendo la fácil identificación de los siete pares de cromosomas (comparar Fig. 6.3e y f). Así pues (AAG)₅ se eligió como sonda diagnóstica para la identificación de cromosomas en experimentos de re-hibridación (Fig. 6.3e, g y k) y caracterizar en detalle el patrón obtenido con las restantes sondas.

Los cariotipos se construyeron ordenando los cromosomas (A-G) en base a su morfología y tamaño, teniendo en cuenta el mapa físico obtenido en la *ssp. marinum*, lo que permitió establecer posibles relaciones de homología entre los cromosomas de las dos subespecies (Fig. 6.4).

Al comparar los cariotipos de las dos accesiones de la *ssp. gussoneanum* no se observaron diferencias en el patrón de distribución de las sondas pTa71, pTa794, pSc119.2 y pAs1 (Fig. 6.4). Entre las señales producidas por las sondas utilizadas para localizar regiones enriquecidas en secuencias SSRs, solo se observó polimorfismo para la presencia/ausencia de dos pares de señales subterminales débiles con (AAG)₅. Las observadas en los brazos cortos de los cromosomas F (presente en la accesión BCC2012 pero ausente en GRA1077), y C (presente en GRA1077 pero ausente en BCC2012) (comparar Fig. 6.3e y g).

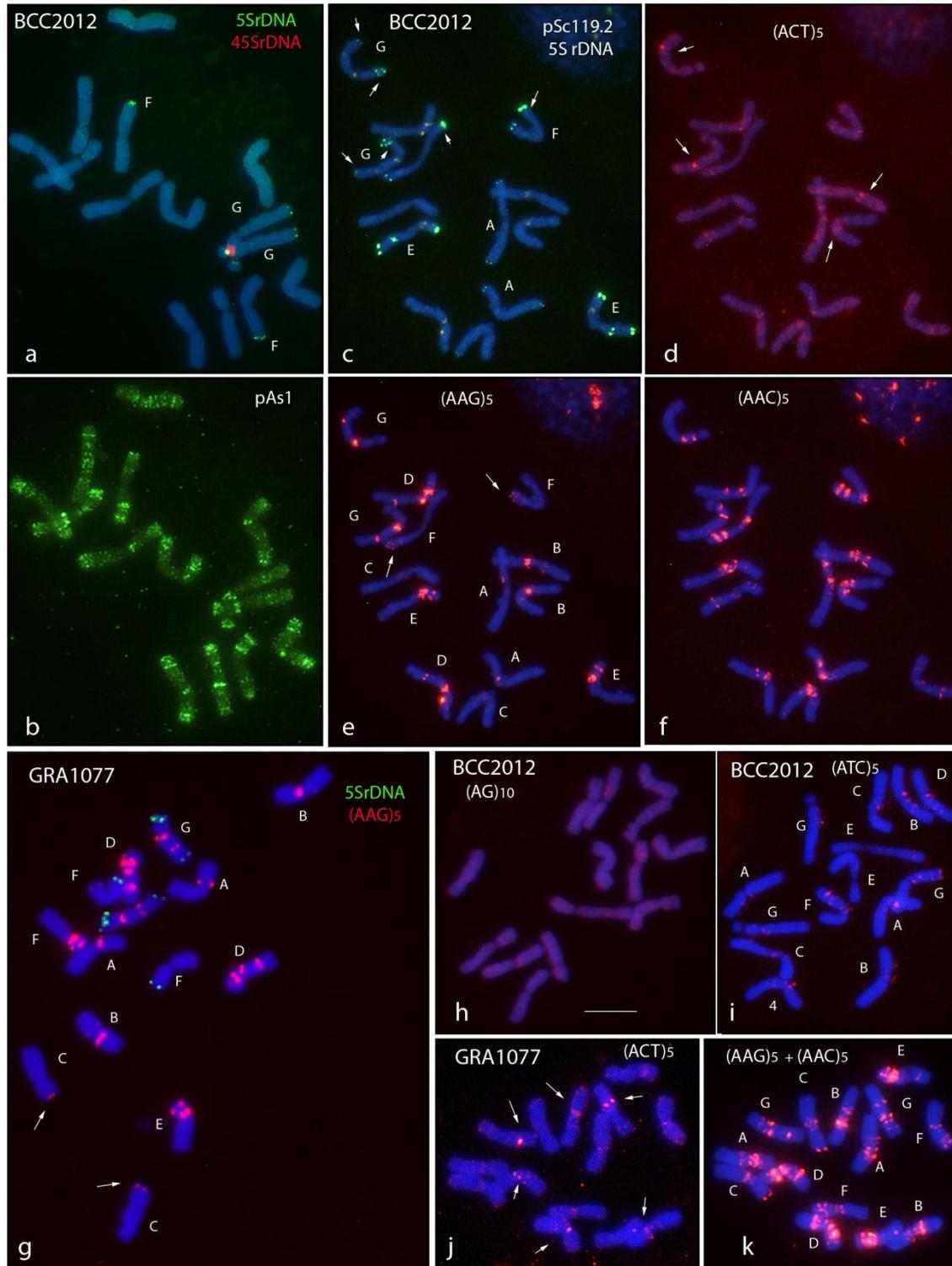


Figura 6.3. Hibridación *in situ* múltiple con las sondas indicadas en metafases mitóticas de dos accesiones diploides de la *ssp.gussoneanum*: BCC2012 (a-f y h-i) y GRA1077 (g y j-k). Varios paneles muestran imágenes fusionadas para facilitar la visualización de señales de hibridación (verde y rosa/rojo con sondas marcadas con digoxigenina y biotina, respectivamente) con respecto a la tinción DAPI (azul). La identidad de los cromosomas está indicada, con letras, en algunos paneles. En c, las flechas apuntan a los loci 5S. En d y j las flechas apuntan a las señales más fuertes (ACT)₅. En e y g las flechas apuntan a señales débiles polimórficas entre las dos accesiones (AAG)₅. Barra de escala = 10 μm.

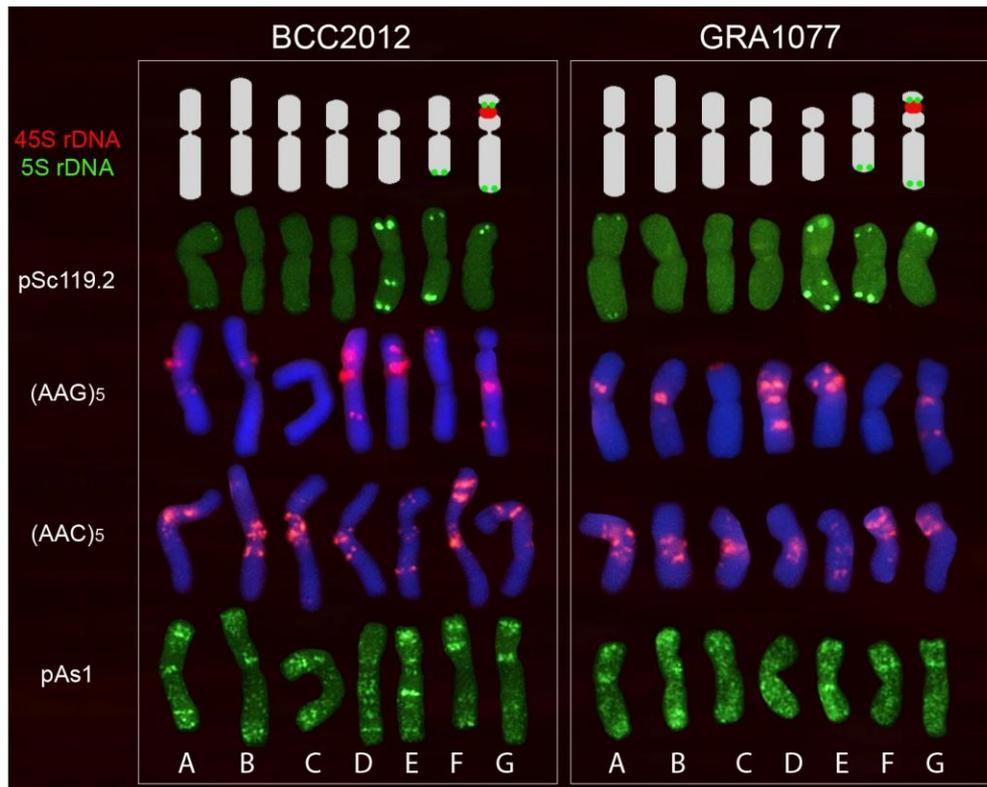


Figura 6.4. Cariotipos de las dos accesiones de la ssp. *gussoneanum* 2x analizadas. Las filas desde la superior hasta la inferior muestran los patrones de hibridación con las sondas indicadas. pTa71 y pTa74 para localizar los genes 45S y 5S respectivamente. Los cromosomas mostrados en cada cariotipo fueron elegidos de la misma metafase. Los cromosomas de BCC2001 con pSc119.2 de la metafase mostrada en la figura 6.3h-i, con (AAG)₅ y pAs1 de la mostrada en la figura 6.3a-b y aquellos hibridados con (AAC)₅ de la metafase mostrada en la figura 6.3c-f. Los de GRA1077 hibridados con (AAG)₅ de la metafase mostrada en la figura 6.3g y con pAs1 de la mostrada en la figura 3j-k. Indicar que para facilitar la visualización del tamaño relativo y morfología de los cromosomas, la localización de los genes ribosomales (Fig. 6.3a) está pintada sobre los ideogramas.

6.2.3. Caracterización de los dos subgenomas presentes en el citotipo tetraploide de la ssp. *gussoneanum*

La figura 6.5 muestra una metafase de la accesión tetraploide BCC2011 que muestra los patrones de hibridación (FISH y ND-FISH) obtenidos con las mismas seis sondas utilizadas para caracterizar los cariotipos de las accesiones diploides.

Tres pares de cromosomas fueron fácilmente identificados mediante FISH con las sonda pTa71 (45S) y pTa794 (5S). Dos pares mostraron señales con las dos sondas ribosomales. El par con señales más fuertes con pTa71 presentaba en cada extremo cromosómico un locus 5S. En este par cromosómico siempre se observó una constricción secundaria y un satélite. Mientras que en el segundo par, con señales pTa71 más débiles y un locus 5S distal en el brazo corto no fue posible visualizar los satélites en la mayoría de las metafases analizadas (Fig. 6.5a). El tercer par que mostró señal con la sonda pTa794 en el extremo de su brazo largo, era

como en las accesiones diploides pequeño y muy metacéntrico (Fig. 6.5a). La sonda pSc119.2 permitió la identificación de la región subtelo mérica de algunos cromosomas. Además de las señales subtelo méricas, como en las accesiones diploides de la *ssp. gussoneanum*, se observó una señal intersticial en el brazo largo de un cromosoma muy submetacéntrico, muy útil para su caracterización (Fig. 6.5d). El patrón de distribución cromosómica que mostró pAs1 coincidió con el observado en las accesiones diploides de *H. marinum sensu lato*. Sin embargo, en el caso del citotipo tetraploide, con la presencia de un mayor número de cromosomas de morfología y patrón similar, aún resultaba mucho más difícil identificar todos cromosomas de forma individual (Fig. 6.5c).

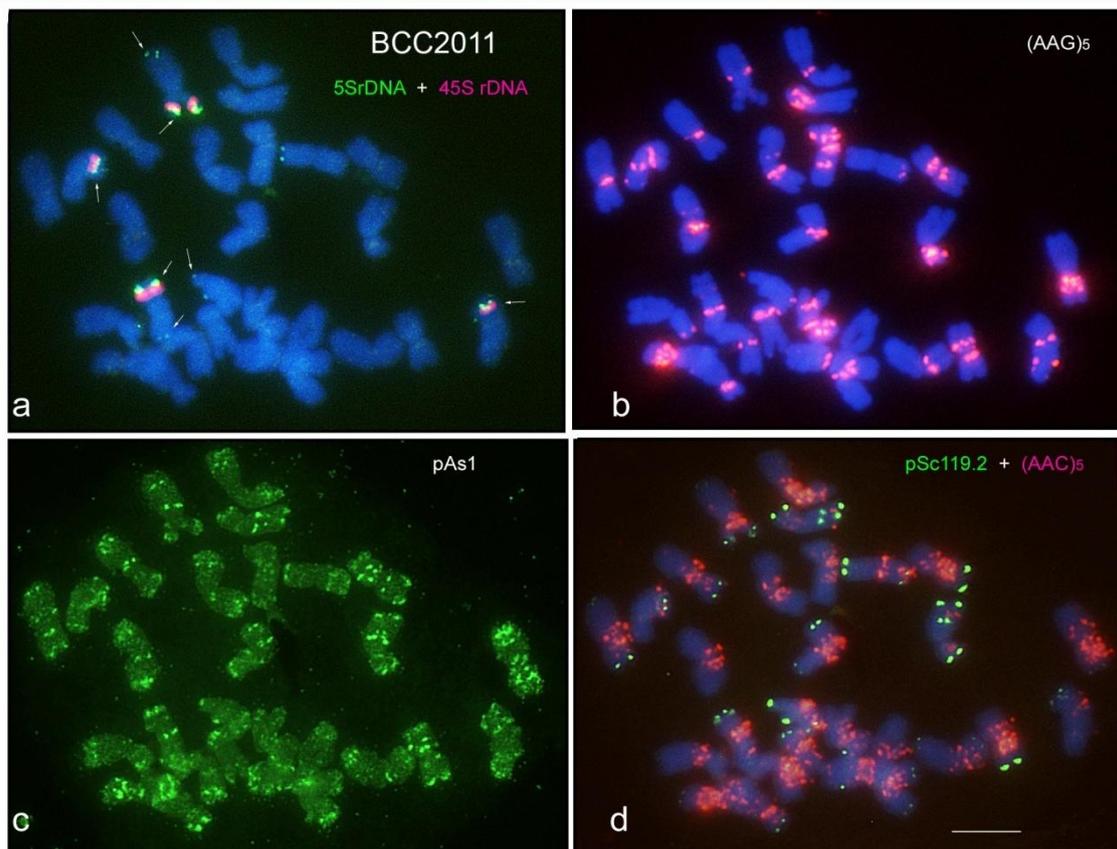


Figura 6.6. Hibridación *in situ* múltiple en una metafase de la accesión tetraploide BCC2011. En a las flechas indican las señales obtenidas con pTa794 (5S). En rosa las señales obtenidas con pTa71 (45S). **b**, (AAG)₅. **c**, pAs1. **d**, pSc119.2 (verde) y (AAC)₅ (rosa). Barra de escala = 10µm.

Al igual que en las accesiones diploides, la sonda (AG)₁₀ no produjo ninguna señal mientras que (ACT)₅ y (ATC)₅ produjeron pocas señales, las cuales siempre fueron de poca intensidad. Por el contrario, se obtuvo un patrón rico en señales de hibridación con (AAC)₅, en general distribuidas especialmente en las regiones pericentroméricas de la mayoría de cromosomas, lo que como en el caso de las diploides dificultaba la identificación de algunos

cromosomas (Fig. 6.5d). La sonda (AAG)₅, la cual produjo el patrón de señales más nítido y distintivo entre los distintos cromosomas fue elegida como sonda diagnóstica en la identificación cromosómica para utilizarla en la caracterización del mapa físico de las restantes sondas en experimentos de hibridación *in situ* múltiple (Fig. 6.5b).

Tras el análisis cariotípico (Fig. 6.6) se identificó un grupo de 14 cromosomas que mostraban el mismo tamaño, morfología y patrones de hibridación *in situ* que los cromosomas de las accesiones diploides de la ssp. *gussoneanum*. Este grupo de cromosomas por tanto podría pertenecer a uno de los dos subgenomas presentes en los tetraploides y sus cromosomas ser homólogos a los del citotipo diploide, asignándoles la denominación de subgenoma *gussoneanum* (comparar Fig. 6.4 y 6.6). El mapa físico de los restantes 14 cromosomas, aun mostrando un cariotipo similar a *H. marinum sensu lato*, no se correspondía con el de ninguna de las accesiones diploides analizadas. Siguiendo el mismo criterio, a este grupo de cromosomas se les asignó la denominación de subgenoma no-*gussoneanum* (comparar Fig. 6.2 y 6.6).

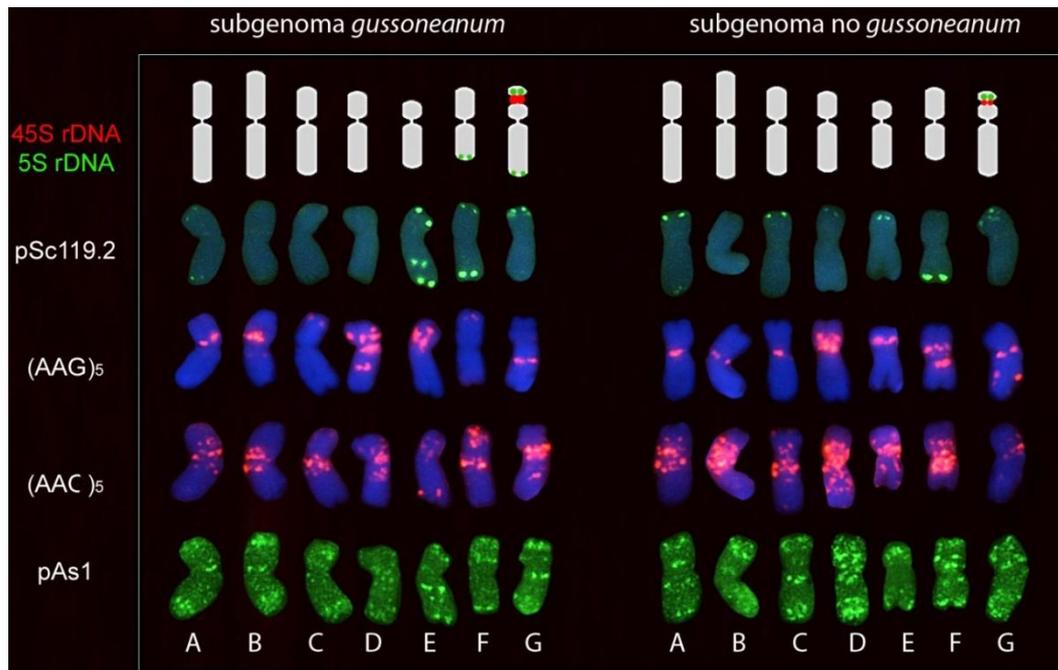


Figura 6.6. Cariotipos de la accesión tetraploide BCC2011. Las filas desde la superior hasta la inferior muestran los patrones de hibridación con las sondas indicadas. pTa71 y pTa74 para localizar los genes 45S y 5S, respectivamente. Los cromosomas mostrados en cada cariotipo fueron seleccionados la metafase mostrada en la figura 6.5. Indicar que para facilitar la observación del tamaño relativo y morfología de los cromosomas, los genes ribosomales (Fig. 6.6a) están pintados sobre los ideogramas.

Finalmente, se construyó el árbol filogenético mostrado en la figura 6.7 en base a las diferencias y similitudes observadas en la distribución de las sondas que resultaron más diagnósticas (pTa71, pTa794, pSc119.2 y (AAG)₅) para la caracterización cromosómica/genómica dentro y entre los taxones de *H. marinum sensu lato*.

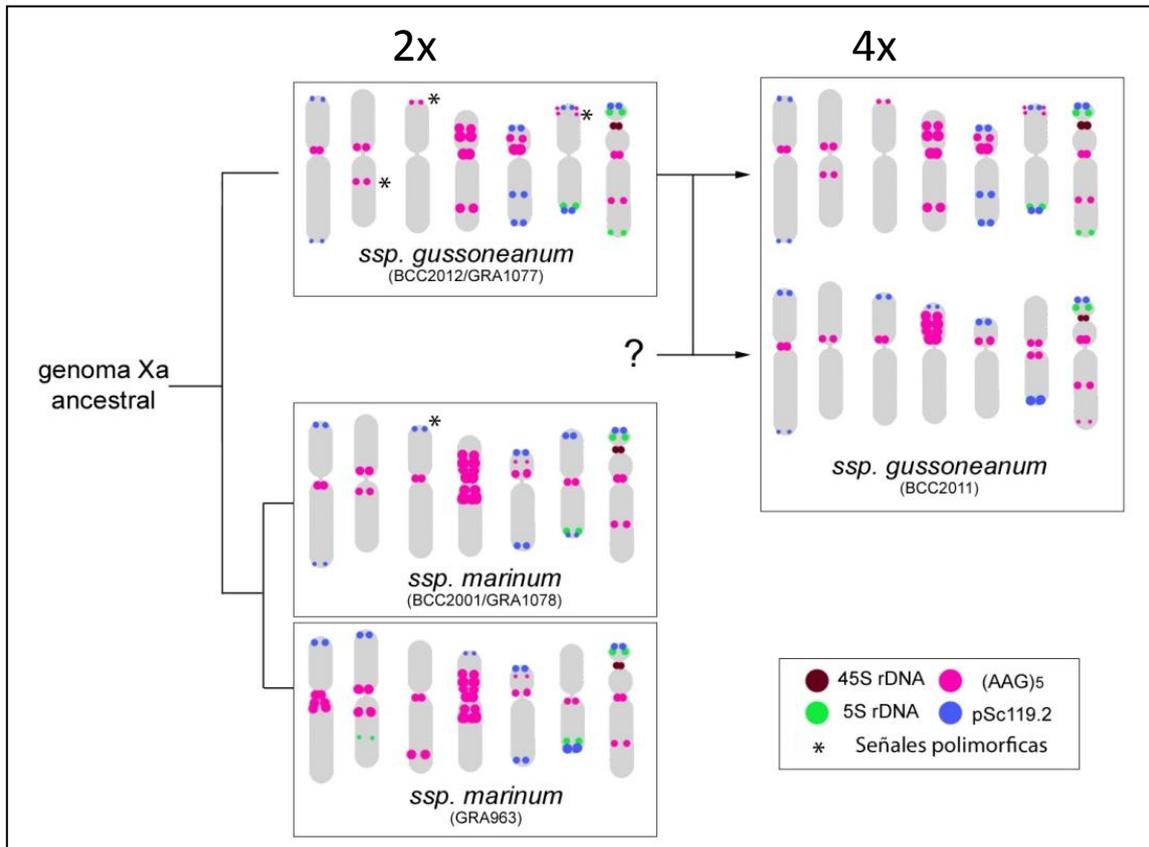


Figura 6.7. Árbol filogenético incluyendo ideogramas con la distribución de cuatro secuencias repetitivas (clave de color) en las seis accesiones de *H. marinum* analizadas. Los asteriscos señalan polimorfismos para la presencia/ausencia en la localización de algunas de las secuencias entre accesiones que comparten el mismo ideograma. Destacar que dos ideogramas fueron necesarios para incluir la diversidad encontrada entre las accesiones de la *ssp. marinum*.

6.3. Discusión

6.3.1. Identificación cromosómica y análisis cariotípico

Este es el primer trabajo donde se han podido identificar en todas las subespecies/citotipos de *H. marinum* todos sus cromosomas sin ningún tipo de ambigüedad. En este caso, los cromosomas de cada taxón, los cuales no son identificables ni por su morfología ni por su patrón de Bando-C, han sido caracterizados detalladamente tras el análisis de los resultados obtenidos mediante experimentos de hibridación *in situ* múltiple. La técnica de FISH utilizando las sondas pTa71, pTa794, pSc119.2 y pAs1 permite la identificación de algunos cromosomas en

H. marinum, pero insuficientes para la identificación completa de todo el complemento, impidiendo el establecimiento de posibles homologías entre los genomas de las subespecies (de Bustos et al. 1996, Taketa et al. 1999b y 2000). Sin embargo, en este trabajo se demuestra como algunas sondas SSRs han resultado muy diagnósticas en la identificación cromosómica. De hecho, el uso de (AAG)₅ en combinación con la morfología (tras la tinción DAPI) fue suficiente para distinguir de forma fácil todos los cromosomas en *H. marinum sensu lato*. La utilidad de este tipo de sondas SSRs como marcadores cromosómicos empleando ND-FISH había sido previamente demostrada en diferentes especies, incluyendo diversos miembros de la tribu *Triticeae* (Cuadrado et al. 2008, Cuadrado y Jouve 2010 y 2011). Aunque en *H. marinum* (AG)₁₀, (ACT)₅ y (ATC)₅ resultaron poco eficaces como marcadores cromosómicos, los combinación de las otras dos sondas analizadas, (AAC)₅ y (AAG)₅, proporcionaron un mapa físico saturado de señales diagnósticas distribuidas a lo largo de todos los brazos cromosómicos en todas las subespecies/citotipos de *H. marinum*.

Para profundizar en el entendimiento de las relaciones existentes entre especies filogenéticamente próximas es importante discernir la homología entre sus cromosomas. El patrón de distribución de las diversas sondas utilizadas, junto con la morfología cromosómica, permitió establecer posibles homologías entre los cromosomas presentes en las distintas accesiones/subespecies. Bajo esta suposición se ha utilizado la misma nomenclatura, denominando con la misma letra, los cromosomas potencialmente homólogos. La presencia de loci para los genes ribosomales apoyaría las homologías para los cromosomas F y G. En base a las similitudes morfológicas y al patrón de (AAG)₅ resultó sencillo establecer las posibles relaciones entre otras tres parejas de cromosomas. De este modo se identificaron como B los cromosomas más metacéntricos, D los más intensamente hibridados con (AAG)₅ y E los más submetacéntricos mostrando señales intersticiales con pSc119.2 en la ssp. *gussoneanum*. Para los otros dos pares cromosómicos restantes (A y C), muy similares entre sí, resultó más difícil establecer relaciones. En cualquier caso, la nomenclatura que se ha utilizado para designar a los cromosomas ha de ser interpretada únicamente a los efectos de la identificación cromosómica. Partiendo de que los cromosomas de *H. marinum* podrían ser identificables en configuración bivalente, se podrían establecer auténticas homologías analizando el apareamiento meiótico de los híbridos entre la ssp. *marinum* y la ssp. *gussoneanum*. En un futuro, las identidades de los cromosomas de *H. marinum* debería adoptar el sistema de homeologías actualmente establecido para otros miembros de la tribu *Triticeae*, tales como la cebada y el trigo. Por ejemplo, el cromosoma satelizado G, portador de los loci 45S y 5S, debería presentar, al menos en parte, homeología con el grupo cromosómico 5 de *Triticeae*

(5H de cebada y 5A, 5B y 5D de trigo) y por lo tanto tendría que pasar a denominarse 5Xa (Linde-Laursen et al. 1997).

6.3.2. Sobre el origen de los poliploides en *H. marinum*

La hibridación *in situ* genómica (GISH) ha permitido distinguir los cromosomas de las especies parentales presentes en algunos híbridos y poliploides de forma eficaz (Cuadrado et al. 2004, Taketa et al. 2009, Chester et al. 2010). Sin embargo, la aplicación de GISH a las formas tetraploides de *H. marinum* utilizando ADN marcado de la ssp. *gussoneanum* como sonda y ADN de la ssp. *marinum* como bloqueante, tras probar distintas concentraciones y proporciones de ADN marcado/ADN bloqueante, no ofreció buenos resultados. Pese a ello, tras la caracterización detallada de los cromosomas presentes en la accesión BCC2011, ha sido posible identificar un grupo de 14 cromosomas con características físicas (tamaño, morfología y mapa físico) similares a los presentes en el citotipo diploide de la ssp. *gussonenatum*. Según esto, este citotipo sería uno de los parentales implicados en las formas tetraploides de *H. marinum*. De acuerdo con las filogenias moleculares basadas en el análisis de secuencias de cloroplastos, la ssp. *gussoneanum* habría sido probablemente el donante materno (Petersen y Seberg 2003, Jakob et al. 2007).

La semejanza general de los dos subgenomas presentes en la accesión BCC2011, diferentes de cualquier otro de los genomas básicos de *Hordeum* (**H**, **Xu** e **I**, ver respectivamente capítulos 4, 5 y 7), indica que el donante del subgenoma no-*gussoneanum* tendría también el genoma básico **Xa**, con más o menos variación, y por tanto los poliploides de *H. marinum* serían alopoloides segmentales. Los resultados de este trabajo no permiten confirmar que la ssp. *marinum* fue la especie donante del segundo subgenoma presente en los tetraploides. Sin embargo, teniendo en cuenta la diversidad de cariotipos detectados dentro de la ssp. *marinum*, no se puede descartar que el genoma no-*gussoneanum* pudiera encontrarse en otros ecotipos de esta misma subespecie. Por otro lado, tampoco se puede descartar que genotipos de la ssp. *marinum* relacionados con las accesiones aquí analizadas hubieran sido uno de los parentales implicados en el proceso de hibridación y que las diferencias observadas sean el resultado de cambios genómicos y cromosómicos ocurridos tras el proceso de poliploidización. Si este hubiera sido el caso, es de destacar que el proceso de poliploidización no habría alterado la morfología de los cromosomas y la estabilidad de las secuencias repetidas analizadas en el subgenoma *gussoneanum*. Sin embargo, tampoco se

puede descartarse que el subgenoma no-*gussoneanum* haya podido estar sujeto a diferentes presiones adaptativas con posterioridad a la hibridación interespecífica que el genoma donado por la ssp. *gussoneanum*. En resumen, el origen de uno de los dos subgenomas presentes en citotipo tetraploide sigue siendo una incógnita, si bien se podría afirmar, a la vista de los cariotipos aquí presentados, que el donante del genoma no-*gussoneanum* habría sido una forma de *H. marinum* más cercana filogenéticamente a la ssp. *marinum* que a la ssp. *gussoneanum*.

6.3.3. Relaciones filogenéticas en *H. marinum*

Aunque los resultados de este trabajo permiten diferenciar los cromosomas de todas las accesiones de *H. marinum* analizadas, el tamaño de estos, su morfología y los patrones de distribución de las sondas empleadas fue bastante similar en los distintos taxones. Esto encajaría con las filogenias que suponen un origen monofilético (un clado sólidamente sustentado) para todos los taxones de *H. marinum*, los cuales compartirían el mismo genoma básico *Xa* (Svitashev et al. 1994, Marillia y Scoles 1996, de Bustos et al. 2002, Petersen y Seberg 2003). En relación con las diferencias encontradas en la distribución de varias sondas, por ejemplo la presencia en la ssp. *gussoneanum* de un locus distal 5S en el brazo largo del cromosoma satelizado (G) o las señales intersticiales en el cromosoma E para pSc119.2 y (AAG)₅, sugieren divergencias citogenéticas sustanciales entre la ssp. *marinum* y el citotipo diploide la ssp. *gussoneanum*. Estas diferencias podrían haber aparecido después de la separación de su ancestro común, supuestamente hace dos millones de años (Blattner 2004 y 2006).

A nivel intraespecífico, la localización conservada de las secuencias repetidas aquí analizadas entre las accesiones de la ssp. *gussoneanum* 2x contrasta con la diversidad observada entre las accesiones de la ssp. *marinum*. Esto se puede relacionar con la alta variabilidad genética observada entre poblaciones de la subespecie *marinum* en contraste con la observada en la subespecie *gussoneanum*. En efecto, en base a las evidencias moleculares, diferentes autores han sugerido la existencia de dos formas de la ssp. *marinum* geográficamente separadas: el grupo Ibérico, constituido por poblaciones distribuidas en España y Portugal, y un grupo no-Ibérico, distribuido en la región Mediterránea Central (Komatsuda et al. 2001, Jakob et al. 2007). En este trabajo, a pesar de que se detectaron señales polimórficas entre las accesiones BCC2001 y GRA1078 de Grecia e Italia,

respectivamente, el mapa físico para las distintas sondas analizadas resultó ser muy similar y significativamente diferente del que se obtuvo en la accesión de origen español GRA963 (comparar cariotipos en Fig. 6.2 o ideogramas en Fig. 6.7). En este trabajo solo se han analizado tres accesiones de la ssp. *marinum*, un número insuficiente para poder apoyar con más fuerza la hipótesis de la separación de esta subespecie en dos o más citotipos geográficamente diferenciados. Lo que sí se confirma es la existencia de diferencias citogenéticas sustanciales entre los miembros de la ssp. *marinum* en contraste con el poco polimorfismo observado entre las accesiones analizadas de la ssp. *gussoneanum*.

6.3.4. Tendencias evolutivas de distintas familias de secuencias de ADN repetitivo durante la especiación de *H. marinum*

En contraste con el patrón conservado del locus 45S entre los taxones de *H. marinum*, se constataron variaciones importantes en la distribución para el resto de secuencias repetitivas analizadas en este trabajo, debido presumiblemente a inserciones independientes, amplificaciones y/o eliminación de copias durante la especiación de los distintos linajes (ver árbol filogenético en Fig. 6.7). Aunque no puede descartarse que, por ejemplo, translocaciones o inversiones hayan contribuido a las diferencias observadas, al menos en *H. marinum* estos reordenamientos cromosómicos no deben de haber sido la principal causa de las diferencias cariotípicas. Esta hipótesis estaría apoyada por el comportamiento meiótico totalmente regular (con ausencia de univalentes y multivalentes) de los cromosomas de híbridos obtenidos entre la ssp. *marinum* y el citotipo diploide de la ssp. *gussoneanum* (Linde-Laursen y Bothmer 2012).

Con respecto a los genes 5S, los loci comunes presentes en las formas diploides (cromosomas F y G) probablemente deberían haber estado presentes en estas mismas posiciones en el genoma ancestral **Xa**. El nuevo locus presente en el brazo largo del cromosoma G en la ssp. *gussoneanum* pudiera ser una adquisición tras la separación de esta subespecie. Es de destacar que ninguna otra especie diploide en *Hordeum* presente un locus 5S en el brazo largo del cromosoma satelizado (de Bustos et al. 1996, Taketa et al. 1999), lo cual apoya la idea de que este locus es una nueva adquisición en el linaje de la ssp. *gussoneanum*. Un evento independiente de amplificación de repeticiones de genes 5S podría ser el origen del tercer locus observado en las poblaciones españolas de la ssp. *marinum* (de Bustos et al. 1996), como es el caso de la accesión GRA963. Es razonable asumir que esto

podría deberse a la amplificación de repeticiones 5S preexistentes en las poblaciones de la ssp. *marinum* presente en la Península Ibérica tras el aislamiento geográfico que supuso los refugios glaciares durante el Pleistoceno (Jakob et al. 2007).

No es inesperado el polimorfismo intraespecífico que afecta al número e intensidad de las señales obtenidas con la sonda pSc119.2 al comparar accesiones de la ssp. *marinum*. El mismo nivel de variación ha sido descrito en otras especies, incluyendo el centeno, la especie de donde se obtuvo la sonda (Cuadrado et al. 1995, Schneider et al. 2003). Las diferencias en la distribución de la sonda pSc119.2 entre las subespecies de *H. marinum*, generalmente exclusiva en regiones subtelméricas como las aquí observadas en la ssp. *marinum* y otras especies de *Hordeum* (Taketa et al. 2000, de Bustos et al. 1996), sugiere que esta secuencia altamente repetitiva, en principio localizada en posiciones subtelméricas, puede sufrir eventos de intersticialización, los cuales habrían originado la presencia de una señal intersticial en un par de cromosomas en la ssp. *gussoneanum*. Una tendencia similar ha ocurrido durante la diversificación de las especies del género *Secale* (Jones y Flavell 1982, Cuadrado y Jouve 2002).

(AAG)₅ reveló la mayor variación cromosómica tanto dentro como entre taxones. Esto sugiere que esta secuencia presenta más predisposición a ser amplificada o eliminada como consecuencia de eventos independientes en diferentes linajes. Esto concuerda con los polimorfismos íntra- e interespecíficos observados en otras especies de *Triticeae*. Por ejemplo, los clústeres con repeticiones AAG son muy abundantes en los cromosomas de cebada y trigo contrastando con su escasa presencia en los cromosomas de *H. bulbosum* (capítulo 4) o centeno (Pedersen et al. 1996, Pedersen y Langridge 1997, Cuadrado et al. 2008). Es razonable asumir que las señales observadas únicamente en la accesión de la ssp. *marinum* GRA963 son el resultado de la amplificación diferencial de los motivos AAG en este material.

Aunque en los ideogramas del árbol filogenético (Fig. 6.7) no se ha incluido el mapa físico de las sondas pAs1 y (AAC)₅, la comparación de los patrones de hibridación de estas sondas entre la ssp. *marinum* (Fig. 6.2) y las poblaciones diploides de la ssp. *gussoneanum* (Fig. 6.4) indican que se puede establecer las mismas conclusiones generales. Es decir que mecanismos independientes de amplificación o reducción en el número de copias de cada secuencia repetida han ocurrido en los diferentes linajes tras la separación de su ancestro común.

Jakob et al. (2004), basándose en las diferencias significativas en la cantidad de ADN entre la ssp. *marinum* (9.10 pg) y las formas diploides de la ssp. *gussoneanum* (10.4 pg) han sugerido que tras la separación de su ancestro común ha debido de producirse un incremento en el tamaño del genoma en el linaje que condujo a la ssp. *gussoneanum*. Al comparar los patrones de distribución de las distintas secuencias repetidas se puede observar que algunas de ellas son más abundantes en una u otra subespecie. Sin embargo, cuando se comparan en conjunto es difícil ver claras diferencias que pudieran explicar que las diferencias en tamaño de los genomas pudieran estar relacionadas con la cantidad total de las secuencias repetidas analizadas. Por último, asumiendo un origen monofilético de los citotipos diploides de *H. marinum*, es difícil explicar por qué las poblaciones de la ssp. *marinum* con diferentes orígenes muestran una mayor variación cariotípica que poblaciones de la ssp. *gussoneanum* de origen geográfico similar.

6.3.5. Taxonomía del complejo *H. marinum*

Aunque el tratamiento taxonómico de *H. marinum* como dos subespecies es el más aceptado entre taxónomos y citogenetistas, las claras diferencias morfológicas entre la ssp. *marinum* y la ssp. *gussoneanum*, junto con la ausencia de flujo génico entre ambos taxones, ha llevado a algunos autores a referirse a ellos como especies separadas, *H. marinum* y *H. gussoneanum* (Jorgensen 1986, Jaaska 1994, Jakob et al. 2007, Blattner 2009). Otro problema sin resolver es el estatus taxonómico de las diferentes formas citológicas de la ssp. *gussoneanum*. Asumiendo la existencia de taxa crípticos en el caso de las formas aloploidoides, Jaaska (1994) propuso que las formas tetraploides de la ssp. *gussoneanum* deberían ser tratadas como *H. caudate* Jaaska. En base a los datos aquí expuestos se apoya el considerar al citotipo tetraploide de la ssp. *gussoneanum* como una especie separada. Resulta evidente el aislamiento reproductivo que se ha tenido que producir tras la poliploidización entre las dos citotipos de la ssp. *gussoneanum*, como indica el comportamiento meiótico (involucrando la casi exclusiva formación de trivalentes) y la baja fertilidad observada en híbridos con formas diploides (Bothmer et al. 1989). Se sugiere tratar el complejo *H. marinum* como dos especies: la diploide *H. marinum* Huds. incluyendo las subespecies *marinum* y *gussoneanum* y una nueva especie para referirse al citotipo tetraploide que podría ser, como se ha indicado, *H. caudate* Jaaska.

**7. SSRs y el genoma I de *Hordeum*. La
compleja historia evolutiva de *H.*
brachyantherum Nevski**

7.1. Introducción

El género *Hordeum* consta de unos 45 taxa (31-33 especies dependiendo del criterio taxonómico utilizado). Exceptuando los tres grupos monofiléticos integrados por las especies europeas *H. vulgare* y *H. bulbosum*, con genoma **H** (ver capítulo 4), el complejo *H. murinum*, con genoma **Xu** (capítulo 5) y el complejo *H. marinum*, con genoma **Xa** (capítulo 6), el resto de las especies, asiáticas y americanas, integran un grupo muy numeroso de taxones, todos ellos poseyendo el genoma **I**.

H. brachyantherum Nevski, consta en dos subespecies. La ssp. *californicum* ($2n=2x=14$), (vulgarmente cebada de California), se distribuye por el oeste de Norteamérica. La segunda es la ssp. *brachyantherum* (cebada de la pradera) que consta de citotipos tetraploides ($2n=4x=28$) y hexaploides ($2n=6x=42$) no reconocidos como taxones diferentes al no presentar características morfológicas distintivas (Bothmer et al. 1995). Las formas tetraploides se distribuyen por una amplia región que incluye el oeste de Estados Unidos y Canadá, llegando hasta las Islas Aleutianas y la península de Kamchatka en Rusia. Hasta la fecha solo se ha descrito una población hexaploide en la Bahía de California (Bothmer et al. 1995). Todos los taxones de *H. brachyantherum* son perennes, de desarrollo rápido y amplia tolerancia a diversos tipos de suelo, por lo que son utilizados frecuentemente como cubierta vegetal para dar estabilidad a los suelos. La importancia que ha adquirido esta especie en los últimos años es consecuencia del éxito conseguido en programas de mejora tras el cruzamiento de la ssp. *californicum* y el trigo panadero, para la introducción en la especie cultivada de caracteres de rusticidad, menor requerimiento de nitrógeno y resistencia a múltiples enfermedades (Kong et al. 2008).

Las relaciones filogenéticas entre los distintos taxones y el origen de los poliploides permanecen sin aclarar, en parte por no existir consenso en cuales fueron las especies que debieron participar en el origen de los citotipos poliploides. Estudios citogenéticos basados en análisis cromosómicos de bandedo-C y FISH con sondas de los genes ribosomales (Linde-Laursen 1992, Taketa et al. 2005) y moleculares, analizando secuencias del ADN de cloroplastos y de algunos genes nucleares (Nishikawa et al. 2002, Wang et al. 2011) apoyan la hipótesis de que la ssp. *californicum* fue el parental materno que intervino en el origen de los tetraploides. Otros estudios como el de Blattner et al. (2004), basado en el análisis de secuencias del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosómico, indican que en *H. brachyantherum*, el

citotipo diploide no intervino en la formación del tetraploide. Recientemente, Brassac et al. (2012), basándose en el análisis de la secuencia del gen de la topoisomerasa 6 (TOPO6), sugieren que el genoma de un progenitor extinto, filogenéticamente próximo a la ssp. *californicum* sería uno de los subgenomas presentes en los citotipos poliploides. Por otro lado hay más consenso en la hipótesis de que *H. roshevitzii*, una especie endémica de la región central de Asia, habría sido clave en la evolución de la mayoría de las cebadas tetraploides americanas, incluyendo la ssp. *brachyantherum* (Linde-Laursen et al. 1992, Blattner et al. 2004, Taketa et al. 2005, Brassac 2012).

Otro punto de controversia es la participación del citotipo tetraploide en el origen del hexaploide. Estudios de apareamiento meiótico en híbridos entre ambas formas poliploides sugieren cierta divergencia entre los subgenomas I de las mismas (Linde-Laursen et al. 1986, Bothmer et al. 1989), lo que también ha sido demostrado en análisis moleculares (Komatsuda et al. 2009). Por otro lado, se ha demostrado mediante GISH la participación de una especie con genoma **Xa** en el origen del citotipo hexaploide de *H. brachyantherum* (Taketa et al. 1999a). Sin embargo, la aplicación de GISH no permitió desvelar cuál de los taxones del complejo *H. marinum*, la ssp. *marinum* o la ssp. *gussoneanum* fue la especie donante del genoma **Xa**. En este sentido, datos recientes basados en el análisis de secuencias de ADN, similitudes morfológicas y estudios de distribución geográfica parecen apuntar al citotipo diploide Europeo de la ssp. *gussoneanum*, introducido en Norte América, como la especie implicada en el origen de *H. brachyantherum* 6x (Brassac et al 2012).

Con el objetivo de aportar nuevos datos sobre la historia evolutiva de este complejo y profundizar en la caracterización del genoma I de *Hordeum* se ha llevado en este trabajo un análisis cariotípico detallado de seis accesiones que representan todas las subespecies y citotipos de *H. brachyantherum*. Además se han analizado dos accesiones de *H. roshevitzii*. En concreto se pretende: 1) Encontrar marcadores cromosómicos tipo SSRs, analizando la distribución de (AG)₁₀, (AAC)₅, (AAG)₅, (ACT)₅ y (CCCATTT)₃ en combinación con las sondas ribosomales pTa71 y pTa794 (Taketa et al. 2001, 2005) y las secuencias repetitivas pSc119.2, pAs1 y pHch950. De este modo se trata de caracterizar lo más detalladamente posible los cromosomas del complejo *H. brachyantherum/californicum*. Este análisis se lleva a cabo mediante hibridaciones múltiples con diferentes combinaciones de sondas utilizando sucesivamente FISH y ND-FISH o viceversa; 2) Analizar la diversidad citogenética en y entre la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii*, que supuestamente poseen variaciones del mismo genoma

básico I; 3) Analizar la diversidad cariotípica entre accesiones tetraploides de la ssp. *brachyantherum* de diferente origen geográfico; 4) Estudiar la posible implicación de la ssp. *californicum* y *H. roshevitzzi* en el origen del citotipo tetraploide de la ssp. *brachyantherum* y de este último en el origen del citotipo hexaploide, y 5) Utilizar la técnica de GISH, con ADN marcado de la ssp. *gussoneanum*, para identificar el subgenoma **Xa** presente en el citotipo hexaploide y comparar su mapa físico con los cariotipos presentados para las subespecies de *H. marinum* en el capítulo anterior. Esto permitiría determinar que especie habría participado en el origen de *H. brachyantherum* 6x.

7.2. Resultados

7.2.1. Caracterización cromosómica de la ssp. *californicum*

La figura 1 muestra los patrones de distribución de las nueve sondas seleccionadas (pTa71, pTa794, pSc119.2, pAs1, (AG)₁₀, (AAC)₅, (AAG)₅, (ACT)₅ y (CCCATTT)₃) utilizadas para caracterizar la constitución cromosómica/genómica de dos accesiones de la ssp. *californicum* (BCC2057 y BCC2058). Para confeccionar los cariotipos los cromosomas (A-G), pertenecientes a una misma metafase mitótica, se ordenaron en orden decreciente de longitud con los cromosomas satelizados al final (Fig. 7.1h). Es significativo el elevado nivel de polimorfismo intraespecífico observado entre las dos accesiones californianas, tanto en la morfología de sus cromosomas como en las localizaciones de algunas de las sondas analizadas. Este polimorfismo no impidió establecer posibles homologías entre cromosomas de las dos accesiones designadas con la misma letra.

La aplicación de FISH con la sonda pTa71 confirmó que los dos pares de cromosomas satelizados observados en la accesión BCC2058 presentaban señales de hibridación en la constricción secundaria. Esta sonda hibridó exclusivamente en la constricción secundaria del único par de cromosomas satelizados en BCC2057 (comparar Fig. 7.1a y c). En ambas accesiones los genes ribosomales 5S, visualizados como dos clústeres de señales de hibridación próximas, se localizaron en un par de cromosomas satelizado.

Como era de esperar, por los resultados obtenidos previamente en otras especies, la localización de pSc119.2 fue subtelomérica en ambas accesiones, si bien se observaron diferencias en el número, intensidad y localización de señales al compararlas entre sí.

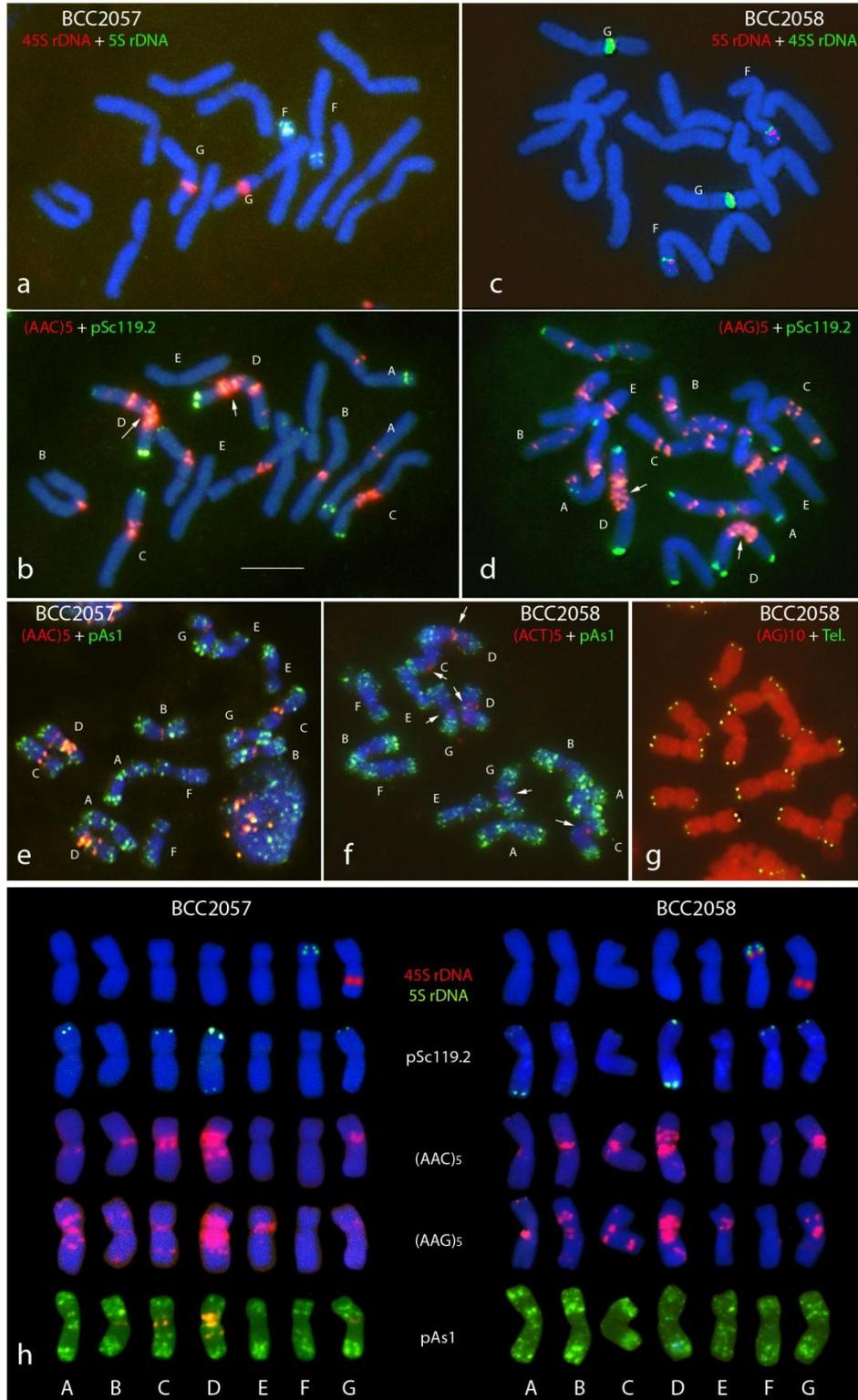


Figura 7.1. Hibridación *in situ* multicolor en metafases somáticas de dos accesiones de *H. brachyantherum* ssp. *californicum* (BCC2057 y BCC2058) con las sondas indicadas. La identidad de los cromosomas se indica en algunos paneles (A-G). En **b** y **d** las flechas apuntan a los cromosomas D, con claras diferencias morfológicas entre las dos accesiones. En **f** las flechas apuntan los tres pares de cromosomas con clústeres ACT. En **h**, cariotipos de BCC2057 y BCC2058 con cromosomas seleccionados de las metafases mostradas en **e** y **f**, respectivamente. Indicar que la localización de las sondas pTa71 y pTa794 (hibridadas en **a** y en **c**) están pintadas sobre los cromosomas teñidos con DAPI (filas superiores). Las señales naranja observadas en el cariotipo pAs1 de BCC2057 son derivadas de hibridaciones previas con (AAC)₅. Barra de escala=10 µm.

Un ejemplo del polimorfismo observado es la presencia en la accesión BCC2058 de señales pSc119.2 en los dos brazos del cromosoma que porta los genes 5S (comparar Fig. 7.1b y d). Como se había observado en otras cebadas silvestres, la sonda pAs1 produjo multitud de señales de hibridación, distribuidas a lo largo de la longitud de los cromosomas, generando un patrón similar en diferentes cromosomas con morfologías y tamaños parecidos y por lo tanto poco útil como marcadores diagnósticos en la identificación individualizada de los mismos (Fig. 7.1e-f).

En relación con los SSRs investigados no se observaron clústeres de repeticiones AG (Fig. 7.1g). La sonda (ACT)₅ mostró señales de hibridación débiles cercanas al centrómero en tres pares de cromosomas (flechas en Fig. 7.1f). Por el contrario con las sondas (AAG)₅ y (AAC)₅ se obtuvo un rico patrón de señales bien definidas, encontrándose estas particularmente concentradas en la región pericentromérica (Fig. 7.1b, d y e). Es de notar que en ambas accesiones se observó un par de cromosomas especialmente enriquecido en estas repeticiones (cromosoma D), si bien mostraba claras diferencias morfológicas entre ellas, resultando más submetacéntrico en BCC2057 (flechas en Fig. 7.1b y d). Finalmente, la sonda telomérica se localizó exclusivamente al final de los brazos cromosómicos (Fig. 7.1g).

7.2.2. Caracterización cromosómica de *H. roshevitzii*

Se analizaron dos accesiones de la especie asiática *H. roshevitzii* (BCC2015 y BCC2069 de China y Rusia, respectivamente) con las mismas sondas utilizadas para caracterizar la cebada californiana. Es de señalar que no se observó polimorfismo para la presencia/ausencia de las marcas producidas con las distintas sondas entre las dos accesiones. La figura 7.2 muestra los patrones de hibridación obtenidos con las distintas sondas en metafases de la accesión BCC2015 y sus correspondientes cariotipos para ilustrar los resultados obtenidos del análisis cromosómico/genómico llevado a cabo en esta especie. Para confeccionar los cariotipos se ordenaron los cromosomas (A-G) en orden decreciente de longitud, con los cromosomas portadores de los genes 45S al final, según el orden creciente en la intensidad de la señales de hibridación. No obstante en los análisis comparativos se utilizará exclusivamente el término cromosoma satelizado (sat) para designar a los cromosomas que mostraban una constricción secundaria visible al microscopio, es decir aquellos cromosomas que muestran señales intensas de hibridación con la sonda pTa71.

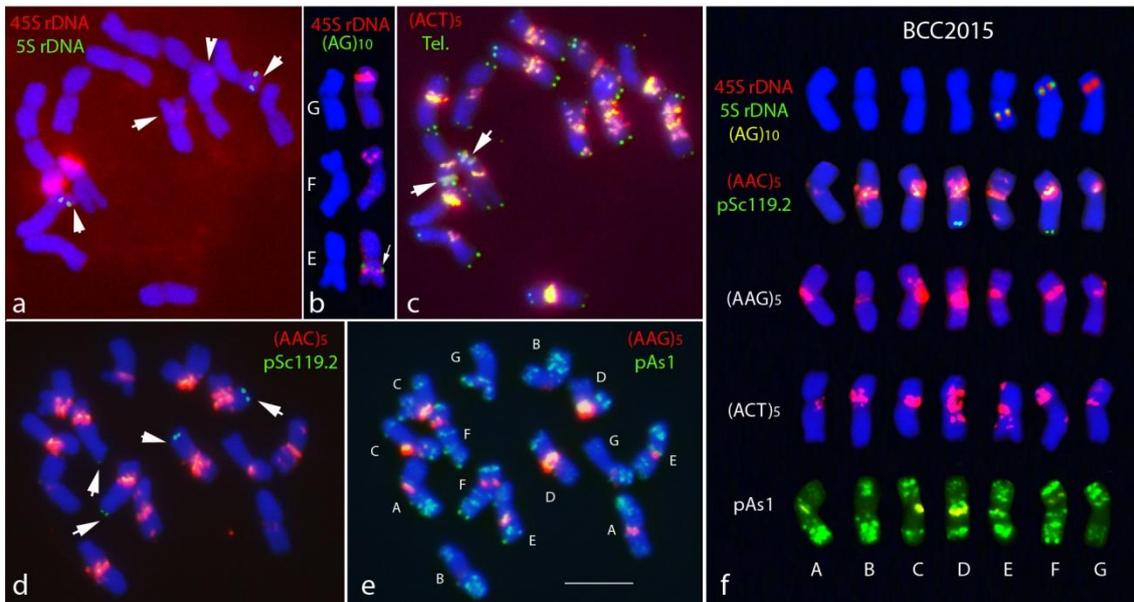


Figura 7.2. Hibridación *in situ* múltiple en la accesión BCC2015 de *H. roshevitzii* mostrando los patrones obtenidos con las sondas indicadas en dos metafases (a-c y d-e) y sus correspondientes cariotipos (f). En a las flechas apuntan las señales débiles obtenidas con pTa71 (45S). En b los tres cromosomas con genes 45S elegidos de la metafase mostrada en a con las señales pTa71 débiles amplificadas; la flecha apunta el clúster de repeticiones AG. En d las flechas apuntan las señales pSc119.2. La identidad de los cromosomas se muestra en e. Indicar que en el cariotipo las señales obtenidas con las sondas pTa71, pTa794 y (AG)₁₀ (hibridadas en a) están pintadas sobre los cromosomas teñidos con DAPI (fila superior). Barra de escala=10 μm.

La aplicación de FISH con las sondas ribosomales pTa71 y pTa794 permitió caracterizar tres pares cromosómicos. El par de cromosomas satelizado, que presentó señales fuertes con la sonda del 45S (cromosoma G), y otros dos pares de cromosomas con señales poco intensas en los que no se observó la presencia de satélite. En la pareja submetacéntrica (cromosoma F) las señales 45S se visualizaron como dobles y rodeando a los genes 5S. Por último, el tercer locus 45S se localizó intersticialmente débil en un par de cromosomas muy metacéntrico (cromosoma E) (Fig. 7.2a y b). La sonda pSc119.2 reveló cuatro señales subtelerómicas en dos pares de cromosomas (Fig. 7.1d). El patrón de distribución obtenido con la sonda pAs1 es similar al descrito en los cromosomas de la ssp. *californicum* (Fig. 7.1e).

En relación a los SSRs investigados mediante ND-FISH, se observó un único clúster de repeticiones AG próximo a los genes 45S en el cromosoma E (Fig. 7.2c). Esta señal resultó diagnóstica en la identificación de sus posibles homólogos en la ssp. *brachyantherum* como posteriormente se describe. Con los tres trinucleótidos analizados, (ACT)₅, (AAC)₅ y (AAG)₅ se obtuvieron patrones con abundantes señales de hibridación (Fig. 7.2 c, d y e, respectivamente). Aunque la mayoría de las señales obtenidas con estas tres sondas muestran

una distribución parecida, especialmente pericentromérica, los patrones resultaron motivo dependientes (Fig. 7.2f). Al igual que en la ssp. *californicum*, la sonda telomérica se observó exclusivamente al final de los brazos cromosómicos (Figura 7. 2c).

Por último se trató de identificar las potenciales homólogas/homeologías entre los cromosomas de la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii*. Aunque se supone que estas formas comparten variantes del mismo genoma I, las notables diferencias observadas al comparar sus cariotipos impidió deducir posibles relaciones de homeología para la mayoría de las parejas cromosómicas (comparar Fig. 7.1h y Fig. 7.2f). En todo caso, la nomenclatura usada para designar a los cromosomas (A-G) no ha de ser interpretada como un sistema basado en relaciones de homología/homeología entre cromosomas de diferentes especies asignados con la misma letra, sino como una manera sencilla de identificar cromosomas en cada accesión.

7.2.3. Caracterización cromosómica del citotipo tetraploide de la ssp. *brachyantherum*

La figura 7.3 ilustra los resultados FISH/ND-FISH obtenidos con el conjunto de sondas seleccionadas para caracterizar los cromosomas/subgenomas de tres accesiones tetraploides de la ssp. *brachyantherum* (BBCC2045 de California, BCC2050 de Alaska y BCC2056 de Newfoundland). Aunque en líneas generales los cariotipos de las tres accesiones resultaron similares (Fig. 7.4), la accesión BCC2056 se caracterizó por presentar un par de cromosomas submetacéntrico relativamente pequeño no presente en las otras dos accesiones (flechas en Fig. 7.3). Estos cromosomas, como se describe más adelante, son el resultado de una translocación recíproca (comparar cariotipos en Fig. 7.4). En la confección de los cariotipos se siguió el criterio de ordenar los cromosomas (A-N) por tamaño, situando al final los cromosomas portadores de los genes 45S en orden creciente de intensidad de hibridación con la sonda pTa71.

Lo primero que se intentó, para llevar a cabo la caracterización citogenética de la ssp. *brachyantheum* 4x, fue abordar la distinción de sus dos subgenomas. Para ello se utilizó la técnica GISH hibridando con ADN marcado de la ssp. *californicum* y ADN de *H. roshevitzii* sin marcar o viceversa. Sin embargo, esta técnica no dio buenos resultados al no generar cromosomas hibridados de forma diferencial (datos no mostrados). De igual manera, no fue posible distinguir dos grupos de 14 cromosomas con la sonda pHch950, la cual como se ha

mostrado en el capítulo 5 resultó muy útil para distinguir los dos subgenomas presentes en los citotipos tetraploides de *H. murinum*, al hibridar de forma dispersa y con la misma intensidad en los 28 cromosomas presentes en las formas tetraploides (Fig. 7.3b).

Las tres accesiones presentaron el mismo patrón con las sondas pTa71 y pTa794, en seis pares de cromosomas (Fig. 7.3f). Esto permitió, establecer con facilidad las posibles relaciones de homología para estos cromosomas entre las accesiones (comparar Fig. 7.3e). Como era de esperar, las señales más fuertes obtenidas con la sonda pTa71 se localizaban en los tres pares de cromosomas satelizados. La combinación de ambas sondas ribosomales reveló diferencias morfológicas en un par de cromosomas (K). En lugar de submetacéntrico este par es muy metacéntrico en la accesión BCC2056, como resultado de una posible translocación recíproca (flecha en Fig. 7.3e).

Se observó bastante diversidad en el número, intensidad y localización de las señales obtenidas con pSc119.2 entre las accesiones. El número de señales varió entre 14, localizadas en seis pares cromosómicos de la accesión BCC2045, y 24 distribuidas en ocho pares cromosómicos en la accesión BCC2056 (comparar Fig. 7.3d y 7.3k). Al igual que en las especies diploides, con pAs1 se obtuvo un patrón rico de señales de hibridación similar en y entre los cromosomas de cada accesión (Fig. 7.3h y 3j).

En las tres accesiones tetraploides se observó un único clúster de repeticiones AG en el par de cromosomas metacéntricos satelizados (L). Es de destacar la similitud de este par (metacéntrico y con genes 45S) con el único par de cromosomas con señales (AG)₁₀ observado en *H. roshevitzii* (comparar Fig. 7.2b y 7.3h). Las señales obtenidas con (AAG)₅ (Fig. 7.3c) y (AAC)₅ (Fig. 7.3d) se mostraron en múltiples localizaciones como en los taxones diploides, contribuyendo significativamente a la identificación individualizada de todos los cromosomas. La sonda (ACT)₅ mostró señales de hibridación de diferente intensidad distribuida en distintos cromosomas, que en conjunto resultaron menos numerosas que las generadas por las otras sondas basadas en repeticiones de trinucleótidos (comparar Fig. 3i y Fig. 3j). Por lo tanto no se trató de caracterizar su patrón de hibridación en detalle. Finalmente, como en los taxones diploides, la sonda telomérica se mostró solo en los extremos cromosómicos (datos no mostrados).

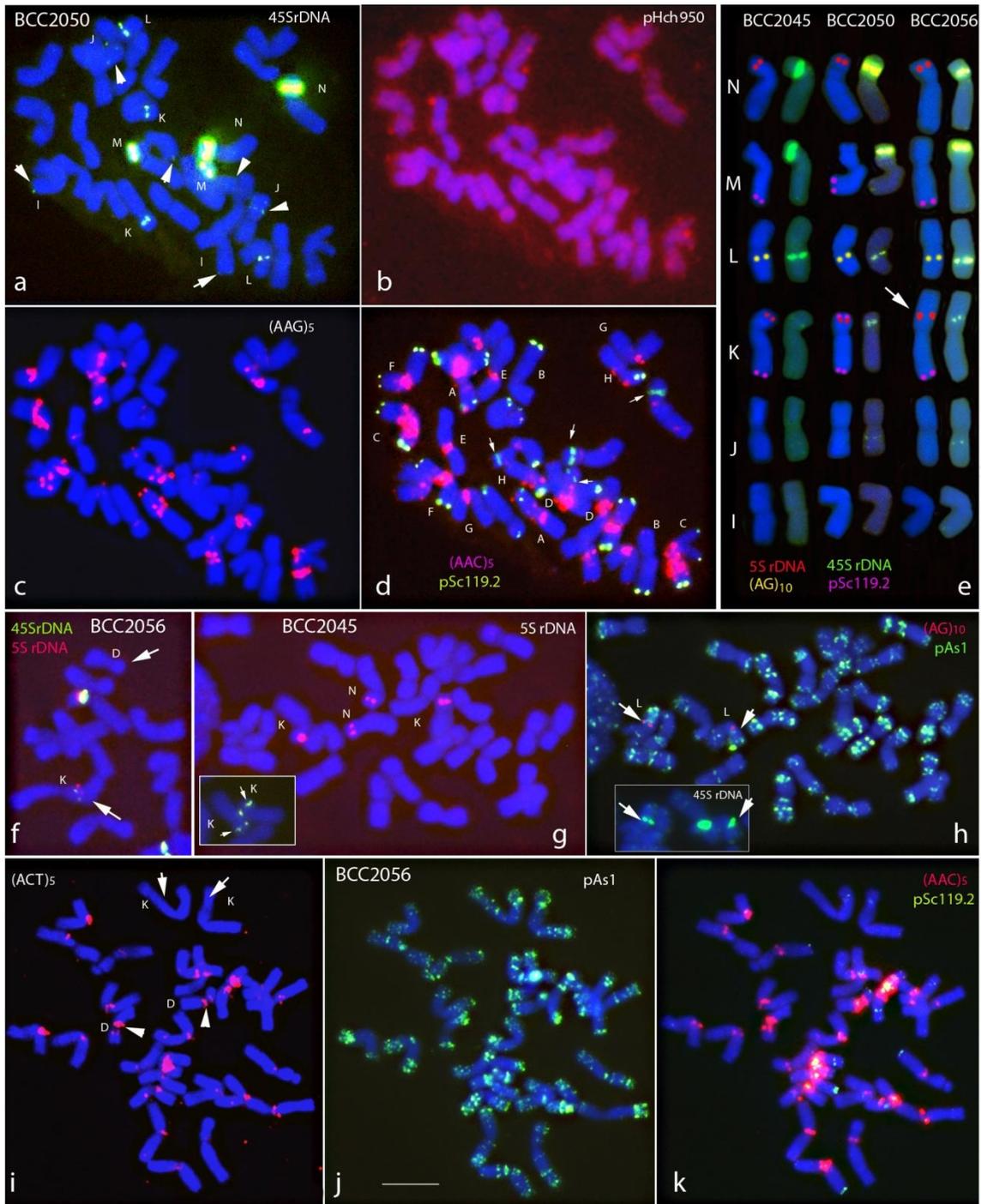


Figura 7.3. Hibridación *in situ* múltiple en metafases de las accesiones BCC2045, BCC2050 y BCC2056 de la *ssp. brachyantherum* 4x mostrando los patrones obtenidos con las sondas indicadas. En a las flechas apuntan las señales menos intensas obtenidas con pTa71 (45S). En d las flechas apuntan las señales más intensas obtenidas con pTa71 (45S) (a). En e los seis cromosomas con genes 45S en las tres accesiones (derecha). Los de las accesiones BCC2050 y BCC2056 seleccionados de las metafases mostradas en a-d y f, respectivamente. Indicar que las señales obtenidas con pTa794 (5S) (g), pSc119.2 (d y k) y (AG)₁₀ (h) han sido pintadas sobre los cromosomas teñidos de DAPI (izquierda). En f e i las flechas apuntan a los cromosomas implicados en una translocación recíproca. El recuadro en g muestra las señales dobles correspondientes a los genes 5S del cromosoma K. Las flechas en h apuntan al cromosoma con señal (AG)₁₀ y genes 45S (recuadro). La identidad de los cromosomas (A-N) se muestra en algunos paneles. Barra =10 μm.

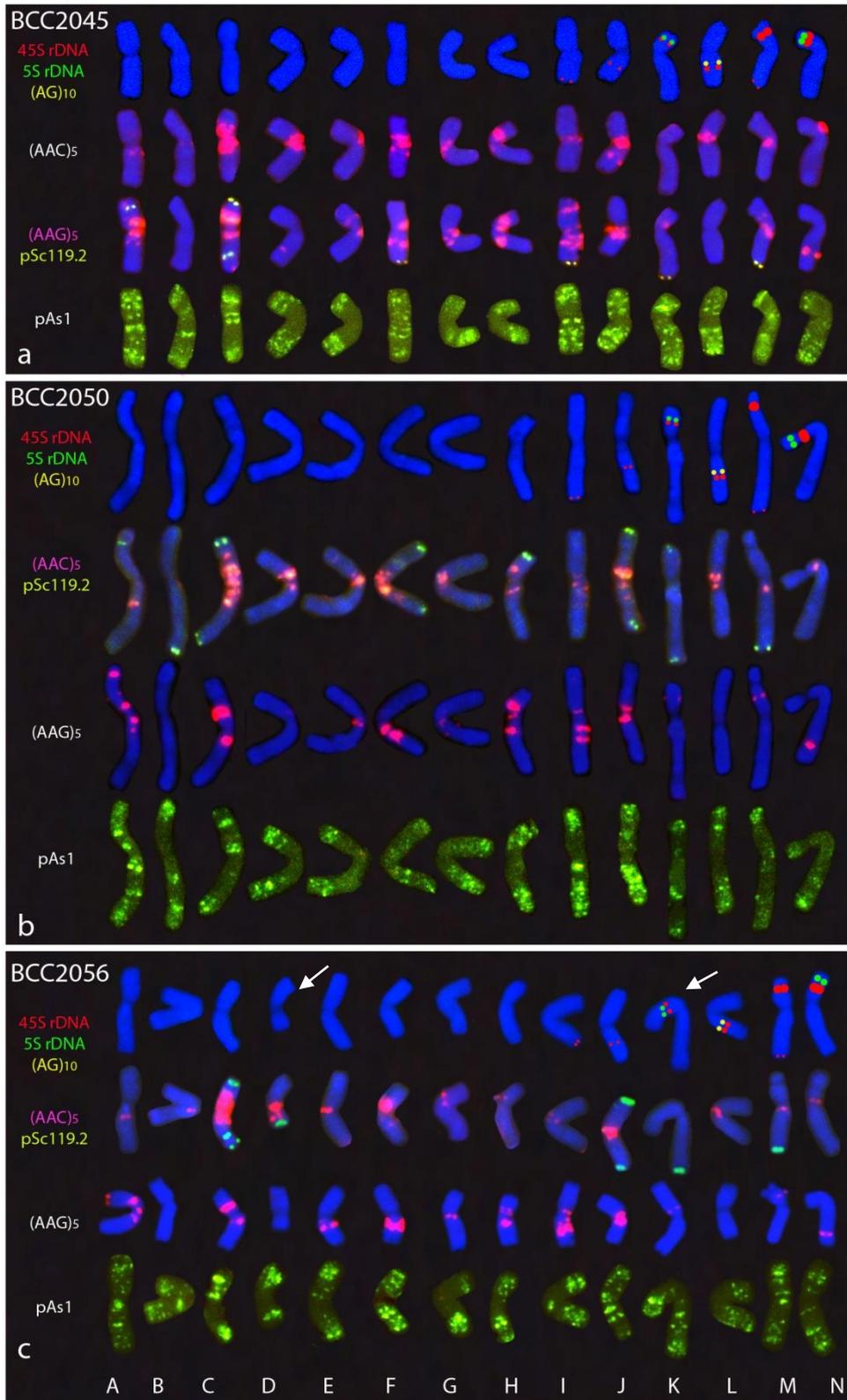


Figura 7.4. Cariotipos de tres accesiones del citotipo tetraploide de *H. brachyantherum* con las sondas indicadas. Los cariotipos de las accesiones BCC2045 y BCC2050 fueron confeccionados con cromosomas de la misma metafase. Los cromosomas de los cariotipos de la accesión BCC2056, excepto para (AAG)₅, seleccionados de la metafase mostrada en Fig. 7.3i-k. Indicar que las señales obtenidas con las sondas pTa71 (45S), pTa794 (5S), y (AG)₁₀ fueron pintadas sobre los cromosomas teñidos con DAPI. Los flechas apuntan a los cromosomas implicados en la translocación recíproca detectada en BCC2056.

Se observó un único clúster de repeticiones AG en el par de cromosomas metacéntricos satelizados (L) en las tres accesiones tetraploides. Es de destacar la similitud de este cromosoma (metacéntrico y con genes 45S) con el único par de cromosomas con señales (AG)₁₀ observado en *H. roshevitzii* (comparar Fig. 7.2b y 7.3h). Como en los taxones diploides, las señales obtenidas con (AAG)₅ (Fig. 7.3c) y (AAC)₅ (Fig. 7. 3d) se mostraron en múltiples localizaciones, contribuyendo significativamente a la identificación individualizada de todos los cromosomas. La sonda (ACT)₅ mostró señales de hibridación de diferente intensidad distribuida en distintos cromosomas que en conjunto resultaron menos numerosas que las generadas por las otras sondas basadas en repeticiones de trinucleótidos (comparar Fig. 3i y Fig. 3j), por lo que no se trató de caracterizar su patrón de hibridación en detalle. Finalmente, como en los taxones diploides, la sonda telomérica se mostró solo en los extremos cromosómicos (datos no mostrados).

7.2.4. Caracterización cromosómica del citotipo hexaploide de la ssp. *brachyantherum*

Siguiendo la misma estrategia empleada para la caracterización cromosómica/genómica de las accesiones tetraploides, para caracterizar la accesión hexaploide BCC2046, se abordó en primer lugar la posibilidad de discriminar entre sus tres subgenomas. La aplicación de GISH utilizando como sonda ADN marcado de *H. marinum* ssp. *gussoneanum* 2x reveló la presencia de los 14 cromosomas pertenecientes al subgenoma **Xa** (Fig. 7.5a). Al igual que en las accesiones tetraploides la sonda pHch950, aunque hibridó de forma dispersa con distinta intensidad en algunos cromosomas, no permitió separar los restantes 28 cromosomas en dos grupos de 14 correspondientes a los otros dos subgenomas. Por otro lado, las restantes sondas al generar en conjunto abundantes marcadores diagnósticos permitió la identificación individualizada de todos los cromosomas.

La combinación de las sondas pTa71 y pTa794 permitió distinguir fácilmente siete pares cromosómicos. Tres pares de cromosomas mostraron señales con pTa71 (45S), las más fuerte asociadas con la constricción secundaria de los dos pares de cromosomas satelizados observables en este taxón. Otros tres pares, submetacéntricos, uno de ellos perteneciente al subgenoma **Xa**, presentaron señales con las dos sondas ribosomales en posiciones cercanas. Es significativo que no se observaron constricciones secundarias en los cromosomas del subgenoma **Xa**, pese a que un par mostro señales de hibridación muy fuertes con la sonda

pTa71 (45S) (Fig. 7.5a). El séptimo par identificado con estas sondas fue el más pequeño del subgenoma **Xa**, que al igual que en *H. marinum sensu lato* (ver capítulo anterior) mostró señales subteloméricas en su brazo largo con la sonda pTa794 (5S) (Fig. 7.5a).

Como en las accesiones diploides y tetraploides analizadas, la sonda pSc119.2 se localizó en regiones subteloméricas de algunos cromosomas. Además, se observó una señal intersticial en un cromosoma submetacéntrico perteneciente al subgenoma **Xa** (Fig. 7.5c). Es significativo que esta señal, como se ha mostrado en el capítulo 6, presente en la ssp. *gussoneanum* sirve para diferenciar los cromosomas entre las subespecies de *H. marinum*. Por último entre los clones analizados, la sonda pAs1 generó un patrón muy rico en señales de hibridación en todos los cromosomas, si bien algo menos abundante en los cromosomas pertenecientes al subgenoma **Xa** (Fig. 7.5d).

Como en *H. roshevitzii* (cromosoma E) y en la ssp. *brachyantherum* 4x (cromosoma L), solo un par de cromosomas (M) mostró la presencia de un clúster de repeticiones AG próximo a los genes 45S (Fig. 7.5c). La aplicación de las sondas (AAC)₅ (Fig. 7.5b) y (AAG)₅ generó múltiples señales de hibridación (Fig. 7.5c). Al igual que en las accesiones tetraploides, la sonda (ACT)₅ mostró señales de hibridación de diferente intensidad entre los cromosomas, en localizaciones similares a las obtenidos con (AAG)₅ y (AAC)₅ pero siendo siempre de menos intensidad que estas, por lo que no se intentó analizar en detalle su patrón de hibridación. La sonda telomérica se observó exclusivamente al final de los brazos cromosómicos (datos no mostrados).

Una vez que fue establecida la identidad de cada par cromosómico, se construyeron cariotipos basados en las sondas pTa71, pTa794, pAs1, (AG)₁₀, (AAC)₅ y (AAG)₅ (Fig. 7.5e). Los cromosomas se clasificaron en dos grupos. Los siete pares identificados mediante GISH como pertenecientes al subgenoma **Xa** (A-G) se ordenaron siguiendo el mismo criterio utilizado previamente para confeccionar los cariotipos de *H. marinum sensu lato* (ver capítulo anterior). Resulta evidente que estos cromosomas muestran esencialmente la misma morfología y distribución de sondas que los cromosomas presentes en las accesiones diploides de la ssp. *gussoneanum* y por tanto fueron designados como subgenoma **Xa**. El otro grupo de 14 pares de cromosomas (A-N) se ordenaron siguiendo el mismo criterio para confeccionar los cariotipos de las accesiones 4x (Fig. 7e).

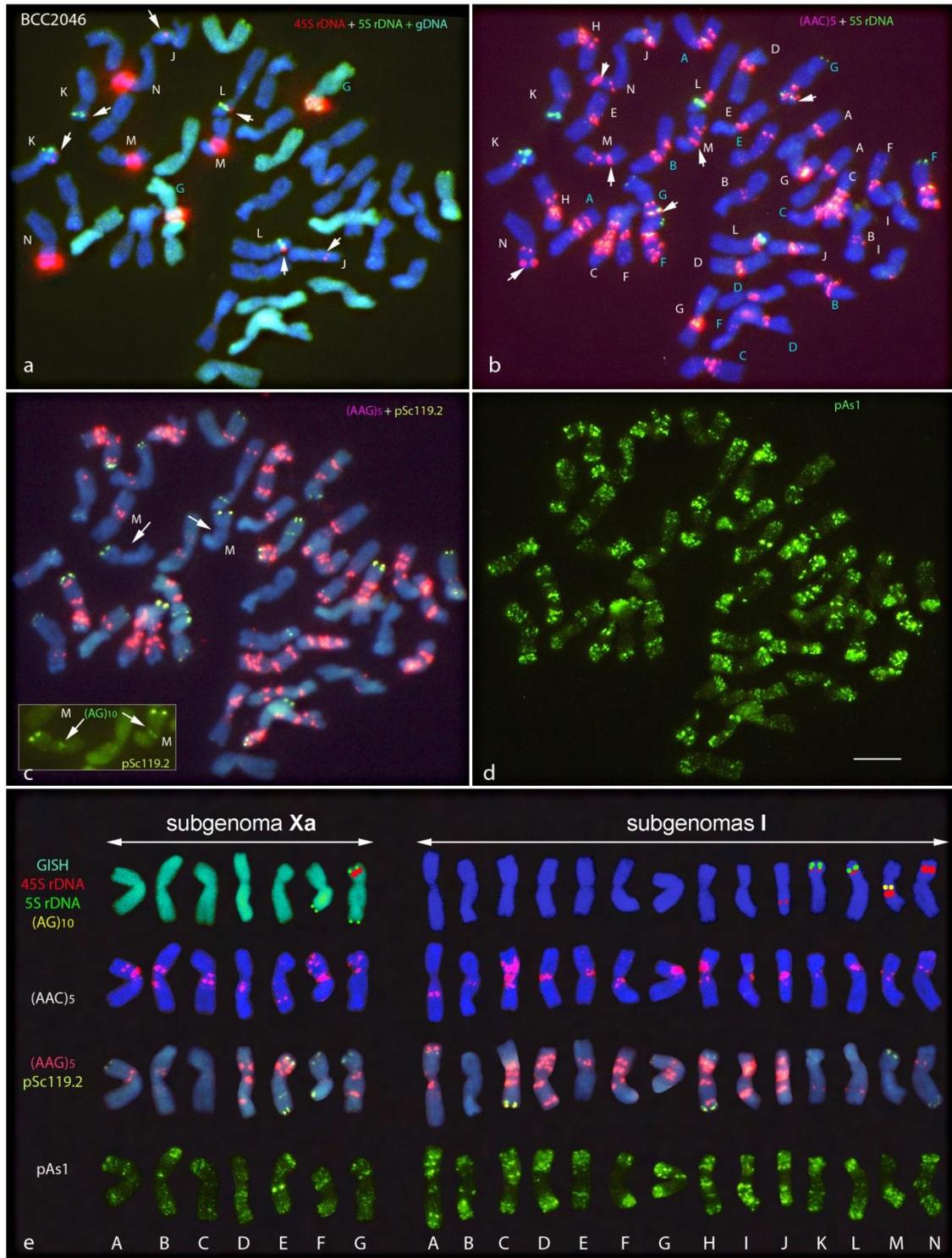


Figura 7.5. Hibridación *in situ* múltiple en una metafase de la accesión hexaploide BCC2046 con las sondas indicadas y sus correspondientes cariotipos. En **a** los 14 cromosomas hibridados utilizando como sonda ADN de *H. marinum* ssp. *gussoneanum* 2x (GISH); las flechas apuntan a las señales más débiles obtenidas con pTa71 (45S). En **b** las flechas señalan los 14 cromosomas revelados mediante GISH en **a**. En el recuadro insertado en **c** las flechas apuntan las señales obtenidas con (AG)₁₀. Indicar que en los cariotipos mostrados en **e** las señales obtenidas con pTa71 (**a**), pTa794 (**b**) y (AG)₁₀ (recuadro en **c**) están pintadas sobre los cromosomas (fila superior). Barra de escala=10 μm.

7.3. Discusión

En este trabajo se muestra por primera vez la identificación inequívoca de todos los cromosomas en todas las subespecies/citotipos de *H. brachyantherum* y *H. roshevitzii*. En base al tamaño, morfología y mapa físico obtenidos con distintas sondas en experimentos de hibridación *in situ* múltiple, incluyendo por primera vez sondas tipo SSRs, ha sido posible establecer posibles homologías entre todos los cromosomas de las accesiones de la misma especie, lo que ha permitido evaluar la diversidad citogenética de las mismas. Además, se han establecido posibles relaciones de homeología entre las especies para algunos cromosomas, proporcionando nuevos datos sobre la evolución cariotípica del género *Hordeum*.

7.3.1. Relaciones filogenéticas entre la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii*

En la ssp. *californicum*, la accesión BCC2057, que posee cinco pares metacéntricos incluyendo el satelizado y dos submetacéntricos, difiere de BCC2058 al presentar esta también satélite en uno de los pares submetacéntricos. Este polimorfismo en el número de cromosomas satelizados había sido ya descrito entre poblaciones de la ssp. *californicum* (Linde-Laursen et al. 1992). De acuerdo con Taketa et al. (2001), las accesiones de la ssp. *californicum* con un par de cromosomas satelizados, como BCC2057, deberían ser el resultado de la delección en el cromosoma F del clúster de genes 45S. En este trabajo se ha detectado además un polimorfismo que afecta a la relación de brazos en los cromosomas D, lo que sugiere que ambas accesiones difieren también por la presencia una inversión pericéntrica. Es significativo que a pesar de que solo se han caracterizado dos accesiones de la ssp. *californicum*, se ha detectado una considerable variación cariotípica, lo cual contrasta con lo restringido del área de distribución de esta especie, básicamente localizada en California. Entre las poblaciones de cebada californiana existe una gran variación morfológica y como se ha puesto de manifiesto analizando diferentes marcadores moleculares se manifiesta una elevada diversidad genética (Otto et al. 2002).

Los cariotipos de *H. roshevitzii* y de la ssp. *californicum* difieren sustancialmente en la morfología de sus cromosomas. *H. roshevitzii* se diferencia de la ssp. *californicum* por presentar un único par submetacéntrico y en la morfología de su cromosoma satelizado. En *H. roshevitzii* los satélites son la mitad de largos que el resto de brazo mientras que en la ssp.

californicum son más largos que sus brazos contiguos. Además, sin descartar posibles cambios cromosómicos, como translocaciones o inversiones, es evidente la poca similitud que se observa al comparar la distribución de algunas de las secuencias repetidas de ADN utilizadas en este trabajo como marcadores físicos. Esto indica que tras la diferenciación de estas especies, como resultado de inserciones independientes, amplificaciones o deleciones, se ha debido de producir una reorganización masiva al menos afectando a fracción del ADN repetitivo. Así, además del contraste en el patrón de distribución de los loci 45S, la distribución cromosómica de algunos SSRs es bastante distintivo entre especies. En la ssp. *californicum* se observa una mayor cantidad de regiones cromosomas enriquecidas en repeticiones AAG y AAC, en comparación con *H. roshevitzii*. El rico patrón de señales (ACT)₅ observado en *H. roshevitzii* contrasta con las tres señales observadas en la ssp. *californicum* (comparar Fig. 1f y 2c). Por último, la sonda (AG)₁₀, que no reveló señales en los cromosomas de la ssp. *californicum*, hibridó en un par de cromosoma en *H. roshevitzii*. Es de señalar que la ssp. *californicum* comparte los mismos patrones de distribución de repeticiones AAG y AG que los observados en los cromosomas de *H. chilense* (Hagrass et al. 2005) lo cual apoyaría una relación más cercana entre los genomas de la cebada de California y la Sudamericana *H. chilense*. Un dato interesante es que el único cromosoma con clúster de repeticiones AG observado en *H. roshevitzii* (presente en la ssp. *brachyantherum* 4x y 6x), no solo no está presente en las dos especies americanas con genomas I analizadas hasta la fecha, sino que tampoco está presente en las especies que integran los otros tres genomas (H, Xa, y Xu) de *Hordeum* (Carmona et al. 2013 a y b, Cuadrado et al. 2013).

Para profundizar en el entendimiento de las relaciones existentes entre especies filogenéticamente próximas es importante discernir la homología de sus cromosomas. Pese a las diferencias cariotípicas, se pudieron deducir algunas posibles homeologías entre los cromosomas de la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii*, las cuales solo pueden ser plenamente corroboradas tras demostrar la conservación de sintenia en estudios posteriores. En la mayoría de las especies americanas diploides con genoma I (como BCC2058) se observan dos pares de cromosomas satelizados con clústeres de genes 45S asociados a su constricción secundaria, uno de ellos además, el par submetacéntrico, con genes 5S (Taketa et al. 2001). Estas parejas se corresponden respectivamente con los grupos de homeología 6 y 5 de *Triticeae* en *H. chilense* (Cabrera et al. 1995). Apoyándonos en el patrón conservado de distribución de genes ribosomales en la tribu *Triticeae*, los cromosomas submetacéntricos F de

la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii* deberían ser al menos en parte homeólogos al grupo de homeología 5. Sin embargo es imposible deducir relaciones de homeología entre los cromosomas satelizados G presentes en la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii*. Es más, si existieran relaciones de homeología entre estos cromosomas satelizados, que tan significativamente difieren en morfología y localización de secuencias repetitivas, tras la separación de estas especies deberían haber ocurrido sustanciales cambios cromosómicos y reorganizaciones en la fracción del ADN repetitivo analizado (comparar Fig. 1h y 2f). Otra posibilidad es que exista relación entre el cromosoma E de *H. roshevitzii* (no satelizado pero con presencia de genes 45S en su brazo largo) y el cromosoma satelizado G de la ssp. *californicum*. Estos cromosomas muestran morfología y patrones de hibridación similares (por ejemplo para las sondas (AAG)₅ y pAs1) lo cual podría indicar que son al menos en parte homeólogos. Esta hipótesis se explicaría perfectamente asumiendo una amplificación/activación y/o pérdida de genes 45S (como ha ocurrido entre las poblaciones de la ssp. *californicum*) lo cual además explicaría la presencia de dos cromosomas submetacéntricos en la ssp. *californicum* frente la presencia de solo uno en *H. roshevitzii*). Un análisis cariotípico detallado de otras cebadas diploides pertenecientes al genoma I ayudaría a resolver la conexión entre las especies americanas y asiáticas, lo cual permitiría inferir la identidad del ancestro asiático portador del genoma I que migró desde Asia hace 5 millones de años, a través del estrecho de Bering, hasta colonizar Norte América y generar las cebadas americanas (Rajhathy et al. 1964, Blattner et al. 2010).

7.3.2. Sobre el origen del citotipo tetraploide de la ssp. *H. brachyantherum*

Ni GISH utilizando ADN total de la ssp. *californicum* y/o ssp. *H. roshevitzii* como sondas, ni FISH empleando la sonda pHch950, la cual resulto eficaz en diferenciar dos subgenomas en distintas cebadas tetraploides como *H. depressum*, *H. murinum* y *H. secalinum* (Ferrer et al. 1994, de Bustos et al. 1996), permitieron identificar los subgenomas presentes en el citotipo tetraploide de la ssp. *H. brachyantherum*. Pese a ello, estos resultados no fueron inesperados dada la poca divergencia genética que se supone que existe entre los genomas de la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii* (Bothmer et al. 1986). Independientemente de la imposibilidad de separar los cromosomas en dos grupos de siete pares, es evidente que las formas tetraploides no son autoploides, lo que apoya su presunta naturaleza aloploiploide segmental como resultado de

hibridación entre dos especies filogenéticamente muy emparentadas (Rajhathy y Morrison 1959, Linde-Laursen et al. 1986).

Aunque se observaron similitudes entre algunos cromosomas presentes en las accesiones tetraploides de la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii*, tampoco fue posible, tras la comparación de los cariotipos, identificar dos grupos completos de siete pares cromosómicos que hubiera permitido demostrar la participación de estas especies en el origen de la ssp. *brachyantherum* 4x. Sin embargo, estos resultados tampoco contradicen que la ssp. *californicum* y/o *H. roshevitzii* pudieran haber participado en la formación del tetraploide. Podría ser que otros genotipos cromosómicamente distintos a las accesiones aquí analizadas hubieran estado implicados en el origen de los tetraploides. Tampoco puede descartarse que se trataran de los mismos genotipos y que tras la hibridación interespecífica, los genotipos involucrados hayan sufrido una gran remodelación. En resumen, con los datos disponibles es imposible evaluar cuanta de la variación cromosómica observada podría ser debida a cada una de estas dos circunstancias. Los análisis citogenéticos detallados sobre la variación intraespecífica existente en la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii*, incluyendo más accesiones y taxones relacionados, podría aportar más datos sobre este aspecto.

Por otro lado, se pudieron establecer con bastante certeza posibles relaciones de homología para las parejas cromosómicas que portan los genes ribosomales. Se emplea la designación de cromosomas tipo-*californicum* y tipo-*roshevitzii* para hacer referencia a los cromosomas de *brachyantherum* 4x con similitudes (morfología y mapa físico) con cromosomas de la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii*, respectivamente, asumiendo que los poliploides originados y sus progenitores compartirían cromosomas similares, pero también con taxones (existentes o extinguidos) estrechamente relacionados (comparar Fig. 7.4 con 7.1h y 7.2f). El patrón de señales para genes 5S permitió emparejar los cromosomas K y N con los cromosomas F de la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii*, respectivamente. Es probable que los cromosomas K (tipo-*californicum* F) y N (tipo-*roshevitzii* F), portadores de clústeres de genes ribosomales 5S y 45S pertenezcan al mismo grupo de homeología (como se ha mencionado anteriormente, al grupo 5 de homeología de la tribu *Triticeae*). La presencia de un grupo de repeticiones AG próximo a señales de genes 45S en el brazo largo del cromosoma L en las accesiones tetraploides y el cromosoma E de *H. roshevitzii* apoya sólidamente una relación entre ambos. Finalmente, se establecieron relaciones entre los otros cromosomas con locus 45S. Se trata del cromosoma J con señales débiles con la sonda del 45S (tipo-*californicum* G), y

el cromosoma satelizado M (tipo-*roshevitzii* G). Estos resultados sugieren por tanto que los tres cromosomas satelizados (L- N) observados en las accesiones tetraploides habrían sido donados por el progenitor tipo-*roshevitzii* como consecuencia de la amplificación/activación de genes 45S en dos pares de cromosomas (tipo-*roshevitzii* E y F) y la eliminación/inactivación en cromosomas derivados del donante tipo-*californicum* (F y G). Este resultado encaja con anteriores hipótesis evolutivas que sugieren que el citotipo tetraploide de la ssp. *brachyantherum* se originó a partir de un híbrido interespecífico entre la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii* (Linde-Laursen et al. 1992) y que el cromosoma satelizado (aquí llamado M) presente en los tetraploides derivó de *H. roshevitzii* (Taketa et al. 2005). Sin embargo, las relaciones establecidas en base a los resultados de este trabajo contradice la hipótesis de que los tres cromosomas satelizados observados en las formas tetraploides de la ssp. *brachyantherum* son la suma de los cromosomas satelizados observados en la ssp. *californicum* y *H. roshevitzii* (Linde-Laursen et al. 1995). Claramente el citotipo tetraploide de la ssp. *brachyantherum* sería un nuevo caso de dominancia nucleolar (inactivación uniparental de genes ribosómicos), un fenómeno conocido como anfiplastia, común en híbridos tanto animales como vegetales, especialmente en poliploides, incluyendo muchos miembros de tribu *Triticeae* (Cermeño y Lacadena 1985).

7.3.3. Diversidad cromosómica entre los citotipos tetraploides de la ssp. *brachyantherum*

Comparando los cariotipos de las tres poblaciones tetraploides de la ssp. *brachyantherum* analizadas se han encontrado que la accesión de Newfoundland difiere de las otras dos (California y Alaska) por la presencia de una translocación recíproca. Sin embargo, comparando el mapa físico generado por el conjunto de secuencias repetidas analizadas, es evidente que la variación intraespecífica es baja. Los polimorfismos en cuanto a la presencia/ausencia de algunas secuencias repetidas, por ejemplo señales pSc119.2, pAs1 o (AAG)₅, coinciden con el polimorfismo intraespecífico encontrado utilizando las mismas sondas en otras especies de *Triticeae*, incluyendo *Hordeum* (Cuadrado et al. 1995, Schneider et al. 2003, Carmona et al. 2013a). Existe una evidencia cada vez mayor, en base a estudios moleculares poblacionales, de que muchos taxones poliploides se han originado en distintas ocasiones, como consecuencia de procesos independientes de aloidización (Soltis et al. 2009). De hecho, existe controversia en cuanto al origen monofilético o polifilético de las poblaciones tetraploides de

la *ssp. brachyantherum*. La amplia área de distribución geográfica del taxón, unido a la significativa variación morfológica (Bothmer et al. 1995) y la elevada diversidad en cuanto al genoma de sus cloroplastos, sugiere o bien que las distintas poblaciones han tenido diverso origen o que existe un amplio flujo genético entre especies relacionadas (Jakob y Blattner 2006). A partir de nuestros datos es imposible deducir si las tres poblaciones presentan un origen único o múltiple e independiente. No obstante el reducido patrón de variación indicaría que en el caso de que se hubieran originado por eventos independientes de alopolidización, las poblaciones de los dos progenitores donantes involucrados en los diferentes episodios de hibridación deberían corresponder a genotipos con poca divergencia cromosómica.

Ningún taxón diploide de *Hordeum* examinado hasta la fecha presenta un cromosoma tan pequeño y submetacéntrico como el cromosoma D observado en la accesión BCC2056 (Linde-Laursen et al. 1992). Linde-Laursen et al. (1986) tras el análisis de Bando-C indicó la presencia de un cromosoma pequeño y submetacéntrico en poblaciones de Newfoundland sin homólogo en otras poblaciones de la *ssp. brachyantherum* 4x, pero no fueron capaces de deducir la causa de este polimorfismo cromosómico. Por otro lado la morfología submetacéntrica de los cromosomas portadores de las secuencias para genes 5S y 45S se mantiene en todas las especies de *Hordeum* (de Bustos et al. 1996, Taketa et al. 2001), como aquí se muestra también para la *ssp. californicum* y *H. roshevitzii*, pero no en el caso del cromosoma K (portador de los genes 45S y 5S) de la accesión BCC2056. En el presente trabajo ha sido posible determinar que los cromosomas D y K presentes en la accesión de Newfoundland, son el resultado de una translocación recíproca (ver Fig. 7.4). Como se ha indicado anteriormente, no fue posible la caracterización de los dos subgenomas presentes en las accesiones tetraploides, lo que hubiera aclarado sin ambigüedad si esta reordenación cromosómica es un intercambio intra- o intergenómico. Está claro que si la reordenación hubiera sido intergenómica, esta solo podría haberse producido tras la convergencia de los genomas de las especies donadoras. Translocaciones como la presente en la accesión BCC2056, podrían constituir un cambio polimórfico estructural similar al observado en otros taxones de *Hordeum*, especialmente en alopoliploides, como se ha mostrado en *H. capense* (Taketa et al. 2009). En efecto, cariotipos detallados, como los que aquí se muestran en variedades/accesiones de *H. vulgare* (Capítulo 4, Farre et al. 2012) ponen de manifiesto que las translocaciones recíprocas en *Hordeum* son mucho más frecuentes que las inicialmente

supuestas en base a análisis cariotípicos basados en bandeos convencionales (Konishi y Linde-Laursen 1988).

7.3.4. Sobre el origen de los hexaploides de la ssp. *H. brachyantherum*

Como Taketa et al. (1999a) describieron previamente, la técnica de GISH permite identificar los cromosomas pertenecientes al subgenoma **Xa** presente en hexaploides, lo cual confirma que la ssp. *brachyantherum* 6x es un alopoloide y que en el proceso de hibridación estuvo implicado un progenitor diploide perteneciente al complejo *H. marinum*. Sin embargo, esta técnica no permite diferenciar cual de las subespecies de *H. marinum* fue el progenitor ancestral, ya que se obtienen los mismos resultados cuando se utiliza como sonda el ADN marcado de la ssp. *marinum* que de la ssp. *gussoneanum*. En el capítulo anterior se muestra la posibilidad de distinguir las dos subespecies de *H. marinum* a nivel cromosómico combinando determinadas sondas (Carmona et al. 2013b). Así, por ejemplo, la presencia de genes 5S en la región distal del brazo largo de los cromosomas satelizados en la ssp. *gussoneanum*, que no se observan en la ssp. *marinum*; o la presencia de señales intersticiales con pSc119.2 en una pareja de cromosomas submetacéntricos de la ssp. *gussoneanum*, que no se observan en la ssp. *marinum*, permiten distinguir los cariotipos de ambas especies (Fig. 6.7). Los cromosomas del subgenoma **Xa** presentes en BCC2056 son los mismos que los cromosomas presentes en las accesiones europeas de la ssp. *gussoneanum* analizadas en el capítulo anterior (comparar Fig. 7.5e y Fig. 6.4). Con excepción de que el cromosoma con genes ribosomales 45S no mostró constricción secundaria en comparación a su homólogo en ssp. *gussoneanum* 2x (posiblemente como resultado de dominancia nucleolar) no se observó ninguna otra diferencia. Esto demuestra la hipótesis presentada en base a filogenias moleculares y evidencias geográficas de que la ssp. *brachyantherum* 6x es un alohexaploide originado en un área restringida de California por la hibridación entre un tetraploide americano con la ssp. *gussoneanum* introducida desde Europa (Nishikawa et al. 2002, Jakob and Blatter 2006, Blatter et al. 2010).

Numerosos estudios han documentado que a los procesos de poliploidización se añaden de forma rápida cambios genómicos significativos, como ocurre por ejemplo en trigos sintéticos que muestran la pérdida o ganancia de secuencias pSc119.2 (Zhang et al. 2013). En el capítulo 6, se han descrito cambios parecidos en *H. murinum*. Sin embargo, en este trabajo

se muestra que no ha existido una reestructuración significativa del genoma **Xa**, al menos en cuanto a las secuencias aquí analizadas, tras el proceso de poliploidización que originó el citotipo hexaploide de la ssp. *brachyantherum* (posterior a la introducción de la ssp. *gussoneanum* en California en tiempos históricos). Es de señalar que el genoma derivado de la ssp. *gussoneanum* en el citotipo tetraploide de *H. marinum* tampoco ha sufrido cambio a nivel cromosómico, como se ha mostrado en el capítulo anterior (Carmona et al. 2013).

En relación al progenitor tetraploide, este trabajo no permite establecer una conexión directa entre los citotipos 4x y 6x de la ssp. *brachyantherum*, lo cual hace pensar que las formas tetraploides de esta subespecie no habrían estado involucradas en el origen de las hexaploides. Aunque no se puede descartar que pudiera haber estado implicado otro ecotipo de la ssp. *brachyantherum* 4x, la semejanza revelada a nivel cariotípico entre las accesiones aquí analizadas, correspondientes a poblaciones de muy distinto origen geográfico, incluyendo una accesión de California (origen del hexaploide), contrastan claramente con los cromosomas no-*gussoneanum* presentes en la población hexaploide. Esto apoyaría la implicación de un taxón tetraploide diferente. Aunque no puede descartarse que los subgenomas **I** y **Xa** hayan podido presentar diferentes procesos evolutivos durante el proceso de adaptación tras la hibridación interespecífica, parece poco probable la hipótesis extendida de que en el origen de los hexaploides hubiera participado un genotipo *brachyantherum* 4x como los aquí analizados y que este sufriese una fuerte diferenciación estructural tras la poliploidización. No se ha detectado ninguna variación a nivel cromosómico entre los cromosomas del subgenoma **Xa** y su especie donante, lo que apoyaría la idea de que las diferencias cromosómicas entre la ssp. *brachyantherum* 4x y la posible especie tetraploide implicada en el origen, deberían haberse producido antes de la formación del hexaploide. Hay que decir, que formalmente se ha asumido que el citotipo tetraploide de la ssp. *brachyantherum* participó en el origen de los hexaploides, en parte debido a la presencia de poblaciones de esta especie rodeando el área donde el citotipo hexaploide fue descubierto (Bothmer y Jacobsen 1985). Más tarde esta evidencia ecogeográfica tuvo su apoyo en los patrones de bandeo-C y análisis del apareamiento meiótico (Linde-Laursen et al. 1986, Bothmer et al. 1989). Sin embargo, Taketa et al. (1999a) en experimentos con GISH observaron cierta divergencia entre los dos citotipos al no obtener señales uniformes en los cromosomas pertenecientes a los subgenomas **I** de los hexaploides utilizando como sonda ADN marcado de los tetraploides. Más aun, algunas filogenias moleculares han revelado que los subgenomas **I** de ambos citotipos son divergentes

(Blattner 2004, Komatsuda et al. 2009). Por último, es de destacar que Brassac et al. (2012), basándose en el análisis de secuencias TOPO6, encuentran que las derivadas de la accesión BCC2056 se aproximan a secuencias de la especie de América Central *H. guatemalense* en un clado bien sustentado que a su vez se separa de las secuencias derivadas de la ssp. *brachyantherum* 4x (se utilizan las mismas accesiones aquí analizadas) y *H. jubatum*. Si bien estos autores no discuten estos resultados asumiendo que las formas 4x participaron en el origen del citotipo 6x. En resumen, no ha sido posible desvelar el progenitor tetraploide que originó las formas hexaploides de *H. brachyantherum*. El análisis cariotípico detallado de otras especies tetraploides, morfológica, citológica y genéticamente muy similares, tales como *H. jubatum*, distribuida también en California o *H. guatemalense*, nativa de América Central (Bothmer et al. 1998) podría ayudar a resolver la historia evolutiva de la ssp. *brachyantherum*.

7.3.5. Taxonomía del complejo *H. brachyantherum*

La taxonomía del grupo *Hordeum brachyantherum/californicum* es todavía un asunto de debate y no existe consenso entre diferentes autores a la hora de realizar la clasificación de estos taxones. En un primer momento se trataron como especies diferentes *H. californicum* Covas y Stebbins y *H. brachyantherum* Nevski, pero Bothmer et al. (1995) en su última revisión del género y basándose en la imposibilidad de establecer una determinación morfológica sin ambigüedad, prefirió mantener los citotipos diploides y tetraploides como subespecies. Otro problema es el estatus taxonómico del citotipo hexaploide descubierto en 1980 (Bothmer y Jacobsen, 1985), que no está ni siquiera reconocido como taxón diferente, ya que no muestra rasgos morfológicos diferenciales con respecto a las formas tetraploides. En este trabajo se ha utilizado el tratamiento taxonómico de subespecies de acuerdo con la información facilitada por el banco de semillas (Tabla 2.1). Sin embargo, incluso asumiendo que la ssp. *californicum* hubiera estado involucrada en el origen del citotipo tetraploide de la ssp. *brachyantherum* y que éste lo estuviera en el origen del citotipo hexaploide (fuertemente cuestionado) está claro que estos taxones no constituyen un grupo monofilético. La taxonomía del género *Hordeum* ha cambiado en numerosas ocasiones durante las últimas décadas. Blattner (2009) intentando reflejar las constituciones subgenómicas de los poliploides de *Hordeum*, considera que el citotipo hexaploide junto con las especies tetraploides *H. secalinum* y *H. capense*, debería integrar una nueva sección, con la denominación propuesta de Nodosa, que combinaría los

genomas I y **Xa**. En consecuencia el tratamiento taxonómico del complejo *H. brachyantherum* basado exclusivamente en criterios morfológicos debería al menos ser cuestionado y las formas 2x, 4x y 6x deberían ser consideradas como tres especies separadas basadas en el aislamiento reproductivo adquirido tras la poliploidización. Sería lógico por tanto dividir los tres citotipos en tres especies de acuerdo a su nivel de ploidía: *H. californicum* debería incluir las formas diploides mientras que *H. brachyantherum* debería incluir solo a las tetraploides. Se debería utilizar una nueva denominación para el citotipo alohexaploide.

8. Análisis de la organización molecular de agrupaciones de SSRs

8.1. Introducción

Las especies de grupos taxonómicos relacionados comparten genes y la ordenación de estos a lo largo de los cromosomas es similar, pero pueden existir grandes diferencias en el tamaño de sus genomas, debido principalmente a la presencia de grandes regiones de ADN de naturaleza repetitiva (Heslop-Harrison 1998). Los SSRs forman parte de la fracción de ADN repetido de todos los genomas formando clústeres que no suelen exceder los 100pb. En algunas especies, además ciertos motivos SSRs pueden formar grandes agrupaciones de varios miles de unidades de repetición formando parte de la fracción de ADN altamente repetido o satélite de estas especies y generalmente asociadas a regiones heterocromáticas.

A medida que la tecnología ha permitido secuenciar genomas de una manera más rápida y barata, se han multiplicado los proyectos de secuenciación de genomas completos. Aunque estos genomas se consideren completamente secuenciados, la secuencia obtenida suele corresponder a la porción eucromática del ADN, rica en genes. En realidad, existe una parte de los genomas, que constituye los llamados *gaps* o lagunas, que permanece sin secuenciar. La existencia de estos *gaps* se explica por dos razones. Por un lado la propia naturaleza del ADN repetitivo le otorga a este una baja capacidad de clonación, lo que hace muy difícil analizar su secuencia (Kourpina et al. 2004). Por otro lado, al trabajar con secuencias repetidas los alineamientos que producen los programas informáticos empleados generan múltiples configuraciones diferentes, lo que impide construir un solapamiento o *contig* único. Precisamente, el descarte de estas secuencias y la utilización de regiones que se alinean sin ambigüedad es la causa de la existencia de *gaps* en los genomas (Treagen y Salzberg 2012). Las grandes regiones ricas en SSRs suelen excluirse por este motivo. Debido en gran parte a la dificultad que entraña trabajar con estas secuencias a día de hoy no se conoce su organización molecular (Morgante 2002, Sonah y Deshmukh 2012).

Con el objetivo de aportar nuevos datos sobre la organización molecular de regiones enriquecidas en SSRs, en este trabajo se pretende analizar una librería de *H. vulgare* para seleccionar clones BAC ricos en SSRs. En concreto se pretende analizar las secuencias de largos tramos de ACT dado que este SSR forma clústeres en los cromosomas de cebada y mostró una organización molecular en grandes agrupaciones en los experimentos de *Southern Blot* (capítulo 4). Para su secuenciación se emplearan dos metodologías: el diseño de cebadores, y cuando no sea posible la generación de delecciones seriadas mediante el uso de la exonucleasa III.

8.2. Resultados

8.2.1. Identificación de clones BAC de cebada ricos en repeticiones ACT

De los 50300 clones BACs que constituye la librería genómica HVVMRXALLhB obtenida de *H. vulgare* cv. Morex (Capítulo 3, Tabla 3.8) se detectaron 243 que mostraron señal positiva de hibridación con el oligonucleótido (ACT)₅ (Fig. 8.1).

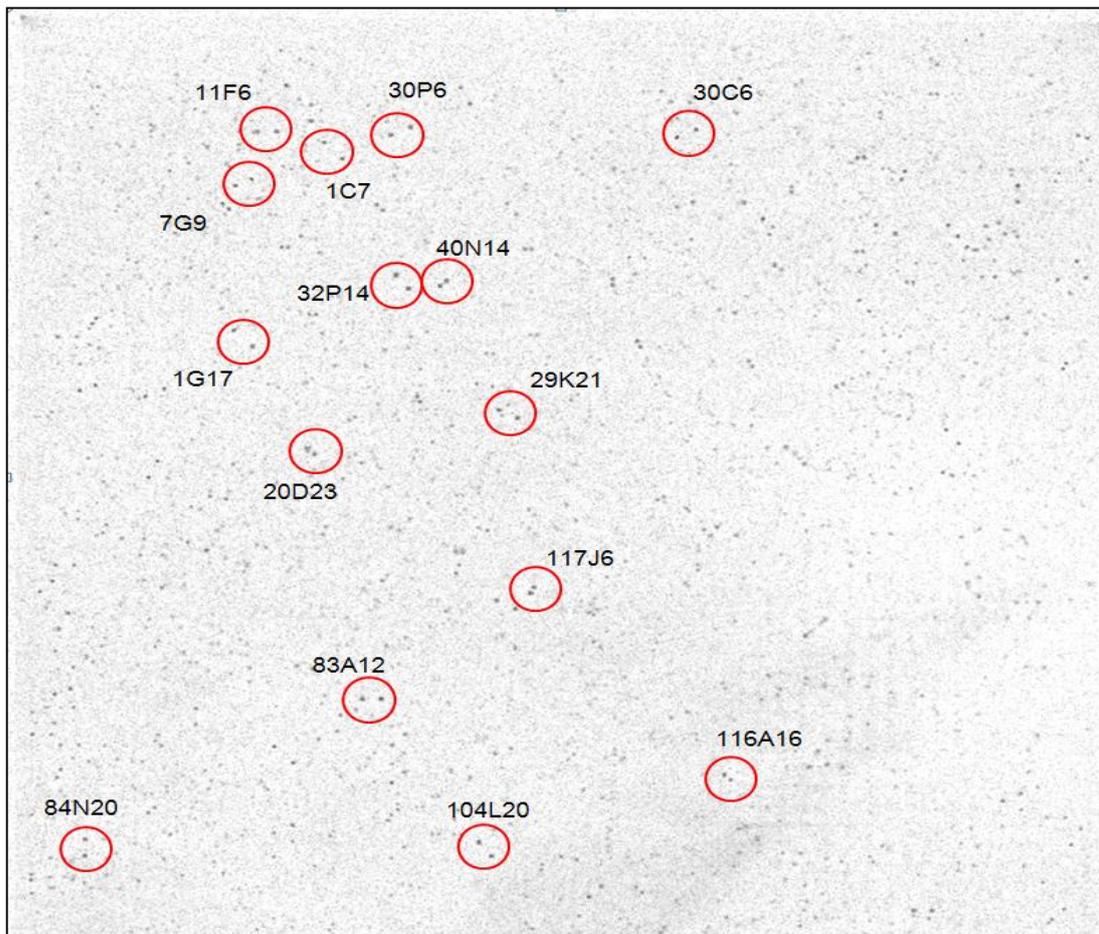


Figura 8.1. Señales obtenidas tras la hibridación del *macroarray* de la librería de BACs HVVMRXALLhB de cebada, con la sonda (ACT)₅. Los clones positivos con mayor intensidad de señal se muestran rodeados por un círculo rojo acompañados de las coordenadas de cada clon en la librería.

Los clones positivos se clasificaron en función de la intensidad de la señal de hibridación, seleccionándose para su análisis los diez clones que presentaron una mayor intensidad (Tabla 8.1).

Nombre del BAC	Coordenadas de los BAC en la librería	Coordenadas de los clones BAC	Intensidad en la señal de (ACT) ₅
BAC 1	73E15	122E15	0,957
BAC 2	83A12	132A12	0,952
BAC 3	32P14	81P14	0,941
BAC 4	104L20	153L20	0,935
BAC 5	29K21	78K21	0,933
BAC 6	30C06	79C06	0,931
BAC 7	07G09	56G09	0,927
BAC 8	40N14	89N14	0,918
BAC 9	60D09	109D09	0,915
BAC 10	67G11	116G11	0,914

Tabla 8.1. Lista de los 10 clones que presentaron una señal más intensa para la hibridación con la sonda (ACT)₅.

8.2.2. Selección de fragmentos de restricción ricos en ACT

Una vez seleccionados los diez clones con una mayor intensidad de señal se trató de obtener el ADN de cada uno ellos. Este proceso resultó difícil dado que en numerosas ocasiones los rendimientos que se obtuvieron en la extracción de ADN fue muy pobre, encontrándose en otras ocasiones el ADN degradado. Se obtuvieron resultados satisfactorios con varios de los clones de entre los que se seleccionó finalmente el BAC 6.

El ADN del BAC6 aislado, se sometió a una digestión con diferentes enzimas de restricción: *AluI*, *EcoRI*, *HindIII*, *TaqI* y *BamHI*. Estas enzimas se seleccionaron ya que su diana no actuaba sobre la secuencia del microsatélite ACT (Capítulo 3, Tabla 3.3). Las digestiones realizadas produjeron una serie de fragmentos de restricción, desde 0.3 kb hasta más de 12 kb (Fig. 8.2a). Para identificar los fragmentos ricos en secuencias ACT de entre todos los generados, éstos se separaron en un gel de agarosa al 0.8% y seguidamente se transfirieron a una membrana donde fueron hibridados empleando (ACT)₅ como sonda.

El resultado del *Southern Blot* mostró qué fragmentos incluían el microsatélite ACT (Fig. 8.2b). Además, para saber si estos fragmentos contenían otro tipo de microsatélites se repitió la hibridación utilizando como sondas distintos SSRs. Es de destacar que algunos de los fragmentos hibridaron también con la sonda (AAG)₅ indicando que estos fragmentos contenían ambos SSRs (Fig. 8.2c).

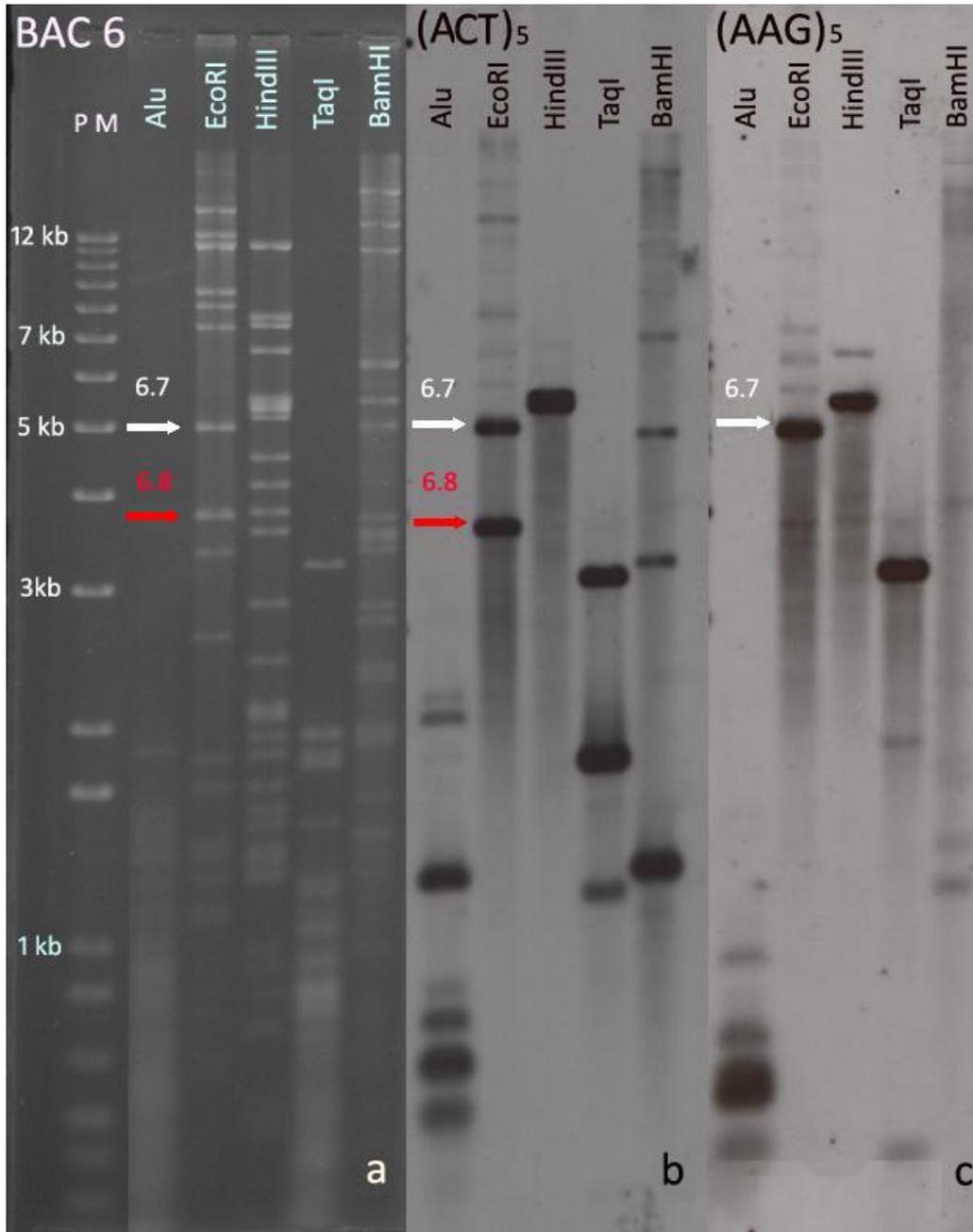


Figura 8.2. Identificación de fragmentos que contienen secuencias SSRs. (a) Patrones de restricción obtenidos al digerir el ADN del BAC 6 con las enzimas de restricción *Alu*, *EcoRI*, *HindIII*, *TaqI* y *BamHI*. PM=marcador de peso molecular; (b) y c) Patrones de hibridación obtenidos secuencialmente con las sondas (ACT)₅ (b) y (AAG)₅ (c). Las flechas señalan los fragmentos elegidos para su estudio.

De entre los fragmentos que dieron una señal positiva tras la hibridación con (ACT)₅ se eligieron el fragmento 6.7 y el fragmento 6.8 por mostrar una señal intensa y presentar un tamaño adecuado para ser clonados. Ambos fragmentos fueron generados por la enzima *EcoRI* presentando el fragmento 6.7 un tamaño cercano a 5000 pb y el fragmento 6.8 alrededor de 3800 pb (Fig. 8.2).

En la secuencia caracterizada, de un tamaño de 4893 pb se observó una zona de 1790 pb donde se concentra una alta densidad de distintos SSRs (Fig. 8.4). En ella se encontró una región de 331 pb rica en repeticiones ACT, como era de esperar por los resultados positivos en los ensayos de hibridación con la sonda (ACT)₅.

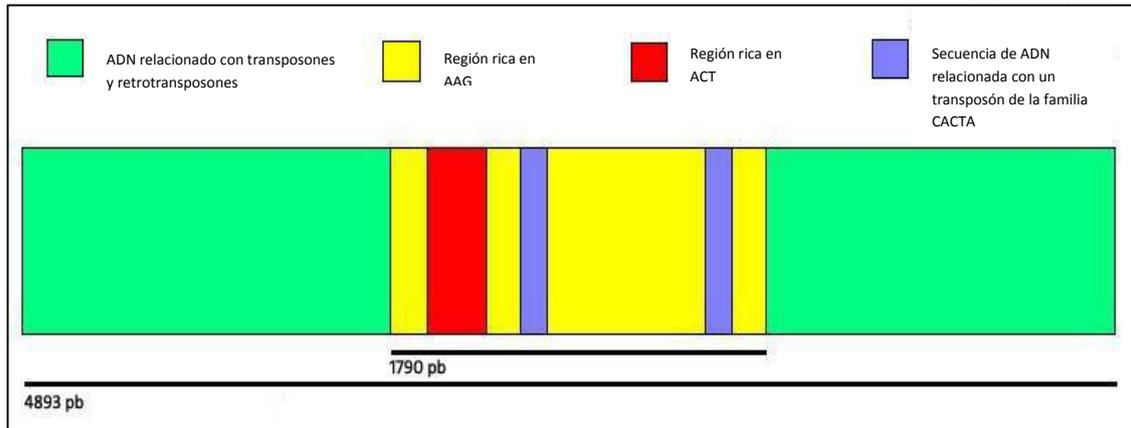


Figura 8.4. Gráfico representando la diferente naturaleza del ADN del fragmento 6.7. La figura muestra un código de colores a lo largo de la secuencia de 4893 pb obtenida. Cada color diferencia regiones del ADN con distintos tipos de secuencias. La región de 1790 pb donde aparecen motivos repetidos de SSRs aparece subrayada.

La región analizada contiene agrupaciones de este SSR formando bloques imperfectos al estar interrumpidos por motivos derivados del propio microsatélite ACT con la sustitución en alguna de sus bases (GCT, ACG, CCT). El mayor bloque continuo e ininterrumpido que se identificó fue un tramo de 93 pb. Esta región rica en ACT se encuentra rodeada por repeticiones de otros SSRs. Entre estos destaca AAG cuyo motivo se localiza flanqueando ambos lados de la región rica en ACT, siendo más abundante que este último, y abarcando unas 500 pb. Además se observaron algunas agrupaciones de repeticiones AAG intercaladas entre las repeticiones ACT. Las repeticiones no aparecían en un gran bloque continuo, sino en bloques menores de diverso tamaño, variando entre las 20 y 30 pb, intercalados por otros motivos derivados de su secuencia (CAG, TAG, AAT). La abundancia de este AAG confirmó los resultados previos del experimento de *Southern blot* realizado utilizando la sonda (AAG)₅ que indicaban la presencia de este SSR junto con ACT en el fragmento 6.7.

En esta misma región de 1790 pb, además de la presencia de estos SSRs también se observó una secuencia de 104 pb que aparecía repetida dos veces de manera casi idéntica con una separación de 653 pb.

Se analizó la secuencia completa del fragmento 6.7 mediante el *software* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCIB) a través de una búsqueda en bases de datos. Si bien la región rica en SSRs de 1790 pb no alineó con ningún otro elemento existente en la base de datos, el resto de la secuencia que la flanquea, demostró su relación con elementos móviles tipo retrotransposones tales como *Gypsy*, *Athila* y *Sabrina*. La secuencia anteriormente citada de 104 pb, situada en el interior de la región rica en SSRs, se analizó por separado mostrando relación con el elemento móvil tipo transposón *Balduin* de la familia CACTA.

El otro fragmento seleccionado para su estudio, el fragmento 6.8 presentó problemas a la hora de obtener su secuencia mediante el diseño consecutivo de cebadores, obteniéndose únicamente una secuencia de alrededor de 1000 pb de uno de los extremos del fragmento. Por ello, se trató de obtener el resto de la secuencia a partir de la obtención de delecciones seriadas mediante el uso de la exonucleasa III. Mediante este método se obtuvieron siete fragmentos seriados que abarcaban el fragmento completo (Fig. 8.5) los cuales fueron clonados y secuenciados.

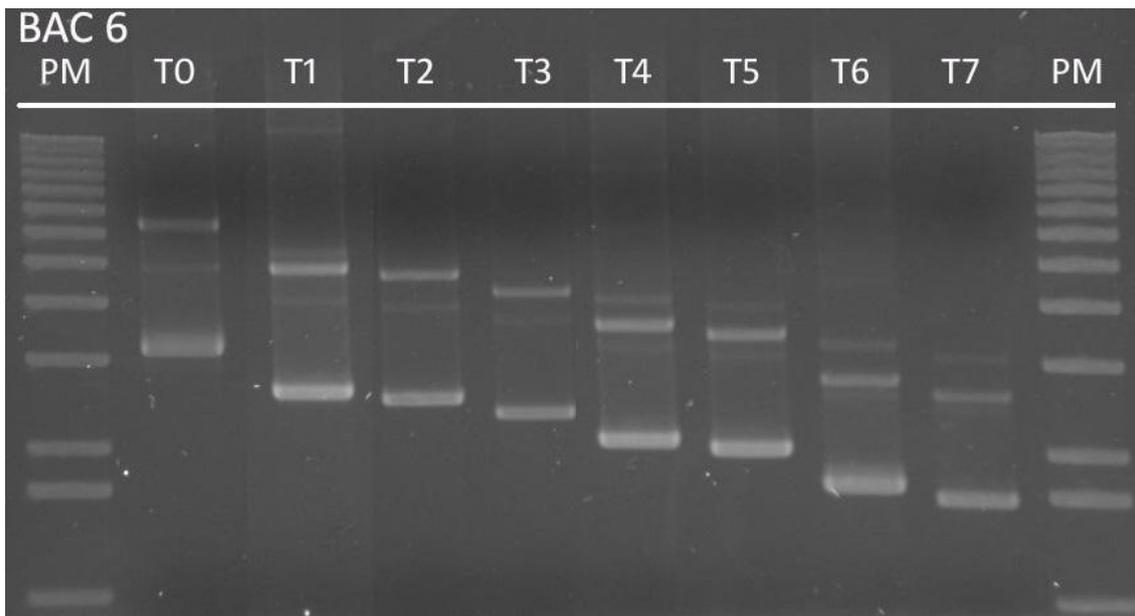


Figura 8.5. Clones portadores de los fragmentos seriados obtenidos tras la utilización de la enzima exonucleasa III. T0 indica el clon que contiene el fragmento completo mientras que T1 a T7 indican los clones que contienen los fragmentos seriados obtenidos en siete tiempos tras la adición de la exonucleasa.

Las secuencias obtenidas fueron ordenadas y el solapamiento que se obtuvo resolvió la estructura de una región de alrededor de 850 pb. El experimento se repitió varias veces pero en ningún caso se pudo avanzar en la obtención de la secuencia completa debido principalmente a la imposibilidad de secuenciar los clones que portaban los fragmentos

restantes. Debido a estos problemas únicamente se consiguió obtener una representación parcial del fragmento (Fig. 8.6).

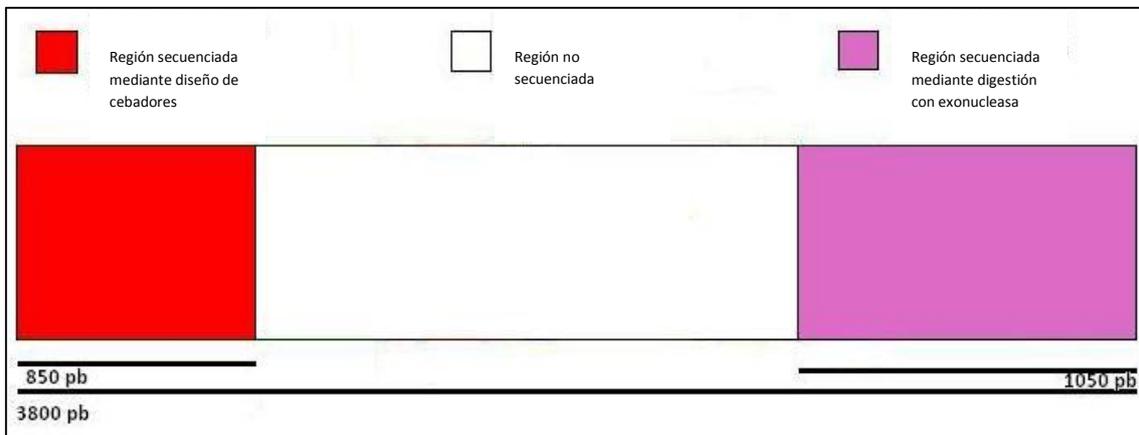


Figura 8.6. Gráfico representando las diferentes regiones secuenciadas del fragmento 6.8. La figura muestra un código de colores a lo largo de la secuencia de 3800 pb estimada, diferenciando las regiones que se pudieron secuenciar y la no secuenciada.

A pesar de que en el experimento de *Southern blot* realizado este fragmento mostró una señal de hibridación muy fuerte con la sonda (ACT)₅, la parte del fragmento secuenciado no presentó agrupación de microsatélites, estando la secuencia obtenida relacionada en su mayor parte con secuencias genómicas de cebada.

8.3. Discusión

8.3.1. Dificultad en la clonación y secuenciación de secuencias ricas en SSRs

Uno de los principales problemas cuando se trabaja con grandes regiones ricas en SSRs es su dificultad de clonación. Esta se debe fundamentalmente a la inestabilidad generada en el hospedador microbiano durante el proceso de clonaje sobre todo si la secuencia clonada contiene ADN con largas repeticiones, secuencias con estructuras especiales como ADN-Z, secuencias ricas en AT o regiones que contienen largos bloques de micro- y minisatélites (Hagan y Warren 1982, Schroth y Ho 1995, Kang y Cox 1996, Razin et al. 2001, Kourpina et al. 2003). Los vectores circulares habitualmente utilizados en el proceso de clonación pueden generar estructuras secundarias muy inestables cuando portan este tipo de secuencias lo que favorece su delección o reordenamiento (Leach y Lindsey 1986, Malagón y Aguilera 1998). Por otro lado, los vectores pueden contener regiones promotoras que pueden inducir la transcripción y la traducción de los fragmentos insertados lo que puede provocar una selección

en contra de los clones recombinantes que portan ADN repetido debido en algunos casos a su naturaleza tóxica para la bacteria. En otros casos son los promotores clonados los que pueden interferir con la estabilidad del vector (Godiska et al., 2010).

En nuestro caso este tipo de problemas ha sido evidente en todo el proceso de clonación. Así, tras crecer las bacterias que contenían los clones BAC en el medio de cultivo a partir de una colonia individual y purificar el ADN en numerosas ocasiones se consiguieron unos rendimientos muy bajos, obteniéndose muy poca cantidad de ADN, que además mostró una alta degradación, claramente observada en geles de agarosa. Esta inestabilidad también se observó en las muestras stock mantenidas a -80°C las cuales perdían en gran medida el clon que contenían. Por otro lado, la clonación en plásmidos de los fragmentos de ADN obtenidos a partir del ADN de los clones BAC también adoleció de la inestabilidad anteriormente comentada, siendo bastante complejo el proceso de obtención de clones para estos fragmentos. Previamente se han descrito situaciones similares a las aquí descritas, tanto al trabajar con clones BAC como con plásmidos portadores de regiones repetitivas, indicando una pérdida total o parcial del inserto, bajos rendimientos y degradación del ADN (Kourpina 2004, Ananiev 2005).

A la vista de estos resultados parece claro el efecto desestabilizador que este tipo de insertos produce sobre la bacteria. La naturaleza repetitiva del inserto favorecería estructuras en el ADN que generarían torsiones o tensiones en el vector y activarían algún mecanismo de la bacteria que terminaría por expulsar o degradar dicho inserto. En este sentido, la utilización de vectores lineales podría suponer un avance para la clonación de este tipo de secuencias ya que en este tipo de vectores no se producen las estructuras secundarias inestables típicas de los vectores circulares (Godiska et al. 2010).

Hasta hace relativamente poco tiempo la secuenciación de los genomas se realizaba mediante el método de Sanger que aunque proporcionaba lecturas de hasta 800 pares de bases representaba un método largo y costoso para la secuenciación completa de un genoma. Sin embargo, con la llegada de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) se produjo un aumento considerable del número de lecturas reduciéndose el tiempo y coste económico, lo que ha llevado a un rápido incremento del número de genomas secuenciados. Sin embargo, estos métodos conllevan la reducción de la longitud de las lecturas, a unas 50-100 pb, lo que ha supuesto una reducción de la calidad de los ensamblajes (Treagen y Salzberg 2012). Esto es debido a que, en presencia de regiones repetitivas, al trabajar con lecturas más cortas, se produce un incremento en el número de alineamientos ambiguos. Tanto es así que a

día de hoy se considera a las secuencias obtenidas anteriormente a los métodos de secuenciación masiva como las de mayor calidad (Bentley 2006).

En nuestro caso al tratar de obtener las secuencias correspondientes a una región rica en microsatélites cabía la posibilidad de encontrar bloques de ADN repetidos tan largos que superasen la longitud de una lectura de 500-800 pb obtenida mediante el método de Sanger empleado. Este hecho impediría el diseño de cebadores para avanzar en la secuenciación. Sin embargo, en el primer fragmento analizado de aproximadamente 5000 pb se obtuvieron lecturas que permitieron encontrar regiones donde poder diseñar nuevos cebadores y así avanzar en su secuenciación. Este tipo de procedimiento fue utilizado previamente en un estudio similar realizado en maíz (Ananiev et al. 2005) obteniendo secuencias similares en tamaño a las obtenidas en nuestro estudio. Cabe destacar que el fragmento caracterizado presentó en algunos casos bloques de SSRs superiores a 100 pb que habrían abarcado la totalidad de una lectura de un secuenciador masivo de nueva generación lo que hubiera supuesto un problema a la hora de alinear dicho fragmento.

Debido al problema potencial que puede suponer la secuenciación de este tipo de regiones mediante el uso consecutivo de cebadores se intentó abordar otro tipo de metodología consistente en secuenciar fragmentos de restricción seriados obtenidos tras la digestión con exonucleasa y así evitar el diseño de cebadores. Al dividir el fragmento a secuenciar en fragmentos seriados de menor tamaño que abarcan la totalidad del original, estos pueden ser clonados individualmente en un vector y secuenciados utilizando cebadores propios de dicho vector. La ventaja de este método es que el conjunto de secuencias que se generan son obtenidas de forma ordenada con lo que el solapamiento consecutivo de las mismas compondrá la secuencia total del fragmento. La literatura consultada relacionada con este tema no ha reflejado el uso de este método para este fin por lo que esta sería la primera vez que se ha utilizado esta metodología para la secuenciación de regiones ricas en microsatélites.

La aplicación de esta metodología para la secuenciación del fragmento 6.8 rico en el microsatélite ACT no permitió obtener la secuencia total del fragmento, obteniéndose únicamente alrededor de 1000 pb. Una posible explicación a este hecho podría ser que la inestabilidad de los clones que contienen las secuencias de ADN repetitivo provoca pérdidas de porciones del fragmento (Kourpina 2004, Ananiev 2005). Esta sería presumiblemente la razón por la que no se ha podido obtener la fracción repetitiva de este fragmento y solo se haya mantenido y podido secuenciar porciones sin presencia de SSRs. Por otro lado es posible

que el problema radique en la dificultad de que la ADN polimerasa reconozca las regiones repetidas a secuenciar dependiendo de las estructuras secundarias que se originen. En un intento por completar el fragmento 6.8 se diseñaron cebadores en algunas zonas que lo permitían, sin embargo solo se pudo secuenciar una región libre de SSRs. De este modo, la zona que contenía el SSR detectado mediante *Southern blot*, no pudo ser secuenciada.

8.3.2. Organización molecular de regiones ricas en SSRs

La organización molecular de grandes regiones ricas en SSRs es un aspecto casi desconocido siendo muy escasos los datos existentes al respecto principalmente por las dificultades metodológicas expuestas. La mayor parte de los SSRs que han sido analizados hasta ahora en plantas se localizan en regiones codificantes o próximas a ellas y suelen tener como mucho 100 pb de longitud (Chin et al. 1996, Taramino y Tingey 1996, Roder et al 1998). Sin embargo, las señales de las hibridaciones *in situ* obtenidas en cromosomas metafásicos indican la existencia de loci de microsatélites organizados en grandes agrupaciones de longitud superior, como ha sido puesto de manifiesto en estudios citogenéticos en diferentes especies de cereales (Cuadrado y Schwarzacher 1998), el garbanzo (Winter et al. 1999), la remolacha (Schmidt y Heslop-Harrison 1996) y los capítulos anteriores.

En el único estudio encontrado en la literatura sobre la estructura de amplias agrupaciones de SSRs en plantas corresponde al maíz, en que Annaniev et al. (2005) obtuvieron resultados similares a los encontrados en este trabajo. En el estudio realizado en maíz se analizó un tramo altamente homogéneo de 600 pb de repeticiones AAG estimando que la longitud de este tramo debía de ser aún mayor al detectar que una porción significativa del SSR se había perdido debido a la inestabilidad del vector. En los fragmentos de ADN analizados también encontraron tramos que contenían agrupaciones de los motivos CAG y TAG, probablemente derivados del microsatélite AAG mayoritario. Al igual que lo que se ha observado aquí los tramos ricos en microsatélites eran imperfectos, con mezcla de distintos motivos y sustituciones puntuales de nucleótidos. De igual manera, también aparecieron intercaladas otras secuencias como elementos móviles tipo transposón y retrotransposón y secuencias de ADN de bajo número de copias de origen desconocido.

Aunque el número de grandes regiones de SSRs analizadas hasta ahora es escaso, parece que la relación con elementos móviles es muy estrecha. Por otro lado, esta asociación ha sido puesta de manifiesto desde hace tiempo al analizar tramos cortos de microsatélites en

distintas especies como por ejemplo en cebada (Ramsay 1999) y en maíz (Ananiev et al. 2005). También se ha detectado la asociación de SSRs con elementos *Alu* en primates (Arcot et al. 1995), y con elementos *MITE* en arroz (De Clerck et al. 2001). En el caso de la cebada, la porción repetitiva relacionada con regiones próximas a genes está compuesta en su gran mayoría de retrotransposones, siendo los retrotransposones *Gypsy* los más abundantes (Meyer et al. 2012). En este trabajo también se ha puesto de relieve la asociación de microsatélites con transposones, en concreto con el transposón *Balduin* de la familia CACTA y también con retrotransposones tipo *Gypsy*, *Athila* y *Sabrina*. Por otro lado se ha demostrado que la distribución de los microsatélites no es aleatoria, sino que citológicamente presenta unos patrones de distribución característicos (La Rota et al. 2005, capítulos anteriores). La relación entre elementos repetitivos y los SSRs podría ser la causa de esta distribución ya que se ha descrito que elementos repetitivos y en general cualquier elemento que contenga secuencias preexistentes simples repetitivas pueden desembocar en la génesis de regiones ricas en SSRs (Wilder y Hollocher 2001).

9. Conclusiones

En este trabajo se ha llevado a cabo la localización cromosómica y caracterización molecular de una serie de SSRs en una amplia colección de especies, subespecies y citotipos del género *Hordeum*, que abarcan las formas más representativas de los cuatro genomas del grupo: **X**, **Xu**, **Xa** e **I**. Para la caracterización citogenética del material se ha utilizado: FISH con una colección de 6 clones de familias de secuencias repetidas típicas de *Triticeae*; GISH con ADN genómico y ND-FISH con 6 oligonucleótidos sintéticos para localizar SSRs. Se ha hecho además una aproximación a la caracterización molecular de regiones del genoma ricas en repeticiones ACT, partiendo de una librería genómica de BACs. Las principales conclusiones son:

1. Se demuestra la utilidad de los SSRs como marcadores cromosómicos permitiendo identificar por primera vez todos los cromosomas de todas las subespecies/citotipos de *H. murinum*, *H. marinum*, *H. brachyantherum* y *H. roshevitzii*.
2. La comparación de los patrones de distribución de las distintas sondas ha permitido evaluar la diversidad citogenética intraespecífica. Las especies *H. bulbosum*, *H. marinum ssp. marinum* y *H. brachyantherum ssp. californicum* resultaron las más polimórficas. Se ha detectado y caracterizado las translocaciones presentes en la accesión HOR22053 de *H. vulgare ssp. vulgare* y en la accesión BCC2046 de *H. brachyantherum ssp. Brachyantherum*. Además, se describe por primera vez una forma tetraploide de *H. murinum ssp. glaucum*.
3. Ha sido posible establecer homeologías entre especies que comparten el mismo genoma básico, lo que ha permitido analizar las tendencias evolutivas de las distintas secuencias repetidas durante la diversificación de *Hordeum*. En cada grupo taxonómico las distintas secuencias han sufrido procesos independientes de amplificación, delección o intersticialización en los distintos linajes.
4. Entre las especies con genoma **H**, se confirma la coincidencia genómica, proximidad y pertenencia a una misma especie de *H. vulgare ssp. vulgare* y *H. vulgare ssp. spontaneum*. Sin embargo, no se apoyaría la supuesta estrecha relación genómica existente entre *H. vulgare* y *H. bulbosum*, que representarían dos grupos genómicos distintos, los cuales deberían recibir distinta denominación. Se confirma el supuesto origen autotetraploide de *H. bulbosum* 4x.
5. Ha sido posible la caracterización de los tres subgenomas presentes en el complejo *H. murinum* confirmando el origen alopoloide del complejo. Se demuestra que la *ssp. glaucum* fue uno de los progenitores que originaron las formas tetraploides del complejo y que estas a su vez originaron las formas hexaploides. No se han observado diferencias cariotípicas entre las formas tetraploides pertenecientes a las subespecies *glaucum*, *murinum* y *leporinum*. Se

propone dividir el complejo *murinum* en tres especies de acuerdo a su nivel de ploidía: la diploide *H. glaucum* (genoma **Xu**); la tetraploide *H. murinum* (genoma **XuXv**) y la hexaploide *H. leporinum* (**XuXvXw**).

6. Entre las especies del complejo *marinum*, la ssp. *marinum* y las formas diploides de ssp. *gussoneanum* compartirían variantes del mismo genoma **Xa**. Se demuestra que ssp. *gussoneanum* 2x fue uno de los parentales implicados en el origen del citotipo tetraploide, que sería un alotetraploide de origen segmental. Se propone dividir el complejo *H. marinum* en dos especies: la diploide *H. marinum*, que incluiría las subespecies *marinum* y el citotipo diploide de la ssp. *Gussoneanum*, y una nueva especie *H. caudate* para designar al citotipo tetraploide.

7. Entre las especies analizadas con genoma **I**, se observan diferencias sustanciales entre los cariotipos de *H. roshevitzii* y ssp. *californicum*. Si estas especies hubieran participado en el origen de la ssp. *brachyantherum* 4x, sus cromosomas tendrían que haber sufrido importantes remodelaciones tras los procesos de hibridación/poliploidización. Por otro lado, se demuestra que formas diploides de ssp. *gussoneanum* han participado en el origen del citotipo hexaploide de la ssp. *brachyantherum*. Sin embargo, se cuestiona la participación del citotipo tetraploide de ssp. *brachyantherum* en su origen. Se propone clasificar el complejo *brachyantherum* en tres especies de acuerdo su nivel de ploidía: la diploide *H. californicum*, la tetraploide *H. brachyantherum* y una nueva designación para el citotipo hexaploide.

8. Es de destacar que el genoma **Xa** de la ssp. *gussoneanum* 2x, implicado al menos en el origen del citotipo tetraploide de *H. marinum* y el hexaploide de *H. brachyantherum* no ha sufrido a nivel cromosómico ningún cambio sustancial tras los procesos de alopoliploidización. Por el contrario el genoma **Xu** de la ssp. *glaucum* implicado en el origen de las formas tetraploides ha sufrido algunos cambios implicando amplificaciones y deleciones de algunas de las secuencias repetidas aquí analizadas.

9. Se pone de manifiesto la dificultad de analizar la estructura molecular de las regiones del genoma ricas en SSRs. Los clones que portan fragmentos enriquecidos en SSRs muestran una elevada inestabilidad que lleva a la pérdida o degradación del inserto, haciendo a estas regiones difíciles de clonar y poco aptas para su secuenciación.

10. Se muestra la complejidad estructural de los clústeres enriquecidos en SSRs. En las secuencias analizadas, las agrupaciones de repeticiones ACT y AAG se encuentran formando bloques imperfectos intercalados por sustituciones puntuales de nucleótidos y mezclados con otros SSRs. Se confirma en cebada la asociación de los SSRs con elementos móviles.

10. Referencias

ARTÍCULOS:

Albert PS, Gao Z, Danilova TV, Birchler JA (2010). Diversity of chromosomal karyotypes in maize and its relatives. *Cytogenet Genome Res* 129:6-16

Ananiev EV, Chamberlin MA, Klaiber J, Svitashv S (2005). Microsatellite megatracks in the maize (*Zea mays* L.) genome. *Genome* 48: 1061-1069

Arcot S, Wang Z, Weber JL, Deininger PL, Batzer MA (1995) Alu Repeats: A Source for the Genesis of Primate Microsatellites *Genomics* Volume 29, Issue 1, Pages 136–144

Badr A, Müller K, Schäfer-Pregl R, El Rabey H, Effgen S, Ibrahim HH, Pozzi C, Rohde W, Salamini F (2000). On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Biol. Evol.* 17(4):499-510

Baum BR, Bailey GL (1990). Key and synopsis of North American *Hordeum* species. *Can J Bot* 68(11):2433-2442.

Baum BR, Edwards T, Johnson DA (2010). Codependence of repetitive sequence classes in genomes: phylogenetic analysis of 5S rDNA families in *Hordeum* (Triticeae:Poaceae). *Genome*: 53, 180-202

Becker J y Heum M (1995). Combined mapping of AFLP nad RFLP Markers in barley. *Mol Gen Genet* (1995) 249: 65-73

Beckmann JS, Weber JL (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12:627–631

Bentley DR (2006). Whole-genome re-sequencing. *Current Opinion in Genetics & Development* Volume 16, Issue 6, Pages 545–552

Blattner F, Pleines T, Jakob SS (2010). Rapid radiation in the barley genus *Hordeum* (Poaceae) during the pleistocene in the Americas. M. Glaubrecht (ed.) *Evolution in Action*. pp 17-33

Blattner FR (2004). Phylogenetic analysis of *Hordeum* (Poaceae) as inferred by nuclear rDNA ITS sequences. *Mol Phylogenet Evol* 33:289-299.

Blattner FR (2006). Multiple intercontinental dispersals shaped the distribution area of *Hordeum* (Poaceae). *New Phytol* 169:603-64.

Blattner FR (2009). Progress in phylogenetic analysis and a new infrageneric classification of the barley genus *Hordeum* (Poaceae:Triticeae). *Breeding Science* 59:471-480.

Bothmer RV, Flink J, Jacobsen N, Jorgensen RB (1989). Variation and differentiation in *Hordeum marinum* (Poaceae). *Nord J Bot* 9:1-10.

Bothmer RV, Flink J, Landström T (1986). Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. I. Diploid combinations. *Can J Genet Cytol* 28:525-535.

Bothmer RV, Flink J, Landström T (1987). Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. II. Triploid combinations. *Evol. Trends Plants* 1:41-50.

Bothmer RV, Flink J, Landström T (1988). Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. III. Tetraploid (2x x 6x) hybrids. *Hereditas* 108:141-148.

Bothmer RV, Flink J, Landström T, Thomas HM (1989). Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. V. Pentaploid hybrids. *Hereditas* 110:217-226

Bothmer RV, Jacobsen N (1985). Origin, taxonomy, and related species. In: Rasmusso D (ed) *Barley. Agronomy Monographs* 26. American Society of Agronomy, Madison, pp 19-56

- Bothmer RV, Jacobsen N (1989).** Interspecific hybridization with *Hordeum guatemalense*. *Genetica* 79:147-151
- Bothmer RV, Jacobsen N, Baden C, Jorgensen RB, Linde-Laursen I (1995).** An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. 2nd ed. IPGRI, Rome, p, 129
- Bothmer, RV, Jacobsen N (1986).** Interspecific crosses in *Hordeum* (Poaceae). *Pl. Syst. Evol.* 153: 49-64
- Brassac J, Jakob SS, Blattner FR (2012).** Progenitor-Derivative relationships of *Hordeum* polyploids (Poaceae, Triticeae) inferred from sequences of TOPO6, a nuclear low-copy gene region. *PLoS One.* 7(3): e33808.
- Cabrera A, Friebe B, Jiang J, Gill BS (1995).** Characterization of *Hordeum chilense* chromosomes by C-banding and *in situ* hybridization using highly repeated DNA probes. *Genome* 38:435-442.
- Carmona A, Friero E, de Bustos A, Jouve N, Cuadrado A (2013a).** The evolutionary history of sea barley (*Hordeum marinum*) revealed by comparative physical mapping of repetitive DNA. *Annals of Botany* 112:1845-1855
- Carmona A, Friero E, de Bustos A, Jouve N, Cuadrado A (2013b).** Cytogenetic diversity of SSR motifs within and between *Hordeum* species carrying the H genome: *H. vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Theoretical and Applied Genetics* 126:949-961
- Casas AM, Igartua E, Valles MP, Molina-Cano JL (1998).** Genetic diversity of barley cultivars grown in Spain, estimated by RFLP, similarity and coancestry coefficients. *Plant Breeding* 117:429-425
- Cermeño MC, Lacadena (1985).** Nucleolar organizer competition in *Aegilops*-rye hybrids. *Genome* 27: 479-483
- Chester M, Gallagher JP, Symonds V et al (2012).** Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *PNAS* 15(4):1176-1181
- Chester M, Leitch AR, Soltis P, Soltis DE (2010).** Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (Polyploidy/Hybridisation). *Genes* 1: 166-192.
- Chin, EC, Senior ML, Shu H y Smith JS (1996).** Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome*, 39: 866-873.
- Collins HM et al. (2010).** Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chem.* 87, 272–282.
- Cuadrado A, Acevedo R, Moreno Díaz de la Espina S, Jouve N, de la Torre C (2004).** Genome remodelling in three modern *S. officinarum* X *S. spontaneum* sugarcane cultivars. *JEB* 55(398) 847-854.
- Cuadrado A, Cardoso M, Jouve N (2008).** Physical organisation of simple sequence repeats (SSRs) in Triticeae: structural, functional and evolutionary implications. *Cytogenet Genome Res* 120:210-219.
- Cuadrado A, Carmona A, Jouve N (2013).** Chromosomal characterization of the three subgenomes in the polyploids of *Hordeum murinum* L.: New insight into the evolution of this complex. *PLoS One.* 8(12): e81385
- Cuadrado A, Ceoloni C, Jouve N (1995).** Variation in highly repetitive DNA composition of heterochromatin in rye studied by fluorescence *in situ* hybridization. *Genome* 38:101-106.
- Cuadrado A, Hieronim G, Jouve N (2009).** A novel, simple and rapid nondenaturing FISH (ND-FISH) technique for the detection of plant telomeres. Potential used and possible target structures detected. *Chromosome Res.* 17:755-762.

- Cuadrado A, Jouve N (1994).** Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-*triticale*. *Chromosome Research* 2:331-338.
- Cuadrado A, Jouve N (2002).** Evolutionary trends of different repetitive DNA sequences during speciation in genus *Secale*. *Journal of Heredity* 93:339-345.
- Cuadrado A, Jouve N (2007).** The non-random distribution of long clusters of all possible classes of trinucleotide repeats in barley chromosomes. *Chromosome Research* 15:711-720.
- Cuadrado A, Jouve N (2007a).** Similarities in the chromosomal distribution of AG and AC repeats within and between *Drosophila*, human and barley chromosomes. *Cytogenet Genome Res*, 119:91-99.
- Cuadrado A, Jouve N (2011).** Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by ND-FISH in heterochromatin of *Drosophila melanogaster* *BMC Genomics* 12:205.
- Cuadrado A, Schwarzacher T (1998).** The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma* 107:587-594
- Cuadrado N, Jouve N (2010).** Chromosomal detection of simple sequence repeats (SSRs) using nondenaturing FISH (ND-FISH). *Chromosoma* 119:495-503.
- de Bustos A, Cuadrado A, Soler C, Jouve N J (1996).** Physical mapping of repetitive DNA sequences and 5S and 18S-26S rDNA in five wild species of the genus *Hordeum*. *Chromosome Res.* 4:491-499.
- de Bustos A, Loarce Y, Jouve N(2002).** Species relationships between antifungal chitinase and nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences in the genus *Hordeum*. *Genome* 45:339-347.
- de Bustos A, Pérez R y Jouve N (2006).** Characterization of the gene Mre11 and evidence of silencing after polyploidization in *Triticum* *Theor Appl Genet.* 2007 Apr;114(6):985-99.
- DeClerck G, Temnykh S, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S (2001)** Computational and Experimental Analysis of Microsatellites in Rice (*Oryza sativa* L.):Frequency, Length Variation, Transposon Associations, and Genetic Marker Potential. *Genome Res.* 11: 1441-1452
- Dewey DR (1982).** Genome relationships and taxonomy of the perennial grasses related to wheat. *Agronomic Abstract* 1982: 63.
- Dewey DR (1984).** The genome system of classification as a guide to intergeneric hybridization with perennial Triticeae. In: Gustafsson J P ed. *Gene Manipulation in Plant Improvement* 209-279.
- Doebley J (1992).** Mapping the genes that made maize. *Trends Genet.* 8,302 -307.
- El Rabey HA, Al-Malki AL, Abulnaja KO, Ebrahim MK, Kumosani T, Khan JA (2014).** Phylogeny of ten species of the genus *Hordeum* L. as revealed by AFLP markers and seed storage protein electrophoresis. *Mol Biol Rep.* 41(1):365-372
- El-Rabey HA, Badr A, Schäfer-Pregl R, Martin W, Salamini F (2002).** Speciation and species separation in *Hordeum* L. (Poaceae) resolved by discontinuous molecular markers. *Plant Biol.* 4(5):567-575.
- Farre A, Cuadrado A, Lacasa-Benito F, Schubert I, Comadran J, Jansen J, Romagosa I (2012).** Genetic characterization of a reciprocal translocation present in a widely grown barley variety. *Mol Breeding* (2012) 30: 1109-1119
- Ferrer E, Loarce Y, Hueros G (1995).** Molecular characterization and chromosome location of repeated DNA sequences in *Hordeum* species and in the amphiploid tritordeum (x *Tritordeum* Ascherson et Graebner). *Genome* 38:850-857

- Friebe B, Gill B (1994).** C-band polymorphism and structural rearrangements detected in common wheat (*Triticum aestivum*). *Euphytica* 78:1-5
- Fukui K, Kakeda K (1990)** Quantitative karyotyping of barley chromosomes by image analysis methods. *Genome* 33, 450-458.
- Garthwaite AJ, Bothmer RV, Colmer TD (2005).** Salt tolerance in wild *Hordeum* species associated with restricted entry of Na⁺ and Cl⁻ into the shoots. *JEB*, 56:2365-2378.
- Giles BE, Lefkovitch LP (1986).** A taxonomic investigation of the *Hordeum murinum* complex (*Poaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 153:181-197.
- Godiska R, Mead D, Dhodda V, Wu C, Hochstein R, Karsi A, Usdin K, Entezam A y Ravin N (2010).** Linear plasmid vector for cloning of repetitive or unstable sequences in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, Vol. 38, No. 6
- Gupta PK, Fedak G (1985).** Intergeneric hybrids between *Hordeum californicum* and *Triticum aestivum*. *J. Hered.* 76(5):365-368.
- Gupta PK, Fedak G, Molanar SJ, Wheatcroft R (1989).** Distribution of a *Secale cereale* DNA repeat sequence among 25 *Hordeum* species. *Genome* 32:383-388.
- Hagan CE, Gareth J (1982).** Warren Lethality of palindromic DNA and its use in selection of recombinant plasmids. Volume 19, Issue 1, Pages 147–151
- Hagras AA, Kishii M, Tanaka H, Sato K, Tsujimoto H (2005).** Genomic differentiation of *Hordeum chilense* from *H. vulgare* as revealed by repetitive and EST sequences. *Genes & Genetic Systems* 80(3):147-159
- Han F, Fedak G, Guo W, Liu B (2005).** Rapid and repeatable elimination of a parental genome-specific DNA repeat (pGc1R-1a) in newly synthesized wheat allopolyploids. *Genetics* 170:1239-1245.
- Harrison GE y Leitch AR (1992).** Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome fragments in wheat. *Theor Appl Genet* 84:778-786
- Hart et al. (1980).** Use of isozymes as chromosome markers in the isolation and characterization of wheat-barley chromosome addition lines. *Genet. Res. Camb.* 311-325.
- Helpson-Harrison JS (2000).** RNA, genes, genomes and chromosomes. Repetitive DNA sequences in plants. *Chromosomes Today* 14-
- Helpson-Harrison JS y Comai L (1998).** A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 149, 307-318
- Heslop-Harrison JS y Leitch IJ (1993).** Physical mapping of four sites of 5S rDNA sequences and one site of the α -amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*) *Genome* 36(3): 517-523
- Hoskins RA (2007).** Sequence Finishing and Mapping of *Drosophila melanogaster* Heterochromatin *Science* 15 June: Vol. 316 no. 5831 pp. 1625-1628
- Houben A, Pickering R (2009).** Applying cytogenetics and genomics to wide hybridisations in the genus *Hordeum*. Feuillet C, Muehlbauer GJ (eds). *Genetics and genomics of the Triticeae*, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 7 5:137.
- Hudakova S y Michalek W (2001).** Sequence organization of barley centromeres. *Nucl. Acids Res.* 29 (24): 5029-5035
- Islam A.K.M.R. , Shepherd (1992).** Substituting ability of individual barley chromosomes through induced homoeologous pairing. *Theor. Appl. Gene.* 83, 489-494

- Islam et al. (1981).** Isolation and characterization of euplasmic wheat-barley addition lines. *Heredity* 46, 161-174
- Jaaska V (1994).** Isoenzyme evidence on the systematics of *Hordeum* section Marina (Poaceae). *Plant Syst Evol* 191:213-226.
- Jacobsen N, Bothmer RV (1995).** Taxonomy of the *Hordeum murinum* complex (Poaceae). *Nord. J. Bot.* 15:449-458.
- Jahan B, Vahidy AA y Ali S (1992).** Chiasma frequency and chromosome associations in sixteen taxa of *Hordeum* species. *Cytologica*, 57: 51-57.
- Jahan B, Vahiny AA, Ali SI (1992).** Chiasma frequency and chromosome associations in sixteen taxa of *Hordeum* species. *Cytologia* 57:51-57.
- Jakob SS, Blattner FR (2006).** A chloroplast genealogy of *Hordeum* (Poaceae): long-term persisting haplotypes, incomplete lineage sorting, regional extinction, and the consequences for phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 23:1602-1612
- Jakob SS, Blattner FR (2010).** Two extinct diploid progenitors were involved in allopolyploid formation in the *Hordeum murinum* (Poaceae:Triticeae) taxon complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* 55:650-659.
- Jakob SS, Meister A, Battner FR (2004).** The considerable genome size variation of *Hordeum* species (Poaceae) is linked to phylogeny, life form, ecology, and speciation rates. *Mo. Biol Evol* 21 (5)860-869.
- Jakob, SS, Ihlow A, Blattner FR. (2007).** Combined ecological niche modelling and molecular phylogeography revealed the evolutionary history of *Hordeum marinum* (Poaceae) –niche differentiation, loss of genetic diversity, and speciation in Mediterranean Quaternary refugia. *Mol Ecol* 16:1713-1727.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985).** Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314:67–73
- Jensen, Linde-Laursen (1992).** Statistical evaluation of length measurements on barley chromosomes with a proposal for a new nomenclature for symbols and positions of cytological markers. *Hereditas* 117, 51-59
- Jiang J, Liu D (1987).** New *Hordeum-Triticum* hybrids. *Cereal Research Communications* 15:95-100.
- Johnson MD III, Fresco JR (1999).** Third-strand in situ hybridization (TISH) to non-denatured metaphase spreads and interphase nuclei. *Chromosoma* 108:181–189
- Jones JDG, Flavell RG (1982).** The structure, amount and chromosomal localization of defined repeated DNA sequences in species of the genus *Secale*. *Chromosoma* 86:613-641
- Jorgensen RB. (1986).** Relationships in the barley genus (*Hordeum*): An electrophoretic examination of proteins. *Hereditas* 104:273-291.
- Kakeda K, Taketa S, Komatsuda T (2009).** Molecular phylogeny of the genus *Hordeum* using thioredoxin-like gene sequences. *Breed. Sci* 59:595-601.
- Kang HK, Cox DW (1996).** Tandem Repeats 3' of the IGHA Genes in the Human Immunoglobulin Heavy Chain Gene Cluster. Volume 35, Issue 1, Pages 189–195
- Kato A (2011).** High-density fluorescence in situ hybridization signal detection on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosomes with improved probe screening and reprobing procedures. *Genome* 54(2)151-159

- Komatsuda T (1999).** Phylogeny in the genus based on nucleotide sequences closely linked to the locus (row number of spikelets) Genome Volumen:42
- Komatsuda T, Salomon B, Bothmer RV (2009).** Evolutionary process of *Hordeum brachyantherum* 6x and related tetraploid species revealed by nuclear DNA sequences. Breed Sci 59:611-616.
- Komatsuda T, Salomon B, Bryngelsson T, Bothmer RV (2001).** Phylogenetic analysis of *Hordeum marinum* Hufs. Based on nucleotide sequences linked to the vrs1 locus. Plant Syst Evol 227:137-144.
- Kong F, Wang H, Cao A, Qin B, Ji J, Wang S, Wang XE (2008).** Characterization of *T. aestivum*-*H. californicum* chromosome addition lines DA2H and MA5H. 35(11):673-678
- Konishi T, Linde-Laursen I (1988).** Spontaneous chromosomal rearrangements in cultivated and wild barleys. Theoretical and Applied Genetics January 1988, Volume 75, Issue 2, pp 237-243
- Kouprina N, Leem SH, Solomon G, Ly A, Koriabine M, Otstot J, Pak E, Dutra A, Zhao S, Barrett JC y Larionov V (2003).** Segments missing from the draft human genome sequence can be isolated by transformation associated recombination cloning in yeast. EMBO reports Vol 4, Nº3, 257-262
- Kulkarni KP, Kulkarni SS, Gedda M, Bandekar M, Sonah H, Gacche RN, Deshmukh NK, Deshmukh RK (2012).** In Silico Identification of Rice Gene Homologues in Brachypodium, Sorghum and Maize: Insight into Development of Gene Specific Markers . WebmedCentral BIOINFORMATICS 2012; 3(4):WMC003258
- La Rota, M. et al. (2005)** Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellites markers in rice, wheat and barley. BCM Genomics 6: 23
- Leach D, y Lindsey J (1986).** In vivo loss of supercoiled DNA carrying a palindromic sequence. Mol. Gen. Genet., 204, 322–327.
- Leem SH, Kouprina N, Grimwood J, Kim JH, Mullokandov M, Yoon YH, Chae JY, Morgan J, Lucas S, Richardson P, Detter C, Glavina T, Rubin E, Barrett JC y Larionov V (2004).** Closing the Gaps on Human Chromosome 19 Revealed Genes With a High Density of Repetitive Tandemly Arrayed Elements. Genome Res. 14: 239-246
- Linde-Laursen I y Frederiksen S (1989).** Giemsa C-banded karyotypes of three subspecies of *Taeniatherum caputmedusae* and two intergeneric hybrids with *Psathyrostachys* spp. (Poaceae). Hereditas, 110: 283-288.
- Linde-Laursen I, Bothmer RV (2012).** Connection between rod bivalents and incomplete meiotic association at NORs in *Hordeum marinum* Huds. Hereditas 149(4):139-145.
- Linde-Laursen I, Bothmer RV, Jacobsen N (1986).** Giemsa C-banding karyotypes of *Hordeum* taxa from North America. Can. J. Genet. Cytol. 28:42-62
- Linde-Laursen I, Bothmer RV, Jacobsen N (1992).** Relationships in the genus *Hordeum*: Giemsa C-banded karyotypes. Hereditas 116:111-116.
- Linde-Laursen I, Bothmer Rv, Jacobsen N (1995).** Karyotype differentiation and evolution in the genus *Hordeum* (Poaceae). En: Brandham, P. E. y M. D. Bennett (eds.) Kew Chromosome Conference IV, Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 233-247
- Linde-Laursen I, Heslop-Harrison JS, Shepherd KW, Taketa S (1997).** The barley genome and its relationship with the wheat genomes. A survey with and internationally agreed recommendation for barley chromosome nomenclature. Hereditas 123:1-16.
- Liu ZW, Biyashew RM, Saghai Maroof MA (1996)** Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. Theor Appl Genet 93:869-876

- Liu, Schooler (1965).** *Hordeum depressum* crosses with the *Hordeum murinum* complex. *Canad. J. Genet. Cytol.* 7: 291-295.
- Löve Á (1984).** Generic evolution of the wheatgrasses. *Biologisches Zentralblatt* 101: 199-212.
- Malagón F y Aguilera A (1998).** Genetic stability and DNA rearrangements associated with a 2 x 1.1-Kb perfect palindrome in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 259, 639–644.
- Marillia EF, Scoles GJ (1996).** The use of RAPD markers in *Hordeum* phylogeny. *Genome* 39:646-654.
- Marthe F, Künzel G (1994).** Localization of translocation breakpoints in somatic metaphase chromosomes of barley. *Theor. Appl. Genet.* 89, 240-248.
- Mayer KFX et al. (2011).** Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *The Plant Cell* April 2011 vol. 23 no. 4 1249-1263
- Meyer et al. (2012).** A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* Vol. 491: 711-717
- Molina Cano JI, Rusell JR, Moralejo MA, Powell W, Arias G y Escacena JL (2005).** Chloroplast DNA microsatellite analysis supports a Phylogenetic origin for barley *Theor Appl Genet*: 110: 613-619
- Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002).** Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature genetics* 30:194-199
- Morgante M, Olivieri AM (1993)** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3:175-178
- Nanda I, Zischler H, Epplen C, Guttenbach M, Schmid M (1991).** Chromosomal organization of simple repeated DNA sequences used for DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 12:193-203
- Naranjo T (1990).** Chromosome structure of durum wheat. *Theor Appl Genet* 79:397-400.
- Nevski et al. (1941).** Beiträge zur Kenntniss der wildwachsenden Gersten in Zusammenhang mit der Frage über den Ursprung von *Hordeum vulgare* L. und *Hordeum distichon* L. (Versuch einer Monographie der Gattung *Hordeum*). *Trudy Bot. Inst. Akad. Nauk. SSSR, ser. 1, 5:* 64-255
- Nishikawa T, Salomon B, Komatsuda T, Bothmer RV (2002).** Molecular phylogeny of the genus *Hordeum* using three chloroplast DNA sequences. *Genome* 45:1157-1166
- Ottosson F, Bothmer RV, Díaz O (2002).** Genetic variation in three species of *Hordeum*, and the selection of accessions for the Barley Core Collection. *Hereditas* 137:7–15
- Ourari M, Ainouche A, Coriton O, Huteau V, Brown S, Misset MT, Ainouche M, Amirouche R (2011).** Diversity and evolution of the *Hordeum murinum* polyploidy complex in Algeria *Genome* 54:639-654.
- Ozkan H, Feldman M (2009).** Rapid cytological diploidization in newly formed allopolyploids of the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Genome* 52:926-934.
- Pedersen C, Langridge P (1997).** Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome* 40:589-593
- Pedersen C, Rasmussen SK, Linde-Laursen I (1996).** Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the Triticeae (Poaceae) by in situ hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome*, 39: 93-104.
- Pedersen C, Rasmussen SK, Linde-Laursen I (1996).** Genome identification in cultivated barley and related species of the Triticeae (Poaceae) by in situ hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome* 39:93-104

- Petersen G, Aagensen L, Seberg O, Larsen IH (2011).** When is enough, enough in phylogenetics? A case in point from *Hordeum* (Poaceae). *Cladistics* 27:428-446.
- Petersen G, Seberg O (2003).** Phylogenetic analyses of the diploid species of *Hordeum* (Poaceae) and a revised classification of the genus. *Syst Bot* 28:293-306.
- Petersen G, Seberg O (2004).** On the origin of the tetraploid species *Hordeum capense* and *H. secalinum* (Poaceae). *Syst Bot* 20:862-873.
- Pickering R, Klatte S, Butler R (2006).** Identification of all chromosome arms and their involvement in meiotic homoeologous associations at metaphase I in 2 *Hordeum vulgare* L. x *Hordeum bulbosum* L. hybrids *Genome* 49: 73-78.
- Plohl M, Luchetti A, Mestrovic N, Mantovani (2002).** Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* 409:72-82
- Pontes O et al. (2004).** Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 18240-5
- Rajhathy T, Morrison JW (1959).** Cytogenetic studies in the genus *Hordeum*. III. Pairing in some interspecific and intergeneric hybrids. *Can. J. Genet. Cytol.* 1:124-132
- Rajhathy T, Morrison JW (1962).** Cytogenetic studies in the genus *Hordeum*. 6. The *murinum* complex. *Canad. J. Genet. Cytol.* 4:240-247.
- Rajhathy T, Morrison JW, Symko S (1964).** Interspecific and intergeneric hybrids in *Hordeum*. S. Broekhuizen et al. (Eds). *Barley Genetics I.* pp.195-212
- Ramsay L (2000).** A Simple Sequence Repeat-Based Linkage Map of Barley Genetics December 1, vol. 156 no. 4
- Ramsay L, Macaulay M, Cardle L, Morgante M, Ivanissewith S, Maestri E, Powell W, Waugh R (1999).** Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. *Plant J* 17:415-525
- Razin SV, Ioudinkova ES, Trifonov EN, Scherrer K (2001).** Non-clonability correlates with genomic instability: a case study of a unique DNA region *Volume 307, Issue 2, Pages 481–486*
- Röder MS, Korzum V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganai MW (1998).** A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149(4) 2007-23
- Röder S, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganai MW (1998)** A Microsatellite Map of Wheat Marion. *Genetics* vol. 149 no. 4 2007-2023
- Rostoks N et al. (2002)** Genomic sequences reveals gene content, genomic organization, and recombination relationships in barley. *Funct Interg Genomics* 2:51-19
- Saghai-Maroo MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994).** Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5466-547
- Sanel M, Pickering R, Kumke K, Nasuda S, Houben A (2011).** Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(33):E498-505
- Sanger F, Coulson AR (1975).** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94 (3): 441–8.

- Savova-Bianchi D, Keller-Senfthen J, Felber F (2002).** Isozyme variation of *Hordeum murinum* L. in Switzerland and test of hybridization with cultivated barley. *Weed Res.* 42(4):325-333.
- Schlotterer C (2004)** The evolution of molecular markers- just a matter of fashion. *Nat. Rev. Genet.* 5, 63-69
- Schmidt T, Heslop-Harrison JS (1996)** The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 8761-8765
- Schmidt T, Heslop-Harrison JS (1998).** Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends Plant Sci.* 3; 195-199.
- Schneider A, Linc G, Molnár-Láng M, Graner A. (2003).** Fluorescence in situ hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breeding* 122:396-400.
- Scholz M, Wehling P, Ruge-Wehling B, Habekuß A, Schrader O, Pendinen G y Fischer K (2009).** Ryd4 : a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. *Theoretical and Applied Genetics* September Volume 119, Issue 5, pp 837-849
- Schrot GP y Ho PS (1995).** Occurrence of potential cruciform and H-DNA forming sequences in genomic DNA *Nucl. Acids Res.* 23 (11): 1977-1983.
- Schulte D, Ariyadasa R, Shi B, Fleury D, Saski C, Atkins M, deJong P, Wu CC, Graner A, Langridge P, Stein N (2011).** BAC library resources for map-based cloning and physical map construction in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genomics* 12:247
- Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD y Heslop-Harrison JS (1989).** *In Situ* Localization of Parental Genomes in a Wide Hybrid (*Ann Bot*) 64 (3): 315-324.
- Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M, Levy AA (2001).** Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* 13:1749-1759.
- Sharp PL, Desai S y Gale MD (1988).** Isozyme variation and RFLPs at the beta-amylase loci in wheat. *Theor Appl Genet* 76:691-699
- Shcherban AB, Vershinin AV. (1992).** The stretched BamHI-fragment of barley genome containing richly repetitive DNA sequences. *Genetika* 28:15-21
- Smith DF (1972).** *Hordeum* species in grasslands. *Herbage Abstracts* 42:213-223.
- Soltis DE et al. (2009).** Polyploidy and angiosperm diversification. *Am J Bot* 96:336-348
- Sonah H , Deshmukh RK, Chand S, Srinivasprasad M, Rao GJN, Upreti HC, Singh AK, Singh NK, Sharma TR (2012).** Molecular mapping of quantitative trait loci for flag leaf length and other agronomic traits in rice (*Oryza sativa*) *Cereal Research Communications* 362-372
- Subrahmanyam NC (1978)** Haploids and hybrids following interspecific crosses. *Barley genet. Newsl.* 8: 97-99
- Sun G, Pourkheirandish M, Komatsuda T (2009).** Molecular evolution and phylogeny of the *RPB2* gene in the genus *Hordeum*. *Ann. Bot.* 103:975-983
- Svitashev S, Bryngelsson T, Vershinin A, Pedersen C, Säll T, Bothmer RV. (1994).** Phylogenetic analysis of the genus *Hordeum* using repetitive DNA sequences. *Theor Appl Genet* 89:801-810.
- Taketa S, Ando H, Takeda K, Bothmer RV (1999a).** Detection of *Hordeum marinum* genome in three polyploidy *Hordeum* species and cytotypes by genomic *in situ* hybridization. *Hereditas* 130:185-188

- Taketa S, Ando H, Takeda k, Bothmer RV (2001).** Physical location of 5S and 18S-25D rDNA in Asian and American diploid *Hordeum* species with the I genome. *Heredity* 86:522-530
- Taketa S, Ando H, Takeda K, Ichii M, Bothmer VR (2005).** Ancestry of American polyploidy *Hordeum* species with the I genome inferred from 5S and 18S-25S rDNA. *Annals of Botany* 96:23-33
- Taketa S, Ando H, Taketa K, Harrison GE, Heslop-Harrison JS (2000).** The distribution, organization and evolution of two abundant and widespread repetitive DNA sequences in the genus *Hordeum*. *Theor. Appl. Genet* 100:169-176.
- Taketa S, Harrison GE, Heslop-Harrison JS (1999b).** Comparative physical mapping of the 5S and 18S.25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. *Theor. Appl. Genet* 98:1-9.
- Taketa S, Linde-Laursen I, Künzel G (2009b).** Cytogenetic diversity. In: R. von Bothmer, Th. Van Hintum, H. Knüpffer and D. Sato (eds), *Diversity in Barley (Hordeum vulgare)*, pp 97-119.
- Taketa S, Nakauchi Y, Bothmer RV (2009a).** Phylogeny of two tetraploid *Hordeum* species, *H. secalinum* and *H. capense* inferred from physical mapping of 5S and 18S.25SrDNA. *Breed. Sci* 59:589-594.
- Tanno K, Bothmer RV, Yamane K, Takeda K, Komatsuda T (2010).** Analysis of DNA sequence polymorphism at the cMWG699 locus reveals phylogenetic relationships and allopolyploidy within *Hordeum murinum* subspecies. *Hereditas* 147:34-42.
- Taramino G, Tingey S (1996).** Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome*. 39(2): 277-287
- Tautz D, Renz M (1984).** Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12:4127-4138
- Terasawa Y, Rahman SM, Takata K, Ikeda TM (2012).** Distribution of Hordoidoline genes in the genus *Hordeum*. *Theor Apple Genet* DOI 10.1007/s00122-011-1693-6
- Terzi V, Faccioli P, Pecchioni N, Cattivelli L, Stanca AM (2001).** Expressed sequence tags from cold-acclimatized barley can identify novel plant genes *Plant Breeding* Volume 120, Issue 6, pages 497–502, December
- Treangen TJ y Salzberg SL (2012).** Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions *Nature Reviews Genetics* 13, 36-46
- Van de Peer y, Maere S, Meyer A (2009).** The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat Rev Genet* 10:725-732.
- Vosman B, Arens P (1997).** Molecular characterization of GATA/GACA microsatellite repeats in tomato. *Genome*, 40: 25-33
- Wang H, Sun G (2011).** Molecular phylogeny and reticulate origins of several American polyploid *Hordeum* species. *Canadian Journal of Botany* 89:405-415.
- Wang RRC, Bothmer RV, Dvorak J, Fedak G, Linde-Laursen I, Maramutsu M (1996).** Genome symbols in the Triticeae. In: Wang RRC, Jensen KB and Jaussi C (eds) *Proceedings of the 2nd International Triticeae Symposium*, Utah State University, Logan, pp 29-34
- Wilder J y Hollocher H (2001).** Mobile Elements and the Genesis of Microsatellites in Dipterans *Mol Biol Evol* 18 (3): 384-392.
- Winter P et al. (1999).** Characterization and mapping of sequence tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Mol. Gen. Genet.* 262: 90-101

Xu J, Procunier D, Kasha KJ. (1999). Species-specific in situ hybridization of *Hordeum bulbosum* chromosomes. Genome 33:628-634

Zhang H et al. (2013). Intrinsic karyotype stability and gene copy number variations may have laid the foundation for tetraploids wheat formation. PNAS 110(38):19466-19471

PÁGINAS WEB:

BLAST: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome

FAO: <http://www.fao.org/home/es/>

11. Anexo

Cytogenetic diversity of SSR motifs within and between *Hordeum* species carrying the H genome: *H. vulgare* L. and *H. bulbosum* L.

Alejandro Carmona · Eva Friero · Alfredo de Bustos ·
Nicolás Jouve · Angeles Cuadrado

Received: 3 September 2012 / Accepted: 28 November 2012 / Published online: 15 December 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract Non-denaturing FISH (ND-FISH) was used to compare the distribution of four simple sequence repeats (SSRs)—(AG)_n, (AAG)_n, (ACT)_n and (ATC)_n—in somatic root tip metaphase spreads of 12 barley (*H. vulgare* ssp. *vulgare*) cultivars, seven lines of their wild progenitor *H. vulgare* ssp. *spontaneum*, and four lines of their close relative *H. bulbosum*, to determine whether the range of molecular diversity shown by these highly polymorphic sequences is reflected at the chromosome level. In both, the cultivated and wild barleys, clusters of AG and ATC repeats were invariant. In contrast, clusters of AAG and ACT showed polymorphism. Karyotypes were prepared after the identification of their seven pairs of homologous chromosomes. Variation between these homologues was only observed in one wild accession that showed the segregation of a reciprocal translocation involving chromosomes 5H and 7H. The two subspecies of *H. vulgare* analysed were no different in terms of their SSRs. Only AAG repeats were found clustered strongly on the chromosomes of all lines of *H. bulbosum* examined. Wide variation was seen between homologous chromosomes within and across these lines. These results are the first to provide insight into the cytogenetic diversity of SSRs in barley and its closest relatives. Differences in the

abundance and distribution of each SSR analysed, between *H. vulgare* and *H. bulbosum*, suggest that these species do not share the same H genome, and support the idea that these species are not very closely related. Southern blotting experiments revealed the complex organization of these SSRs, supporting the findings made with ND-FISH.

Introduction

Microsatellites, or simple sequence repeats (SSRs), which are found in both coding and non-coding regions, are among the most abundant and widely dispersed types of tandemly repetitive DNA sequences in eukaryotic genomes (Tautz and Renz 1984). Composed of short, repeated units about 1–6 nucleotides (nt) in length, these sequences are organized in tandem arrays usually under 100 nt long. One of the most remarkable properties of SSRs is their ability to produce variants in terms of the numbers of repeats at a given locus. Such polymorphism, easily detected by PCR, makes SSRs the molecular markers of choice for many species in linkage mapping, gene tagging, DNA fingerprinting and genetic evolution studies (Morgante and Olivieri 1993; Röder et al. 1998). SSRs, or at least SSR-based markers, show wide variation between individuals, however, the extent to which SSR variation at the chromosome level may contribute to adaptive divergence among populations and species is still to be determined.

In situ hybridization techniques can be used to detect SSRs in both animal and plant chromosomes. However, over the last three decades, only a few reports have described the physical organization of SSRs (Nanda et al. 1991; Cuadrado and Schwarzachner 1998). Some species of the family *Triticeae* are among the best characterized in terms of the chromosomal distribution of SSRs.

Communicated by B. Friebe.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00122-012-2028-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Carmona · E. Friero · A. de Bustos · N. Jouve ·
A. Cuadrado (✉)

Department of Cell Biology and Genetics, University of Alcalá,
28871 Alcalá de Henares (Madrid), Spain
e-mail: angeles.cuadrado@uah.es

Chromosomal Characterization of the Three Subgenomes in the Polyploids of *Hordeum murinum* L.: New Insight into the Evolution of This Complex

Ángeles Cuadrado*, Alejandro Carmona, Nicolás Jouve

Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Abstract

Hordeum murinum L. is a species complex composed of related taxa, including the subspecies *glaucum*, *murinum* and *leporinum*. However, the phylogenetic relationships between the different taxa and their cytotypes, and the origin of the polyploid forms, remain points of controversy. The present work reports a comparative karyotype analysis of seven accessions of the *H. murinum* complex representing all subspecies and cytotypes. The karyotypes were determined by examining the distribution of the repetitive *Triticeae* DNA sequences pTa71, pTa794, pSc119.2, pAs1 and pHch950, the simple sequence repeats (SSRs) (AG)₁₀, (AAC)₅, (AAG)₅, (ACT)₅, (ATC)₅, and (CCCTAAA)₃ via in situ hybridization. The chromosomes of the three subgenomes involved in the polyploids were identified. All tetraploids of all subspecies shared the same two subgenomes (thus suggesting them to in fact belong to the same taxon), the result of hybridization between two diploid ancestors. One of the subgenomes present in all tetraploids of all subspecies was found to be very similar (though not identical) to the chromosome complement of the diploid *glaucum*. The hexaploid form of *leporinum* came about through a cross between a tetraploid and a third diploid form. Exclusively bivalent associations among homologous chromosomes were observed when analyzing pollen mother cells of tetraploid taxa. In conclusion, the present results identify all the individual chromosomes within the *H. murinum* complex, reveal its genome structure and phylogeny, and explain the appearance of the different cytotypes. Three cryptic species are proposed according to ploidy level that may deserve full taxonomic recognition.

Citation: Cuadrado Á, Carmona A, Jouve N (2013) Chromosomal Characterization of the Three Subgenomes in the Polyploids of *Hordeum murinum* L.: New Insight into the Evolution of This Complex. PLoS ONE 8(12): e81385. doi:10.1371/journal.pone.0081385

Editor: Christos A. Ouzounis, The Centre for Research and Technology, Hellas, Greece

Received: May 10, 2013; **Accepted:** October 13, 2013; **Published:** December 13, 2013

Copyright: © 2013 Cuadrado et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL 2009-10373 and AGL2012-34052). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The author have declared that no competing interests exist.

* E-mail: angeles.cuadrado@uah.es

Introduction

Polyploidy has been particularly important in the evolution of the family *Poaceae* [1]. Certainly, it has played an important role in the diversification of the genus *Hordeum*, which contains diploid, tetraploid and hexaploid taxa. C-banding karyotypes and the meiotic behaviour of *Hordeum* hybrids suggest the existence of four basic diploid genomes [2–4]: **H**, **I**, **Xa** and **Xu** (following the nomenclature of Wang et al. [5] and Linde-Laursen et al. [6]). Accordingly, molecular phylogenies cluster *Hordeum* species into four groups [7]. The species *H. murinum* L., which possesses the **Xu**-genome, is usually recognized as having three subspecies: *glaucum* (Steud.) Tzvelev ($2n = 2x = 14$), *murinum* ($2n = 4x = 28$), and *leporinum* (Link) Arcang. ($2n = 4x = 28$, $2n = 6x = 42$) [8]. However, since there is no single diagnostic morphological characteristic that distinguishes the three forms - which are easily confused - most authors refer to the *murinum* complex [9,10].

For many years it remained unclear whether the polyploid forms of *H. murinum* were auto- or allopolyploids [11–16]. Recently, however, allopolyploidy has been strongly supported by molecular phylogenetic analyses that differentiate 2x, 4x and 6x forms [17–19]. Indeed Jakob and Blattner [20] indicate that *glaucum* was involved in the formation of the tetraploids together

with a now likely extinct taxon belonging to the same *Hordeum* **Xu** genome group, and that a third, closely related taxon contributed to the formation of the hexaploid *leporinum*. Nevertheless, additional cytogenetic analyses are needed to reveal the true genomic constitution of the different *H. murinum* taxa and cytotypes.

The aim of the present work was to examine the karyotypes of a representative sample of *H. murinum* accessions covering all subspecies and cytotypes. If the diploid *glaucum* was involved in the origin of the polyploid cytotypes, its chromosomes should be present in them. The same is true if tetraploid forms were involved in the origin of the hexaploid forms.

Materials and Methods

Material representing all three subspecies and cytotypes of the *H. murinum* complex was obtained from the IPK Germplasm Bank (Gatersleben, Germany). Table 1 provides information on the accession numbers and places of origin of the material used.

Chromosome preparation

Root tips were obtained from seedlings and exceptionally from plants grown in pots in a greenhouse. Meiotic divisions were

The evolutionary history of sea barley (*Hordeum marinum*) revealed by comparative physical mapping of repetitive DNA

Alejandro Carmona, Eva Friero, Alfredo de Bustos, Nicolás Jouve and Angeles Cuadrado*

Department of Cell Biology and Genetics, University of Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

*For correspondence. E-mail angeles.cuadrado@uah.es

Received: 25 April 2013 Returned for revision: 31 July 2013 Accepted: 30 August 2013

- **Background and Aims** *Hordeum marinum* is a species complex that includes the diploid subspecies *marinum* and both diploid and tetraploid forms of *gussoneanum*. Their relationships, the rank of the taxa and the origin of the polyploid forms remain points of debate. The present work reports a comparative karyotype analysis of six *H. marinum* accessions representing all taxa and cytotypes.
- **Methods** Karyotypes were determined by analysing the chromosomal distribution of several tandemly repeated sequences, including the *Triticeae* cloned probes pTa71, pTa794, pAs1 and pSc119-2 and the simple sequence repeats (SSRs) (AG)₁₀, (AAC)₅, (AAG)₅, (ACT)₅ and (ATC)₅.
- **Key Results** The identification of each chromosome pair in all subspecies and cytotypes is reported for the first time. Homologous relationships are also established. Wide karyotypic differences were detected within *marinum* accessions. Specific chromosomal markers characterized and differentiated the genomes of *marinum* and diploid *gussoneanum*. Two subgenomes were detected in the tetraploids. One of these had the same chromosome complement as diploid *gussoneanum*; the second subgenome, although similar to the chromosome complement of diploid *H. marinum sensu lato*, appeared to have no counterpart in the *marinum* accessions analysed here.
- **Conclusions** The tetraploid forms of *gussoneanum* appear to have come about through a cross between a diploid *gussoneanum* progenitor and a second, related—but unidentified—diploid ancestor. The results reveal the genome structure of the different *H. marinum* taxa and demonstrate the allopolyploid origin of the tetraploid forms of *gussoneanum*.

Key words: *Hordeum marinum*, *Hordeum gussoneanum*, sea barley, evolutionary history, allopolyploids, FISH, ND-FISH.

INTRODUCTION

The *Triticeae* genus *Hordeum* consists of about 30 species, with diploid ($2n = 2x = 14$), tetraploid ($2n = 4x = 28$) and hexaploid ($2n = 6x = 42$) taxa, including cultivated barley and its wild related species (Bothmer *et al.*, 1995). The chromosome morphology, Giemsa banding patterns and meiotic behaviour of *Hordeum* hybrids suggest the existence of four basic diploid genomes (Bothmer *et al.*, 1986, 1987; Linde-Laursen *et al.*, 1992): H, Xa, Xu and I [following the nomenclature of Wang *et al.* (1996) and Linde-Laursen *et al.* (1997)]. Accordingly, molecular phylogenies cluster *Hordeum* species into four groups (Blattner, 2009). One of these groups, the members of which carry the Xa genome, includes the sea barleys. These are usually recognized as a single species, *H. marinum*, with two subspecies: *marinum* ($2n = 2x = 14$) and *gussoneanum* ($2n = 2x = 14$ and $2n = 4x = 28$). The *marinum* and *gussoneanum* diploid forms coexist throughout the Mediterranean region and can be clearly distinguished by their morphology. The tetraploid cytotype of *gussoneanum* overlaps with the diploids only in the farthest eastern Mediterranean, extending from there towards the east into Asia (Jakob *et al.*, 2007). There are no distinctive morphological traits that distinguish the diploid and tetraploid forms of *gussoneanum*, and currently they are not recognized as different taxa (Bothmer *et al.*, 1995).

The relationships within this group of waterlogging-tolerant barleys have remained unclear. For example, controversy exists regarding the polyphyletic or monophyletic origin of this species, in part due to conflicts between phylogenetic trees derived from plastid and nuclear sequences (Blattner, 2009; Petersen *et al.*, 2011). Another major disagreement concerns the auto- or allopolyploid origin of the tetraploids. An autopolyploid origin is supported by a number of cytogenetic studies, including the analysis of C-banded karyotypes and the meiotic behaviour of hybrids (Bothmer *et al.*, 1989; Linde-Laursen *et al.*, 1992), as well as the results of molecular phylogenetic studies based on the examination of chloroplast loci, geographical information and ecological data (Jakob *et al.*, 2007). Breaking with what became a long-standing assumption of autopolyploid origin, recent molecular phylogenetic analyses using single nuclear markers seem to indicate that tetraploids originated by hybridization between a diploid form of *gussoneanum* and another diploid progenitor. Some studies suggest *marinum* to have been this second progenitor (Kakeda *et al.*, 2009; Blattner, 2009), while others indicate an unknown extant or (probably) extinct diploid form belonging to the *H. marinum* complex (Komatsuda *et al.*, 2001; Brassac *et al.*, 2012).

To understand the genomic constitution of *H. marinum*, detailed cytogenetic analyses are required. The aim of the present work was to identify chromosomal markers for characterizing

