



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**E.T.S.I.A.M.**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**TESIS DOCTORAL**

“Obtención y caracterización de híbridos interespecíficos en *Pisum* y  
*Lathyrus*”

Doctorando:

Alfredo Bolaños Herrera

Directores:

Dra. Adoración Cabrera Caballero

Dr. Diego Rubiales Olmedo

Córdoba, Septiembre de 2013

TITULO: *Obtención y caracterización de híbridos interespecíficos en Pisum y Lathyrus*

AUTOR: *Alfredo Bolaños Herrera*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



**Adoración Cabrera Caballero**, Catedrática de la Universidad de Córdoba y **Diego Rubiales Olmedo**, Profesor investigador del Instituto de Agricultura Sostenible del Consejo Superior de Investigaciones (IAS-CSIC), Córdoba.

INFORMAN:

Que el trabajo titulado: “**Obtención y caracterización de híbridos interespecíficos en *Pisum* y *Lathyrus***”, realizado por Alfredo Bolaños Herrera, bajo su dirección, se considera ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, 25 de septiembre 2013

Firma del/de los director/es



Fdo: Adoración Cabrera Caballero



Fdo: Diego Rubiales Olmedo



**TÍTULO DE LA TESIS:**

**Obtención y caracterización de híbridos interespecíficos en *Pisum* y *Lathyrus***

**DOCTORANDO/A: Alfredo Bolaños Herrera**

**IFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

Los objetivos de esta tesis se centran en la caracterización citogenética de las descendencias de los cruzamientos interespecíficos en *Pisum* y *Lathyrus* con el objetivo de obtener líneas de introgresión y estudiar la reorganización genómica en las primeras generaciones segregantes.

Estos objetivos se han desarrollado con la metodología adecuada, lo que ha permitido al doctorando conocer las técnicas de citogenética molecular y citometría necesarias para la realización del trabajo.

Los resultados obtenidos pueden ser muy útiles para su utilización en programas de mejora y estudios de la dinámica y evolución de los genomas originados de la hibridación interespecífica. La contrastación de sus resultados con los obtenidos por otros autores es adecuada y la revisión bibliográfica está actualizada

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 25 de septiembre 2013

Firma del/de los director/es



Fdo: Adoración Cabrera Caballero



Fdo: Diego Rubiales Olmedo



**A Vivi, Patri y Caro**





Deseo expresar su agradecimiento a la Dra. Adoración Cabrera bajo cuya dirección se ha realizado este trabajo, gracias a su apoyo y guía he llegado al final de este proceso. Al Dr. Diego Rubiales, codirector de esta tesis, mi agradecimiento por su gentileza y confianza en el trabajo realizado.

Quiero manifestar mi agradecimiento a Rocío Recio, no sólo por su colaboración en temas del laboratorio, sino que también por su amistad.

Durante mis numerosas estancias en Córdoba, he tenido la oportunidad de conocer a grandes personas, cuyos nombres no cito por temor de olvidarme de alguno. Son parte ya de mis buenos recuerdos en esta linda ciudad y en la Universidad de Córdoba.

Quiero agradecer al Ministerio de Agricultura y Ganadería y al Instituto Nacional de Innovación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria la oportunidad de mejorar mis conocimientos. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, al Programa de doctores INIA- España- América Latina por haber financiado parcialmente los gastos asociados a mis estudios en la Universidad de Córdoba.

Mi agradecimiento a mi esposa y mis hijas: Viviana, Patricia y Carolina que me han apoyado y acompañado en esta aventura. A Constantino y Corina, mis padres, Raquel, Margarita, María Eugenia, Constantino, Marta Estela y Eduardo mis hermanas y hermanos. a todos gracias por el apoyo y las alegrías.

De nuevo, gracias totales!



# Índice

<b>Capítulo 1.</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Introducción: Importancia económica del cultivo de <i>L. sativus</i> y <i>L. cicera</i> para consumo como grano.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Materiales y métodos .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.1 Material vegetal .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.2 Preparaciones cromosómicas .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.3 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Resultados.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1 Obtención del híbrido interespecífico y características de las plantas en los primeros tres ciclos de autopolinización.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2 Caracterización citogenética de <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i>. .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.3 Caracterización citogenética de las plantas de la generación F4 procedentes del cruzamiento interespecífico entre <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i>. .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.4 Determinación de los grupos de homeología entre <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i>. .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.5 Caracterización citogenética de las plantas de la generaciones F5 procedentes del cruzamiento interespecífico entre <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i>. .....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.6 Caracterización morfológica de las plantas de la generación F5 procedentes del cruzamiento <i>L. cicera</i> x <i>L. sativus</i>. .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 Discusión.....</b>	<b>26</b>
<b>Capítulo 2.</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Introducción .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Materiales y métodos .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.1 Material vegetal .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.2 Preparaciones cromosómicas .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.3 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.4 Análisis de las imágenes.....</b>	<b>36</b>
<b>2.2.5 Citometría de flujo.....</b>	<b>37</b>
<b>2.3 Resultados.....</b>	<b>37</b>

2.3.1	Caracterización citogenética de las plantas de la generación F5. ....	37
2.3.2	Análisis de citometría .....	38
2.4	Discusión.....	41
<b>Capítulo 3.</b>		<b>45</b>
3.1	Introducción: Importancia económica del cultivo de guisante .....	47
3.2	Materiales y métodos.....	50
3.2.1	Material vegetal.....	50
3.2.2	Preparaciones cromosómicas .....	50
3.2.3	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....	51
3.2.4	Análisis de las imágenes .....	52
3.3	Resultados.....	53
3.3.1	Obtención de las progenies híbridas y características más notorias de las progenies de cada cruzamiento en las dos primeras generaciones. ....	53
3.3.2	Caracterización citogenética de las especies de <i>Pisum</i> incluidas en este estudio. ....	54
3.3.3	Caracterización citogenética de las progenies F1 y F2 procedentes de los cruzamientos interespecíficos en <i>Pisum</i> .....	55
3.3.4	Variación en el índice de fluorescencia entre las líneas parentales y las generaciones F1 y F2 obtenidas del cruzamiento interespecífico de <i>P. sativum</i> y <i>P. fulvum</i> .....	58
3.4	Discusión.....	62

## Lista de Figuras

Figura 1.1. Diagrama representativo de la obtención de las tres primeras generaciones procedentes del cruzamiento entre <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i> .....	12
Figura 1.2. FISH en metafase somática de <i>L. sativus</i> (a) y <i>L. cicera</i> (c) con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (roja); (b y d) GISH con ADN genómico total de <i>L. cicera</i> marcado con biotina y <i>L. sativus</i> con digoxigenina; (e y f) cariotipo de <i>L. sativus</i> y <i>L. cicera</i> .....	14
Figura 1.3. Ideograma de (a) <i>L. sativus</i> y (b) <i>L. cicera</i> basado en las señales de hibridación con las secuencias pTa71 y 5S, respectivamente y los patrones observados de bandas DAPI. ....	15
Figura 1.4 FISH de una célula en metafase somática de cinco plantas de generación F4 entre <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i> la hibridadas con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (roja) y la GISH con ADN genómico total de <i>L. cicera</i> (c, rojo) y <i>L. sativus</i> (s, verde); (a y b) sustitución doble monosómica de los cromosomas 2 y 4 y además con los cromosomas recombinantes 1, 4 y 5 en heterocigosis y los cromosomas recombinantes 7 y 3 en homocigosis; (c y d) sustitución monosómica del cromosoma 4; (e y f) sustitución triple monosómica de los cromosomas 2, 4 y 5; (g y h) cromosoma 2 recombinante en homocigosis y el cromosomas 4 recombinante en heterocigosis; (i y j) cromosomas recombinantes 2, 4 y 6. ....	20
Figura 1.5. FISH de una célula en metafase somática de cinco planta de generación F5 <i>L. cicera</i> x <i>L. sativus</i> hibridadas con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (roja) y la GISH con ADN genómico total de <i>L. cicera</i> (rojo) y <i>L. sativus</i> (verde). (a y b) cromosomas 4 y recombinantes en heterocigosis; (c y d) cromosoma 6 recombinante en homocigosis; (e y f) cromosomas 4 con recombinación en el brazo corto y largo y cromosoma 6 recombinante; (g y h) sustitución monosómica del cromosoma 5, además de los cromosomas recombinantes 6 y 4; (i y j) sustitución monosómica del cromosoma 5 además del cromosoma 4 recombinante en heterocigosis y el cromosoma 6 recombinante en homocigosis.....	23
Figura 1.6. Segregación del color de las flores de las plantas de la generación F5 del cruzamiento entre <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i> . ....	24
Figura 1.7. Plantas de la generación F5 del cruzamiento <i>L. cicera</i> x <i>L. sativus</i> . La planta de la izquierda presenta un par de cromosomas 6 recombinante; sin dicho cromosoma. ....	25
Figura 1.8. Semillas de <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i> y segregación del color, tamaño y forma las semillas de plantas de la generación F5 procedentes del cruzamiento <i>L. cicera</i> x <i>L. sativus</i> . ....	26
Figura 2.1. (a) FISH en metafase somática con las sondas de ADNr pTa71 (verde) y 5S (roja) de una planta F5 con la sustitución monosómica del cromosoma 5 de <i>L. cicera</i> por el de <i>L. sativus</i> (a) y de una planta F5	

euploide portadora del par 5 de <i>L. sativus</i> ; en (b) la misma metafase hibridada con ADN genómico total de <i>L. cicera</i> (rojo) y <i>L. sativus</i> (verde). Los cromosomas 5 de ambas especies se indican con flechas. ....	38
Figura 2.2. Diagramas obtenidos mediante citometría en los que se representa la intensidad relativa de fluorescencia de (a) <i>L. sativus</i> , (b) <i>L. cicera</i> (c) línea F5 euploide, (d) línea de sustitución monosómica del cromosoma 5 de <i>L. cicera</i> y (e) superposición de los diagramas anteriores. ....	39
Figura 2.3. Histograma de la RawInDent (RID) de los cromosomas 5 de <i>L. cicera</i> (rojo) y <i>L. sativus</i> (verde) medida en seis plantas doble monosómicas para los cromosomas 5 de <i>L. sativus</i> y <i>L. cicera</i> . ....	40
Figura 2.4. Diagrama de dispersión del índice de ADN (IADN) de <i>L. cicera</i> , <i>L. sativus</i> , plantas F5 monosómicas para la sustitución del cromosoma 5 de <i>L. cicera</i> y plantas hermanas F5 euploides. ....	41
Figura 3.1. Fluctuación en el rendimiento promedio en toneladas por hectárea de las principales leguminosas de grano en el mundo. (FAO, 2013). ....	47
Figura 3.2. Fluctuación en el tiempo de la superficie cultivada, rendimiento y producción total del guisante en el mundo (FAO, 2013). ....	48
Figura 3.3. FISH en metafase somática de (a) <i>Pisum sativum</i> y (b) <i>P. fulvum</i> con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (roja). ....	54
Figura 3.4. Ideograma de (a) <i>P. sativum</i> y (b) <i>P. fulvum</i> basado en las señales de hibridación con las secuencias pTa71 y 5S de ADNr, respectivamente y los patrones de bandas DAPI. ....	55
Figura 3.5. FISH en metafase somática del híbrido F1 entre <i>P. sativum</i> y <i>P. fulvum</i> hibridada con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (roja) (a). En (b) la misma preparación hibridada con ADN genómico total de <i>P. sativum</i> (verde) y <i>P. fulvum</i> (rojo). ....	56
Figura 3.6. Metafases somáticas de cuatro plantas de la generación F2 obtenidas del cruzamiento entre <i>P. sativum</i> y <i>P. fulvum</i> , hibridadas con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (rojo). ....	58
Figura 3.7. Variación en los índices de fluorescencia (IF=IR/IG) por cromosoma para una muestra de plantas de <i>P. sativum</i> (a), <i>P. fulvum</i> (b) una planta F1 (c) y tres plantas F2 (d-f). ....	59
Figura 3.8. GISH en metafases somáticas de plantas de la generación F2 obtenidas del cruzamiento entre <i>P. sativum</i> y <i>P. fulvum</i> , hibridadas con ADN genómico total de ambos parentales. Las flechas indican regiones cromosómicas de color amarillo rojizo. ....	60
Figura 3.9. Dispersión del índice de fluorescencia (IF) de los cromosomas metafásicos de las especies parentales <i>P. sativum</i> (línea 4) y <i>P. fulvum</i> (línea 660) de los 7 cromosomas correspondientes a cada especie presentes en las plantas híbridas F1 y de las plantas de la generación F2. ....	62

## Lista de tablas

Tabla 1.1. Promedio de semillas recolectadas en las plantas de las generaciones F3 y F4 originadas del cruzamiento entre <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i> .....	13
Tabla 1.2 Longitud del brazo corto (C) brazo y del largo (L); longitud total del cromosoma (C+L) y relación entre la longitud del brazo largo y el brazo corto L/C medidos sobre 10 preparaciones metafásicas de <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i> . ....	15
Tabla 1.3. Caracterización citogenética de 35 plantas de la generación F4 del cruzamiento entre <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i> .....	18
Tabla 1.4. Características citogenéticas de 42 plantas de tres familias F5 del cruzamiento entre <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i> .....	22
Tabla 1.5. Caracterización citogenética de ocho plantas de la generación F5 con crecimiento determinado y entrenudos cortos. ....	25
Tabla 2.1. Intensidad relativa de fluorescencia (IRF) de las especies <i>L. cicera</i> y <i>L. sativus</i> , de las plantas de sustitución monosómica del cromosoma 5 y de las plantas euploides. ....	38
Tabla 3.1. Especies del género <i>Pisum</i> utilizadas en este estudio. ....	50
Tabla 3.2. Nucleótido usado para marcar el ADN de las especies de <i>Pisum</i> en los experimentos de GISH. ....	52
Tabla 3.3. Cantidad promedio de semillas colectadas en las plantas de las generaciones F1 y F2 originadas de los cruzamientos interespecíficos en <i>Pisum</i> . ....	53
Tabla 3.4. Segregación en el número de señales de hibridación con las secuencias pTa71 y 5S de ADN <sub>r</sub> en una muestra de once plantas de la generación F2 obtenidas del cruzamiento <i>P. sativum</i> x <i>P. fulvum</i> . ....	57
Tabla 3.5 Valores promedio del índice de fluorescencia (IF) de los cromosomas metafásicos de las especies parentales <i>P. sativum</i> y <i>P. fulvum</i> y de los 7 cromosomas correspondientes a cada especie presentes en las plantas de la generación F1.....	59
Tabla 3.6. Clasificación de los cromosomas de una muestra de 10 plantas de la generación F2 del cruzamiento entre <i>P. sativum</i> y <i>P. fulvum</i> según el índice de fluorescencia. ....	61





## Resumen

Con el objetivo de obtener líneas de introgresión de *Lathyrus cicera* en *L. sativus* y de *Pisum fulvum*, *P. abyssinicum* y tres subespecies de *P. sativum* en *P. sativum* subsp. *sativum*, se ha analizado la composición genómica de una muestra de plantas de las generaciones F4 y F5 originadas del cruzamiento *L. cicera* x *L. sativus*, así como de las generaciones F1 y F2 originadas del cruzamiento de *P. sativum* subsp. *sativum* con cuatro guisantes silvestres y con las especies *P. abyssinicum* y *P. fulvum*. Además se ha analizado la posibilidad de utilizar la citometría de flujo para separar plantas con la sustitución monosómica del cromosoma 5 de *L. cicera* de las plantas hermanas euploide. Los análisis genómicos se realizaron mediante la hibridación *in situ* con los marcadores citológicos pTa71 y S5 (FISH), Así como con ADN genómico total de las dos líneas parentales (GISH). El análisis genómico de las plantas de la generación F4 provenientes del cruzamiento de *L. cicera* x *L. sativus*, mostró que todas ellas tienen 14 cromosomas y que el genoma predominante es el de *L. sativus*. Se han generado líneas de introgresión de *L. cicera* en *L. sativus*, que incluyen tanto sustituciones cromosómicas como cromosomas recombinantes. El análisis de la composición genómica de las líneas de introgresión ha permitido modificar el orden de los cromosomas en el cariotipo de *L. cicera*, estableciéndose una nueva relación de homología entre *L. cicera* y *L. sativus*. La diferencia observada en el índice de fluorescencia relativa de las plantas portadoras de la sustitución monosómica y las plantas euploides hermanas, ha permitido identificar las plantas con mayor probabilidad de portar el genotipo deseado reduciéndose el número de plantas a analizar por FISH. El análisis FISH de las plantas de *P. fulvum* ha permitido establecer la localización física de la subunidad 5S de rADN. El análisis GISH de las plantas de las generaciones F4 y F5 procedentes del cruzamiento *L. cicera* x *L. sativus*, permitió distinguir la cromatina de las líneas parentales presente en estas plantas. Sin embargo, el análisis GISH de las plantas de la generación F2 provenientes del cruzamiento *P. sativum* subsp. *sativum* x *P. fulvum*, no permitió identificar la cromatina proveniente de las líneas parentales. Este resultado ha obstaculizado la identificación de líneas de introgresión en el género *Pisum*.



## **Introducción General**



## Introducción general

La familia de las leguminosas agrupa 917 géneros; es la más numerosa de las angiospermas e incluye especies perennes y anuales (The Plant List, 2010) que tienen la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico mediante la relación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium*. Esta característica permite reducir las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados en sistemas de producción en los que se ha incluido una leguminosa, ya sea en relevo o en cultivos mixtos, como por ejemplo la leucaena (*Leucaena leucocephala*) con cultivos de ciclo corto (Sharma y Behera, 2010) o con especies perennes (Kumar et al., 1998), así como la inclusión de especies de leguminosas arbustivas en sistemas agroforestales (Nygren et al., 2012).

El área dedicada al cultivo de especies leguminosas en el mundo es superada únicamente por la cultivada con cereales (FAO, 2013). Su importancia radica en el alto contenido de proteínas de sus granos, lo que las convierte en una fuente importante de este macronutriente, especialmente en regiones del mundo donde la proteína de origen animal es cara o no está disponible a toda la población. Las proteínas de las leguminosas se incorporan a la dieta humana en forma directa por el consumo de los granos cocidos o procesados de varias maneras, así como de manera indirecta, transformada en proteína animal, pues los granos de estas plantas se utilizan para elaborar piensos y mejorar los pastos y forrajes para la alimentación de animales (Day, 2013). Los granos de la soja (*Glicine max*), además de tener un alto porcentaje de proteína, también son ricos en aceite, lo que ha convertido a este cultivo en uno de los más importantes dentro de esta familia.

La mejora de las variedades de leguminosas cultivadas se ha enfocado principalmente en la incorporación de genes de resistencia a plagas y enfermedades, en mejorar la tolerancia a la sequía y altas temperaturas y en la producción en suelos con baja fertilidad. En el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) la alta variabilidad genética disponible dentro del pool genético primario ha facilitado el avance en el cumplimiento de estos objetivos con la utilización de variedades rústicas y líneas élite en los programas de mejora (Beaver y Osorno, 2009).

En otras leguminosas la variabilidad genética dentro del pool genético primario es reducida, por lo que es necesario recurrir, con mayor frecuencia, a la hibridación interespecífica, para enriquecer la base genética sobre la cual se fundamenten los

programas de mejora. En garbanzo (*Cicer arietinum*), por ejemplo, se han realizado cruzamientos con *C. reticulatum*, *C. cuneatum* y *C. echinospermum* con el objetivo de mejorar la resistencia a rabia (*Ascochyta rabiei*), fusariosis vascular (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*), pudrición de la base del tallo (*Opercillella padwicii*) y rizoctonia (*Rhizoctonia bataticola*) (Singh et al., 2005). En gandul (*Cajanus cajan*) se han realizado cruzamientos con *C. platycarpus* para introducir resistencia a *Phytophthora drechsleri* f.sp. *cajani* (Mallikarjuna et al., 2006).

La hibridación de las especies de leguminosas cultivadas con los parientes silvestres es difícil, debido fundamentalmente a la existencia de mecanismos muy eficientes que impiden el movimiento de genes entre especies, por lo que generalmente se obtienen pocas semillas o bien las progenies resultantes son estériles (Smartt, 1979). El origen de estos resultados está en la existencia de barreras que impiden la fertilización del óvulo (prefertilización) o bien provocan la muerte del embrión (posfertilización). Gopinathan et al. (1986) demostraron la existencia de barreras prefertilización en el cruzamiento entre *Vigna umbellata* y *V. minima*, que impiden la fertilización del óvulo, debido al retraso en el crecimiento del tubo polínico y, en el cruzamiento recíproco, determinaron que la baja producción de semillas se debía a barreras posfertilización ligadas al retraso en la división de las células del endospermo o a degeneración de este tejido, seguidas del aborto del embrión. En algunos cruzamientos como el de *Cicer arietinum* x *C. pinnatifidum*, aunque se han obtenido plantas F1 por medio del rescate de embriones, las plantas carecieron de clorofila, lo que demuestra que en algunos casos las barreras posfertilización son realmente insuperables (Badami et al., 1997).

Las progenies que se obtienen de los cruzamientos interespecíficos por lo general tienen un nivel variable de esterilidad debido usualmente a variaciones en los arreglos cromosómicos o baja recombinación que reducen la viabilidad del polen (Muehlbauer et al., 1994). En este sentido, Murray y Hammett (1989) analizaron la descendencia del cruzamiento entre *Lathyrus chrysanthus* y *L. chloranthus* y encontraron que la meiosis en los híbridos era altamente irregular y los cromosomas aparecían como univalentes durante la metafase I o bien como trivalentes formando cadenas de cromosomas de diferente tamaño. Además observaron una falta de sincronía entre las células, pues encontraron células en profase I mientras que otras estaban en citoquinesis, lo que resultó que el polen producido por estas plantas fue inviable en su totalidad. En una situación similar, Abbo et al. (2011) analizaron las progenies obtenidas de los

cruzamientos entre *Cicer bijugum* x *C. judaicum*, *C. judaicum* x *C. pinnatifidum* y *C. cuneatum* x *C. canariense* pero, a diferencia de lo observado por Murray y Hammett (1989), el apareamiento de los cromosomas en la metafase I de las plantas de la generación F1 fue normal y la viabilidad del polen fue de un 50%, pero aun así la producción de semillas fue muy baja, lo cual se ha atribuido a posibles distorsiones en los arreglos genéticos en los gametos masculinos y a la existencia de barreras complejas entre estas especies.

Aun si el cruzamiento interespecífico fuese exitoso y la progenie resultante fuese suficientemente fértil para desarrollar líneas avanzadas, éstas habrían de someterse a rigurosos ciclos de retrocruza y selección para recuperar el tipo de planta de la especie cultivada sin perder la característica de interés (Muehlbauer et al., 1994).

El presente trabajo se ha desarrollado con dos géneros de las leguminosas, *Pisum* y *Lathyrus*. En el pool genético primario del guisante (*Pisum sativum* subsp. *sativum*) se han identificado genes de resistencia a la ascoquitosis (*Mycosphaerella pinodes*) (Fondevilla et al., 2007a; Fondevilla et al., 2005), al oídio (*Erysiphe pisi*) (Fondevilla et al., 2007b), a la roya (*Uromyces pisi*) (Barilli et al., 2009) y a jopo (Rubiales et al., 2005) pero los niveles de resistencia detectados en *P. fulvum* son más altos, por lo que esta especie puede ser la de mayor interés para la mejora del guisante.

En *Lathyrus*, la especie de más interés para la mejora de *L. sativus* (almorta o alverjón) es *L. cicera*. La evaluación de germoplasma de *L. cicera* ha permitido identificar entradas que poseen genes de resistencia a oídio (*Erysiphe pisi*) (Vaz Patto et al., 2006a; Vaz Patto et al., 2007), jopo (*Orobanche crenata*) (Fernández-Aparicio y Rubiales, 2010; Fernández-Aparicio et al., 2012) y roya (*Uromyces pisi* y *U. viciae-fabae*) (Vaz Patto et al., 2009).

Mientras el guisante ocupa el tercer lugar entre las leguminosas por área cosechada en el mundo (FAO, 2013), *L. sativus* se considera un cultivo menor, al que se ha dedicado menos esfuerzo para producir cultivares mejorados. Aun así, las plantas del género *Lathyrus* tienen numerosos atributos interesantes para el enriquecimiento de los sistemas de producción. Llama la atención, sobre todo, su rusticidad y capacidad productiva en sistemas de bajos insumos (Campbell, 1997; Vaz Patto et al., 2006b).



## **Objetivos**

La presente Tesis plantea como objetivo general obtener líneas de introgresión de *Lathyrus cicera* en *L. sativus* y de *Pisum fulvum* en *P. sativum* con el fin último de ampliar la base genética de ambos cultivos.

Este objetivo se aborda desde los siguientes objetivos específicos:

Obtener híbridos interespecíficos entre *Pisum sativum* y las especies silvestres *P. fulvum*, *P. abyssinicum*, *P. sativum* subsp. *asiaticum* *P. sativum* subsp. *syriacum* y *P. sativum* subsp. *humile* y estudiar la composición genómica de las descendencias.

Obtener y caracterizar citológica y morfológicamente líneas de introgresión de *Lathyrus cicera* en *L. sativus*

Analizar el empleo de la citometría como una herramienta de ayuda a la selección de líneas de introgresión de *L. cicera* en *L. sativus*.

## **Capítulo 1.**

**Obtención y caracterización citológica y morfológica de líneas de introgresión de *Lathyrus cicera* en *L. sativus*.**



## **1.1 Introducción: Importancia económica del cultivo de *L. sativus* y *L. cicera* para consumo como grano.**

El género *Lathyrus* comprende alrededor de 187 especies con presencia en casi todas las regiones del mundo. Pertenecen a la familia Leguminosae, sub familia Papilionoideae, tribu Viciae (Campbell, 1997) sección *Lathyrus* (Kenicer et al., 2005). Es un género con numerosas especies y al igual que en el caso del guisante, algunas especies antiguas se tienen por sinónimos de otras, o bien han sido recalificadas recientemente. *L. cicera* y *L. sativus* se consideran especies diferentes (The Plant List, 2010) y, dependiendo del tipo de estudio que se realice para establecer distancias entre ellas, pueden resultar más o menos filogenéticamente próximas (Kenicer et al., 2005). *L. sativus* ha sido ampliamente utilizada para la alimentación humana desde tiempos remotos hasta la actualidad (Campbell et al., 1994; Hillocks y Maruthi, 2012; Vaz Patto et al., 2006b) y en menor grado su pariente *L. cicera* (Campbell, 1997; Hanbury y Siddique, 2000; ICARDA, 2007; Tay et al.; Vaz Patto et al., 2006b) a la que se considera como parte del pool genético secundario de la primera (Heywood et al., 2007; Yunus et al., 1991). La importancia alimentaria del género radica en su elevado contenido proteico (Granati et al., 2003; Pastor-Cavada et al., 2011). Grela et al. (2012) indican que el contenido de proteína en *L. cicera* es de 25 % de la materia seca y en *L. sativus* el 30 %, similares al de otras leguminosas como el garbanzo (Gil et al., 1996) y el guisante (Day, 2013).

A diferencia del guisante, las almortas no cuentan con datos sobre área sembrada, rendimiento o producción global. La relevancia de esta leguminosa como cultivo agrícola de importancia se circunscribe a unos pocos países como India, Bangladesh, Paquistán, Nepal y Etiopía (Campbell, 1997). Las almortas se cultivan en regiones muy limitadas alrededor de la cuenca del Mediterráneo, el Medio Oriente y África, pero en mucho menor escala en esta última (Campbell, 1997). Las almortas (*L. sativus*) y los titarros (*L. cicera*) también se utilizan para mejorar la calidad de forraje (Campbell, 1997; Vaz Patto et al., 2006b) o en los campos de pastoreo en asociación con algunas gramíneas (Campbell et al., 1994; Rao et al., 2007). También se utilizan como abono verde y protectores del suelo contra la erosión, dada su capacidad para fijar nitrógeno y la cantidad de biomasa que producen (Krause y Krause, 2003).

Dentro del género *Lathyrus* hay especies de interés como plantas ornamentales, las que también suscitan gran cantidad de investigaciones ligadas a la mejora de la calidad de

las flores y resistencia a varias enfermedades (Campbell, 1997; Hammett et al., 1994; Murray y Hammett, 1989; Poulter et al., 2003).

Tanto las semillas de *L. sativus* como las de *L. cicera* contienen varios compuestos nocivos para la salud de los animales y potencialmente peligrosos para la salud humana (Yan et al., 2006). Entre ellos sobresale la neurotoxina  $\beta$ -N-oxalyl L-a,  $\beta$ -diaminopropanoic acid (ODAP) que provoca la enfermedad conocida como latirismo.

Se han llevado a cabo programas de mejora para intentar reducir el contenido de ODAP, pero no se han obtenido líneas que carezcan totalmente de estos compuestos (Kumar et al., 2011; Tsegaye et al., 2005) y tal vez, como sugieren Kurma y Korbu (2012) esto se deba a la alta interacción entre el genotipo y el ambiente. Una solución alternativa a la mejora es la reducción de ODAP con diferentes tratamientos antes o durante el procesado del grano para su consumo (Ur-Rehman et al., 2006).

Desde el punto de vista de la mejora genética, la importancia de estos cultivos radica en la posibilidad de potenciar su capacidad para producir grano de alto contenido proteico aún en condiciones ambientales muy limitantes o inaceptables para otras leguminosas. Además, la evaluación de colecciones de germoplasma de *L. cicera* y *L. sativus* ha permitido identificar entradas de ambas especies que poseen genes de resistencia a oídio (*Erysiphe pisi*) (Vaz Patto et al., 2006a; Vaz Patto et al., 2007) y jopo (*Orobanche crenata*) (Fernández-Aparicio y Rubiales, 2010; Fernández-Aparicio et al., 2012) así como entradas de *L. cicera* con resistencia a roya (*Uromyces pisi* y *U. viciae-fabae*) (Vaz Patto et al., 2009) y entradas de *L. sativus* con resistencia a *Mycosphaerella pinoides* (Gurung et al., 2002; Skiba et al., 2004b).

La hibridación interespecífica se ha utilizado con éxito en mejora vegetal para ampliar la base genética de los cultivos, a través de la introgresión de fragmentos cromosómicos o bien, la sustitución de uno o varios cromosomas. La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) facilita este estudio, pues permite la detección y localización de las introgresiones que puedan haber ocurrido (Cerbah et al., 1999; Dávila-Rodríguez et al., 2009; Fuchs et al., 1998; Hernández et al., 2002; Prieto et al., 2001; Prieto et al., 2006; Samatadze et al., 2005; Schneider et al., 2003; Seijo et al., 2007; Soliman et al., 2001; Vischi et al., 2003) así como el grado de recombinación y sustitución genética a favor de uno de las líneas paternas (Armstead et al., 2001; Fu et al., 2012; Said et al., 2012; Zwierzykowski et al., 2006).

En este trabajo se pretende caracterizar los híbridos interespecíficos entre *Lathyrus sativus* y *L. cicera*, estudiar la composición genómica de las descendencias de los cruzamientos interespecíficos y caracterizar citológica y morfológica las líneas de introgresión obtenidas.

## **1.1 Materiales y métodos**

### **1.1.1 Material vegetal**

En esta tesis se han utilizado las generaciones F3, F4 y F5 obtenidas por autofecundación de una planta F1 procedente del cruzamiento entre *Lathyrus cicera* y *L. sativus*. Los cruzamientos entre ambas especies se realizaron utilizando *L. cicera* como parental femenino y fueron llevados a cabo por el equipo del Dr. Rubiales del Instituto de Agricultura Sostenible del Consejo Superior de Investigaciones (IAS-CSIC) de Córdoba. Los parentales utilizados en los cruzamientos fueron la línea L-138 (=BG 23555) de *L. cicera* ( $2n=2x=14$ ) y la línea L-180 (=BG 17184) de *L. sativus* ( $2n=2x=14$ ), ambas amablemente suministradas por el Centro de Recursos Fitogenéticos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid al IAS-CSIC.

### **1.1.2 Preparaciones cromosómicas**

Las semillas se pusieron a germinar en oscuridad a 25° C. Una vez que la raíz creció aproximadamente 1 cm de longitud, se cortó la sección distal y se trató con una solución acuosa de colchicina (0,05%) a 25° C durante tres horas. Posteriormente, los ápices radiculares se fijaron en una solución de tres partes de etanol absoluto con una parte de ácido acético glacial (v/v) y se almacenaron a 4° C hasta su uso. Se cortaron secciones muy finas de los ápices radiculares y se prensaron entre un porta objetos y el cubre objetos en una gota de ácido acético al 45%. Las preparaciones cromosómicas se estudiaron en un microscopio de contraste de fase e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido seguido de la eliminación del cubreobjetos. Las mejores preparaciones cromosómicas se almacenaron a 20° C para su uso posterior.

### 1.1.3 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La hibridación *in situ* fluorescente se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Cabrera et al. (2002). Las sondas de ADNr que se utilizaron en los experimentos de FISH fueron la pTa71 que consiste en unidad 18S-5,8S-26S de ADNr (8,9 kb) de *Triticum aestivum* (Gerlach y Bedbrook, 1979) y la sonda para la subunidad 5S de ADNr (Lee et al., 1999).

Las sondas pTa71 y la 5S se marcaron con digoxigenina-11-dUTP y biotina -16-dUTP (Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Alemania) respectivamente. La sonda pTa71 se marcó mediante *Nick translation* y la 5S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Lee et al., 1999). Ambas sondas se mezclaron en la solución de hibridación a una concentración final de 2 ng/μl.

Para la hibridación *in situ* con ADN genómico total (GISH: *Genomic In Situ Hybridization*) el ADN de las líneas parentales se extrajo a partir de hojas jóvenes mediante la técnica descrita por Murray y Thompson (1980). Posteriormente el ADN se marcó mediante *Nick translation*, con digoxigenina-11-dUTP el de *L. sativus* y el de *L. cicera* con biotina-16-dUTP (Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Alemania). El ADN de ambos parentales se mezcló en partes iguales en la solución de hibridación a una concentración de 10 ng/μl con la que se hicieron las hibridaciones.

Las sondas de ADN que se marcaron con biotina-16-dUTP se detectaron con Streptavidina-Cy3 (Sigma) (50 ng/μl) y las sondas marcadas con digoxigenina-11-dUTP se detectaron con anti-digo-FITC (Isotiocianato de fluoresceína, Boehringer Mannheim) (10ng/μl).

Las preparaciones cromosómicas se hibridaron en primer lugar con las sondas de ADNr y se observaron al microscopio de fluorescencia. Las mismas preparaciones se lavaron para eliminar las sondas y se hibridaron de nuevo con ADN genómico total. En ambos casos los cromosomas se tiñeron con DAPI (40, 6-diamidino-2-phenylindole) y las preparaciones se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, 94010, USA). Las imágenes se capturaron separadamente para el canal de longitud de onda correspondiente a cada fluorocromo. Para ello se utilizó un sistema de cámara CCD (Photometrics) acoplada a un microscopio de fluorescencia Leica DMR equipado con los filtros de luz adecuados para los fluorocromos utilizados. Las fotografías de los canales luminosos rojo (R) verde (G) y azul (B) se mezclaron con el programa SPOT

2.1 (Diagnostics Instruments, Inc., Burroughs, Sterling Heights, Michigan, USA) para producir una imagen multicanal (RGB) en la que se visualizaron las sondas de ADN<sub>r</sub> y la hibridación con las sondas de ADN genómico total.

## **1.2 Resultados**

### **1.2.1 Obtención del híbrido interespecífico y características de las plantas en los primeros tres ciclos de autopolinización**

Previa a esta tesis, se habían realizado los cruzamientos entre *L. cicera* y *L. sativus* en ambas direcciones en el IAS-CSIC, Córdoba. De todos los cruzamientos realizados sólo se había obtenido una semilla híbrida del cruzamiento entre *L. cicera* como parental femenino y *L. sativus* como donador de polen. Esta semilla una vez germinada había dado origen a una planta F1 vigorosa de morfología y flores de color semejantes a *L. cicera*. Esta planta había dado 10 semillas F2 producidas por autopolinización, de las cuales germinaron seis y dieron lugar a plantas adultas (Figura 1.1). La producción de semillas de las seis plantas F2 establecidas mostró gran variación, la planta F2-2 fue la de mayor producción con 138 semillas y F2-3 produjo sólo dos semillas. Dos plantas fueron estériles (Figura 1.1).

En la generación F2 se había observado segregación para el color de la flor. Una planta había producido flores totalmente blancas como las de *L. sativus*; otra flores rosadas similares a las de *L. cicera*; otra planta flores azules; y las tres plantas restantes flores blancas con manchas azuladas y rojas en el estandarte y en la quilla (Figura 1.1).



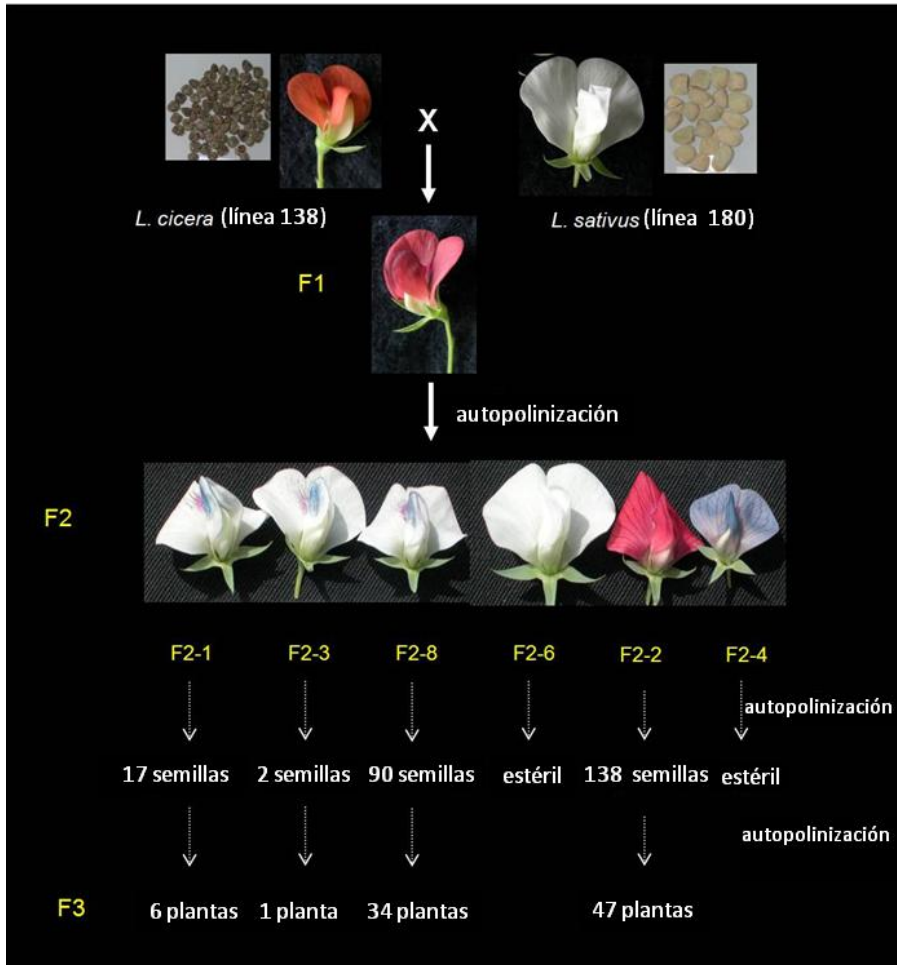


Figura 1.1. Diagrama representativo de la obtención de las tres primeras generaciones procedentes del cruzamiento entre *L. cicera* y *L. sativus*.

Ya que las plantas F2-1, F2-2 y F2-8 fueron las que produjeron más semillas (17, 138, 90 respectivamente) se continuó sólo con éstas. En la Tabla 1.1 se muestra el número de plantas sembradas y cosechadas, así como la producción de semillas por planta en las generaciones F3 y F4 correspondientes. El porcentaje de plantas cosechadas en la generación F3 fue del 88 %. Las plantas de la generación F3 produjeron muchas flores pero muy pocas vainas. La producción de semillas por planta de las tres familias F3 varió entre las 1.023 de una planta de la familia F3-2 y una semilla en una planta de la familia F3-8.

Tabla 1.1. Promedio de semillas recolectadas en las plantas de las generaciones F3 y F4 originadas del cruzamiento entre *L. cicera* y *L. sativus*.

Familia	Número de plantas		Semillas por planta $\bar{X} \pm SE$
	sembradas	cosechadas	
F3-1	6	6	24,3 ± 7,8
F3-2	47	40	132,7 ± 25,6
F3-8	34	32	356,8 ± 49,7
F4-1	21	15	76,9 ± 28,0
F4-2	16	15	12,8 ± 56,5
F4-8	64	47	123,7 ± 19,6

En el siguiente ciclo de cultivo se sembraron 21 plantas de la familia F4-1, 16 de la familia F4-2 y 63 de la familia F4-8. El porcentaje de plantas cosechadas fue del 76,2 %, casi un 12 % inferior al del ciclo anterior. Todas las plantas florecieron en abundancia, pero la producción de semillas por planta en este ciclo fue más baja que en el ciclo previo y varió de dos a 558 semillas por planta. En esta generación hubo ocho plantas albinas que murieron antes del trasplante a campo.

### 1.2.2 Caracterización citogenética de *L. cicera* y *L. sativus*.

Tanto *L. cicera* como *L. sativus* son diploides con  $2n=2x=14$ . La FISH de *L. cicera* con la secuencia pTa71 mostró una señal de hibridación en el par de cromosomas 1 que es el par cromosómico más largo del cariotipo. Esta señal se corresponde con el NOR de esta especie. El NOR se localizó en el brazo largo del cromosoma 1, el cual también presenta una señal de hibridación con la secuencia 5S en el brazo corto. La FISH también mostró dos señales de hibridación de la secuencia 5S en el brazo corto de dos pares cromosómicos submetacéntricos, ambos de morfología diferente. Uno de ellos presenta una banda DAPI subtelomérica en el brazo corto mientras que el otro par cromosómico no presenta ninguna banda DAPI visible (Figura 1.2 y Figura 1.3). Con base en las diferencias en morfología y longitud de los cromosomas (Tabla 1.2), así como en los resultados de la FISH y la GISH de las plantas de las generaciones F4 que serán expuestos en detalle más adelante, estos pares cromosómicos se identificaron como el par 4 y el par 6, respectivamente (Figura 1.2 y Figura 1.3).

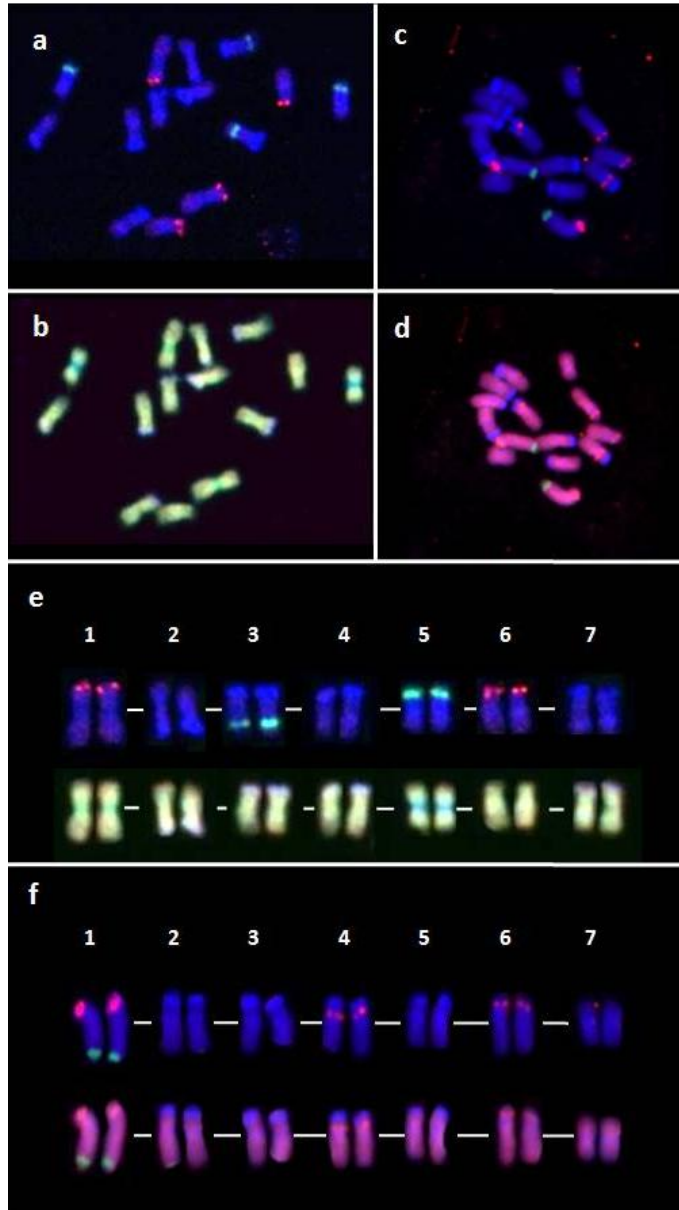


Figura 1.2. FISH en metafase somática de *L. sativus* (a) y *L. cicera* (c) con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (roja); (b y d) GISH con ADN genómico total de *L. cicera* marcado con biotina y *L. sativus* con digoxigenina; (e y f) cariotipo de *L. sativus* y *L. cicera*.

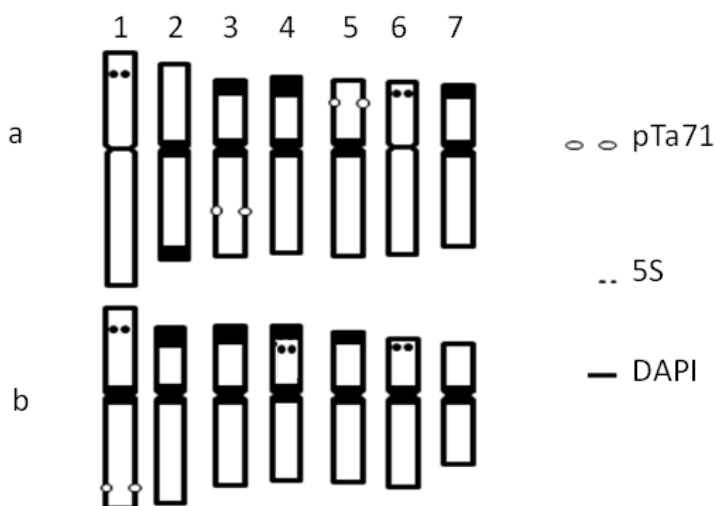


Figura 1.3. Ideograma de (a) *L. sativus* y (b) *L. cicera* basado en las señales de hibridación con las secuencias pTa71 y 5S, respectivamente y los patrones observados de bandas DAPI.

Tabla 1.2 Longitud del brazo corto (C) brazo y del largo (L); longitud total del cromosoma (C+L) y relación entre la longitud del brazo largo y el brazo corto L/C medidos sobre 10 preparaciones metafásicas de *L. cicera* y *L. sativus*.

	$(\bar{X} \pm SE \text{ en } \mu\text{m})$			
	C	L	C+L	L/C
<i>L. cicera</i>				
1	3,78 $\pm$ 0,24	4,85 $\pm$ 0,24	8,62 $\pm$ 0,45	1,28
2	2,86 $\pm$ 0,16	4,64 $\pm$ 0,33	7,50 $\pm$ 0,45	1,62
3	3,02 $\pm$ 0,19	3,93 $\pm$ 0,17	6,90 $\pm$ 0,33	1,30
4	2,99 $\pm$ 0,13	3,69 $\pm$ 0,22	6,68 $\pm$ 0,32	1,23
5	2,79 $\pm$ 0,19	3,73 $\pm$ 0,16	6,43 $\pm$ 0,33	1,34
6	2,46 $\pm$ 0,14	3,99 $\pm$ 0,28	6,44 $\pm$ 0,38	1,62
7	2,15 $\pm$ 0,15	3,12 $\pm$ 0,18	5,27 $\pm$ 0,31	1,45
<i>L. sativus</i>				
1	4,14 $\pm$ 0,35	5,98 $\pm$ 0,28	10,15 $\pm$ 0,60	1,44
2	3,58 $\pm$ 0,21	4,85 $\pm$ 0,24	8,44 $\pm$ 0,40	1,36
3	2,92 $\pm$ 0,15	4,75 $\pm$ 0,24	7,67 $\pm$ 0,36	1,62
4	3,13 $\pm$ 0,18	4,54 $\pm$ 0,27	7,65 $\pm$ 0,41	1,45
5	2,90 $\pm$ 0,14	4,70 $\pm$ 0,22	7,60 $\pm$ 0,34	1,62
6	2,84 $\pm$ 0,15	4,67 $\pm$ 0,23	7,51 $\pm$ 0,31	1,64
7	2,72 $\pm$ 0,13	4,27 $\pm$ 0,21	6,99 $\pm$ 0,29	1,57

La FISH en *L. sativus* con la sonda pTa71 mostró dos señales de hibridación, una de ellas se localizó en el brazo largo del cromosoma 3 y la otra en el brazo corto del

cromosoma 5. La hibridación con la sonda 5S mostró dos señales de hibridación en el brazo corto de los cromosomas 1 y 6 (Figura 1.2 y Figura 1.3).

Además de las diferencias observadas en la posición de las señales de hibridación con las sondas pTa71 y 5S entre ambas especies, también se han observado diferencias en la presencia de bandas DAPI entre ambas especies. Todos los cromosomas de *L. cicera* presentan bandas DAPI en las regiones centroméricas y en las regiones subtlocéntricas del brazo corto de los cromosomas 2, 3, 4 y 5 (Figura 1.2 y Figura 1.3).

En *L. sativus* también se observan bandas DAPI en las regiones centroméricas de todos los cromosomas a excepción de los cromosomas 1 y 6. Además, los cromosomas 3, 4 y 7 muestran bandas DAPI en la región subtlocémica del brazo corto mientras que el cromosoma 2 presenta una banda DAPI en la región subtlocémica del brazo largo (Figura 1.2 y Figura 1.3).

La longitud de los cromosomas de la línea L-138 de *L. cicera* varió de 8,6  $\mu\text{m}$  del cromosoma 1, el más largo del cariotipo, a 5,27  $\mu\text{m}$  del cromosoma 7. Todos los cromosomas de esta línea de *L. cicera* son metacéntricos, y a excepción del cromosoma 1, todos muestran una longitud similar. La longitud total del cariotipo de *L. cicera* fue de 47,84  $\mu\text{m}$  (Tabla 1.2).

La longitud de los cromosomas de la línea L-180 de *L. sativus* varió de 10,15  $\mu\text{m}$  para el cromosoma de mayor tamaño a 6,99  $\mu\text{m}$  para el cromosoma de menor tamaño. Todos los cromosomas de la línea L-138 de *L. sativus* son de mayor longitud que los de *L. cicera* lo que hace que la longitud total del cariotipo de esta especie exceda a la de *L. cicera*. Los cromosomas 3, 4, 5 y 6 son de longitud muy similar (Tabla 1.2).

### **1.2.3 Caracterización citogenética de las plantas de la generación F4 procedentes del cruzamiento interespecífico entre *L. cicera* y *L. sativus*.**

Para la caracterización citogenética de las plantas de la generación F4 se ha utilizado el resultado de la FISH con las sondas pTa71 y 5S junto con el de la GISH con ADN genómico total de *L. cicera* marcado con biotina y de *L. sativus* marcado con digoxigenina.

En la Tabla 1.3 se presenta el número de las señales de hibridación de las sondas pTa71 y 5S en las 35 plantas F4 analizadas. La FISH y la GISH de las 35 plantas de la

generación F4 revelaron que todas ellas tienen 14 cromosomas y que el genoma predominante es el de *L. sativus*, en todas las plantas analizadas se observó cromatina de *L. cicera*, ya sea como sustituciones cromosómicas o como cromosomas recombinantes. En 27 plantas (77,1 %) se observaron sustituciones cromosómicas de *L. sativus* por *L. cicera*, de las cuales 19 (54,3 %) presentaron además cromosomas recombinantes entre ambos genomas. En solo 8 plantas (22,8 %) se observaron sustituciones cromosómicas de *L. cicera* con el resto del complemento cromosómico perteneciente a *L. sativus*. Se observó el mismo porcentaje de plantas que contenían cromosomas recombinantes y ninguna sustitución cromosómica.

De las 27 plantas en las que se observaron sustituciones cromosómicas de *L. cicera*, 19 (70,3%) fueron de sustitución monosómica, cinco (18,5 %) doble monosómicas y una (3,7 %) triple monosómica. Las dos plantas restantes (7,4 %) presentaron la sustitución disómica para el cromosoma 4 de *L. cicera*. Una de estas plantas era además portadora del cromosoma 5 en monosomía y la segunda doble monosómica para los cromosomas 2 y 5 de *L. cicera* (Tabla 1.3).

Los cromosomas de *L. cicera* observados en las líneas de sustitución fueron los cromosomas 2, 4, 5 y 7. La sustitución cromosómica más frecuente fue la del cromosoma 4 de *L. cicera* que se observó en un 44,5 % de las plantas, seguida de los cromosomas 5 (25,9 %), 2 (18,5 %) y 7 (11,2 %), respectivamente.

La FISH y la GISH de las plantas de la generación F4 reveló que la recombinación cromosómica entre el genoma de *L. cicera* y *L. sativus* implicó a los 14 cromosomas del genoma (Tabla 1.3). De las 27 plantas en las que se observaron cromosomas recombinantes 15 (55,6 %) presentaron únicamente un cromosoma recombinante. Cinco plantas (18,5 %) presentaron dos cromosomas recombinantes, e igual cantidad de plantas presentaron tres cromosomas recombinantes. Una planta (3,7 %) presentó cinco cromosomas recombinantes. En otra planta se observaron siete cromosomas recombinantes, de los cuales los cromosomas 3 y 7 recombinantes estaban en homocigosis (Tabla 1.3).

El cromosoma recombinante que se observó con mayor frecuencia fue el 6, que se observó en el 66,7 %, de las plantas, seguido del 4 que estuvo presente en un 44,3 % de las plantas, en dos plantas en sustitución doble monosómica junto con el cromosoma 6 y

en una planta con sustitución triple monosómica junto con los cromosomas 6 y 3 en otra planta junto con la sustitución disómica del 2 (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Caracterización citogenética de 35 plantas de la generación F4 del cruzamiento entre *L. cicera* y *L. sativus*.

Número de plantas	Número de señales de hibridación		Sustituciones cromosómicas de <i>L. cicera</i> en <i>L. sativus</i>	Cromosomas recombinantes
	pTa71	5S		
1	4	4	(2') <sup>a</sup>	-
1	4	4	(2')	(6L', 2C') <sup>b</sup>
1	4	5	(2', 4')	(5C')
1	4	5	(2', 4')	(1L', 5L', 6L')
1	5	5	(2', 4')	(1L', 3L', 4L', 5L', 7L'')
1	3	6	(2, 4'', 5')	-
1	3	5	(2', 4', 5')	(4L')
1	3	4	(2', 5')	-
2	4	5	(4')	-
3	4	5	(4')	(6L')
2	4	5	(4')	(4L')
1	4	5	(4')	(1L', 2C')
1	4	5	(4')	(2C', 6L')
1	5	5	(4')	(1L', 2C', 6L')
1	3	6	(4''), 5')	(2C')
1	3	5	(4', 5')	(6L')
2	3	4	(5')	-
2	3	5	(5')	(6L', 4C')
1	4	4	(7')	-
1	4	4	(7')	(6L')
1	4	4	(7')	(6L')
4	4	4	-	(6L')
1	4	5	-	(2L'', 4L')
1	4	4	-	(1C', 3C', 5C')
1	4	4	-	(6L', 3L', 4L')
1	4	5	-	(1L', 2L', 2C', 5L', 6L')

a ' indica sustitución monosómica y '' sustitución disómica.

b L indica brazo largo C indica brazo corto del cromosoma correspondiente.

#### 1.2.4 Determinación de los grupos de homeología entre *L. cicera* y *L. sativus*.

Trece plantas (37,1 %) de la generación F4, mostraron cuatro señales de hibridación de la secuencia pTa71 y 5 señales de la secuencia 5S (Tabla 1.3) en cromosomas independientes (Figura 1.2 (a)). El análisis GISH de esas plantas mostró que los cuatro

cromosomas que portan la señal de hibridación de la secuencia pTa71, así como cuatro de los cromosomas que llevan la secuencia 5S, provienen de *L. sativus*. El mismo análisis mostró que el quinto cromosoma con la señal de hibridación de la 5S, corresponde a un cromosoma de *L. cicera* (Figura 1.4 (a) y (b)). Este resultado muestra que dado que en estas plantas están los cuatro cromosomas de *L. sativus* que portan las señales de la secuencia pTa71, entonces el cromosoma de *L. cicera* presente en ellas tiene por homeólogo a un cromosomas que no porta la señal de hibridación de la pTa71. La longitud de los cromosomas de *L. cicera* observada en esta investigación (Tabla 1.2) así como el análisis de correspondencia de los grupos de homeología en las otras plantas de la generación F4, indican que los pares cromosómicos en *L. cicera*, que portan señales de hibridación con la secuencia 5S, son el par 4 y el 6 y que el cromosoma 1 es el que porta la señal de hibridación de la secuencia 5S en el brazo corto junto con la secuencia pTa71 en el brazo largo. Con base en estos resultados se ha cambiado en orden de los cromosomas propuesto en el ideograma de *L. cicera* publicado por (Mohammed-Ali et al., 2000) Esta numeración es la que se ha utilizado en toda esta Tesis para referirse a los cromosomas de *Lathyrus*.



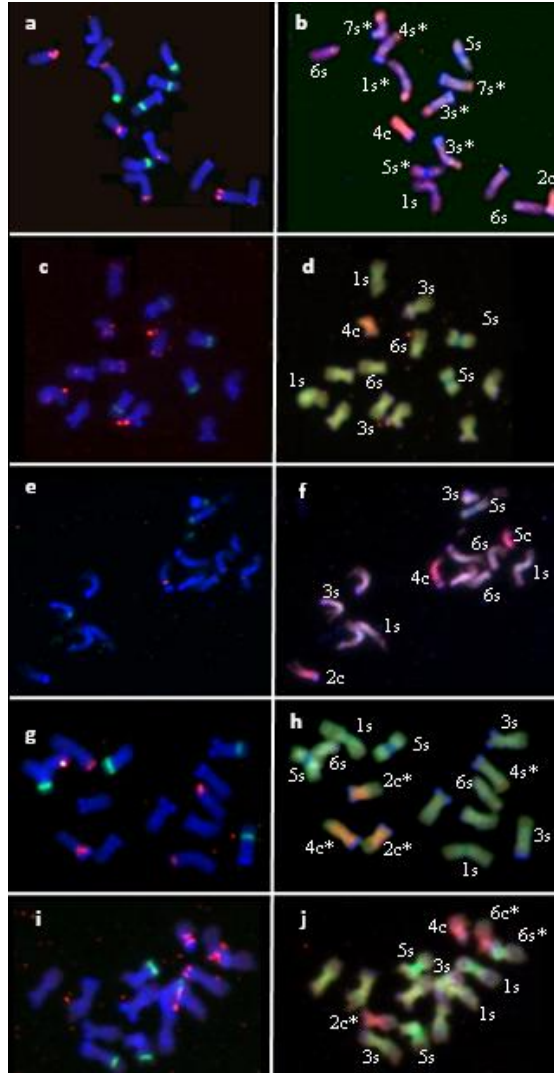


Figura 1.4 FISH de una célula en metafase somática de cinco plantas de generación F4 entre *L. cicera* y *L. sativus* la hibridadas con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (roja) y la GISH con ADN genómico total de *L. cicera* (c, rojo) y *L. sativus* (s, verde); (a y b) sustitución doble monosómica de los cromosomas 2 y 4 y además con los cromosomas 2 y 4 y además con los cromosomas recombinantes 1, 4 y 5 en heterocigosis y los cromosomas recombinantes 7 y 3 en homocigosis; (c y d) sustitución monosómica del cromosoma 4; (e y f) sustitución triple monosómica de los cromosomas 2, 4 y 5; (g y h) cromosoma 2 recombinante en homocigosis y el cromosomas 4 recombinante en heterocigosis; (i y j) cromosomas recombinantes 2, 4 y 6.

### **1.2.5 Caracterización citogenética de las plantas de la generaciones F5 procedentes del cruzamiento interespecífico entre *L. cicera* y *L. sativus*.**

En Tabla 1.4. se presentan los resultados de la FISH y la GISH de las tres familias F5 evaluadas. La familia F5-1 constó de 19 plantas procedentes de una planta portadora de la sustitución monosómica del cromosoma 5 de *L. cicera* por el de *L. sativus* junto con los cromosomas 4 y 6 recombinantes entre ambas especies. 11 plantas (57,8 %) presentaron la sustitución del cromosoma 5, de las cuales 10 (90,9 %) correspondieron a la sustitución monosómica y una a la sustitución disómica (Tabla 1.4.). Quince plantas (78,9 %) presentaron cromosomas recombinantes. El cromosoma 6 recombinante se observó en 14 plantas (73,9 %). En seis de estas plantas (42,9%) el cromosoma 6 recombinante se presentó en heterocigosis y en ocho plantas (57,1 %) en homocigosis. Cuatro plantas (21,1 %) mostraron el cromosoma 4 recombinante en heterocigosis y ninguna en homocigosis (Tabla 1.4.).

La familia F5-2 constó de 11 plantas procedentes de una planta portadora de la sustitución doble monosómica de los cromosomas 4 y 5 de *L. cicera* por los de *L. sativus* junto con los cromosomas 4 y 6 recombinantes. Cuatro plantas (36,4 %) presentaron la sustitución monosómica del cromosoma 4. En ninguna de las plantas se observó la sustitución el cromosoma 5 (Tabla 1.4). Ocho (72,7 %) plantas presentaron el cromosoma 6 recombinante en heterocigosis y a diferencia de la familia F5-1, en esta familia no se obtuvieron plantas con el cromosoma 6 recombinante en homocigosis. Únicamente tres plantas presentaron el cromosoma 4 recombinante en heterocigosis (Tabla 1.4).

La familia F5-3 constó de 12 plantas procedentes de un planta doble monosómica para la sustitución de los cromosomas 2 y 5. En plantas 3 (25 %) se observó la sustitución monosómica del cromosoma 5. Dos plantas (16,7 %) presentaron la sustitución doble monosómica de los cromosomas 2 y 5 (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Características citogenéticas de 42 plantas de tres familias F5 del cruzamiento entre *L. cicera* y *L. sativus*.

Número de plantas	Número de señales pTa71	5S	Sustituciones cromosómicas de <i>L. cicera</i> en <i>L. sativus</i>	Cromosomas recombinantes
<b>Familia F5-1 (planta F4 portadora de la sustitución monosómica del 5 de <i>L. cicera</i> y el 6L' y 4C')</b>				
3	4	4	-	-
1	4	4	-	(6L' <sup>b</sup> )
1	4	5	-	(6L', 4C')
2	4	4	-	(6L'')
1	4	5	-	(6L'', 4C')
1	2	4	(5'' <sup>a</sup> )	(6L')
4	3	4	(5')	(6L'')
1	3	5	(5')	(6L'', 4C')
3	3	5	(5')	(6L')
1	3	5	(5')	(4C')
1	3	5	(5')	-
<b>Familia F5-2 (planta F4 portadora de la sustitución doble monosómica del 5 y 4 de <i>L. cicera</i> y con 6L' y el 4C')</b>				
2	4	5	(4')	-
2	4	5	(4')	(6L')
2	4	4	-	-
3	4	4	-	(6L')
1	4	5	-	(6L', 4C', 4L')
1	4	4	-	(Telo., 4C')
<b>Familia F5-3 (Planta F4 portadora de la sustitución doble monosómica del cromosoma 2 y 5 de <i>L. cicera</i>)</b>				
6	4	4	-	-
3	3	4	(5')	-
1	4	4	(2')	-
2	3	4	(2', 5')	-

a ' indica sustitución monosómica y '' sustitución disómica.

b L indica brazo largo C indica brazo corto del cromosoma correspondiente.

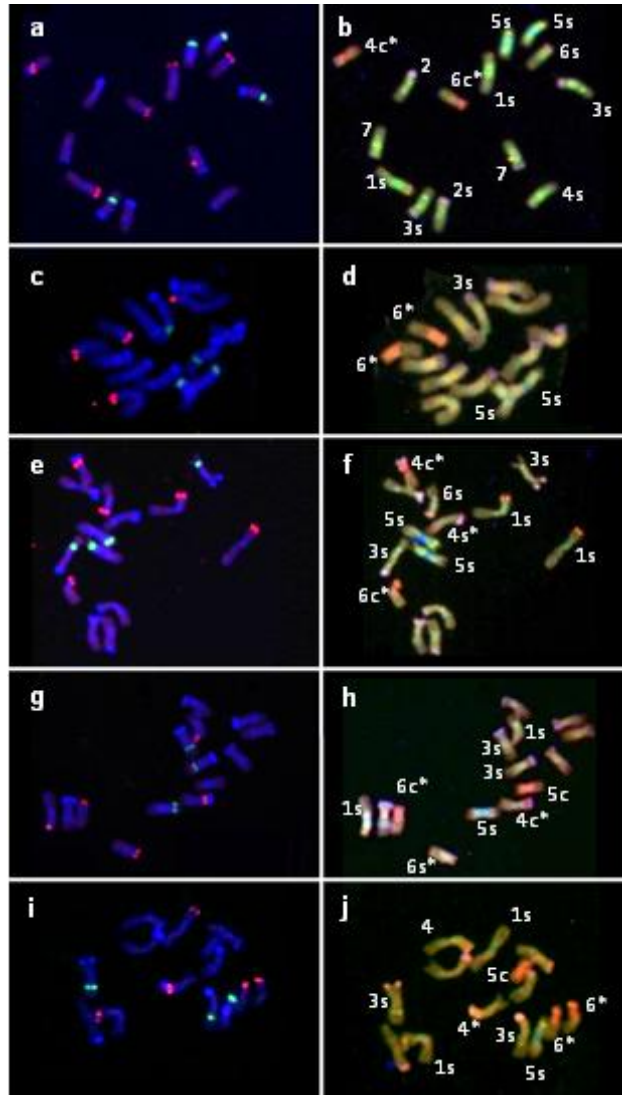


Figura 1.5. FISH de una célula en metafase somática de cinco planta de generación F5 *L. cicera* x *L. sativus* hibridadas con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (roja) y la GISH con ADN genómico total de *L. cicera* (rojo) y *L. sativus* (verde). (a y b) cromosomas 4 y recombinantes en heterocigosis; (c y d) cromosoma 6 recombinante en homocigosis; (e y f) cromosomas 4 con recombinación en el brazo corto y largo y cromosoma 6 recombinante; (g y h) sustitución monosómica del cromosoma 5, además de los cromosomas recombinantes 6 y 4; (i y j) sustitución monosómica del cromosoma 5 además del cromosoma 4 recombinante en heterocigosis y el cromosoma 6 recombinante en homocigosis.

### 1.2.6 Caracterización morfológica de las plantas de la generación F5 procedentes del cruzamiento *L. cicera* x *L. sativus*.

Al igual que las generaciones anteriores, en esta generación se observaron plantas con flores blancas y azules y también blancas con manchas celestes y rosadas pero, a diferencia de las generaciones anteriores, no se observaron plantas con flores color rosa (Figura 1.6).



Figura 1.6. Segregación del color de las flores de las plantas de la generación F5 del cruzamiento entre *L. cicera* y *L. sativus*.

Todas las plantas de la generación F5 mostraron una altura y arquitectura similar a las líneas parentales. Sin embargo, en esta generación se observaron ocho plantas de porte bajo, de entrenudos muy cortos y con las terminaciones de las guías en forma de roseta, lo que les confirió una apariencia achaparrada. Estas plantas de crecimiento determinado (Figura 1.7) completaron el ciclo de crecimiento y produjeron flores, pero ninguna fue fértil.

La constitución cromosómica de estas plantas se muestra en la Tabla 1.5. Todas las plantas de la generación F5 con entrenudos cortos y crecimiento determinado tiene en común la presencia en condición disómica del cromosoma 6 de *L. cicera* con una región recombinante en el brazo largo. Este resultado sugiere una asociación entre la presencia del cromosoma 6 recombinante en disomía y dicho fenotipo.

Tabla 1.5. Caracterización citogenética de ocho plantas de la generación F5 con crecimiento determinado y entrenudos cortos.

Número de plantas	Sustitución cromosómica	Cromosomas recombinantes
2	-	6L''
1	-	6L'', 4C'
4	5	6L''
1	5	6L'', 4C'



Figura 1.7. Plantas de la generación F5 del cruzamiento *L. cicera* x *L. sativus*. La planta de la izquierda presenta un par de cromosomas 6 recombinante; sin dicho cromosoma.

El color, el tamaño y la forma de las semillas variaron entre las plantas de la generación F5. Algunas de ellas produjeron semillas semejantes a las de *L. cicera*, pero de color más oscuro y con manchas negras. Otras plantas produjeron semillas de color verde crema y bordes redondeados semejantes a los de *L. sativus* (Figura 1.8).

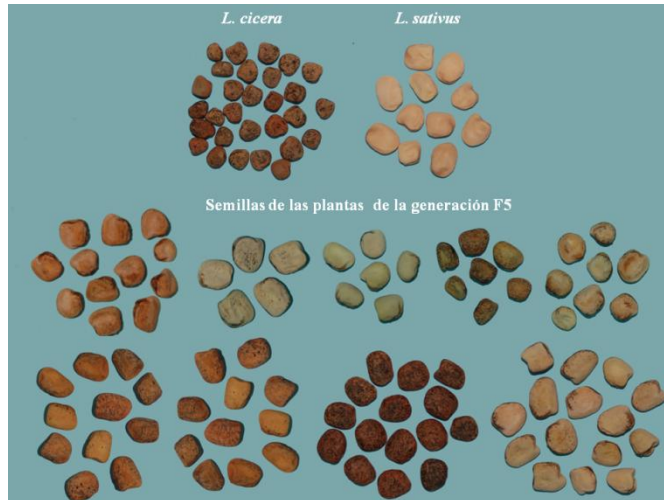


Figura 1.8. Semillas de *L. cicera* y *L. sativus* y segregación del color, tamaño y forma las semillas de plantas de la generación F5 procedentes del cruzamiento *L. cicera* x *L. sativus*.

### 1.3 Discusión

El cruzamiento *L. cicera* x *L. sativus* ha sido realizado varias veces (Addis y Narayan, 2000; Yunus y Jackson, 1991) pero esta es la primera vez que se obtiene descendencia con un grado adecuado de fertilidad como para permitir la obtención de líneas avanzadas con fines de mejora y para el estudio de la citogenética de *L. cicera* y *L. sativus*.

Precisamente, la determinación de los pares de homeología entre estas dos especies ha sido posible gracias a que se dispone de plantas híbridas para estudiar las relaciones los grupos de homeología. Los grupos de homeología propuestos en esta investigación fueron corroborados con éxito en las plantas de la generación F5

La relación entre la longitud del brazo largo y el brazo corto (L/C) de los cromosomas de ambas líneas de *Lathyrus* muestra que la línea L-138 *L. cicera* posee cuatro cromosomas metacéntricos y tres submetacéntricos (4m+3sm) y que la línea L-180 de *L. sativus* presenta un cromosoma metacéntrico y tres submetacéntricos (1m+3sm). La diferencia en la fórmula del cariotipo entre especies del género *Lathyrus* ha sido

reportada previamente en especies colectadas en Brasil por Klamt y Schifino-Wittmann (2000), y por Arzani (2006) en especies colectadas en Irán.

La longitud de los cromosomas de las dos líneas de *Lathyrus*, se encuentra entre los rangos reportados por Mohammed-Ali et al. (2000). La longitud total del cariotipo de la línea L-180 de *L. sativus* fue de 56,01  $\mu\text{m}$ , mayor que la longitud del cariotipo de L-138 de *L. cicera* que fue de 47,87  $\mu\text{m}$ . Estos valores están entre los rangos reportados previamente por Mohammed-Ali et al. (2000) y Nandini et al. (1997).

La GISH de las plantas de las generaciones F4 permitió distinguir la cromatina de *L. cicera* en el fondo genético de *L. sativus* y analizar el nivel de reorganización de los genomas paternos en las plantas de esta generación. Los resultados obtenidos en esta investigación muestran el reacomodo que ha sufrido el genoma de las plantas híbridas en tan solo tres ciclos de autopolinización y que ha resultado en una notoria eliminación del genoma de *L. cicera* con el consiguiente aumento del genoma de *L. sativus*. La eliminación de uno de los genomas paternos en las progenies procedentes de cruzamientos interespecíficos, ha sido observada en otros géneros. Por ejemplo en *Hordeum*, Zhang et al. (1999) encontraron que en el cruzamiento entre *H. bulbosum* x *H. vulgare*, el número de cromosomas de *H. bulbosum* disminuía a favor de los cromosomas de *H. vulgare*. En este mismo sentido, Zwierzykowski et al. (2006) observaron la eliminación de los cromosomas de *Festuca* y el aumento del número de cromosomas de *Lolium* en las seis generaciones siguientes del cruzamiento entre estos dos géneros. Los mecanismos que impulsan la eliminación de uno de los genomas en la progenie de un cruzamiento interespecífico no han sido establecidos con certeza; se puede atribuir a la dominancia de un genoma sobre el otro. Zwierzykowski et al. (2006) citan como posibles causas la competencia entre gametos, así como la supervivencia y mayor vigor de las plantas con determinados arreglos cromosómicos.

El análisis GISH de genomas resultantes de cruzamientos interespecíficos, han mostrado que en los cromosomas recombinantes se observan regiones de color marrón lo cual indica que en esas áreas cromosómicas hay segmentos cortos de ADN intercalados de ambas líneas parentales y que al estar muy próximas, aparecen en la imagen como la mezcla del color rojo de la sonda de ADN genómico total (Contreras et al., 2012; Pita et al., 2003; Pita et al., 2008; Pita et al., 2009). En el presente trabajo el análisis GISH de las plantas de las generaciones F4 y F5 procedentes del cruzamiento entre *L. cicera* y *L. sativus*, mostró una región cromosómica de color



marrón, en el brazo largo del cromosoma 6 recombinante que podría ser indicativo de que en esa parte del cromosoma ha ocurrido recombinación entre ambos genomas, o bien, podría indicar la existencia de una región cromosómica conservada entre ambas especies por lo que las sondas de ADN genómico total cohibridarían en ella (Akiyama et al., 2010).

Esta segunda hipótesis fue descartada en este trabajo dado que el análisis GISH de las preparaciones cromosómicas de ambas especies con ADN genómico total de *L. cicera* y *L. sativus* marcado con biotina y digoxigenina respectivamente, mostró que los cromosomas de *L. cicera* emiten fluorescencia en el canal rojo y los de *L. sativus* en el canal verde sin que en ninguno de ellos se observen regiones cromosómicas de distinta coloración. Este resultado significaría que estas dos especies no comparten secuencias de ADN detectables por GISH y por ende, que las regiones de color marrón en el cromosoma 6 recombinante, corresponderían al resultado de la recombinación entre ambos cromosomas homeólogos como

El cromosoma de *L. cicera* que se ha observado con mayor frecuencia en las plantas de la generación F4, ha sido el cromosoma 4, que estuvo presente en el 48,6 % de las plantas de esta generación. El cromosoma 6 recombinante se presentó en el 51 % de las plantas de la generación F4 y en el 66 % de las plantas de la generación F5. Este resultado indica que estos cromosomas son los que se transmiten con más frecuencia del complemento.

La obtención de líneas de sustitución disómica en las generaciones F4 F5 ha sido, en general infructuosa. Solo se ha obtenido una línea de sustitución disómica para el cromosoma 5 en la generación F5 y esta planta fue estéril. Esto se podría deber a que la carga genética asociada a las sustituciones cromosómicas disómicas podrían provocar trastornos en la fisiología y reproducción de las plantas, que no permiten su desarrollo normal y reproducción. Sin embargo, es posible que en generaciones siguientes, tras otro ciclo de autopolinización de las plantas con sustituciones monosómicas, sea posible obtener plantas que porten la sustitución disómica y que produzcan semillas viables.

La baja cantidad de semillas colectadas en las plantas de las generaciones F4 y F5 contrasta con la alta cantidad de flores observadas durante el periodo de floración. Murray y Hammett (1989) obtuvieron resultados similares en el cruzamiento entre *L. chloranthus* y *L. chrysanthus* y la atribuyeron al comportamiento irregular de los

cromosomas durante la meiosis, lo que reduciría la viabilidad del polen en las plantas híbridas. La eliminación de cigotos con determinadas combinaciones cromosómicas (Ishii et al., 2010; Martino et al., 2000) así como factores genéticos (Castro et al., 2011), pueden ser también las causas de la baja producción de semillas, especialmente en los cruzamientos interespecíficos

El color de las flores de las plantas de las líneas L-138 de *L. cicera* y la L-180 de *L. sativus* es una buena característica para diferenciar con facilidad las plantas de ambos géneros, pues las flores de L-138 son de color rosado y las de L-180 son de color blanco. Las plantas de las progenies procedentes del cruzamiento de estas dos líneas, produjeron flores blancas, azules y blancas con manchas celestes y rosadas en el estandarte y la quilla. Estas variaciones en la coloración de las flores de las progenies híbridas pueden tener su origen en la interacción entre los genes que controlan la síntesis de varios pigmentos antocianicos responsables de la coloración de las flores en algunas leguminosas como ocurre en el guisante (Rat'kin y Tarasov, 2010).

Las ocho plantas de la generación F5 que presentaron el cromosoma 6 recombinante en homocigosis, mostraron crecimiento determinado y produjeron flores, sin embargo todas ellas fueron estériles. Aunque el número de plantas fue reducido, los resultados indican que podría haber una asociación entre la presencia del cromosoma 6 recombinante en homocigosis y el crecimiento anormal de las plantas.



## **Capítulo 2.**

**Estudio de la citometría de flujo como herramienta para la identificación de líneas de sustitución cromosómica de *Lathyrus cicera* en *L. sativus*.**



## 2.1 Introducción

La hibridación interespecífica es un método de mejora que permite incorporar variabilidad genética de una especie en otra relacionada a través del cruzamiento. La introgresión de material genético incorporado de la especie donadora a la especie receptora ha de ser cuidadosamente controlada y para ello, en los programas de hibridación interespecífica es importante disponer de herramientas que permitan la identificación de los cromosomas o fragmentos introgresados. Durante los últimos años, los marcadores moleculares han proporcionado una poderosa herramienta para el desarrollo de mapas genéticos en numerosas especies cultivadas. Estos mapas están saturándose rápidamente gracias a la incorporación de nuevos tipos de marcadores, a la unión de mapas de diferentes poblaciones y al mapeo comparativo de marcadores entre genomas relacionados. Particularmente, los marcadores de ADN basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*Polymerasa Chain Reaction*) proporcionan un método muy eficaz de seguimiento de las introgresiones y evaluación de los fragmentos recombinantes pero para ello un requisito imprescindible es la disponibilidad de marcadores polimórficos entre ambas especies, la especie donadora y la receptora.

Aunque se ha realizado mucho esfuerzo en desarrollar marcadores basados en la PCR que sean útiles a través de un grupo de especies relacionadas, sin embargo, la mayor parte de estos recursos moleculares se han desarrollado en la especie cultivada pero no están disponibles en la silvestre relacionada. En el caso de *Lathyrus* el desarrollo de marcadores moleculares basados en la PCR y la construcción de mapas genéticos está aún en una etapa muy temprana. En *L. sativus* se han desarrollado marcadores moleculares y se ha construido un mapa genético preliminar basado en marcadores de ADN (Skiba et al., 2003; Skiba et al., 2004a; Skiba et al., 2005; Sun et al., 2012). Sin embargo, no se dispone hasta la fecha de marcadores polimórficos entre *L. sativus* y *L. cicera* que permitan discriminar inequívocamente entre el genoma de ambas especies y por lo tanto que sean de utilidad para la detección de introgresiones intergenómicas de *L. cicera* en *L. sativus*.

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH/GISH) constituye una herramienta muy poderosa para identificar dichas introgresiones así como hacer un seguimiento de los cromosomas o fragmentos introgresados a través de los ciclos de selección. Particularmente la GISH con sondas de ADN genómico en preparaciones cromosómicas

somáticas, ha sido utilizada con éxito en programas de hibridación interespecífica en un elevado grupo de especies vegetales para la detección e identificación de cromosomas completos en líneas de adición y sustitución (Uhrin et al., 2012; Vu et al., 2012; Zhao et al., 2010; Zhuang et al., 2011; Zwierzykowski et al., 2006) traslocaciones intergenómicas (Armstead et al., 2001; Cseh et al., 2009; Fu et al., 2012; Said et al., 2012; Wei et al., 2003; Zhou et al., 2012; Zwierzykowski et al., 2006) o detección de introgresiones de pequeño tamaño o bajo número de copias (Zoller et al., 2001). Sin embargo, aunque este método es eficaz para la identificación inequívoca de cromosomas o fragmentos introgresados, puede resultar un método poco eficiente cuando se trata de evaluar un gran número de plantas, como es el caso de los que normalmente se manejan en un programa de hibridación interespecífica.

La citometría de flujo es un método que permite estimar la cantidad de ADN de una determinada especie (Doležel y Bartos, 2005; Doležel y Greilhuber, 2010). El método se ha utilizado también con éxito para aislar cromosomas o fragmentos cromosómicos con base en las diferencias en intensidad de fluorescencia principalmente asociadas a variaciones en el tamaño de los cromosomas (Doležel et al., 2012; Kubaláková et al., 2005; Zatloukalová et al., 2011). Esta variación del método tiene su origen en que cada cromosoma previamente marcado con un fluorocromo determinado, al pasar por un haz luminoso, emite luz cuya intensidad es proporcional a la cantidad de fluorocromo lo que a su vez está en relación directa con el tamaño y cantidad de ADN de cada uno de ellos. De esta manera, los cromosomas pueden separarse en función de la intensidad de fluorescencia detectada por el citómetro (Doležel y Bartos, 2005; Doležel et al., 2012).

La estimación de la cantidad de ADN mediante citometría ha permitido que este método sea también de utilidad para estimar diferencias en niveles de ploidía entre distintas especies relacionadas (Mohammed-Ali et al., 2000; Moreno et al., 2008; Ochatt et al., 2013). También se ha utilizado con éxito en la evaluación de las variaciones en los niveles de ploidía en la descendencia procedente de cruzamientos entre especies o líneas dentro de una especie que difieren en su contenido de ADN (Lysak et al., 1999; Ochatt et al., 2004; Zonneveld y Pollock, 2012).

En este trabajo se ha evaluado la posibilidad de utilizar la citometría de flujo como una herramienta para identificar plantas que contengan introgresiones de *L. cicera* en *L. sativus* como método de acelerar la selección de los genotipos de interés en un programa de hibridación interespecífica.

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Material vegetal**

Se ha utilizado la descendencia obtenida por autofecundación de una línea de *L. sativus* portadora de una sustitución monosómica del cromosoma 5 de *L. cicera* por el homeólogo de *L. sativus*. Esta línea, doble monosómica para los cromosomas 5 de *L. sativus* y *L. cicera*, se obtuvo en la generación F4 obtenida a partir del cruzamiento interespecífico *L. cicera* x *L. sativus*. Todo el material se sembró en macetas en un invernadero en el campus de Rabanales de la Universidad de Córdoba.

### **2.2.2 Preparaciones cromosómicas**

Las semillas se pusieron a germinar en oscuridad a 25° C. Una vez que la raíz creció aproximadamente a 1 cm de longitud, se cortó la sección distal, la que se trató con una solución acuosa de colchicina (0,05%) a 25° C durante tres horas. Posteriormente, los ápices radiculares se fijaron en una solución de tres partes de etanol absoluto con una parte de ácido acético glacial (v/v) y se almacenaron a 4° C hasta su uso. Se cortaron secciones muy finas de los ápices radiculares y se prensaron entre un porta objetos y el cubre objetos en una gota de ácido acético al 45%. Las preparaciones cromosómicas se estudiaron en un microscopio de contraste de fase e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido seguido de la eliminación del cubre objetos. Las mejores preparaciones cromosómicas se almacenaron a 20° C para su uso posterior.

### **2.2.3 Hibridación in situ fluorescente (FISH)**

La hibridación *in situ* fluorescente se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Cabrera et al. (2002). Las sondas de ADNr que se utilizaron en los experimentos de FISH fueron la pTa71 que consiste en la unidad 18S-5,8S-26S de ADNr (8,9 kb) de *Triticum aestivum* (Gerlach y Bedbrook, 1979) y la sonda para la subunidad 5S de ADNr (Lee et al., 1999).

Las sondas pTa71 y la 5S se marcaron con digoxigenina-11-dUTP y biotina -16-dUTP (Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Alemania) respectivamente. La sonda pTa71 se marcó mediante *Nick translation* y la 5S mediante la reacción en cadena de la



polimerasa (PCR) (Lee et al., 1999). Ambas sondas se mezclaron en la solución de hibridación a una concentración final de 2 ng/μl cada una.

Para la hibridación *in situ* con ADN genómico total (GISH) el ADN de las líneas parentales se extrajo a partir de hojas jóvenes mediante la técnica descrita por Murray y Thompson (1980) y posteriormente se marcó mediante *Nick translation* con digoxigenina-11-dUTP o con biotina-16-dUTP (Boehringer Mannheim D-68305 Mannheim, Alemania). Las sondas de ADN de las líneas parentales se mezclaron en partes iguales en solución de hibridación a una concentración de 10 ng/μl cada una.

Las sondas de ADN que se marcaron con biotina-16-dUTP se detectaron con Streptavidina-Cy3 (Sigma) (50 ng/ml) y las sondas marcadas con digoxigenina-11-dUTP se detectaron con anti-digo-FITC (Isotiocianato de fluoresceína, Boehringer Mannheim) (10ng/ml).

Las preparaciones cromosómicas se hibridaron en primer lugar con las sondas de ADN<sub>r</sub> y se observaron al microscopio de fluorescencia. Las mismas preparaciones se lavaron para eliminar las sondas y se hibridaron de nuevo con ADN genómico total. En ambos casos los cromosomas se tiñeron con DAPI (40, 6-diamidino-2-phenylindole) y las preparaciones se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, 94010, USA). Las imágenes se capturaron separadamente para el canal de longitud de onda correspondiente a cada fluorocromo. Para ello se utilizó un sistema de cámara CCD (Photometrics) acoplada a un microscopio de fluorescencia Leica DMR equipado con los filtros de luz adecuados para los fluorocromos utilizados. Las fotografías se mezclaron con el programa SPOT 2.1 (Diagnostics Instruments, Inc., Burroughs, Sterling Heights, Michigan, USA) para producir una imagen multicanal (RGB).

#### **2.2.4 Análisis de las imágenes**

La intensidad integrada sin procesar (RawInDent, RID) definida como la intensidad promedio de la fluorescencia en el canal de interés multiplicada por el área analizada (Ferreira y Rasband, 2012) se utilizó para estimar la diferencia en intensidad de la fluorescencia entre el cromosoma 5 de *L. cicera* y su homeólogo de *L. sativus*. La RID se midió con la rutina `analyze> measure` del programa ImageJ (Ferreira y Rasband, 2012). La RID permite calcular las relaciones de área e intensidad de fluorescencia

entre diferentes cromosomas en relación al complemento cromosómico completo (Akiyama et al., 2010).

### **2.2.5 Citometría de flujo**

Se han realizado suspensiones celulares de las especies *L. cicera* (L-138), *L. sativus* (L-180) así como de la descendencia obtenida por autofecundación de una planta F5 doble monosómica para los cromosomas 5 de *L. cicera* y *L. sativus* obtenida del cruzamiento interespecífico *L. cicera* x *L. sativus*. Las suspensiones celulares se obtuvieron a partir de hojas jóvenes cortadas finamente en una placa de Petri con 0,4 ml de solución tampón (Partec kit 05-5002) siguiendo el protocolo de Moreno et al. (2008). La intensidad relativa de fluorescencia (IRF) se midió en un citómetro Partec GmbH, PA-I (Münster, Germany). El citómetro se programó para obtener la información del histograma en la escala lineal con el programa proporcionado con el citómetro. Como testigo interno se utilizó una línea diploide de espárrago (*Asparagus officinalis*,  $2n=2x=20$ ). Con la IRF las muestras que se han analizado y el IFR del testigo interno. Se calculó el índice de ADN (IADN) definido como la relación entre el IRF de la muestra/IRF testigo interno (Pfosser et al., 1995; Roux et al., 2003).

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Caracterización citogenética de las plantas de la generación F5.**

Se han analizado mediante FISH/GISH 17 plantas F5 procedentes de la autofecundación de una línea de *L. sativus* portadora de una sustitución monosómica del cromosoma 5 de *L. cicera* por el homeólogo de *L. sativus*. La segregación obtenida fue de nueve plantas de sustitución monosómica portadoras del cromosoma 5 de *L. cicera* y ocho euploides, portadoras del par 5 de *L. sativus*. Desafortunadamente no se obtuvo ninguna planta disómica para la sustitución disómica. En la Figura 1 se muestra el análisis FISH/GISH en metafase somática de una planta portadora de la sustitución monosómica del cromosoma 5 de *L. cicera* por el de *L. sativus*.

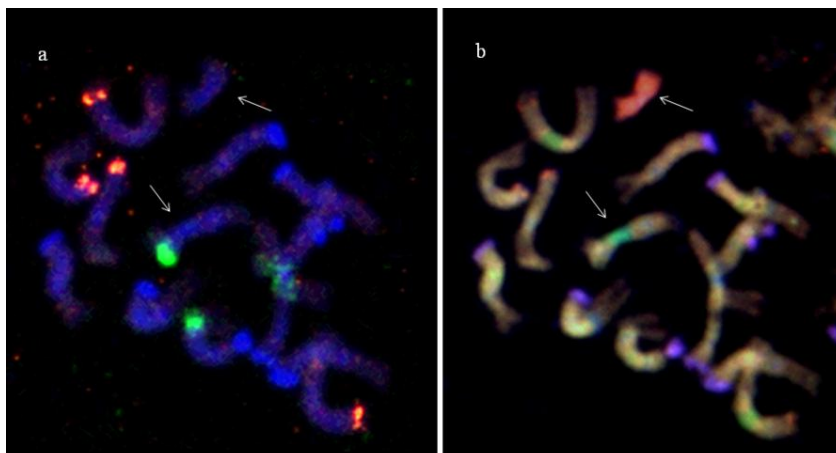


Figura 2.1. (a) FISH en metafase somática con las sondas de ADNr pTa71 (verde) y 5S (roja) de una planta F5 con la sustitución monosómica del cromosoma 5 de *L. cicera* por el de *L. sativus* (a) y de una planta F5 euploide portadora del par 5 de *L. sativus*; en (b) la misma metafase hibridada con ADN genómico total de *L. cicera* (rojo) y *L. sativus* (verde). Los cromosomas 5 de ambas especies se indican con flechas.

### 2.3.2 Análisis de citometría

En la Tabla 1 se muestran los valores medios de intensidad relativa de fluorescencia (IRF) obtenidos mediante citometría en las especies parentales *L. cicera* y *L. sativus*, así como los obtenidos para las plantas monosómicas para el cromosoma 5 de *L. cicera* y las plantas euploides. El valor medio más alto obtenido correspondió a *L. sativus* y el más bajo a *L. cicera*, siendo ambos valores estadísticamente diferentes (Tabla 2.1). El valor medio de IRF de las plantas euploides (sin ningún cromosoma de *L. cicera*) no fue significativamente diferente al obtenido para *L. sativus*. Sin embargo, las plantas monosómicas mostraron un valor medio de IRF significativamente inferior al de las plantas hermanas euploides.

Tabla 2.1. Intensidad relativa de fluorescencia (IRF) de las especies *L. cicera* y *L. sativus*, de las plantas de sustitución monosómica del cromosoma 5 y de las plantas euploides.

Material vegetal	Número de plantas	IRF
<i>L. sativus</i>	4	106,02 a <sup>1</sup>
Plantas euploides	8	104,77 a
Plantas de sustitución monosómica	9	102,97 b
<i>L. cicera</i>	4	88,27 c

<sup>1</sup> valores seguidos de letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSD P<0,05).

En la Figura 2.2 se presenta un ejemplo de los diagramas obtenidos del análisis de citometría de las plantas de la generación F5 de sustitución monosómica, de las plantas F5 euploides y de los parentales *L. cicera* y *L. sativus* (Figura 2.2).

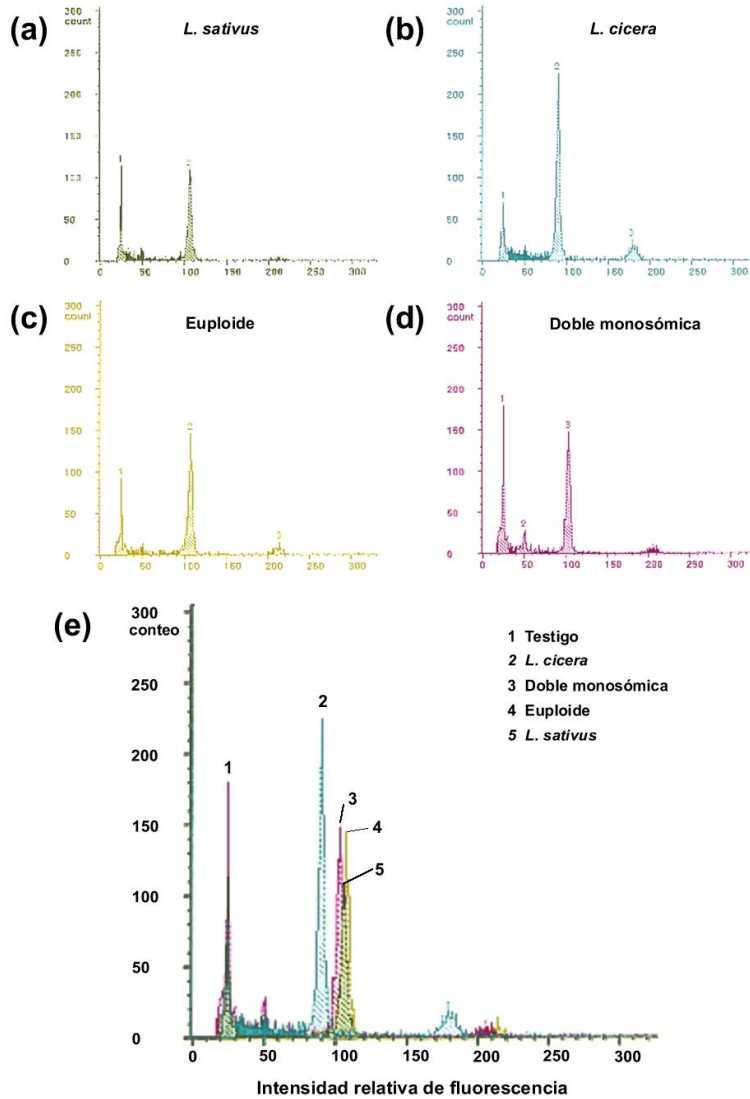


Figura 2.2. Diagramas obtenidos mediante citometría en los que se representa la intensidad relativa de fluorescencia de (a) *L. sativus*, (b) *L. cicera* (c) línea F5 euploide, (d) línea de sustitución monosómica del cromosoma 5 de *L. cicera* y (e) superposición de los diagramas anteriores.

En Figura 2.3 se muestran los valores de RawIndDent (RID) del cromosomas 5 de *L. cicera* (rojo) y de su homeólogo de *L. sativus* medidos en las plantas en que ambos cromosomas se encuentran en monosomía. El valor medio de RID obtenido para el cromosoma 5 de *L. sativus* fue 24.751 mientras que el valor medio de RID para el cromosoma 5 de *L. cicera* fue de 16.199. En todos los casos el valor de la RID fue mayor para el cromosoma 5 de *L. sativus*. La diferencia porcentual promedio entre la RID de ambos cromosomas fue de 41,8 %.

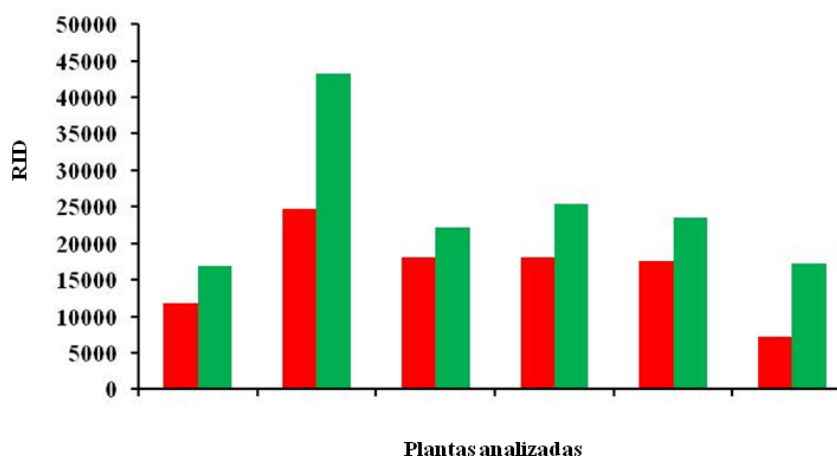


Figura 2.3. Histograma de la RawIndDent (RID) de los cromosomas 5 de *L. cicera* (rojo) y *L. sativus* (verde) medida en seis plantas doble monosómicas para los cromosomas 5 de *L. sativus* y *L. cicera*.

El análisis de la dispersión de los valores del índice de ADN (IADN), calculado como la relación entre IRF de la planta y el IRF del patrón de las 17 plantas de la generación F5 y de las plantas de cada uno de los progenitores, mostró un patrón de dispersión diferencial con los valores de IADN de *L. cicera* en la parte inferior del gráfico, los de *L. sativus* en la parte superior y los de las plantas de la generación F5 intermedios entre ambas especies progenitoras si bien separados en dos grupos, situándose los valores correspondientes a las plantas monosómicas en la parte inferior de este grupo (Figura 2.4).

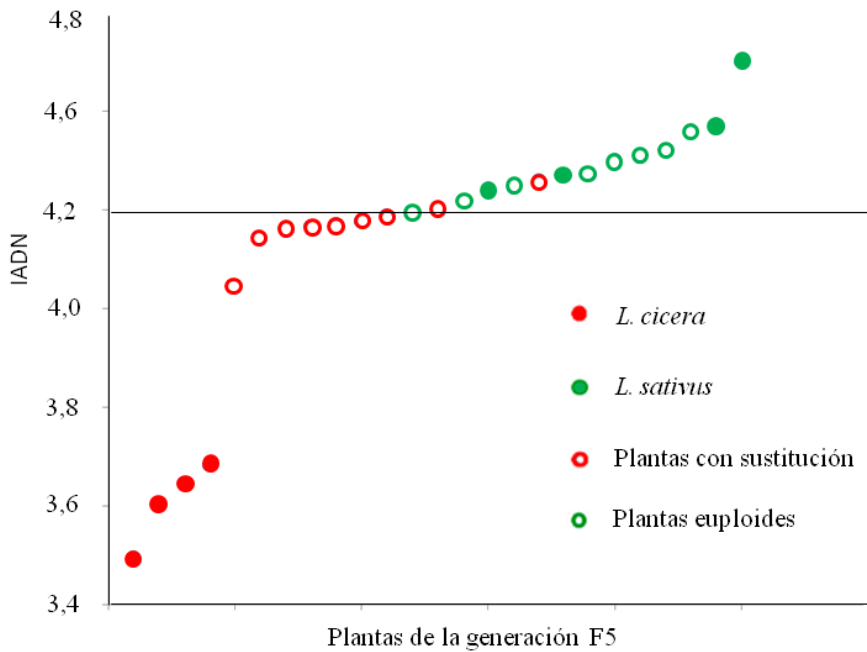


Figura 2.4. Diagrama de dispersión del índice de ADN (IADN) de *L. cicera*, *L. sativus*, plantas F5 monosómicas para la sustitución del cromosoma 5 de *L. cicera* y plantas hermanas F5 euploides.

## 2.4 Discusión

La intensidad relativa de fluorescencia (IRF) entre los genomas de *L. cicera* y *L. sativus* fue mayor para *L. sativus* que para *L. cicera* con una diferencia entre ambos del 18,3 %. El contenido de ADN calculado a partir de la citometría de flujo se relaciona directamente con la IRF (Doležel et al., 2012) por lo que la relación observada entre las IRF de estas dos especies estaría en concordancia con el mayor contenido de ADN del genoma de *L. sativus* en relación a *L. cicera*. Mohammed-Ali et al. (2000) estimaron el contenido de ADN de *L. cicera* en 10,6 pg/2C y de 13,37 pg/2C para *L. sativus*. La diferencia porcentual en la IRF entre estas dos especies fue del 18,3 %, lo que concuerda con los de esos autores.

La diferencia observada en la IRF entre las plantas monosómicas para el cromosoma 5 de *L. cicera* y las plantas hermanas euploides pueden atribuirse a los valores de la IRF

que aporta el cromosomas 5 de *L. cicera* y el de *L. sativus* al IRF de cada planta. Dado que no es posible medir la IRF de estos cromosomas por separado y considerando que la RawInDent (RID) mide tanto la intensidad de la fluorescencia como el tamaño relativo del cromosoma (Ferreira y Rasband, 2012), dos variables fundamentales en la citometría (Doležel et al., 2012), se ha utilizado la RID una medida indirecta para comprobar si existe diferencia en la IRF de ambos cromosomas. En este caso, la diferencia en la RID obtenida para los cromosomas 5 de *L. cicera* y *L. sativus* fue del orden del 10,7 % con valores más elevados para el cromosoma 5 de *L. sativus*. El establecimiento de diferencias en los valores de RID entre ambos cromosomas homeólogos concuerda con el mayor tamaño medio del cromosoma 5 de *L. sativus* con respecto al de *L. cicera* (Mohammed-Ali et al., 2000) e indica que si es posible que existan diferencias importantes en la IRF de ambos cromosomas y que por ende, la diferencia mostrada por el análisis de citometría entre las plantas monosómicas para la sustitución del cromosoma 5 y las plantas euploides hermanas sea real.

El análisis del gráfico de la dispersión de las medias de IADN (IAD=IRF de la muestra/IRF del patrón) permitió separar las plantas monosómicas para el cromosoma 5 de las planas hermanas euploides. Tomando el valor de 4,2 como el valor límite de I ADN para la selección de plantas que contengan el cromosoma 5 de *L. cicera* se reduce el número de plantas a analizar por FISH al 47 % de la muestra inicial. Aunque la selección por este método pueda ocasionar la pérdida de un pequeño porcentaje de plantas con el genotipo deseado, sin embargo la reducción considerable de tiempo que supone la aplicación de esta técnica permite acelerar el programa de selección y por tanto la eficiencia del programa de mejora. Este resultado es especialmente importante teniendo en cuenta que en cada ciclo de autofecundación se espera un alto porcentaje de plantas sin la constitución cromosómica deseada y cuyo análisis mediante GISH ralentiza el proceso de selección. Es decir, el análisis de citometría permitiría seleccionar plantas potencialmente portadoras de los genotipos deseados reduciendo considerablemente el número de plantas a evaluar por GISH y por tanto la eficiencia del programa.

Desafortunadamente, no se han obtenido plantas con la sustitución disómica del cromosoma 5 de *L. cicera* en *L. sativus* en la población de plantas estudiadas. Esto se podría deber al reducido tamaño de población evaluada. No obstante, en futuros trabajos encaminados a la obtención de las líneas de sustitución disómica, además de aumentar

el número de plantas a evaluar, será importante determinar si existe alguna barrera esporofítica o gametofítica que limite la transmisión de este cromosoma de *L. cicera* y por tanto su fijación en el fondo genético de *L. sativus*. También habrá de tenerse en cuenta el hecho que supone la carga de ligamiento. La introgresión de un cromosoma completo de una especie en otra es más severa en especies diploides debido a que sus genomas son más sensibles al desequilibrio genético comparados con los genomas de especies poliploides.

En especies poliploides como es el caso del trigo harinero, la citometría se ha utilizado con éxito para detectar la presencia de un cromosoma de centeno en el fondo genético de trigo (Bashir et al., 1993; Pfosser et al., 1995) o bien la presencia de segmentos cromosómicos de centeno en trigo (Wetzel y Rayburn, 2000). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la citometría de flujo puede ser utilizada para diferenciar entre plantas de *L. sativus* con introgresiones de *L. cicera* y pone de manifiesto que puede ser posible utilizar la citometría como método de evaluación de plantas aneuploides que incorporen material genético procedente de especies diploides.

La obtención de líneas de sustitución de *L. cicera* en *L. sativus* permitiría establecer relaciones de homoeología entre los genomas de ambas especies mediante el análisis de la capacidad de sustitución cromosómica, sobre todo teniendo en cuenta que hasta la fecha no se dispone de marcadores polimórficos entre ambas especies. Además, la obtención de estas líneas, junto con los marcadores de ADN disponibles para *L. sativus* (Skiba et al., 2003; Skiba et al., 2004a; Skiba et al., 2005; Sun et al., 2012) constituye el primer paso para la construcción de mapas físicos como ha sido realizado en otros cultivos (Cabrera et al., 2002; Humphreys et al., 1998; Sadler y Weber, 2002; Said y Cabrera, 2009; Said et al., 2012) y estudiar el efecto de la sustitución de un determinado cromosomas sobre el fenotipo.





## **Capítulo 3.**

**Obtención y caracterización citogenética de líneas de introgresión en *Pisum*.**



### 3.1 Introducción: Importancia económica del cultivo de guisante

El guisante (*Pisum sativum*) es la tercera leguminosa en área cultivada en el mundo, superada por los frijoles y la soja (FAO, 2013). En cuanto al comportamiento de los rendimientos de estos cultivos, es notorio que los guisantes han excedido históricamente al de todas las otras leguminosas de grano. No obstante, mientras que el rendimiento de cultivos como la lenteja, el garbanzo y los frijoles se ha incrementado de forma más o menos constante, el de los guisantes ha mostrado una marcada tendencia a la baja desde mediados de los años 90 a la actualidad (Figura 3.1). El comportamiento en el rendimiento global del guisante se contrapone en el caso de España, en donde este ha aumentado durante los últimos 10 años (FAO, 2013).

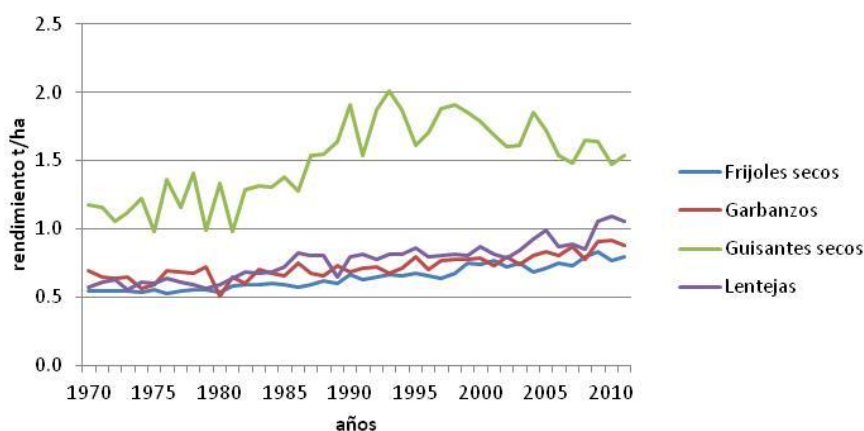


Figura 3.1. Fluctuación en el rendimiento promedio en toneladas por hectárea de las principales leguminosas de grano en el mundo. (FAO, 2013).

El área cultivada con guisante en el mundo experimentó una marcada reducción a inicios de los años 90 y en lo que va de este siglo, se ha situado ligeramente por encima de los seis millones de hectáreas, con Canadá en primer lugar seguido por la República Popular China y los Estados Unidos de Norte América (FAO, 2013). La tendencia de los rendimientos globales ha sido a la baja por lo que la producción total también ha seguido el mismo patrón (Figura 3.2).

En el mundo se dedicaron al cultivo del guisante 6.214. 270 hectáreas en 2011, con un rendimiento promedio de 1.532 kg/ha (FAO, 2013). En España, según la misma fuente,

en ese mismo año, se cultivaron 200.000 hectáreas de guisante con rendimiento por debajo de media mundial, situándose en los 970 kg/ha (FAO, 2013). En Andalucía, según datos de la Conserjería de Pesca y Medio Ambiente (Junta de Andalucía, 2013) la superficie bajo cultivo de especies leguminosas en el 2010 fue de 50.101 ha, de las cuales el 18,91 % correspondió a guisantes secos.

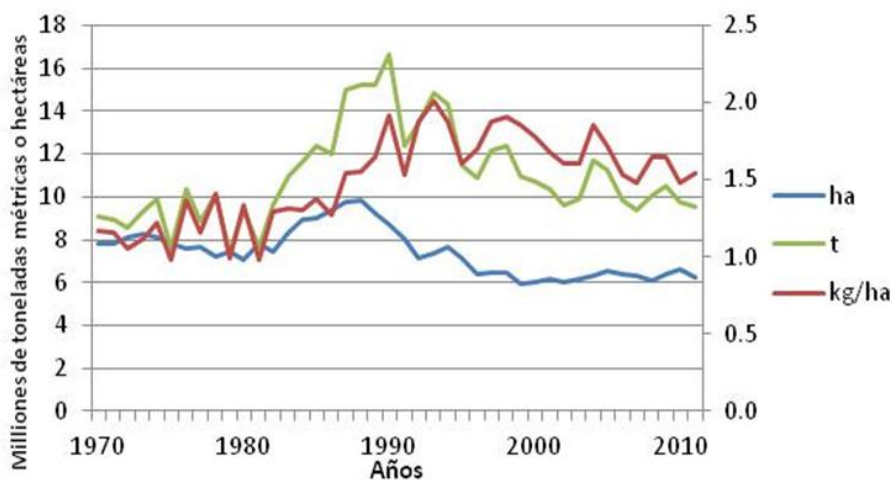


Figura 3.2. Fluctuación en el tiempo de la superficie cultivada, rendimiento y producción total del guisante en el mundo (FAO, 2013).

Los factores que influyen en la disminución en el rendimiento de un cultivo suelen ser numerosos y sus interacciones complejas. Por lo general, se consideran elementos importantes: los cambios en las condiciones climáticas, económicas, de mercado, o bien, a que la tecnología no aporte nuevas herramientas que promuevan aumentos sustanciales en los rendimientos. El efecto de los cambios en la tecnología sobre el rendimiento y en especial la adopción por los agricultores de nuevos cultivares, ha sido profundamente estudiados en el caso de cultivos como el maíz en los Estados Unidos de Norte América (Padgitt, 1982). El desarrollo de nuevos cultivares que aprovechen mejor los insumos agrícolas y que incorporen nuevos alelos o genes de resistencia a condiciones de estrés es una manera efectiva de mejorar los rendimientos de los cultivos.

En el caso del guisante, el perfeccionamiento de los sistemas de producción se ha enfocado a través de la mejora genética con el objetivo de reducir el impacto negativo de las plagas y enfermedades sobre el rendimiento. El oídio, la ascoquitosis y el jopo

son los tres factores bióticos que causan daños de importancia en el cultivo de esta leguminosa (Ali et al., 1994; Ghafoor y McPhee, 2012; Rubiales et al., 2006). Si bien se han identificado fuentes de resistencia a oídio (Fondevilla et al., 2007b), jopo (Pérez-De-Luque et al., 2005) y a ascoquitosis (Fondevilla et al., 2007a; Fondevilla et al., 2008b) entre otros, dentro de la misma especie, la ineffectividad de algunos de estos genes frente a nuevas razas virulentas de los patógenos motiva a los mejoradores a ampliar la búsqueda de nuevos alelos en especies relacionadas, que sirvan de insumo para la obtención de nuevos cultivares resistentes. Tal motivación ha originado el estudio y utilización de entradas de *P. fulvum* para la mejora de las variedades en cultivo que ha permitido la identificación de un nuevo gen dominante (*Er3*) que confiere resistencia al oídio (Fondevilla et al., 2011) para el cual se ha desarrollado posteriormente un marcador molecular que podría ser de utilidad en los programas de mejora del guisante (Fondevilla et al., 2008a).

El género *Pisum* incluye a las especies *P. sativum*, *P. fulvum*, y *P. abyssinicum* (The Plant List, 2010). Estudios recientes en los que se ha analizado las variaciones en los aminoácidos en la secuencia *His5* de H5 (Zaytseva et al., 2012), sí como las diferencias en la presencia de tres marcadores moleculares (uno asociado al ADN de la mitocondria, otro asociado al ADN del cloroplasto y un tercero al ADN nuclear) (Kosterin y Bogdanova, 2008), han mostrado que existe una marcada distancia filogenética entre *P. fulvum*, *P. abyssinicum* y *P. sativum*; con este último taxón formado por el guisante cultivado junto con un grupo heterogéneo de tipos silvestres de *P. sativum* (Kosterin y Bogdanova, 2008; Zaytseva et al., 2012).

En este trabajo se abordan los siguientes objetivos: obtener híbridos interespecíficos entre *P. sativum* y las especies silvestres, *P. fulvum*, *P. abyssinicum* y las subespecies *L. sativum* subsp. *asiaticum*, *P. sativum* subsp. *syriacum* y *L. sativum* subsp. *humile*, estudiar la composición genómica de las descendencias de los cruzamientos interespecíficos y caracterizar citológica y morfológica las progenies obtenidas.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Material vegetal

Las especies y subespecies de guisante, cultivado y silvestre, utilizadas en este trabajo, así como el origen de cada línea, se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Especies del género *Pisum* utilizadas en este estudio.

Especie	Línea	Origen	Identificación de origen
<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>asiaticum</i> <sup>1</sup>	203	JIC <sup>2</sup>	203
<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>syriacum</i>	1090	JIC	1090
<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>humile</i>	1854	JIC	1854
<i>Pisum abyssinicum</i>	130	JIC	130
<i>Pisum fulvum</i>	660	IAS <sup>3</sup>	IFPI 3260
<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	4	INTA <sup>4</sup>	L-4

<sup>1</sup> Clasificación concordante entre registro en el banco de origen y The Plant List.

<sup>2</sup> John Innes Center, Inglaterra;

<sup>3</sup> Instituto de Agricultura Sostenible, España;

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Innovación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria, Costa Rica.

Los cruzamientos se realizaron en la Finca Experimental Dr. Carlos Durán, del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Tierra Blanca de Cartago, Costa Rica. En todos los cruzamientos realizados se utilizó como parental femenino *P. sativum* subsp. *sativum* (línea 4).

Las semillas F1 obtenidas se sembraron en macetas en un jaulón en el año agronómico 2007-2008 y se dejaron autofecundar. Al año siguiente se sembraron 20 semillas de cada cruzamiento para obtener la generación F2. Todo el material se cultivó en el capus de Rabanales de Universidad de Córdoba.

### 3.2.2 Preparaciones cromosómicas

Las semillas se pusieron a germinar en oscuridad a 25° C. Una vez que la raíz creció aproximadamente 1 cm de longitud, se cortó la sección distal y se trató con una solución acuosa de colchicina (0,05%) a 25° C durante tres horas. Posteriormente, los ápices radiculares se fijaron en una solución de tres partes de etanol absoluto con una parte de ácido acético glacial (v/v) y se almacenaron a 4° C hasta su uso. Se cortaron secciones

muy finas de los ápices radiculares y se prensaron entre un porta objetos y el cubre objetos en una gota de ácido acético al 45 %. Las preparaciones cromosómicas se estudiaron en un microscopio de contraste de fase e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido seguido de la eliminación del cubre objetos. Las mejores preparaciones cromosómicas se almacenaron a 20° C para su uso posterior.

### 3.2.3 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La hibridación *in situ* fluorescente se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Cabrera et al. (2002). Las sondas de ADN<sub>r</sub> que se utilizaron en los experimentos de FISH fueron la pTa71 que consiste en unidad 18S-5,8S-26S de ADN<sub>r</sub> (8,9 kb) de *Triticum aestivum* (Gerlach y Bedbrook, 1979) y la sonda para la subunidad 5S de ADN<sub>r</sub> (Lee et al., 1999).

Las sondas pTa71 y la 5S se marcaron con digoxigenina-11-dUTP y biotina-16-dUTP (Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Alemania) respectivamente. La sonda pTa71 se marcó mediante *Nick translation* y la 5S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Lee et al., 1999). Ambas sondas se mezclaron en la solución de hibridación a una concentración final de 2 ng/μl.

Para la hibridación *in situ* con ADN genómico total (GISH) el ADN de las líneas parentales se extrajo a partir de hojas jóvenes mediante la técnica descrita por Murray y Thompson (1980) y posteriormente se marcó mediante *Nick translation* con digoxigenina-11-dUTP o con biotina-16-dUTP (Boehringer Mannheim, D-68305 Mannheim, Alemania) (Tabla 3.2). Se realizaron hibridaciones dobles usando como sondas el ADN marcado de cada uno de las especies parentales del cruzamiento. El ADN de ambos parentales se mezcló en partes iguales en una solución de hibridación a una concentración de 10 ng/μl. Las sondas de ADN marcadas con biotina-16-dUTP se detectaron con Streptavidina-Cy3 (Sigma) (50 ng/μl) y las sondas marcadas con digoxigenina-11-dUTP se detectaron con anti-digo-FITC (Isotiocianato de fluoresceína, Boehringer Mannheim) (10ng/μl).

Las preparaciones cromosómicas se hibridaron en primer lugar con las sondas de ADN<sub>r</sub> y se observaron al microscopio de fluorescencia. Las mismas preparaciones se lavaron para eliminar las sondas y se hibridaron de nuevo con ADN genómico total de las



especies progenitoras del cruzamiento. En ambos casos los cromosomas se tiñeron con DAPI (40, 6-diamidino-2-phenylindole) y las preparaciones se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, 94010, USA).

Tabla 3.2. Nucleótido usado para marcar el ADN de las especies de *Pisum* en los experimentos de GISH.

Especie y subespecie		Nucleótido
<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>asiaticum</i>	(203)	biotina-16-dUTP
<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>syriacum</i>	(1090)	biotina-16-dUTP
<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>humile</i>	(1854)	biotina-16-dUTP
<i>Pisum abyssinicum</i>	(130)	biotina-16-dUTP
<i>Pisum fulvum</i>	(660)	biotina-16-dUTP
<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>sativum</i>	(4)	digoxigenina-11-dUTP

Las imágenes se capturaron separadamente para el canal de longitud de onda correspondiente a cada fluorocromo. Para ello se utilizó un sistema de cámara CCD (Photometrics) acoplada a un microscopio de fluorescencia Leica DMR equipado con los filtros de luz adecuados para los fluorocromos utilizados. Las fotografías de los canales luminosos rojo (R) verde (G) y azul (B) se mezclaron con el programa SPOT 2.1 (Diagnostics Instruments, Inc., Burroughs, Sterling Heights, Michigan, USA) para producir una imagen multicanal (RGB) en la que se visualizaron las sondas de ADN<sub>r</sub> y la hibridación con las sondas de ADN genómico total.

### 3.2.4 Análisis de las imágenes

La fluorescencia de cada canal de luz se midió con la subrutina `analyze> measure RGB` del programa ImageJ (Ferreira y Rasband, 2012; Shamir et al., 2010) que permite medir la intensidad de la fluorescencia (F) de cada canal de luz. Con esta información se calculó el índice de fluorescencia ( $IF = FR/FG$ ) (Pita et al., 2007) de cada cromosoma de *P. sativum* (línea 4) y *P. fulvum* (línea 660) y de las descendencias F1 y F2 derivadas del cruzamiento de ambas especies.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Obtención de las progenies híbridas y características más notorias de las progenies de cada cruzamiento en las dos primeras generaciones.

Las plantas de la generación F1 producto de los cruzamientos de *P. sativum* subsp. *sativum* (línea 4) con *P. sativum* subsp. *asiaticum* (línea 203), *P. sativum* subsp. *syriacum* (línea 1090), *P. sativum* subsp. *humile* (línea 1854) y *P. abyssinicum* (línea 130), mostraron buen vigor. Por el contrario, las plantas F1 procedentes del cruzamiento entre *P. sativum* subsp. *sativum* (línea 4) y *P. fulvum* (línea 660) fueron de tamaño pequeño y mostraron escaso vigor. En la Tabla 3.3 se presenta la producción de semilla por planta cosechada en las generaciones F1 y F2 procedentes de los cruzamientos realizados. En todos los cruzamientos los híbridos F1 fueron fértiles, variando el número medio de semillas de 16,4 en el cruzamiento entre *P. sativum* y *P. fulvum* a 50 semillas en los cruzamientos entre *P. sativum* subsp. *sativum* y las subespecies *P. sativum* subsp. *syriacum* y *P. sativum* subsp. *humile*.

Tabla 3.3. Cantidad promedio de semillas colectadas en las plantas de las generaciones F1 y F2 originadas de los cruzamientos interespecíficos en *Pisum*.

Cruzamiento	Número de semillas por planta ( $\bar{X} \pm SE$ )	
	F1	F2
(4x203)	47,0 $\pm$ 3,0	119,3 $\pm$ 28,0
(4x1090)	50,0 $\pm$ 4,5	423,8 $\pm$ 56,5
(4x1854)	50,0 $\pm$ 8,1	249,2 $\pm$ 26,7
(4x130)	36,7 $\pm$ 1,8	178,7 $\pm$ 42,3
(4x660)	16,4 $\pm$ 4,1	251,4 $\pm$ 107,8

Las plantas de la generación F2 derivadas de los cruzamientos entre *P. sativum* subsp. *sativum* (línea 4), *P. abyssinicum* y las subespecies *asiaticum*, *syriacum*, e *humile*, fueron de altura similar, a excepción de las descendientes del cruzamiento con *P. sativum* subsp. *asiaticum* (línea 203) que mostraron un altura más baja.

### 3.3.2 Caracterización citogenética de las especies de *Pisum* incluidas en este estudio.

Todas las especies utilizadas en el presente trabajo (Tabla 3.2) son diploides con  $2n=2x=14$ . En las especies *P. sativum* subsp. *sativum*, *P. sativum* subsp. *asiaticum*, *P. sativum* subsp. *syriacum*, *P. sativum* subsp. *humile* y *P. abyssinicum*, los análisis FISH con la sonda pTa71 mostraron cuatro señales de hibridación, lo que corresponde a dos pares de NOR por genoma. En todos los casos los lugares de hibridación coincidieron con las constricciones secundarias abarcando parte del satélite y se localizaron en el brazo largo de los cromosomas 4 y 7.

El patrón de hibridación de la secuencia 5S también fue coincidente para todas las subespecies de *P. sativum* y *P. abyssinicum* (Figura 3.3). Esta secuencia hibridó en tres pares de cromosomas, en dos de ellos las señales de hibridación se localizaron en la región subtelomérica del brazo corto de los pares cromosómicos 1 y 3 mientras que en el tercer par se localizó en la región subtelomérica del brazo corto del cromosoma 5 (Figura 3.3).

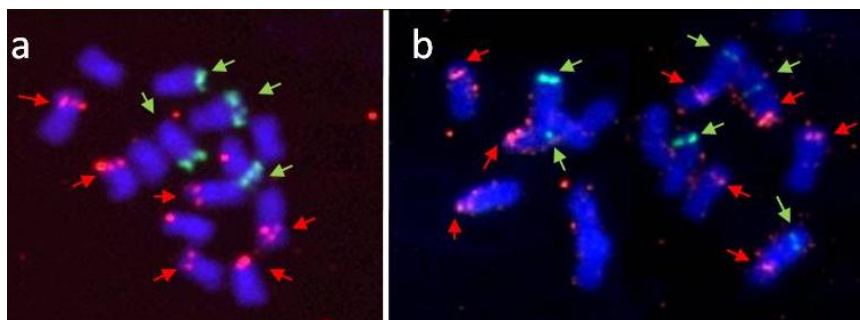


Figura 3.3. FISH en metafase somática de (a) *Pisum sativum* y (b) *P. fulvum* con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (roja).

Por el contrario, los análisis FISH con la sonda pTa71 sobre preparaciones metafásicas de *P. fulvum* mostraron seis señales de hibridación, lo que corresponde a tres pares de NOR por genoma en esta especie. Los tres pares de NOR se localizaron el brazo largo de los pares cromosómicos 4, 5 y 7. La hibridación *in situ* con la sonda 5S mostró que esta secuencia se localiza en cuatro pares cromosómicos en *P. fulvum*. Dos de ellos se localizan en la región submetacéntrica del brazo corto de los pares cromosómicos 4 y 7

y los otros dos se localizan en la región subtelo mérica en del brazo corto en los pares cromosómicos 1 y 3. En la Figura 3.4 se muestra el ideograma basado en las señales de hibridación con las secuencias pTa71 y 5S de ADNr en *P. sativum* y *P. fulvum*.

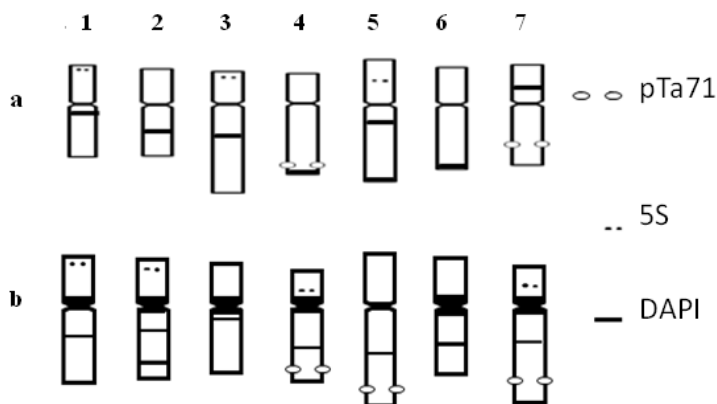


Figura 3.4. Ideograma de (a) *P. sativum* y (b) *P. fulvum* basado en las señales de hibridación con las secuencias pTa71 y 5S de ADNr, respectivamente y los patrones de bandas DAPI.

### 3.3.3 Caracterización citogenética de las progenies F1 y F2 procedentes de los cruzamientos interespecíficos en *Pisum*

Se realizaron preparaciones cromosómicas de las plantas F1 originadas de los cruzamientos entre *P. sativum* subsp. *sativum* y *P. sativum* subsp. *asiaticum*, *P. sativum* subsp. *syriacum*, *P. sativum* subsp. *humile* y *P. abyssinicum*, respectivamente. Los análisis de GISH se llevaron a cabo mediante hibridaciones dobles utilizando igual concentración de ADN genómico total del parental común en todos los cruces (*P. sativum* subsp. *sativum*) y ADN genómico total de cada una de las especies parentales anteriormente citadas, según el cruzamiento. En todos los casos, los análisis de las metafases somáticas analizadas no mostraron hibridación preferencial de ninguna de las sondas de ADN genómico total en algún cromosoma o región cromosómica en especial, lo que impidió la distinción de los cromosomas provenientes de cada especie parental en las plantas de la generación F1. Solamente en el cruzamiento entre *P. sativum* subsp. *sativum* y *P. fulvum*, el análisis GISH de los híbridos de la generación F1 permitió discriminar los 7 cromosomas pertenecientes a cada una de las especies parentales. Los

cromosomas de *P. sativum* se observaron color verde y los de *P. fulvum* en color amarillo (Figura 3.5). La hibridación *in situ* con las sondas de ADN<sub>r</sub> permitió visualizar cinco señales de hibridación con la secuencia pTa71 localizadas en los cromosomas 4 y 7 de *P. sativum* y 4, 5 y 7 de *P. fulvum*, así como siete señales de hibridación con la secuencia 5S localizadas en los cromosomas 1, 3 y 5 de *P. sativum* y 1, 2, 4, y 7 de *P. fulvum* (Figura 3.5).

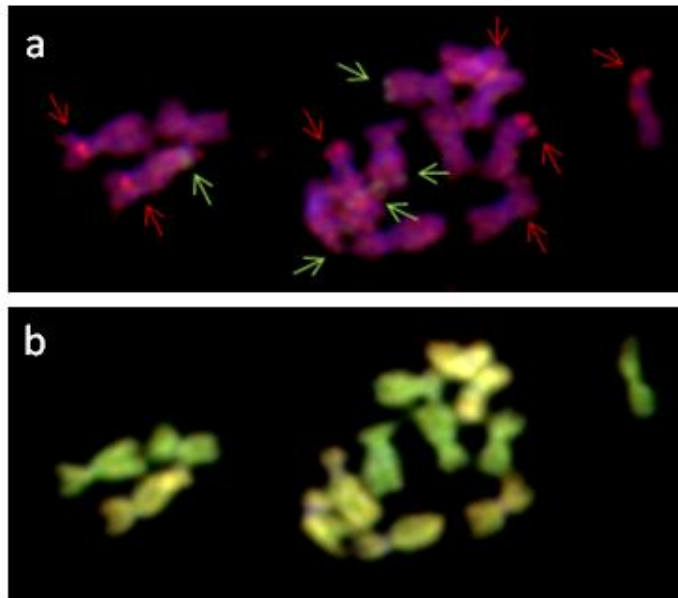


Figura 3.5. FISH en metafase somática del híbrido F1 entre *P. sativum* y *P. fulvum* hibridada con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (roja) (a). En (b) la misma preparación hibridada con ADN genómico total de *P. sativum* (verde) y *P. fulvum* (rojo).

El análisis del FISH de las plantas de la generación F2 del cruzamiento entre *P. sativum* y *P. fulvum*, mostró que los patrones de hibridación de las secuencias pTa71 y la 5S difirieron entre plantas (Tabla 3.4). Los resultados muestran la posible ocurrencia de diferentes eventos de recombinación, o sustituciones cromosómicas, o de ambos eventos en estas plantas. Por ejemplo, en una de las plantas en la que están presentes dos cromosomas con la señal de hibridación de la secuencia pTa71, cuatro cromosomas con la señal de hibridación con la secuencia 5S, junto dos cromosomas con ambas señales, podrían estar presentes los pares cromosómicos 2, 4 y 5 de *P. sativum* junto con los pares cromosómicos 3 y 7 de *P. fulvum*. Pero también, este mismo número de

señales de hibridación con las secuencias pTa71 y 5S, podría corresponder a recombinaciones en todos los cromosomas de esa planta.

Tabla 3.4. Segregación en el número de señales de hibridación con las secuencias pTa71 y 5S de ADNr en una muestra de once plantas de la generación F2 obtenidas del cruzamiento *P. sativum* x *P. fulvum*.

Número de plantas	Número de señales de hibridación de las secuencias		
	pTa71	5S	pTa71/5S en la misma planta
1	4	6	0
1	4	4	0
2	4	5	0
1	4	3	1
1	3	4	1
1	3	5	1
1	3	3	2
1	3	3	1
1	2	4	2
1	2	4	2

Dado que la GISH en las plantas de la generación F1 únicamente permitió discriminar los cromosomas parentales en las plantas procedentes del cruzamiento *P. sativum* subsp. *sativum* x *P. fulvum*, se decidió continuar con el análisis GISH de las plantas de la generación F2 provenientes de ese cruzamiento. Sin embargo, la GISH de estas plantas no permitió distinguir con claridad regiones de cromatina o cromosomas de uno u otro parental en ninguna de las plantas analizadas. La diferencia observada en la coloración de los cromosomas o regiones de ellos en la GISH de las plantas de la generación F2, no proporcionó información adicional para clarificar el origen de las variaciones en los patrones de hibridación de la secuencia pTa71 o de la secuencia 5S, a los que se ha hecho referencia (Figura 3.6).

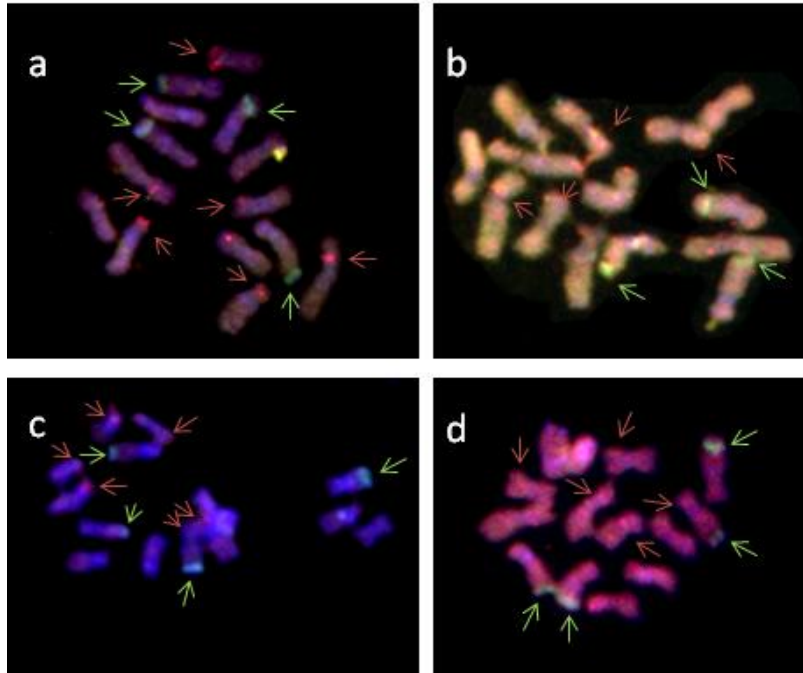


Figura 3.6. Metafasas somáticas de cuatro plantas de la generación F2 obtenidas del cruzamiento entre *P. sativum* y *P. fulvum*, hibridadas con las secuencias pTa71 (verde) y 5S (rojo).

### 3.3.4 Variación en el índice de fluorescencia entre las líneas parentales y las generaciones F1 y F2 obtenidas del cruzamiento interespecífico de *P. sativum* y *P. fulvum*.

La relación entre la intensidad de fluorescencia de canal de luz roja (IR) y verde (IG) de las GISH de *P. sativum* y *P. fulvum*, así como la de los cromosomas de cada parental en la generación F1, permitió analizar numéricamente las diferencia en la intensidad de fluorescencia que origina las distintas coloraciones de los cromosomas de ambas especies. El índice de fluorescencia ( $IF=IR/IG$ ) promedio más bajo fue para los cromosomas de *P. sativum*, que difirió significativamente del IF de los cromosomas de *P. fulvum*, tanto en las mediciones en preparaciones de los parentales, como en las preparaciones celulares de las plantas de la generación F1 ( ).

Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Valores promedio del índice de fluorescencia (IF) de los cromosomas metafásicos de las especies parentales *P. sativum* y *P. fulvum* y de los 7 cromosomas correspondientes a cada especie presentes en las plantas de la generación F1.

	<i>P. sativum</i>	<i>P. fulvum</i>	<i>P. sativum</i> (en F1)	<i>P. fulvum</i> (en F1)
$\bar{x} \pm DE$	0,937±0,043	1,091±0,027	0,938±0,034	1,089±0,056

Como lo muestra la Figura 3.7, al analizar el IF medido por cromosoma por planta, se observó que la relación en la intensidad de fluorescencia de los canales de luz roja y verde no fue la misma en todos los casos. Es decir, si bien en promedio los cromosomas de *P. sativum* tienen un IF menor al de los cromosomas de *P. fulvum*, la relación entre la intensidad de fluorescencia en el canal rojo y verde no fue igual en todos los cromosomas de la misma especie.

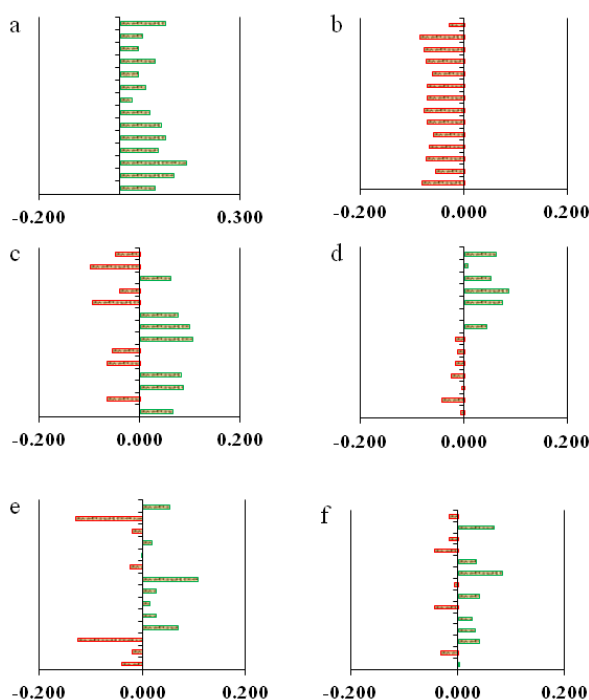


Figura 3.7 Variación en los índices de fluorescencia (IF=IR/IG) por cromosoma para una muestra de plantas de *P. sativum* (a), *P. fulvum* (b) una planta F1 (c) y tres plantas F2 (d-f).

La GISH de las plantas de la generación F2 puso de manifiesto que los 14 cromosomas de cada planta tienen regiones de diferente intensidad de fluorescencia para cada canal



de luz (Figura 3.8). Sin embargo, estas diferencias no fueron suficientes como para asignar visualmente los cromosomas o fragmentos recombinantes a los genomas de ambas especies parentales. Por este motivo, se recurrió al cálculo del índice de fluorescencia (IF) de los 14 cromosomas, que permite visualizar el nivel de recombinación o sustitución cromosómica en esas plantas. Como criterio de separación entre cromosomas recombinantes y los no recombinantes se utilizó el valor de la media del índice de fluorescencia de la planta y su desviación estándar. Cromosomas con un IF mayor a la suma de la media y una unidad de desviación estándar se clasificaron como *P. fulvum* y los cromosomas con IF menor al valor de la media menos una unidad de desviación estándar se clasificaron como *P. sativum* y los cromosomas con valores de IF en el rango de los valores fijados para los parentales se clasificaron como recombinantes.

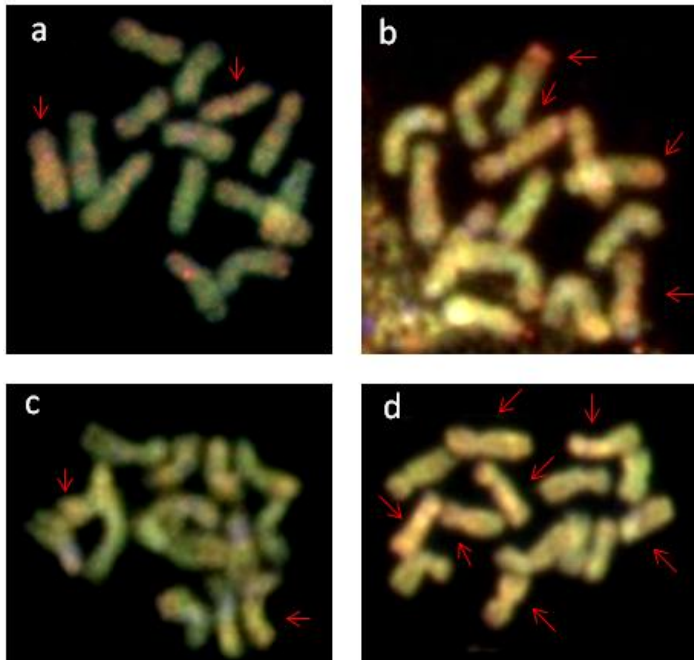


Figura 3.8. GISH en metafases somáticas de plantas de la generación F2 obtenidas del cruzamiento entre *P. sativum* y *P. fulvum*, hibridadas con ADN genómico total de ambos parentales. Las flechas indican regiones cromosómicas de color amarillo rojizo.

En la Tabla 3.6 se presenta el resultado del análisis del IF para los 14 cromosomas medidos en diez plantas de la generación F2. Los valores IF obtenidos indican que todas las plantas podrían ser portadoras al menos dos sustituciones cromosómicas de *P.*

*fulvum*. Una de ellas tendría cinco cromosomas de *P. fulvum* uno de *P. sativum* y ocho recombinantes. En otra planta cabe la posibilidad de que lleve cuatro cromosomas de *P. sativum*, dos de *P. fulvum* y ocho recombinantes.

Tabla 3.6. Clasificación de los cromosomas de una muestra de 10 plantas de la generación F2 del cruzamiento entre *P. sativum* y *P. fulvum* según el índice de fluorescencia.

Número de plantas	<i>P. fulvum</i>	<i>P. sativum</i>	Cromosomas recombinantes
3	2	2	10
1	5	1	8
1	2	3	9
1	2	4	8
1	4	1	9
3	3	2	9

La dispersión de los valores de IF de los cromosomas en los parentales y de la generación F1 fue similar, con una distribución próxima a la normalidad como indica lo reducido de las cajas y la proximidad de la mediana y la media (Figura 3.9). Por el contrario, la dispersión del valor de IF que se observa en los cromosomas de las plantas de la generación F2 mostró una tendencia a los valores altos y mayor grado de dispersión del IF.

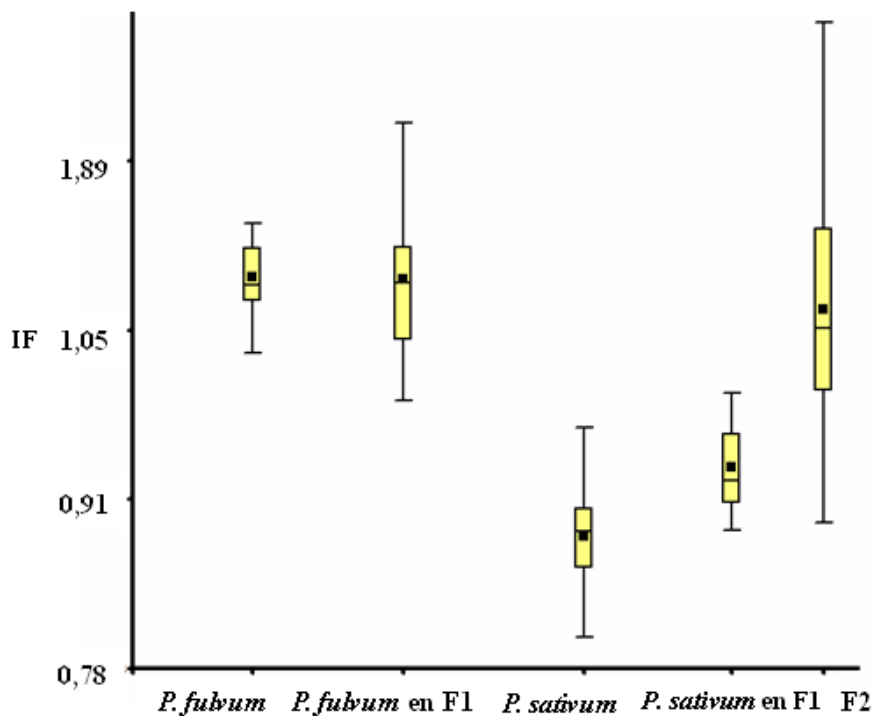


Figura 3.9. Dispersión del índice de fluorescencia (IF) de los cromosomas metafásicos de las especies parentales *P. sativum* (línea 4) y *P. fulvum* (línea 660) de los 7 cromosomas correspondientes a cada especie presentes en las plantas híbridas F1 y de las plantas de la generación F2.

### 3.4 Discusión

La relativa facilidad para obtener semillas fértiles en los cruzamientos en que *P. sativum* subsp. *sativum* fue el parental femenino y *P. sativum* subsp. *asiaticum*, *P. sativum* subsp. *syriacum*, *P. sativum* subsp. *humile* y *P. abyssinicum* fueron los donadores de polen es un indicativo de la proximidad genética de estas subespecies, así como de *P. abyssinicum* con *P. sativum* subsp. *sativum*. Por el contrario, la baja producción de semillas de plantas F1 y F2, procedentes del cruzamiento entre *P. sativum* y *P. fulvum* obedecería a la mayor distancia genética entre estas dos especies. En este sentido, Zaytseva et al. (2012) al analizar las variaciones en los aminoácidos de *His5* de la

histona H1 en *Pisum*, llegaron a la conclusión que *P. fulvum* se separa claramente de un grupo heterogéneo, conformado por entradas previamente clasificadas como *P. abyssinicum*, o como subespecies silvestres de *P. sativum* que en conjunto formarían la especie *P. sativum*. A una conclusión similar llegaron Kosterin y Bogdanova (2008) al analizar la combinación de tres marcadores moleculares, en una serie de entradas de *Pisum*. Si bien estos autores separaron con claridad a *P. fulvum*, incluyen a los guisantes silvestres en el grupo *P. sativum* subsp. *elatius* y a los guisantes cultivados en dos especies: *P. sativum* subsp. *sativum* y *P. abyssinicum*. Hace unos años, Conicella y Errico (1990) habían propuesto que *P. abyssinicum* se considerase como un ecotipo o variedad de *P. sativum* da la similitud en los cariotipos de ambas especies. Esto apoyaría la simplificación taxonómica del género *Pisum*.

La baja producción de semillas de plantas F1 y F2, procedentes del cruzamiento entre *P. sativum* y *P. fulvum* se podría deber a la distancia genética que separa estas dos especies. Al igual que en otras familias de plantas, en las leguminosas también existen barreras que impiden o dificultan el intercambio genético entre las especies. Bogdanova et al. (2012) localizaron dos genes nucleares en *P. sativum* subsp. *sativum* que interaccionan con el ADN en los cloroplastos de *P. sativum* subsp. *elatius*. Uno de ellos actúa en forma dominante con efecto letal sobre el gametófito y de forma recesiva con efecto letal sobre el esporófito. El otro gen reduce también la producción de polen cuando está en heterocigosis y en homocigosis causa clorosis. Es posible que existan interacciones del núcleo con las organelas del citoplasma semejantes al caso mencionado, entre las subespecies de *Pisum* y entre *P. sativum* con *P. fulvum* evaluadas en este trabajo. Bogadnova y Kosterin (2006) también han propuesto que la interacción del ADN nuclear y el citoplasmático (mitocondria y cloroplastos) en el género *Pisum*, es parte de las barreras que separan las especies de este género.

Las señales de hibridación con las secuencias pTa71 y 5S en *P. sativum* con las concordaron con el cariotipo previamente publicado para esta especie (Abirached-Darmency et al., 2005; Samatadze et al., 2005; Samatadze et al., 2008). La FISH en *P. fulvum* (Figura 3.3) reveló 6 señales de hibridación de la secuencia pTa71, que se corresponden a los NOR en los pares cromosómicos 4, 5 y 7, (Conicella y Errico, 1990; Errico et al., 1991; Errico et al., 1996; Venora et al., 1991). Además, la FISH de esta especie, reveló ocho señales de hibridación de la secuencia 5S que no han sido reportadas con anterioridad. Cuatro señales de hibridación se localizaron en el brazo

corto de dos pares cromosómicos que además presentan las señales de hibridación con la secuencia pTa71 en el brazo opuesto y las otras cuatro en dos pares de cromosomas metacéntricos (Figura 3.3). Al no existir trabajos previos sobre la localización de la secuencia 5S en *P. fulvum*, se utilizó el tamaño relativo de los satélites y la longitud de los cromosomas para identificar los pares cromosómicos con las señales de hibridación de la secuencia 5S y de la secuencia pTa71. Uno de ellos se identificó como el par 4, que es el más corto de los tres que portan los NOR y el otro como el par 7, que tiene el satélite más grande. Los otros dos pares cromosómicos que muestran las señales de hibridación de la secuencia 5S se identificaron como el par 1 y el 2, que corresponden a los cromosomas metacéntricos más cortos del cariotipo de *P. fulvum*. La inclusión de las señales de hibridación con la secuencia 5S en el cariotipo de *P. fulvum* provee cuatro marcadores citológicos nuevos que facilitan la identificación del complemento cromosómico de esta especie. En los cromosomas 3 y 6 no se han observado sitios de hibridación de la secuencia pTa71 o de la 5S, pero se diferencia por diferente tamaño y por una banda DAPI que está presente en el brazo largo del 6 y no en el del 3 (Figura 3.3).

Los cariotipos de las sub especies de *P. sativum* y *P. abyssinicum* analizados en este trabajo han mostrado el mismo patrón de señales de hibridación con las secuencia pTa71 y 5S que el observado en *P. sativum* subsp. *sativum*. No hay menciones previas sobre la presencia y distribución de estas secuencias en las subespecies estudiadas o en *P. abyssinicum*. Aun así, es razonable esperar que los cariotipos resulten semejantes dada su cercanía taxonómica. Se han observado variaciones en el cariotipo dentro del género *Pisum* a nivel de subespecie (Fuchs et al., 1998) y es común encontrar variaciones en el número y localización de las secuencias de ADNr dentro de las especies de leguminosas (Abirached-Darmency et al., 2005; Fernández et al., 2005; Mohammed-Ali et al., 2000; Pedrosa-Harand et al., 2006). Por este motivo, cabe la posibilidad que el cariotipo de otras entradas, diferentes a las aquí estudiadas, pudiera diferir del obtenido en este trabajo para las subespecies de *P. sativum* y *P. abyssinicum*.

Los resultados obtenidos mediante FISH de las plantas de la generación F2 provenientes del cruzamiento *P. sativum* x *P. fulvum* mostró diferencias en el número y distribución cromosómica de las señales de hibridación con las secuencias pTa71 y 5S. Estas diferencias se podrían deber a eventos de recombinación o sustituciones cromosómicas, o bien, a ambos eventos que implicaron a los cromosomas homeólogos.

Los análisis de GISH de las plantas de la generación F1, provenientes de los cruzamientos en que *P. sativum* subsp. *sativum* fue el parental femenino y *P. sativum* subsp. *asiaticum*, *P. sativum* subsp. *syriacum*, *P. sativum* subsp. *humile* y *P. abyssinicum* fueron los donadores de polen, no permitió diferencia los cromosomas de las líneas parentales. Como se mencionó con anterioridad, la especie *P. sativum* es un grupo heterogéneo en características fenotípicas como color de flor o semillas, pero que resultan muy próximas desde el punto de vista genético (Zaytseva et al., 2012). Posiblemente el grado de divergencia en las secuencias de ADN en las subespecies de *P. sativum* y *P. abyssinicum* con las de *P. sativum* subsp. *sativum*, está por debajo del rango a partir del cual los análisis de GISH permiten discernir entre los genomas de especies relacionadas (Jiang y Bikram, 2006; Schwarzacher et al., 1989) y sea la causa de la dificultad para distinguir los cromosomas parentales en las plantas de la generación F1 procedentes del cruzamiento entre estas especies.

Por el contrario, la descendencia del cruzamiento *P. sativum* x *P. fulvum* en el que los análisis de GISH permitieron distinguir los 7 cromosomas provenientes de cada especie en las plantas de la generación F1. Resultados similares fueron obtenidos por Ochatt et al. (2004) al analizar las plantas de la generación F1 del cruzamiento *P. sativum* x *P. fulvum* (Ochatt et al., 2004).

En los cromosomas de las plantas de la generación F1 procedentes del cruzamiento *P. sativum* x *P. fulvum* se observaron regiones difusas en las que la intensidad del color rojo o verde fue mayor que en las regiones cromosómicas circundantes. Este resultado se pudo deber a diferencias en la relación de la intensidad de fluorescencia de los canales de luz roja y verde (IR/IG) de estas regiones con el resto del cromosoma (Dávila-Rodríguez et al., 2009) lo que puede indicar, que esas regiones cromosómicas comparte secuencias de ADN similares en diferente proporción (Contreras et al., 2012; Li et al., 2004; Ljosa y Carpenter, 2009; Pita et al., 2003; Pita et al., 2007; Pita et al., 2008). Así, regiones más amarillas en los cromosomas de *P. fulvum* indicarían la presencia de bandas de ADN más afín a *P. sativum* que a *P. fulvum* y las regiones menos verdes en los cromosomas de *P. sativum* indicarían lo inverso. Es decir, los resultados del análisis GISH de esas plantas podrían indicar que *P. sativum* y *P. fulvum* presentan secuencias de ADN conservadas en zonas suficientemente amplias como para ser observables en la GISH. Se han obtenido resultados similares en otras especies, como por ejemplo en la generación F1 originada de la hibridación interespecífica en

tulipán en cuyos cromosomas se observaron con claridad regiones de diferentes tonalidades de rojo y verde (Marasek-Ciolakowska et al., 2012).

Los análisis de GISH de las plantas de la generación F2 originadas del cruzamiento entre *P. sativum* y *P. fulvum*, no permitieron diferenciar con claridad cromosomas enteros o partes de ellos que pudieran ser identificados como provenientes de alguna de las dos líneas parentales. Se observaron regiones cromosómicas, que aunque no estaban claramente delimitadas, difirieron en la intensidad del verde, amarillo y rojo. Un resultado similar obtuvieron Jiang y Xia (2012) cuando analizaron con la GISH la interacción de los genomas de *Swertia tetraptera* y *Bupleurum scorzonerifolium* en callos somáticos y plantas híbridas regeneradas *in vitro*, en los que observaron regiones cromosómicas de diferentes coloraciones que, ellos identificaron como introgresiones de *B. scorzonerifolium* en cromosomas de *S. tetraptera*. Resultados análogos se han obtenido en plantas de las generaciones F2 y F3 derivadas del cruzamiento entre *P. sativum* y *P. fulvum*, (Ochatt et al., 2004) así como en las generaciones F1, BC1 y BC2 del cruzamiento entre *Festuca pratensis* y *Lolium perenne* (Zwierzykowski et al., 2006). En este último caso la observación de franjas cromosómicas de distinto color con bordes bien definidos, fue atribuida por los autores a la ocurrencia de intercambios de segmentos de cromatina entre cromosomas homeólogos.

La diferencia en color observada entre los cromosomas parentales en preparaciones cromosómicas en plantas de la generación F1 derivadas del cruzamiento entre *P. sativum* y *P. fulvum*, así como los análisis de GISH de las especies parentales, concordó con las diferencias en el índice de fluorescencia ( $IF = IR/IG$ ) que se obtuvo en cada caso. Este resultado permitió utilizar el IF en las plantas de la generación F2 para identificar por su origen a los cromosomas en cada planta. El análisis mostró que es posible que la recombinación cromosómica haya sido más frecuente que la sustitución cromosómica, puesto que el número de señales de hibridación de las secuencias pTa71 y 5S ya sea en cromosomas independientes o no, es más alta que el número de sustituciones cromosómicas que se derivan del análisis del índice de fluorescencia (Tabla 3.6). Akiyama (2010) utilizó un método semejante que le permitió estimar la proporción de ADN de las líneas parentales en la plantas del híbrido intergenérico entre *Festuca* y *Lolium*.

La alta variabilidad observada para los valores de IF entre las plantas de la generación F2 podría deberse a diferencias en la proporción de ADN de cada parental presente en

las plantas de esa generación. La selección cromosómica a favor de uno u otro parental en generaciones tempranas de híbridos interespecíficos ha sido reportado en otros géneros (Zhang et al., 1999; Zwierzykowski et al., 1998), así como los diferentes porcentajes de recombinación entre cromosomas, que provoca diferencias en la cantidad de ADN de uno de los parentales presente en el híbrido (Akiyama y Jin, 2007; Zhang et al., 1999; Zwierzykowski et al., 2006).





## **Discusión general**



## Discusión general

En esta investigación se reporta por primera vez la obtención de líneas avanzadas procedentes del cruzamiento interespecífico *L. cicera* x *L. sativus*. Este nuevo material genético permitirá acceder a los genes de resistencia a los factores previamente identificados en *L. cicera*. De esta manera se abre el camino para la utilización del pool genético secundario de *L. sativus* y avanzar en la mejora de la almorta.

Zaytseva et al. (2012) y Kosterin y Bogdanova (2008) estudiaron las relaciones filogenéticas de numerosas entradas pertenecientes a las especies *P. fulvum*, *P. abyssinicum* y *P. sativum*, así como varias entradas de guisantes silvestres. Estos investigadores coincidieron al separar a *P. fulvum* de un grupo heterogéneo de guisantes con diferente origen. Sin embargo, aunque no concordaron en las relaciones filogenéticas de los diferentes grupos de guisantes silvestres y cultivados, sí coincidieron en la similitud genética de este gran grupo de guisantes. En la presente investigación tanto los resultados de la hibridación *in situ* con los marcadores citogenéticos, pTa71 y 5S como los realizados con ADN genómico total han coincidido en la enorme similitud entre las especies de *P. sativum* y de las diferencias de este grupo con *P. fulvum*. Este último tiene un cariotipo diferente a los otros guisantes evaluados y únicamente los cromosomas de *P. fulvum* pueden distinguirse de los cromosomas de *P. sativum* subsp. *sativum* en las plantas F1.. Conicella y Errico (1990) han propuesto que *P. sativum* y *P. abyssinicum* se consideren como una sola especie dada la similitud en los cariotipos de ambas especies, lo que apoyaría la simplificación taxonómica del género *Pisum*.

La doble FISH con las secuencias pTa71 y 5S junto con el análisis GISH han sido técnicas muy informativas para el estudio de los cariotipos en *Lathyrus* y en *Pisum*. En ambos géneros han permitido aumentar el conocimiento sobre la organización de los genomas de las especies estudiadas. En *Lathyrus* la observación de la de las señales de hibridación de los marcadores citogenéticos pTa71 y 5S junto con el análisis GISH de las progenies híbridas ha permitido establecer con claridad el orden de los cromosomas en las dos especies estudiadas. En *Pisum*, la FISH con las secuencias pTa71 y 5S ha permitido establecer que las subespecies de *P. sativum* presentan el mismo cariotipo y que este es diferente al observado en *P. fulvum*. La FISH en *P. fulvum* ha revelado que,

además de las 6 señales de hibridación de la secuencia pTa71 correspondientes a los NOR en los pares cromosómicos 4, 5 y 7, (Conicella y Errico, 1990; Errico et al., 1991; Errico et al., 1996; Venora et al., 1991), esta especie también porta ocho señales de hibridación de la secuencia 5S, localizadas en el brazo corto de los pares cromosomas 1,2, 4 y 7. La inclusión de las señales de hibridación con la secuencia 5S en el cariotipo de *P. fulvum* provee cuatro puntos más de referencia para identificar fácilmente los cromosomas de esta especie.

La GISH de las plantas de la generación F2 originadas del cruzamiento entre *P. sativum* y *P. fulvum*, no ha permitido diferenciar con claridad cromosomas enteros o partes de ellos que pudieran ser identificados como provenientes de alguna de las dos líneas parentales. En ellos se han observado regiones cromosómicas que, aunque no estaban claramente delimitadas, difirieron en la intensidad de los colores verde, amarillo y rojo. Un resultado similar obtuvieron Jiang y Xia (2012) cuando analizaron con la GISH la interacción de los genomas de *Swertia tetraptera* y *Bupleurum scorzonerifolium* en callos somáticos y plantas híbridas regeneradas *in vitro*. Estos autores observaron regiones cromosómicas de diferentes coloraciones que, aunque algo difusas, identificaron como introgresiones de *B. scorzonerifolium* en cromosomas de *S. tetraptera*.

La GISH en las progenies del cruzamiento *L. cicera* x *L. sativus* fue mucho más informativa que en el género *Pisum*. En *Lathyrus*, la GISH permitió distinguir la cromatina de *L. cicera* en el fondo genético de *L. sativus* en plantas de tres y cuatro generaciones más avanzadas que en *Pisum*. Si se toma en cuenta que la GISH en ambos géneros se realizó de la misma manera, entonces la diferencia en el número de generaciones en las que la GISH permitió distinguir la cromatina de las especies parentales, podría depender de la distancia genética entre las especies en cada género y del grado de recombinación genética que haya ocurrido en los híbridos. De esta manera, los resultados indicarían que la distancia genética entre *L. cicera* y *L. sativus* es mayor que entre *P. sativum* y *P. fulvum*. Esta hipótesis también encuentra fundamento en la facilidad con que se obtuvieron los híbridos y la relativa fertilidad en los cruzamientos en *Pisum* y la extrema dificultad para obtener el híbrido en *Lathyrus*, así como la baja fertilidad de su progenie. Por supuesto que se requerirían investigaciones adicionales para sustentar esta hipótesis.

La baja capacidad de resolución del análisis visual de la GISH en las plantas de la generación F2 originadas del cruzamiento *P. sativum* subsp. *sativum* x *P. fulvum*, fue compensada por la utilización del índice de fluorescencia que permite realizar cálculos numéricos independientes del criterio del investigador al valorar la diferencia en la intensidad de los colores en una fotografía. Ese análisis mostró, que es posible que la recombinación cromosómica haya sido más frecuente que la sustitución cromosómica en estas plantas

La selección cromosómica a favor de uno u otro parental en generaciones tempranas de híbridos interespecíficos ha sido reportada en otros géneros (Zhang et al., 1999; Zwierzykowski et al., 1998). Así como diferencia en los porcentajes de recombinación entre cromosomas en híbridos interespecíficos (Akiyama y Jin, 2007; Zhang et al., 1999; Zwierzykowski et al., 2006). Los resultados obtenidos en esta investigación han mostrado que en el cruzamiento *L. cicera* x *L. sativus* también ha ocurrido una notable disminución en la presencia del genoma de *L. cicera*. y que algunos cromosomas, como el 4 de *L. cicera*, se presentan con mayor frecuencia en la población que otros. Ese cromosoma estuvo presente en el 48,6 de las plantas con sustituciones cromosómicas en la generación F4.

Todos estos resultados muestran la fuerte dinámica que ha tenido el reacomodo del genoma de las plantas híbridas. Tan solo tres ciclos de autopolinización han sido necesarios para que la presencia del genoma de *L. cicera* en estas plantas se reduzca a cuatro o menos cromosomas. Similares resultados han sido encontrados en cruzamientos de *Hordeum bulbosum* x *H. vulgare* por Zhang et al. (1999) y en el cruzamiento entre especies de los géneros *Festuca* y *Lolium* por Zwierzykowski et al. (2006). En ambos casos se ha observado la reducción en el número de cromosomas de uno de los parentales y el aumento en el número de cromosomas del otro.

Los mecanismos que impulsan la eliminación de uno de los genomas en la progenie de un cruzamiento interespecífico no han sido establecidos con certeza. Se podrían atribuir a una serie de factores como la dominancia de un genoma sobre el otro (Zwierzykowski et al., 2006), a la competencia entre gametos, así como a que determinados arreglos cromosómicos mejoren el vigor de las plantas y por ende puedan tener más descendencia. Además, es posible que los cromosomas o cromátidas de un género tengan ventaja sobre las del otro en su traslación a los polos del huso durante la meiosis (Zwierzykowski et al., 2006; Zwierzykowski et al., 2008). El ritmo acelerado con se da

la eliminación de cromosomas de *L. cicera* en el fondo de *L. sativus* hace pensar que muy posiblemente, en este caso, la incorporación de segmentos de cromatina de *L. cicera* en *L. sativus* puede ser la manera de fijar la introgresión de alelos, en el fondo genético de *L. sativus* para mejorar sus calidades agronómicas y no la sustitución cromosómica como lo ha sugerido Zwierzykowski et al (2006) en el caso del cruzamiento de *Festuca pratensis* y *Lolium perenne*.

La obtención de líneas de sustitución disómica ha sido infructuosa. En este sentido, los resultados muestran que la única planta disómica obtenida para la sustitución del cromosoma 5 en la generación F5, fue estéril. Esto se podría deber a que la carga genética que supone la disomía en una planta diploide no le permite crecer con normalidad y reproducirse aunque sea de manera precaria. Además, las ocho plantas de la generación F5 que presentaron el cromosoma 6 recombinante en homocigosis, tampoco produjeron semillas viables y su desarrollo vegetativo fue marcadamente anormal. Queda por continuar con otro ciclo de autopolinización de las plantas con sustituciones monosómicas y analizar su descendencia para identificar aquellas que porten la sustitución disómica y que produzcan semillas viables, o bien caracterizar los fenotipos asociados a las disomías que se obtengan.

En el presente trabajo también se ha evaluado exitosamente la posibilidad de utilizar la citometría de flujo como herramienta para cribar plantas de la generación F5 procedentes del cruzamiento *L. cicera* x *L. sativus* cuya planta madre era portadora de la sustitución doble monosómica del cromosoma 5 de *L. cicera* en el fondo genético de *L. sativus*. Tomando el valor de 4,2 como el valor límite de IADN para la selección de plantas que contengan el cromosoma 5 de *L. cicera*, se reduce el número de plantas a analizar por FISH al 47 % de la muestra inicial. Este resultado es especialmente importante teniendo en cuenta que en cada ciclo de autofecundación se espera un alto porcentaje de plantas sin la constitución cromosómica deseada y cuyo análisis mediante GISH ralentiza el proceso de selección.

## **Conclusiones**





## Conclusiones

1. Se han generado líneas de introgresión de *L. cicera* en *L. sativus*. Las líneas obtenidas incluyen tanto sustituciones cromosómicas como cromosomas recombinantes. Las nuevas combinaciones genómicas generadas facilitan la introgresión de germoplasma de *L. cicera* en *L. sativus* abriendo la posibilidad de ampliar la base genética de este cultivo.
2. El análisis de la composición genómica de las líneas de introgresión obtenidas ha permitido modificar el orden de los cromosomas en el cariotipo de *L. cicera*, estableciéndose una nueva relación de homología entre *L. cicera* y *L. sativus*. Esta nueva información permitirá asignar los grupos de ligamiento a los cromosomas correctos y analizar los patrones de sustitución y recombinación cromosómica en generaciones avanzadas.
3. La citometría de flujo puede utilizarse como un método de preselección de los genotipos deseados en el programa de hibridación interespecífica entre *L. cicera* y *L. sativus* reduciendo así el número de plantas a analizar mediante hibridación in situ y aumentando la eficiencia del programa.
4. La utilización del índice de fluorescencia en el análisis GISH ha permitido obtener más información sobre el grado de interacción de los genomas de *P. sativum* y *P. fulvum* en la generación F2 que la obtenida por la observación visual de los resultados del GISH.
5. Se ha establecido la localización física de la subunidad 5S de rADN en *P. fulvum* lo que proporciona nuevos marcadores citogenéticos en esta especie.
6. El análisis GISH de las plantas de las generaciones F4 y F5 procedentes del cruzamiento *L. cicera* x *L. sativus*, permitió distinguir la cromatina de las líneas parentales presente en estas plantas. Sin embargo, el análisis GISH de las plantas de la generación F2 provenientes del cruzamiento *P. sativum* subsp. *sativum* x *P. fulvum*, no permitió identificar la cromatina proveniente de las líneas parentales. Estos resultados sugieren que la distancia genética entre *L. cicera* y *L. sativus* puede ser mayor que la que separa a *P. sativum* subsp. *sativum* de *P. fulvum*.

7. La presencia en homocigosis del cromosoma 6 recombinante entre *L. cicera* y *L. sativus* en el fondo genético de *L. sativus* podría estar asociada al crecimiento determinado crecimiento de las plantas en la generación F5 del cruzamiento entre *L. cicera* y *L. sativus*

## **Bibliografía**



## Bibliografía

- Abbo S., et al. (2011) Interspecific hybridization in wild *Cicer* sp. *Plant Breeding* 130:150-155.
- Abirached-Darmency M., et al. (2005) Variation in rDNA locus number and position among legume species and detection of 2 linked rDNA loci in the model *Medicago truncatula* by FISH. *Genome* 48:556-561.
- Addis G., Narayan R.K.J. (2000) Interspecific hybridisation of *Lathyrus sativus* (Guaya) with wild *Lathyrus* species and embryo rescue. *African Crop Science Journal* 8:129-136.
- Akiyama T., Jin S. (2007) Molecular cloning and characterization of an arginine decarboxylase gene up-regulated by chilling stress in rice seedlings. *Journal of Plant Physiology* 164:645-654.
- Akiyama Y., et al. (2010) Development of a genomic *in situ* hybridization (GISH) and image analysis method to determine the genomic constitution of festulolium (*Festuca x Lolium*) hybrids. *Breeding Science* 60:347-352.
- Ali S.M., et al. (1994) Current status and future strategy in breeding pea to improve resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica* 73:115-126.
- Armstead I.P., et al. (2001) Genetic and physical analysis of a single *Festuca pratensis* chromosome segment substitution in *Lolium perenne*. *Chromosoma* 110:52-57.
- Arzani A. (2006) Karyotype study in some *Lathyrus* L. accessions of Iran. *Iranian Journal of Science & Technology, Transaction A* 30:9-17.
- Badami P.S., et al. (1997) Interspecific hybridization between *Cicer arietinum* and *C. pinnatifidum*. *Plant Breeding* 116:393-395.
- Barilli E., et al. (2009) Identification of resistance to *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in *Pisum* spp. germplasm. *Field Crops Research* 114:198-203.
- Bashir A., et al. (1993) Flow cytometric DNA analysis of wheat-rye addition lines. *Cytometry* 14:843-847.
- Beaver J.S., Osorno J.M. (2009) Achievements and limitations of contemporary common bean breeding using conventional and molecular approaches. *Euphytica* 168:145-175.
- Bogdanova V.S., Kosterin O.E. (2006) A case of anomalous chloroplast inheritance in crosses of garden pea involving an accession of wild subspecies. *Doklady Biological Sciences* 406:44-6.
- Bogdanova V.S., et al. (2012) Inheritance and genetic mapping of two nuclear genes involved in nuclear-cytoplasmic incompatibility in peas (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 124:1503-1512.
- Cabrera A., et al. (2002) *In situ* comparative mapping (ISCM) of Glu-1 loci in *Triticum* and *Hordeum*. *Chromosome Research* 10:49-54.

- Campbell C.G. (1997) Grass pea. *Lathyrus sativus* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- Campbell C.G., et al. (1994) Current status and future strategy in breeding grasspea (*Lathyrus sativus*). *Euphytica* 73:167-175.
- Castro P., et al. (2011) A segregation distortion locus located on linkage group 4 of the chickpea genetic map. *Euphytica* 179:515-523.
- Cerbah M., et al. (1999) FISH Chromosome Mapping Allowing Karyotype Analysis in *Mendicago Truncatula* Lines Jemalong J5 and R-108-1. *Molecular Plant Microbe Interactions* 12:947-950.
- Conicella C., Errico A. (1990) Karyotype variation in *Pisum sativum* ect. *abyssinicum*. *Caryologia* 44:87-91.
- Contreras R.N., et al. (2012) Confirmation of hybridity using GISH and determination of 18S rDNA copy number using FISH in interspecific F-1 hybrids of *Tecoma* (Bignoniaceae). *Genome* 55:437-445.
- Cseh A., et al. (2009) Incorporation of a winter barley chromosome segment into cultivated wheat and its characterization with GISH, FISH and SSR markers. *Cereal Research Communications* 2009. 37:Suppl.
- Dávila-Rodríguez M.I., et al. (2009) Whole-comparative genomic hybridization in domestic sheep (*Ovis aries*) breeds. *Cytogenetic and Genome Research* 124:19-26.
- Day L. (2013) Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology* 32:25-42.
- Doležel J., Bartos J. (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95:99-110.
- Doležel J., Greilhuber J. (2010) Nuclear Genome Size: Are We Getting Closer? *Cytometry Part A* 77A:635-642.
- Doležel J., et al. (2012) Chromosomes in the flow to simplify genome analysis. *Functional & Integrative Genomics* 12:397-416.
- Errico A., et al. (1991) Karyotype studies on *Pisum fulvum* and *Pisum sativum*, using a chromosome image analysis system. *Genome* 34:105-108.
- Errico A., et al. (1996) Chromosome reconstructions in *Pisum sativum* through interspecific hybridization with *P. fulvum*. *Journal of Genetics and Breeding* 50:309-313.
- FAO. (2013) FAOSTAT, FAO, Italia.
- Fernández-Aparicio M., Rubiales D. (2010) Characterisation of resistance to crenate broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) in *Lathyrus cicera* L. *Euphytica* 173:77-84.
- Fernández-Aparicio M., et al. (2012) Escape and true resistance to crenate broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) in grass pea (*Lathyrus sativus* L.) germplasm. *Field Crops Research* 125:92-97.

- Fernández M., et al. (2005) 5S rDNA genome regions of *Lens* species. *Genome* 48:937.
- Ferreira T., Rasband W. (2012) The ImageJ user guide. IJ. 46r. pp. 187.
- Fondevilla S., et al. (2007a) Inheritance of resistance to *Mycosphaerella pinodes* in two wild accessions of *Pisum*. *European Journal of Plant Pathology* 119:53-58.
- Fondevilla S., et al. (2011) Confirmation that the *Er3* gene, conferring resistance to *Erysiphe pisi* in pea, is a different gene from *er1* and *er2* genes. *Plant Breeding* 130:281-282.
- Fondevilla S., et al. (2005) Response to *Mycosphaerella pinodes* in a germplasm collection of *Pisum* spp. *Plant Breeding* 124:313-315.
- Fondevilla S., et al. (2007b) Identification and characterization of sources of resistance to *Erysiphe pisi* Syd. in *Pisum* spp. *Plant Breeding* 126:113-119.
- Fondevilla S., et al. (2008a) Identification and validation of RAPD and SCAR markers linked to the gene *Er3* conferring resistance to *Erysiphe pisi* DC in pea. *Molecular Breeding* 22:193-200.
- Fondevilla S., et al. (2008b) Mapping of quantitative trait loci for resistance to *Mycosphaerella pinodes* in *Pisum sativum* subsp *syriacum*. *Molecular Breeding* 21:439-454.
- Fu S., et al. (2012) Molecular Cytogenetic Characterization of Wheat-*Thinopyrum elongatum* Addition, Substitution and Translocation Lines with a Novel Source of Resistance to Wheat Fusarium Head Blight. *Journal of Genetics and Genomics* 39:103-110.
- Fuchs J., et al. (1998) Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent *in situ* hybridization. *Chromosoma* 107:272-6.
- Gerlach W.L., Bedbrook J.R. (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* 7:1869-1885.
- Ghafoor A., McPhee K. (2012) Marker assisted selection (MAS) for developing powdery mildew resistant pea cultivars. *Euphytica* 186:593-607.
- Gil J., et al. (1996) Variability of some physico-chemical characters in desi and kabuli chickpea types. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71:179-184.
- Girma D., Korbu L. (2012) Genetic improvement of grass pea (*Lathyrus sativus*) in Ethiopia: an unfulfilled promise. *Plant Breeding* 131:231-236.
- Gopinathan M.C., et al. (1986) Interspecific hybridization between rice bean (*Vigna umbellata*) and its wild relative (*V. minima*): fertility-sterility relationships. *Euphytica* 35:1017-1022.
- Granati E., et al. (2003) Characterization of Italian and exotic *Lathyrus* germplasm for quality traits. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50:273-280.
- Grella E.R., et al. (2012) Variability of phenotypic and morphological characteristics of some *Lathyrus sativus* L. and *Lathyrus cicera* L. accessions and nutritional traits of their seeds. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:1687-1703.



- Gurung A.M., et al. (2002) Examination of *Pisum* and *Lathyrus* species as sources of ascochyta blight resistance for field pea (*Pisum sativum*). Australasian Plant Pathology 31:41-45.
- Hammett K.R.W., et al. (1994) Interspecific hybridization between *Lathyrus odoratus* and *L. belinensis*. International Journal of Plant Sciences 155:763-771.
- Hanbury C.D., Siddique K.H.M. (2000) Registration of 'Chalus' *Lathyrus cicera* L. Crop Science 40:1199.
- Hernández P., et al. (2002) Rapid verification of wheat-Hordeum introgressions by direct staining of SCAR, STS, and SSR amplicons. GENOME 45:198-203.
- Heywood V., et al. (2007) Conservation and sustainable use of crop wild relatives. Agriculture Ecosystems & Environment 121:245-255.
- Hillocks R.J., Maruthi M.N. (2012) Grass pea (*Lathyrus sativus*): Is there a case for further crop improvement? Euphytica 186:647-654.
- Humphreys M.W., et al. (1998) Physically mapping quantitative traits for stress-resistance in the forage grasses. Journal of Experimental Botany 49:1611-1618.
- ICARDA. (2007) Mega-Project 2 Integrated Gene Management: Conservation, Enhancement and Utilization of Agrobiodiversity in Dry Areas. Improving yield and nutritional quality of grass pea, in: ICARDA (Ed.), Annual Report 2006. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, ICARDA, Aleppo, Syria. pp. 57-58.
- Ishii T., et al. (2010) Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. Chromosome Research 18:821-831.
- Jiang J., Bikram G. (2006) Current status and future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. Genome 49:1054-1068.
- Jiang L., et al. (2012) Introgression of the heterologous nuclear DNAs and efficacious compositions from *Swertia tetraptera* Maxim. into *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. via somatic hybridization. Protoplasma 249:737-745.
- Junta de Andalucía. (2013) Estudios y Estadísticas, bimensual, Conserjería de Agricultura. Pesca y Medio Ambiente, Sevilla.
- Kenicer G.J., et al. (2005) Systematics and biogeography of *Lathyrus* (Leguminosae) based on internal transcribed spacer and cpDNA sequence data. American Journal of Botany 92:1199-1209.
- Klamt A., Schifino-Wittmann M.T. (2000) Karyotype morphology and evolution in some *Lathyrus* (Fabaceae) species of southern Brazil. Genetics and Molecular Biology 23:463-467.
- Kosterin O., Bogdanova V.S. (2008) Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum* L. as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. Genetic Resources and Crop Evolution 55:735-755.
- Krause D., Krause I. (2003) New green manuring *Lathyrus sativus* variety AC Greenfix available in USA. Lathyrus Lathyrism Newsletter:13-14.

- Kubaláková M., et al. (2005) Chromosome sorting in tetraploid wheat and its potential for genome analysis. *Genetics* 107:823-829.
- Kumar B.M., et al. (1998) Intercropping teak with *Leucaena* increases tree growth and modifies soil characteristics. *Agroforestry Systems* 42:81-89.
- Kumar S., et al. (2011) Genetic improvement of grass pea for low neurotoxin ( $\beta$ -ODAP) content. *Food and Chemical Toxicology* 49:589-600.
- Lee S.H., et al. (1999) Chromosomal localization of 5S rRNA gene loci and the implications for relationships within the *Allium* complex. *Chromosome Research* 7:89-93.
- Li Q., et al. (2004) A syntaxin 1, G $\alpha$ (o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: Analysis by quantitative immunocolocalization. *Journal of Neuroscience* 24:4070-4081.
- Ljosa V., Carpenter A.E. (2009) Introduction to the Quantitative Analysis of Two-Dimensional Fluorescence Microscopy Images for Cell-Based Screening, *PLoS Computational Biology*. pp. 1-10.
- Lysak M.A., et al. (1999) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics* 98:1344-1350.
- Mallikarjuna N., et al. (2006) Introgression of *Cajanus platycarpus* genome into cultivated pigeonpea, *C. cajan*. *Euphytica* 149:161-167.
- Marasek-Ciolakowska A., et al. (2012) Assessment of intergenomic recombination through GISH analysis of F1, BC1 and BC2 progenies of *Tulipa gesneriana* and *T. fosteriana*. *Plant Systematics and Evolution* 298:887-899.
- Martino T.d., et al. (2000) Distorted segregation resulting from pea chromosome reconstructions with alien segments from *Pisum fulvum*. *Journal of Heredity* 91 322-325
- Mohammed-Ali H.B., et al. (2000) DNA content, rDNA loci, and DAPI bands reflect the phylogenetic distance between *Lathyrus* species. *Genome* 43:1027-1032.
- Moreno R., et al. (2008) Origin of tetraploid cultivated asparagus landraces inferred from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers' polymorphisms. *Annals of Applied Biology* 153:233-241.
- Muehlbauer F.J., et al. (1994) Potential for wild species in cool season food legume breeding *Euphytica* 73:109-114.
- Murray B.G., Hammett K.R.W. (1989) *Lathyrus chloranthus* X *L. chrysanthus*: a new interspecific hybrid. *Botanical Gazette Chicago* 150:469-476.
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8:4321-4325.
- Nandini A.V., et al. (1997) Intra and interspecific variation in genome size in *Lathyrus* (Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 125:359-366.
- Nygren P., et al. (2012) Symbiotic dinitrogen fixation by trees: an underestimated resource in agroforestry systems? *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 94:123-160.

- Ochatt S.J., et al. (2013) Flow cytometry distinction between species and between landraces within *Lathyrus* species and assessment of true-to-typeness of in vitro regenerants. *Plant Systematics and Evolution* 299:75-85.
- Ochatt S.J., et al. (2004) Overcoming hybridization barriers between pea and some of its wild relatives. *Euphytica* 137:353-359.
- Padgett M.M. (1982) Technical and economic causes of U.S. corn and soybean yield chances, in: S. R. S. Statistical Research Division (Ed.), United States Department of Agriculture, Columbia, Missouri 65201.
- Pastor-Cavada E., et al. (2011) Effects of the addition of wild legumes (*Lathyrus annuus* and *Lathyrus clymenum*) on the physical and nutritional properties of extruded products based on whole corn and brown rice. *Food Chemistry* 128:961-967.
- Pedrosa-Harand A., et al. (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics* 112:924-933.
- Pérez-De-Luque A., et al. (2005) *Orobanche crenata* resistance and avoidance in pea (*Pisum* spp.) operate at different developmental stages of the parasite. *Weed Research* 45:379-387.
- Pfossen M., et al. (1995) Evaluation of sensitivity of Flow-cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat accition lines. *Cytometry* 21:387-393.
- Pita M., et al. (2003) Whole-comparative genomic hybridization (W-CGH): 1. The quick overview of repetitive DNA sequences on a genome. *Chromosome Research* 11:673-679.
- Pita M., et al. (2007) Whole-comparative genomic hybridization and "cell code" estimation: An application for assessment of cellular chimerism. *European Journal of Medical Research* 12:206-211.
- Pita M., et al. (2008) *Arcyptera fusca* and *Arcyptera tornosi* repetitive DNA families: whole-comparative genomic hybridization (W-CGH) as a novel approach to the study of satellite DNA libraries. *Journal of Evolutionary Biology* 21:352-361.
- Pita M., et al. (2009) A Highly Conserved Pericentromeric Domain in Human and Gorilla Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 126:253-258.
- Poulter R., et al. (2003) Qualitative resistance to powdery mildew in hybrid sweet peas. *Euphytica* 133:349-358.
- Prieto P., et al. (2001) Identification of intergenomic translocations involving wheat, *Hordeum vulgare* and *Hordeum chilense* chromosomes by FISH. *Hereditas* 135:171-174.
- Prieto P., et al. (2006) Development and cytogenetic characterisation of a double goat grass-barley chromosome substitution in tritordeum. *EUPHYTICA* 147:337-342.
- Rao S.C., et al. (2007) Interseeding novel cool-season annual legumes to improve bermudagrass paddocks. *Crop Science* 47:168-173.

- Rat'kin A.V., Tarasov V.A. (2010) Genetic control of biosynthesis of anthocyanins in sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.) flowers. Russian Journal of Genetics 46:431-438.
- Roux N., et al. (2003) Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. Plant Cell Reports 21:483-490.
- Rubiales D., et al. (2005) Search for resistance to crenate broomrape (*Orobancha crenata* Forsk.) in pea germplasm. Genetic Resources and Crop Evolution 52:853-861.
- Rubiales D., et al. (2006) Screening techniques and sources of resistance against parasitic weeds in grain legumes. Euphytica 147:187-199.
- Sadder M.T., Weber G. (2002) Comparison between genetic and physical maps in *Zea mays* L. of molecular markers linked to resistance against *Diatraea* spp. Theoretical and Applied Genetics 104:908-915.
- Said M., Cabrera A. (2009) A physical map of chromosome 4H(ch) from *H. chilense* containing SSR, STS and EST-SSR molecular markers. Euphytica 167:253-259.
- Said M., et al. (2012) Development and characterisation of structural changes in chromosome 3H(ch) from *Hordeum chilense* in common wheat and their use in physical mapping. Euphytica 188:429-440.
- Samatadze T.E., et al. (2005) Investigation of chromosomes in varieties and translocation lines of pea *Pisum sativum* L. by FISH, Ag-NOR, and differential DAPI staining. Russian Journal of Genetics 41:1381-1388.
- Samatadze T.E., et al. (2008) Comparative genome analysis in pea *Pisum sativum* L. varieties and lines with chromosomal and molecular markers. Russian Journal of Genetics 44:1424-1430.
- Schneider A., et al. (2003) Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. Plant Breeding 122:396-400.
- Schwarzacher T., et al. (1989) *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. Annals of Botany 64:315-324.
- Seijo G., et al. (2007) Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. American Journal of Botany 94:1963-1971.
- Shamir L., et al. (2010) Pattern recognition software and techniques for biological image analysis. PLoS Comput Biol 6:e1000974.
- Sharma A.R., Behera U.K. (2010) Green leaf manuring with prunings of *Leucaena leucocephala* for nitrogen economy and improved productivity of maize (*Zea mays*)-wheat (*Triticum aestivum*) cropping system. Nutrient Cycling in Agroecosystems 86:39-52.
- Singh S., et al. (2005) Introgression from wild *Cicer reticulatum* to cultivated chickpea for productivity and disease resistance. Plant Breeding 124:477-480.
- Skiba B., et al. (2003) Amplification and detection of polymorphic sequence-tagged sites in *Lathyrus sativus*. Plant Molecular Biology Reporter 21:391-404.

- Skiba B., et al. (2004a) Construction of a linkage map based on a *Lathyrus sativus* backcross population and preliminary investigation of QTLs associated with resistance to ascochyta blight. *Theoretical and Applied Genetics* 109:1726-1735.
- Skiba B., et al. (2004b) Genetics of resistance to *Mycosphaerella pinodes* in *Lathyrus sativus*. *Australian Journal of Agricultural Research* 55:953-960.
- Skiba B., et al. (2005) Construction of a cDNA library of *Lathyrus sativus* inoculated with *Mycosphaerella pinodes* and the expression of potential defence-related expressed sequence tags (ESTs). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66:55-67.
- Smartt J. (1979) Interspecific hybridization in the grain legumes—a review. *Economic Botany* 33:329-337.
- Soliman M.H., et al. (2001) A fertile amphiploid between durum wheat (*Triticum turgidum*) and the x Agroticum amphiploid (*Agropyron cristatum* x *T. tauschii*). *Hereditas* 135:183-6.
- Sun X.L., et al. (2012) Development of 161 novel EST-SSR markers from *Lathyrus sativus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 99:E379-E390.
- Tay J., et al. (2004) Luanco-INIA: nueva variedad de chícharo (*Lathyrus sativus* L.) de grano para la exportación. *Agricultura Técnica* 64:309-313.
- The Plant List. (2010) Version 1. Retrived 3-13-2013 <http://www.theplantlist.org>
- Tsegaye D., et al. (2005) Performance of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) somaclones at Adet, northwest Ethiopia. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*:5-6.
- Uhrin A., et al. (2012) Molecular cytogenetic characterization and SSR marker analysis of a leaf rust resistant wheat line carrying a 6G(6B) substitution from *Triticum timopheevii* (Zhuk.). *Euphytica* 186:45-55.
- Ur-Rehman S., et al. (2006) Influence of detoxified Indian vetch (*Lathyrus sativus* L.) on sensory and protein quality characteristics of composite flour chapatti. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:1172-1180.
- Vaz Patto M.C., et al. (2006a) Characterization of resistance to powdery mildew (*Erysiphe pisi*) in a germplasm collection of *Lathyrus sativus*. *Plant Breeding* 125:308-310.
- Vaz Patto M.C., et al. (2007) Resistance reaction to powdery mildew (*Erysiphe pisi*) in a germplasm collection of *Lathyrus cicera* from Iberian origin. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:1517-1521.
- Vaz Patto M.C., et al. (2009) Pre and posthaustorial resistance to rusts in *Lathyrus cicera* L. *Euphytica* 165:27-34.
- Vaz Patto M.C., et al. (2006b) *Lathyrus* improvement for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical breeding to marker assisted selection. *Euphytica* 147:133-147.
- Venora G., et al. (1991) Karyotyping in plants by an image analysis system. *Journal of Genetics and Breeding* 45:233-240.

- Vischi M., et al. (2003) Karyotype of Norway spruce by multicolor FISH. *Theoretical and Applied Genetics* 107:591-597.
- Vu H.Q., et al. (2012) Alien genes introgression and development of alien monosomic addition lines from a threatened species, *Allium roylei* Stearn, to *Allium cepa* L. *Theoretical and Applied Genetics* 124:1241-1257.
- Wei W.H., et al. (2003) Genomic in situ hybridization analysis for identification of introgressed segments in alloplasmic lines from *Zea mays* x *Zea diploperennis*. *Hereditas* 138:21-26.
- Wetzel J.B., Rayburn A.L. (2000) Use of fluorescence genomic *in situ* hybridization (GISH) to detect the presence of alien chromatin in wheat lines differing in nuclear DNA content. *Cytometry* 41:36-40.
- Yan Z.Y., et al. (2006) *Lathyrus sativus* (grass pea) and its neurotoxin ODAP. *Phytochemistry* 67:107-121.
- Yunus A.F., Jackson M.T. (1991) The gene pools of the grasspea (*Lathyrus sativus* L.). *Plant Breeding* 106:319-328.
- Yunus A.G., et al. (1991) Phenotypic polymorphism of six enzymes in the grasspea (*Lathyrus sativus* L.). *Euphytica* 55:33-42.
- Zatloukalová P., et al. (2011) Integration of genetic and physical maps of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome using flow-sorted chromosomes. *Chromosome Research* 19:729-739.
- Zaytseva O.O., et al. (2012) Phylogenetic reconstruction at the species and intraspecies levels in the genus *Pisum* (L.) (peas) using a histone H1 gene. *Gene* 504:192-202.
- Zhang L., et al. (1999) Direct measurement of recombination frequency in interspecific hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* using genomic *in situ* hybridization. *Heredity* 83:304-309.
- Zhao J., et al. (2010) Development and identification of a wheat *Psathyrostachys huashanica* addition line carrying HMW-GS, LMW-GS and gliadin genes. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57:387-394.
- Zhou J., et al. (2012) Characterization of a new T2DS.2DL-?R translocation *triticale* ZH-1 with multiple resistances to diseases. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:1161-1168.
- Zhuang L.F., et al. (2011) Identification and development of diagnostic markers for a powdery mildew resistance gene on chromosome 2R of Chinese rye cultivar Jingzhouheimai. *Molecular Breeding* 27:455-465.
- Zoller J.F., et al. (2001) Comparative genomic in situ hybridization (GISH) analysis on plant chromosomes revealed by labelled *Arabidopsis* DNA. *Chromosome Research* 9:357-375.
- Zonneveld B.J.M., Pollock W.I. (2012) Flow cytometric analysis of somaclonal variation in lineages of *Hosta* sports detects polyploidy and aneuploidy chimeras. *Plant Biology* 14:972-979.

- Zwierzykowski Z., et al. (1998) Genome recombination in intergeneric hybrids between tetraploid *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. *Journal of Heredity* 89:324-328.
- Zwierzykowski Z., et al. (2006) Genome balance in six successive generations of the allotetraploid *Festuca pratensis* x *Lolium perenne*. *Theoretical and Applied Genetics*:539-547.
- Zwierzykowski Z., et al. (2008) Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* x *Lolium perenne* revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). *Chromosome Research* 16:575-585.