

reno, 2008), pero podría llegar a cumplir en el futuro los criterios de la UICN, considerando el declive que viene sufriendo. En Miralsot, perdió parte de su hábitat hacia 2003 por otra transformación en regadío y en 2007 la construcción de un gasoducto afectó tanto a Velilla de Cinca como a Miralsot. La población más occidental, la de Monegrillo, junto a la carretera de Osera, estaba formada por 3 núcleos en el seguimiento de 2008, uno de los cuales, situado en la linde de un campo de cultivo de secano, tenía sólo dos matas. En el seguimiento de 2011, se constató que el agricultor había labrado un poco fuera del campo y las dos matas habían desaparecido. Parece que sería más sensato evitar que la especie llegue a entrar en las listas rojas que dedicarle mucho esfuerzo cuando ya esté dentro.

### Otras amenazas para la flora oscense que se han materializado

En los últimos años también se ha constatado la desaparición de núcleos de otras especies de flora amenazada en Huesca, como la de *Carex acutiformis* Ehrh., "vulnerable" en el Catálogo de Especies Amenazadas de Aragón, en una acequia de Puente la Reina de Jaca (Villar *et al.*, 2001), que se entubó en 2006 inmediatamente antes de edificar una urbanización en el solar adyacente, y la de *Epipogium aphyllum* Swartz, cuyo hábitat en



Fragmento de tallo de *Boleum asperum* rebrotando (detalle)

el hayedo de Linza, en Ansó (Benito, 2004), fue destruido en 2011 por el propio personal del Parque Natural de los Valles Occidentales, que supuestamente protegía este lugar, al ejecutar un sendero accesible para minusválidos, de hormigón, de 1,5 m de anchura, con bordillos.

JAVIER PUENTE ■

Servicio Provincial de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente de Huesca

## Bibliografía

- Benito, J. (2004). Apuntes sobre orquídeas ibéricas II. *Estudios del Museo de Ciencias Naturales de Alava* 18-19: 95-109.
- Ferrández, J.V. (2004). *Catálogo florístico de la comarca del Cinca Medio*. Centro de Estudios de Monzón y del Cinca Medio, Monzón.
- Moreno, J.C., coord. (2008). *Lista Roja 2008 de la flora vascular española*. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino), y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas, Madrid.
- Sainz, H., F. Franco & J. Arias (1996). *Estrategias para la conservación de la flora amenazada de Aragón*. Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón, Zaragoza.
- Villar, L., J.A. Sesé & J.V. Ferrández (2001). *Atlas de Flora del Pirineo Aragonés, vol. II*. Instituto de Estudios Altoaragoneses y Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón, Huesca.

## Código de barras genético de gramíneas modelo (*Brachypodium*): incremento de la biodiversidad

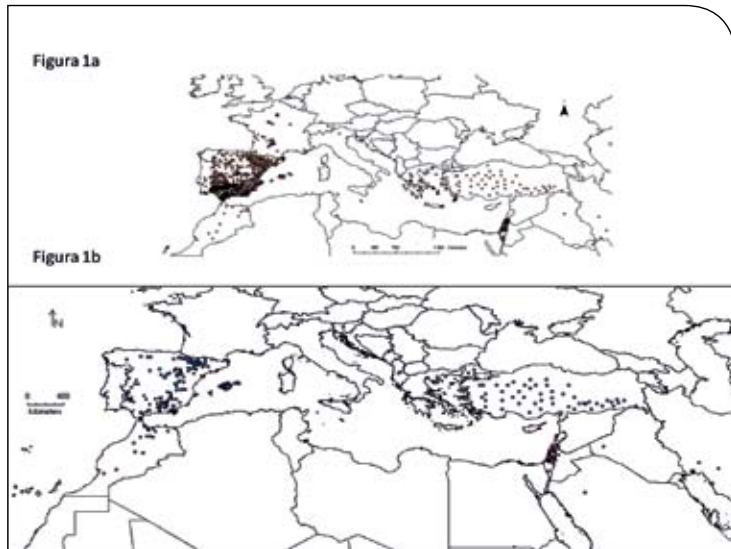
"Brachy", la gramínea anual autóctona *Brachypodium distachyon* s.l. ('sensu lato'), ampliamente distribuida en la región Mediterránea y utilizada desde hace más de dos décadas como planta modelo de cereales templados y en la lucha contra la erosión, consiste en realidad en tres especies distintas. Un código de barras genético basado en secuencias del ADN permite diferenciarlas. La separación molecular de la (auténtica) *B. distachyon* y de las dos nuevas especies escindidas del complejo, *B. stacei* y *B. hybridum*, supone un incremento de la diversidad en los países mediterráneos, entre ellos España. Estos estudios abren la puerta a la investigación de procesos de especiación y de programas de conservación utilizando los genomas completos de estas plantas ("landscape genomics").

### Criptoespecies, plantas modelos y los "Brachys"

En taxonomía se conocen como especies crípticas o 'criptoespecies' aquellas que durante un cierto tiempo han pasado desa-

percibidas por haber sido confundidas con otras especies próximas. Generalmente estas confusiones se deben al hecho de que unas y otras son morfológicamente muy parecidas y por ello han sido identificadas como una única especie. Sin embargo, pese a su gran similitud fenotípica, las criptoespecies y sus especies próximas son entidades distintas, evolutivamente diferentes. En plantas existen numerosos ejemplos de especies crípticas, cuyos descubrimientos sólo han visto la luz tras el desarrollo de estudios más profundos. Esto es lo que ha ocurrido con las tres especies del complejo *Brachypodium distachyon* s.l., ampliamente extendidas en la región Mediterránea.

A otro nivel, los organismos modelo son seres vivos que presentan una serie de atributos que los han hecho merecedores de estudios más avanzados, como consecuencia de su valor representativo de los principales linajes evolutivos del árbol de la vida, o por su interés económico, ecológico o biomédico. Estas especies



**Figura 1:** Distribución de las especies del complejo *Brachypodium distachyon* en la región Mediterránea. a) Distribución de *Brachypodium distachyon* 'sensu lato' (puntos naranjas), basada en 3.458 datos obtenidos de GBIF; b) distribuciones de *B. distachyon* (puntos azules), *B. stacei* (puntos rojos) y *B. hybridum* (puntos púrpura) tras la identificación de las muestras mediante el método *barcoding*.

modelo, entre las que se encuentran el briófito *Physcomitrella patens* o la planta *Arabidopsis thaliana*, han sido algunas de las primeras en disponer de su genoma completo secuenciado. El conocimiento exhaustivo de los genomas ha permitido el desarrollo posterior de análisis de genómica comparada y, a partir de éstos, de los de transcriptómica, proteómica y otros diversos estudios "ómicos" que han permitido entender procesos metabólicos, fisiológicos y del desarrollo de los organismos.

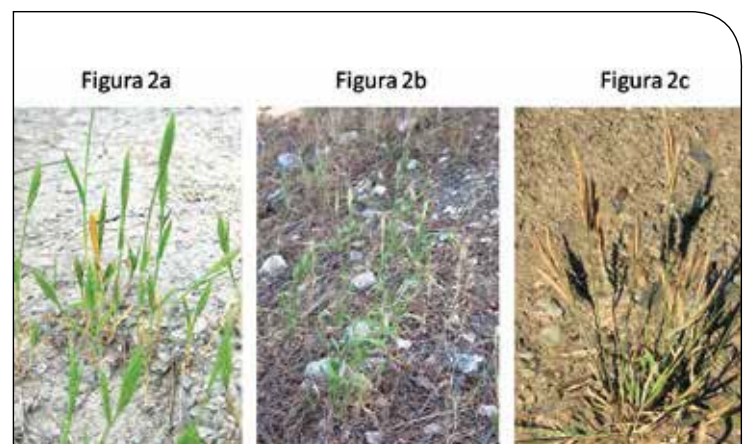
En plantas, al igual que en el resto de los seres vivos, las especies cuyos genomas completos han sido secuenciados son aquéllas de mayor interés económico, como las especies cultivadas (arroz, fresa, vid) o las forestales (chopo, pino). Sin embargo, el notable avance que están teniendo las técnicas de secuenciación masiva de genomas (Secuenciación de Próxima Generación o *Next Generation Sequencing*), ha propiciado que en el momento actual se estén obteniendo las secuencias completas de un alto número de genomas de plantas y de otros organismos (Catalán & González-Candelas, 2012). Pese a ello, algunas plantas de alto interés agronómico, como los trigos y la cebada -los cultivos de mayor consumo mundial-, no han sido aún completamente secuenciadas. Esto se debe a la complejidad de sus genomas, que presentan grandes tamaños genómicos, superiores al humano, y con una alta proporción de ADN repetitivo, lo que complica el ensamblaje de las secuencias. Es en estas situaciones donde las plantas modelo óptimas son aquellas que destacan precisamente por su simplicidad.

*Brachypodium distachyon*, una pequeña gramínea silvestre autóctona de la región Mediterránea, fue propuesta hace más de dos décadas como planta modelo de los cereales templados (Draper *et al.*, 2001). La elección de esta especie se basó en sus peculiares características biológicas, genómicas y evolutivas, al tratarse de una planta anual de ciclo corto (6 semanas), fácilmente cultivable, autógama (lo que favorece la obtención de líneas puras en sólo 2 generaciones), poseedora de uno de los genomas de gramíneas más pequeños ( $1C = 0.3$  pg) y compactos, y el hallarse evolutivamente más próxima a los trigos y la cebada que el arroz, la anterior gramínea modelo, lo que posibilitaba una potencial transferencia de resultados de interés agronómico más directa desde *B. distachyon* a los complejos cereales mediterráneos (Mur *et al.*, 2011). El éxito de "Brachy"

como nueva gramínea modelo quedó patente tras la secuenciación de su genoma completo por un consorcio internacional (IBI, 2010), y actualmente implica una ingente labor investigadora en más de 400 laboratorios de biotecnología y mejora vegetal del mundo. Además de servir de modelo a los importantes cereales templados, principales fuentes de alimento de la humanidad, también se utiliza como modelo para otras gramíneas de alto interés energético, como son las especies biocombustibles (Mur *et al.*, 2011). A ello se añade su interés ecológico, al ser empleada como planta adecuada para la lucha contra la erosión, por su fácil crecimiento y su rápida formación de cubierta vegetal, en especial en suelos de uso agrícola de la región Mediterránea.

### Estudios multidisciplinares demuestran que "Brachy" es un complejo triangular formado por tres especies

Hasta fechas relativamente cercanas se pensaba que la gramínea modelo *Brachypodium distachyon* consistía en una única especie que presentaba tres citotipos distintos con  $2n=10$ ,  $20$  y  $30$  cromosomas, que se asumió correspondían a individuos diploides, tetraploides y hexaploides de una misma planta (Robertson, 1981). Una búsqueda actual en la base de datos orgánica mundial GBIF ([www.gbif.org](http://www.gbif.org)) todavía adscribe a esta especie los más de 3.000 registros acumulados para su zona nativa mediterránea (Figura 1a). Sin embargo, en un estudio multidisciplinar reciente basado en análisis citogenéticos, morfológicos y evolutivos hemos demostrado que cada uno de esos tres citotipos corresponde en realidad a una especie distinta (Robertson, 1981). En este trabajo hemos puesto de manifiesto que el complejo triangular "Brachy" está formado por dos especies diploides con distinto número cromosómico básico, *B. distachyon* ( $2n=10$ ,  $x=5$ ) (cuyo genoma completo está secuenciado) y *B. stacei* ( $2n=20$ ,  $x=10$ ), y por una especie alotetraploide derivada de ambas, *B. hybridum* ( $2n=30$ ,  $x=5+10$ ), resultado de la hibridación pretérita de las dos diploides seguida de una posterior (alo)poliploidización (Figura 2).



**Figura 2:** Comparación de plantas de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. hybridum*. Individuos adultos de a) *Brachypodium distachyon*  $2n=10$  (Huesca: Puente de la Reina), b) *B. stacei*  $2n=20$  (Jaén: Ntra. Sra. de Tiscar), y c) *B. hybridum*  $2n=30$  (Girona: Cadaqués: Port Lligat).

Los análisis citogenéticos de hibridación *in situ* GISH y FISH y de tamaños genómicos han corroborado de forma conclusiva que los genomas de las dos especies diploides han participado en el origen del genoma mixto de la alotetraploide. Por su parte, los análisis filogenéticos de dos genes cloroplásticos (*ndhF*, *trnLF*) y de cinco genes nucleares (ITS, ETS, CAL, Gl, DGAT) han revelado que la especie más ancestral *B. stacei* y la más recientemente evolucionada *B. distachyon* emergieron de dos linajes independientes, confirmando sus contribuciones respectivas como donadores en genomas de *B. hybridum*. Por último, los

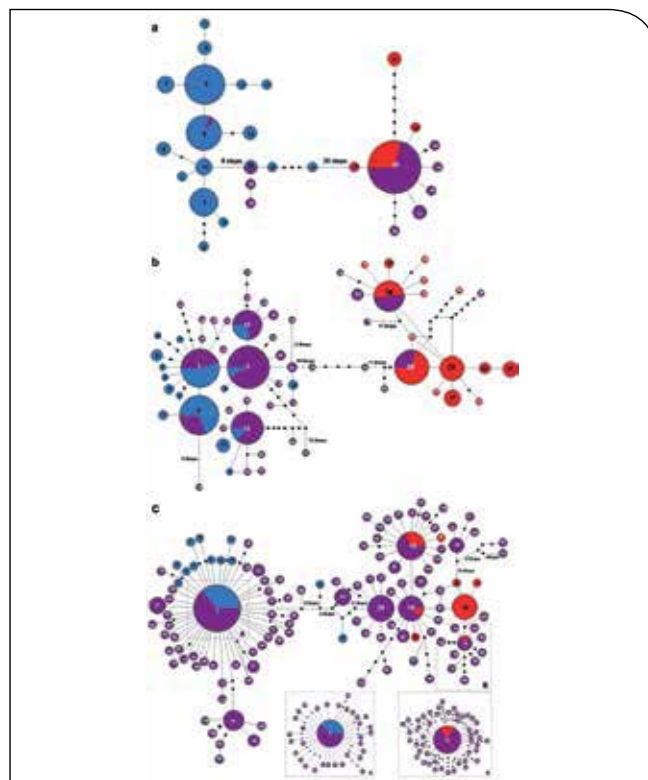
análisis estadísticos de caracteres morfométricos han mostrado que cinco caracteres (tamaños polínicos, de células guardianas de estomas, y de órganos florales (gluma superior, lema y arista)) permiten discriminar significativamente a las tres especies cuando crecen en condiciones controladas de invernadero (5). La importancia de estos hallazgos es doble, por un lado ponen en entredicho la identidad taxonómica de lo que hasta ahora se venía considerando una única planta modelo de cereales templados, y por otro contribuyen al incremento de la biodiversidad, al haberse descrito dos nuevas especies para la ciencia.

### El código de barras genético de secuencias de ADN permite diferenciar a las tres especies de "Brachys"

Pese a que las tres especies del complejo pueden ser diferenciadas mediante diversos caracteres fenotípicos y citogenéticos, su identificación directa no es siempre sencilla. Los individuos silvestres de estas tres especies 'crípticas' muestran solapamientos en algunos caracteres y las dos especies diploides tienen tamaños genómicos parecidos. Esto ha causado identificaciones falsas de las muestras en bancos de germoplasma e incluso errores en la selección de líneas (de procedencia silvestre) en experimentos biotecnológicos. Se ha comprobado que algunos datos extraños no se obtuvieron de la planta modelo *per se* *B. distachyon*, como se creía inicialmente, sino de alguna de sus especies próximas *B. stacei* o *B. hybridum*. El problema taxonómico en los herbarios y en otras bases de datos, como GBIF, es aún más complejo, dado que bajo el epíteto *B. distachyon* puede haber materiales de cualquiera de las tres especies. Esto nos llevó a plantearnos la necesidad de encontrar un código de barras genético (*barcoding*) que permitiese discriminar a las tres especies de "Brachys".

El Consorcio del Código de Barras de la Vida (*Consortium for the Barcode Of Life* (CBOL); [www.barcodinglife.com](http://www.barcodinglife.com)) pretende identificar, mediante códigos de barras genéticos basados en secuencias de ADN, a todos los organismos del planeta. El objetivo es emplear un método estandarizado, rápido y fiable, en el que unas secuencias específicas de una muestra permitan adscribirla a la especie a la que pertenece, clasificando así molecularmente a toda la biodiversidad. Para las plantas, el grupo botánico del CBOL y otros autores han recomendado el uso de ciertos genes cloroplásticos (*rbcl*, *matK*, *trnL*) y genes nucleares multicopia (ITS). Pero el problema subyacente cuando se analizan grupos recientemente evolucionados e híbridos, como es el caso del complejo triangular de los "Brachys", reside en la selección génica, ya que algunas moléculas pueden no ser suficientemente informativas para separar a las especies, o a que el híbrido, pese a coheredar biparentalmente copias génicas nucleares de ambas especies progenitoras, puede haber mantenido sólo las de una única especie. En nuestro método "barcoding" empleamos tres genes, uno cloroplástico (*trnL*) y dos nucleares, uno multicopia (ITS) y otro copia-simple (GIGANTEA (*G1*)) (López-Álvarez *et al.*, 2012).

El método propuesto ha mostrado un alto porcentaje de éxito en la identificación molecular de las tres especies. Las dos diploides *B. distachyon* y *B. stacei* pueden ser distinguidas e identificadas en el 100% de los casos con cualquiera de los tres genes, dado que presentan haplotipos de secuencias *trnL*, ITS o *G1* altamente divergentes (Figura 3). Por el contrario, *B. hybridum* sólo puede ser correctamente identificada mediante el uso combinado de secuencias *trnL* + ITS (90% de éxito en la identificación, cuando hereda una copia *trnL* de una especie progenitora y una copia ITS de la otra (o dos copias ITS de ambas al clonarlas)) o mediante el uso de secuencias *G1* clonadas (96.7% de éxito,



**Figura 3:** Redes de haplotipos del complejo *Brachypodium distachyon* mostrando las diferencias entre los haplotipos de *B. distachyon* (azul) y de *B. stacei* (rojo), y la similitud o identidad de los haplotipos de *B. hybridum* (púrpura) con respecto a los de una u otra especie progenitora. Genes: a) haplotipos *trnL*, b) haplotipos ITS, c) haplotipos *G1*. En cada red los números indican los distintos haplotipos encontrados y cada punto corresponde a la diferencia que hay entre haplotipos próximos separados por una mutación.

cuando cohereda y mantiene ambas copias *G1* de cada una de las especies progenitoras) (López-Álvarez *et al.*, 2012). Nuestro estudio también ha demostrado que *B. hybridum* se ha originado a partir de cruzamientos bidireccionales de *B. stacei* y de *B. distachyon* actuando tanto como progenitores maternos o paternos (aunque en la mayoría de los casos estudiados, el progenitor materno fue *B. stacei* y el paterno *B. distachyon*; Figura 3). Los resultados de nuestro estudio 'barcoding' de los "Brachys" nos ha permitido redefinir el mapa del complejo en la región Mediterránea (Figura 1b) (López-Álvarez *et al.*, 2012). Así, *B. distachyon* y *B. hybridum* son especies relativamente comunes y abundantes en toda la región, mientras que *B. stacei* es una especie rara, presente sólo en el sur, y cuyo estatus de conservación deberá ser analizado. Se observa una tendencia general de *B. distachyon* y *B. stacei* a vivir en zonas de, respectivamente, mayor y menor latitud y altitud, mientras que *B. hybridum* vive en zonas intermedias entre ambas y frecuentemente en simpatria con una u otra especie progenitora. Nuevos estudios filogeográficos y de modelización de nicho ecológico nos permitirán definir los parámetros espacio-temporales y ecológicos que han modelado la historia adaptativa de las poblaciones de las tres especies.

### Aplicación de los resultados y el interés de las nuevas especies modelo

Una de las aplicaciones inmediatas del código de barras propuesto es la revisión taxonómica de los herbarios y de los bancos de germoplasma, con el fin de identificar correctamente las muestras de las tres especies de "Brachys" y para que los nuevos datos resultantes puedan hacerse accesibles a la comunidad científica a través de estas colecciones o de las bases de datos de consulta y descarga *on line* (GBIF y otras). Igualmente, las nuevas identificaciones permitirán un correcto tratamiento taxonómico

en *Flora Ibérica* y la actualización de las floras mediterráneas. La importancia genómica de las tres especies de “*Brachys*”, caracterizadas por presentar genomas pequeños y con escaso ADN repetitivo, lo convierten en un grupo ideal para investigar los mecanismos de la especiación híbrida poliploide, paralela a la de los cereales más ampliamente cultivados (trigos). Ello ha propulsado nuevas iniciativas internacionales encaminadas a la secuenciación *de-novo* de los genomas completos de *B. stacei* y *B. hybridum* y a la re-secuenciación de 51 nuevas líneas de *B. distachyon*. Estos avances permitirán el desarrollo de estudios de genómica comparada y funcional en estas gramíneas diploides y poliploides y su potencial transferencia a otros cereales y forrajes. Pero además, nos permitirán analizar la genómica adaptativa de sus poblaciones silvestres ante distintos factores ambientales y abordar estudios de genómica del paisaje.

## Agradecimientos

Estos estudios han sido financiados por dos proyectos consecutivos de los Ministerios de Ciencia e Innovación (CGL2009-12955-C02-01) y Economía y Competitividad (CGL2012-39953-C02-01) y una beca doctoral FPI a Diana López-Álvarez. Queremos agradecer la colaboración de L. Mur, J. Allainguillaume, R. Hasterok, G. Jenkins, K. Lesniewska, I. Thomas, J. Vogel y A. Betekhtin, coautores de nuestros trabajos, y de otros colegas que nos proporcionaron muestras de “*Brachys*” de la región Mediterránea y que figuran en los agradecimientos de dichas publicaciones.

PILAR CATALÁN, DIANA LÓPEZ ÁLVAREZ Y MARIA LUISA LÓPEZ HERRANZ ■

Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Escuela Politécnica Superior de Huesca (Universidad de Zaragoza). Carretera de Cuarte, km 1. 22071 Huesca; E-mail: pcatalan@unizar.es; dianalopez430@gmail.com; mllopez@unizar.es

## Bibliografía

- Catalán, P. & F. González-Candelas (2012). Técnicas y marcadores filogenéticos. In: Zardoya, R. & P. Vargas P (eds.): *El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos*. pp. 533-542. Madrid.
- Catalán, P., J. Müller, R. Hasterok, G. Jenkins, L.A.J. Mur, T. Langdon, A. Betekhtin, D. Siwinska, M. Pimentel & D. López-Álvarez (2012). Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. *Annals of Botany* 109: 385–405.
- Draper, J., L.A.J. Mur, G. Jenkins, G.C. Ghosh-Biswas, P. Bablak, R. Hasterok & A.P.M. Routledge (2001). *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiology* 127: 1539–1555.
- International Brachypodium Initiative, IBI (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463: 763–768.
- López-Álvarez, D., M. L. López-Herranz, A. Betekhtin & P. Catalán (2012). A DNA barcoding method to discriminate between the model plant *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *PLoS ONE* 7(12): e51058.
- Mur, L., J. Allainguillaume, P. Catalán, R. Hasterok, G. Jenkins, K. Lesniewska, I. Thomas & J. Vogel (2011). Exploiting the *Brachypodium* Tool Box in cereal and grass research. *New Phytologist* 191: 334-347.
- Robertson, I.H. (1981). Chromosome numbers in *Brachypodium* Beauv. (Gramineae). *Genetica* 56: 55–60.

# Thymus caespititius en Extremadura

La especie *Thymus caespititius* Brot., Fl. Lusit. 1: 176 (1804) corresponde a un tomillo cespitoso, con tallo rastrero que coloniza suelos de escaso desarrollo, con abundancia de afloramientos rocosos, y que podríamos definir como una especie casi rupícola. Su área de distribución corresponde a la península Ibérica, Azores y Madeira. En Portugal aparecen poblaciones muy extendidas por la costa, desde el norte hasta por debajo de Lisboa. En España las poblaciones conocidas están asentadas en el sur y oeste del litoral gallego, junto con una población aislada en el Sistema Central, en las estribaciones más occidentales, en la sierra de Gata. Esta última población, poco estudiada, se extiende por los términos municipales de Descargamaría (Cc), Robledillo de Gata (Cc), Martiago (Sa) y El Saúgo (Sa), y serían las únicas citas conocidas para Extremadura y Castilla y León. El núcleo de esta población la encontramos en el paraje conocido como fuente Malena, extendiéndose, de una manera aproximada, en torno a un territorio de 600-800 ha; la población está muy dispersa y ocupando tan solo los espacios favorables para su desarrollo.

Se trata de una sierra de pizarras cambrianas, con fuerte pendientes, suelos de escaso desarrollo y afloramientos constantes de pizarras, formando tramos de amplias rocallas. La precipita-

ción media oscila en torno a los 900 mm. Las repoblaciones de *Pinus pinaster* de mediados del siglo XX cubre gran parte de la sierra. En algunas zonas, donde los afloramientos rocosos no permitieron los trabajos y el asentamiento de las repoblaciones, la vegetación autóctona pudo refugiarse. Este es el caso de un enebro (*J. oxycedrus*) en donde se da cobijo encinas (*Q. ilex*), brezos (*E. arborea*, *E. australis*), cantuesos (*Lavandula stoechas*) y jaguarzos (*Cistus populifolius*) además de *Th. caespititius*.

A falta de un mayor conocimiento y estudio de la especie, en el área mencionada podemos decir que es difícil la localización de plantas jóvenes aisladas (reproducción sexual) y la mayor parte de las localizaciones corresponden a ejemplares muy adultos, formando un manto a modo de “césped” encima de la roca o en lugares de escaso suelo; esta forma de crecimiento permite la formación de nuevos ejemplares que se desprenden de la planta madre (reproducción asexual) y en conjunto dan lugar a grandes matas. Los ejemplares con mayor desarrollo los hemos encontrado en torno a la carretera que cruza el área, así como en bordes de pista y algún cortafuego. Los trabajos de mantenimiento de estas infraestructuras (desbroces con maquinaria y en el caso de la carretera el uso de herbicida) están eliminando individuos que por otro lado podrían ser rescatados para traba-