



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN BOTÁNICA

MÉTODO DE REGENERACIÓN *EX SITU* DE ANCESTROS SILVESTRES DEL TRIGO DE ESPECIES DE *Triticum* y *Aegilops*

HEDILBERTO VELÁZQUEZ MIRANDA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

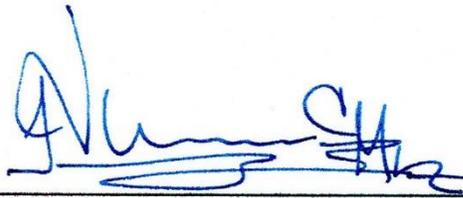
2016

La presente tesis titulada: **Método de regeneración *ex situ* de ancestros silvestres del trigo de especies de *Triticum* y *Aegilops*** realizada por el alumno: **Hedilberto Velázquez Miranda** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
BOTÁNICA

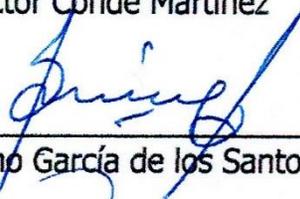
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. F. Víctor Conde Martínez

ASESOR



Dr. Gabino García de los Santos

ASESOR



Dr. Javier Suarez Espinosa

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto del 2016.

MÉTODO DE REGENERACIÓN *EX SITU* DE ANCESTROS SILVESTRES DEL TRIGO DE ESPECIES DE *Triticum* y *Aegilops*

Hedilberto Velázquez Miranda, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

Los ancestros silvestres del trigo, al estar presentes en el ciclo de evolución de este, se pueden utilizar como base para su mejoramiento genético, en busca de genes que confieran resistencia a plagas y enfermedades, y tolerancia a estrés abiótico. En el presente estudio, se desarrolló un método para llevar a cabo la regeneración *ex situ* de ancestros silvestres del trigo, simulando condiciones climáticas similares a las que están adaptadas. Se probaron 21 tratamientos, con cinco repeticiones respectivamente, en cada tratamiento se evaluaron tres efectos: vernalización de la semilla (VS), vernalización de la plántula (VP) y semilla sin vernalizar (SSV). En el experimento se trabajó con tres especies del género *Aegilops* (*Aegilops speltoides*, *Aegilops tauschii*, *Aegilops umbellulata*) y cuatro de *Triticum* (*Triticum urartu*, *Triticum spelta*, *Triticum dicoccoides*, *Triticum timopheevii*), las cuales se tomaron del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). La vernalización consistió en someter a las semillas y plántulas a un periodo determinado de tiempo, luz y frío; en el caso de las semillas fue durante 6 semanas, a 6 °C sin luz, y para las plántulas fue de 6 semanas a 6°C y 8 horas luz al día. Se realizó caracterización morfológica, en donde se evaluaron 10 descriptores; la vernalización de plántula, para la regeneración de ancestros silvestres del trigo, permitió recuperar significativamente el número de semillas más alto; las especies de *Aegilops* en el efecto SSV se obtiene significativamente el número de semillas más bajo; la concentración de azúcares totales fue significativamente mayor en plantas tratadas con vernalización, 21 mg g⁻¹ PF en VS y 18 mg g⁻¹ PF en VP. Los descriptores morfológicos que presentan

diferencias significativas bajo el efecto de vernalización, son días a espigamiento y floración 126 y 130 días, mayor que VS y SSV; el tamaño de espiga, gluma y barba es menor en el efecto de SSV que en VP y VS. Estos resultados con un nivel de significancia del 0.05. La especie que mejor se comportó bajo el efecto de VS fue *Aegilops tauschii*, con VP fueron *Aegilops speltoides* y *Aegilops tauschii* y para SSV fue *T. spelta*.

Palabras clave: vernalización plántula, azúcares solubles, parientes silvestres del trigo, semilla embebida.

***EX SITU* REGENERATION OF WILD ANCESTORS OF WHEAT OF *Triticum* and *Aegilops* SPECIES**

**Hedilberto Velázquez Miranda, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2016**

ABSTRACT

The wild ancestors of wheat, to be present in the evolution of this, can be used as a basis for breeding, looking for genes that confer resistance to pests and diseases, and tolerance to abiotic stress. In this study, a method was developed to carry out the *ex situ* regeneration wild ancestors of wheat, with similar climatic conditions to which they are adapted. 21 treatments were tested; with five replicates respectively in each treatment three effects were evaluated: seed vernalization (VS), seedling vernalization (VP) and seed without vernalization (SSV). The experiment was done with three species of the genus *Aegilops* (*Aegilops speltoides*, *Aegilops tauschii*, *Aegilops umbellulata*) and four of *Triticum* (*Triticum Urartu*, *Triticum spelta*, *Triticum dicoccoides*, *Triticum timopheevii*), which were taken from the Germplasm Bank of International Maize and Wheat Improvement Center. Vernalization consisted of subjecting seeds and seedlings to a period of light and cold; in the case of seeds it was for 6 weeks to 6 ° C without light, and for seedlings was 6 weeks to 6 ° C and 8 hours of light a day. In the morphological characterization was evaluated 10 descriptors; seedling vernalization, for the regeneration of wild ancestors of wheat, allowed to recover significantly higher number of seeds, *Aegilops* species in the SSV effect is significantly obtained the lowest number of seeds and the total sugars concentration was significantly higher in plants with vernalization. 21 mg g⁻¹ PF in VS y 18 mg g⁻¹ PF in VP. The morphological descriptors with significant differences under the effect of vernalization, are days to spiking and flowering days 126 and 130, higher than VS and SSV; the size of

spike glume and beard is lower in the effect of SSV than VP and VS. With a significance level of 0.05. The best performing species under the effect of VS was *Aegilops tauschii* with VP were *Aegilops tauschii* and *Aegilops speltoides* and SSV was and *T. spelta*.

Keywords: seedling vernalization, soluble sugars, wild relatives of wheat, imbibed seed.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados y al CONACYT por permitirme realizar y culminar mis estudios de Maestría.

Al Dr. Víctor Conde por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por el conocimiento y los consejos brindados, por siempre creer en mí, gracias por toda la confianza y amistad.

A los integrantes de mi consejo particular Dr. Gabino García de los Santos y Dr. Javier Suarez Espinosa por su contribución a culminar mis estudios, sus recomendaciones, su apoyo, confianza y amistad.

Al Dr. Thomas Payne y la Dra. Bibiana Espinosa por brindarme la oportunidad de superarme profesionalmente, gracias por su apoyo y amistad.

Al CIMMYT y en especial al equipo de trabajo del Banco de Germoplasma de Trigo, Rocío Quiroz, Fernando Rodríguez, Jesús Perales, Clara Torres, Octavio Frutero, Sergio González y demás personas que colaboraron en esta investigación.

Al todo el personal que conforma el grupo del Laboratorio de Bioquímica de Botánica.

DEDICATORIAS

A dos grandes seres que en todo momento me han acompañado incondicionalmente, en mis triunfos y fracasos, siempre brindándome su apoyo comprensión, cariño y amor, a mis queridos padres Irene Miranda y Hedilberto Velázquez gracias por todo. Los amo.

A mis apreciables hermanas Delia y Rosalba porque siempre creyeron en mí y han estado apoyándome. Las amo.

Mis queridas sobrinas y ahijadas Fernanda, Fátima y Jocelin por todo su cariño y alegría que me han dado y que me motivan para continuar cosechando logros.

A mi amigo y hermano Luis por su apoyo inigualable, sus consejos y regaños. Gracias por tu amistad y confianza.

A mis amigos y compañeros que aprecio y quiero mucho por sus ánimos e incentivar me día a día a terminar este logro.

A aquél ser motivo de inspiración en la culminación de este reto. En donde quiera que estés, gracias.

CONTENIDO

PORTADA.....	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vii
DEDICATORIAS	viii
CONTENIDO	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE CUADROS	xii
1. INTRODUCCION.....	1
2. MARCO TEORICO.....	2
2.1 Importancia del trigo en México y a nivel mundial.....	2
2.2 Origen y distribución del trigo.....	4
2.3 Morfología del genero <i>Triticum</i> y <i>Aegilops</i>	5
2.3.1 <i>Triticum</i>	5
2.3.2 <i>Aegilops</i>	6
2.4 Mejoramiento genético del trigo en México.....	7
2.5 Importancia de los ancestros silvestres del trigo y su preservación.....	9
2.5.1 Resistencia o tolerancia al estrés biótico.....	10
2.5.1.1 <i>Triticum</i>	10
2.5.1.2 <i>Aegilops</i>	11
2.5.2 Tolerancia al estrés abiótico.....	11
2.6 Habito de crecimiento.....	11
2.7 Requerimientos de vernalización y fotoperiodo.....	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	14
4. HIPOTESIS.....	14

5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1	Características del material biológico	15
5.2	Tratamientos	15
5.2.1	Vernalización de semilla (VS)	15
5.2.2	Vernalización de plántulas (VP).....	16
5.2.3	Semilla sin vernalizar (SSV).....	16
5.3	Caracterización Morfológica	16
5.4	Caracterización Bioquímica	17
5.5	Diseño del Experimento	18
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
7.	CONCLUSIONES	30
8.	LITERATURA CITADA.....	31
9.	ANEXOS	36
9.1	Anexo I.....	36
9.2	Anexo II.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de trigo en México. Fuente: SIAP, 2014.	3
Figura 2. Relaciones evolutivas entre el genoma de los trigos harineros y duros y su relación con las especies silvestres diploides (Shewry, 2009).....	5
Figura 3. Efecto de las especies (V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7) sobre la altura de planta, el tamaño de espiga y pedúnculo. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.....	20
Figura 4. Efecto de la Vernalización VS, VP, SSV sobre la altura de planta y el tamaño de espiga, barba y pedúnculo. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.....	21
Figura 5. Efecto de las combinaciones especies V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 y vernalización VS, VP y SSV sobre la altura de planta y el tamaño de espiga, gluma, barba y pedúnculo en <i>Triticum</i> y <i>Aegilops</i> . Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.....	22
Figura 6. Efecto de las especies V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 sobre los días a floración y espigamiento, del genero <i>Triticum</i> y <i>Aegilops</i> . Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.2.....	23
Figura 7. Efecto de la vernalización VS, VP y SSV sobre los días a floración y espigamiento, del genero <i>Triticum</i> y <i>Aegilops</i> . Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.....	24
Figura 8. Efecto de las especies sobre el número de semillas del genero <i>Triticum</i> y <i>Aegilops</i> . Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05	25

Figura 9. Efecto de la vernalización VS, VP, SSV sobre el número de semillas del genero <i>Triticum</i> y <i>Aegilops</i> . Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.....	25
Figura 10. Efecto de la vernalización VS, VP, SSV para cada especie V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 en el número de semillas de los generos de <i>Triticum</i> y <i>Aegilops</i> . Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.	27
Figura 11. Efecto de las especie V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 en cada vernalización VS, VP, SSV sobre el número de semillas de los géneros de <i>Triticum</i> y <i>Aegilops</i> . Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.....	28
Figura 12. Efecto de VS, VP y SSV sobre la concentración de azúcares totales (mg g ⁻¹ PF) en hojas de especies del genero <i>Aegilops</i> y <i>Triticum</i> en estado vegetativo. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.	29
Figura 13. Efecto de las especies V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 del genero <i>Aegilops</i> y <i>Triticum</i> sobre la concentración de azúcares totales (mg g ⁻¹ PF) en hojas de en estado vegetativo. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.....	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descriptores morfológicos de <i>Triticum</i> y <i>Aegilops</i>	17
Cuadro 2. Descriptores no afectados con el tipo de vernalización	19

1. INTRODUCCION

Los cereales son las especies cultivadas más importantes en el mundo en lo que se refiere a superficie de cultivo, producción y distribución geográfica. El trigo fue domesticado hace 10,000 años y desde entonces se ha extendido por todo el mundo para convertirse en uno de los principales cultivos (Dubcovsky and Dvorak, 2007). Así mismo, desde el origen de la agricultura, el trigo ha sido el cultivo más sembrado por el hombre en grandes extensiones y cantidades (Moreno *et al.*, 2001). Las especies del género *Triticum* han tenido su centro de diferenciación en el denominado Creciente Fértil, la cual es un área en donde actualmente se localiza Israel, Jordania, Líbano, el oeste de Siria, suroeste de Turquía y llegando a lo largo de los ríos Tigris y Éufrates hasta Irak e Irán (Nesbitt, 2001).

La mejor estrategia para el mejoramiento de trigo es utilizar los recursos genéticos de los ancestros silvestres como *Triticum dicoccoides*, *Triticum urartu*, *Aegilops tauschii* y algunos otros. Su domesticación ha causado erosión genética considerable la cual se observó durante los procesos modernos de mejoramiento genético lo que causó una mayor susceptibilidad y vulnerabilidad a cambios del ambiente, plagas y enfermedades (Peng *et al.*, 2011).

Los ancestros silvestres del trigo al estar presentes en el ciclo de evolución de este, se pueden utilizar como base para su mejoramiento genético, en busca de genes que confieran resistencia a plagas, enfermedades y tolerancia a estrés abiótico. Estas especies han permanecido hasta la actualidad como pastos silvestres sin ningún método de regeneración, por lo que dichas características se fueron perdiendo ya que las primeras formas de cultivo de trigo fueron esencialmente especies que los agricultores seleccionaron de las poblaciones silvestres, posiblemente debido a su rendimiento superior y descriptores genéticos que los iban diferenciando de sus ancestros silvestres (Shewry, 2009).

Las semillas del genero *Triticum* y *Aegilops* son difíciles de coleccionar, incrementar y mantener, ya que tienden a desgranarse más que las de las variedades comunes. Su regeneración en campo es complicada porque pueden convertirse en malezas introducidas, por tal motivo muchas especies están en riesgo de desaparecer aunado a los cambios en el uso de la tierra en sus centros de origen donde se distribuyen de manera natural (Dubcovsky and Dvorak, 2007).

La vernalización en los ancestros silvestres del trigo es necesaria para la actividad metabólica, aunque las semillas secas no pueden ser vernalizadas. Por lo que las semillas de muchos cereales pueden ser embebidas con una cantidad de agua que sea suficiente para la vernalización, pero a la vez insuficiente para la germinación (Purvis, 1961).

2. MARCO TEORICO

2.1 Importancia del trigo en México y a nivel mundial

El trigo es el tercer grano de mayor producción en el mundo con un volumen de 728,966 Mt después del arroz con 740,956 Mt y el maíz con 1,021,616 Mt. La superficie cosechada a nivel mundial es de 221,616 MHa con un rendimiento promedio de 3.3 ton/Ha. Los principales países productores por volumen de producción son China, India, Federación Rusa y Estados Unidos de América, los cuales aportan el 46% de la producción de trigo de todo el mundo, mientras que México participa con el 0.5 % (FAOSTAT, 2014).

Para el año 2050 se estima que habrá más de 8 mil millones de personas en el mundo y por lo tanto se tendrá que aumentar la producción alrededor del 30 % (Rosegrant y Agcaoili, 2010); pero por otro lado se pronostica que en los siguientes 40 años la producción de trigo en países en vías de desarrollo podría reducirse en 29%, debido a la amenaza de las enfermedades (Singh *et al.*, 2008; Rosegrant y Agcaoili, 2010).

En México el grano de mayor producción es el maíz con un volumen de 23,273 Mt, seguido del sorgo 8,394 Mt y el trigo 3,669 Mt con un valor superior a los 12 mil millones de pesos. La superficie cosechada del cultivo de trigo a nivel nacional es de 706 MHa con un rendimiento promedio de 5.2 ton/Ha. El 79 % del volumen de la producción total en el país se obtiene de cuatro estados: Sonora, Baja California, Guanajuato y Sinaloa (Figura 1). De las 6,400 Mt que se consumen al año solo el 57 % se produce y el resto se tiene que cubrir con importaciones (SIAP, 2014).

Además, alrededor de 92 % del volumen de la producción de trigo se emplea de manera directa para consumo humano, 5% para consumo animal, 2 % se utiliza como semilla y 1 % en mermas (SIAP, 2014).

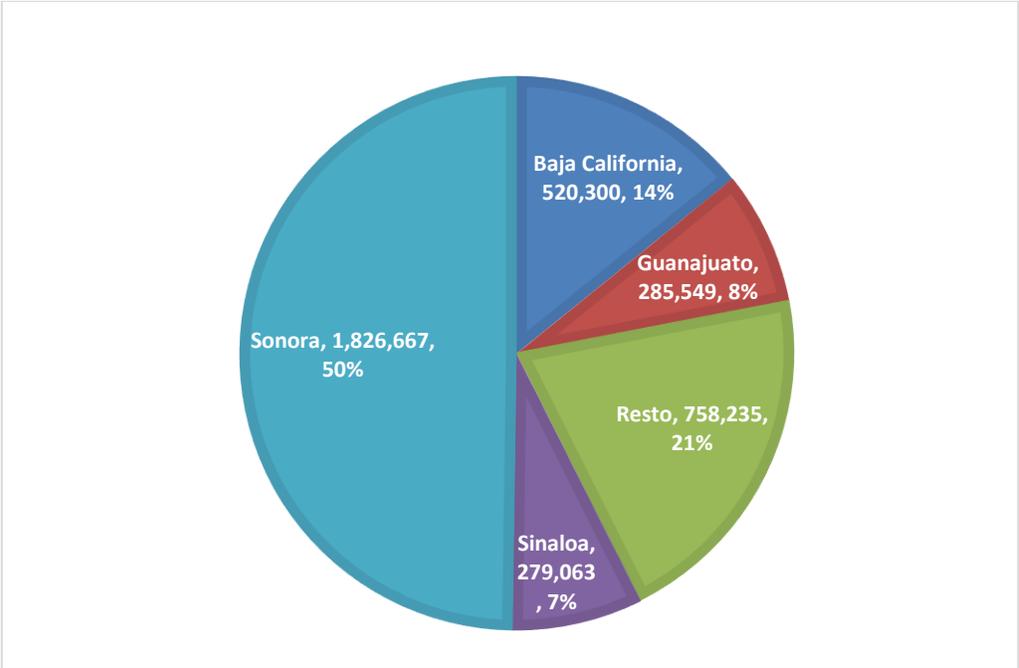


Figura 1. Producción de trigo en México. Fuente: SIAP, 2014.

2.2 Origen y distribución del trigo

A la familia Poaceae (Gramineae) pertenecen los cultivos como el maíz, el trigo y el arroz; dentro de esta familia está la tribu Triticeae y en la cual se encuentran los géneros *Triticum* y *Aegilops* que comprenden tanto especies silvestres como cultivadas diploides, tetraploides y hexaploides, dependiendo del número de genomas que constituyen su número básico duplicado de siete cromosomas (Villaseñor y Espitia 2000). El género *Aegilops* tiene 22 especies mientras que el *Triticum* lo componen alrededor de 30 diferentes especies y subespecies de trigo. En la actualidad solamente se han reconocido 16 especies y el resto son consideradas como silvestres (Moreno *et al.*, 2001).

El genoma de *Triticum aestivum* está compuesto por 21 pares de cromosomas (genoma AABBDD), en la Figura 2 se muestra como fue el proceso de evolución del trigo; es en una especie hexaploide formada por la fusión genética de la especie silvestre diploide *Aegilops tauschii*, también llamada *Aegilops tauschii*, quien es el donante del genoma DD; y la especie tetraploide *Triticum turgidum* donante del genoma AABB (*Triticum turgidum ssp. dicoccon* y *dicoccoides*). La especie *Triticum turgidum* se formó por la fusión genética del juego de cromosomas AA dados por el ancestro silvestre *Triticum urartu* y por el juego de cromosomas BB, que en los últimos estudios moleculares parecen indicar que es herencia de la especie *Aegilops speltoides* (Devorak *et al.*, 1998; Levy and Feldman 2002; Petersen *et al.*, 2006; Devorak *et al.*, 2011).

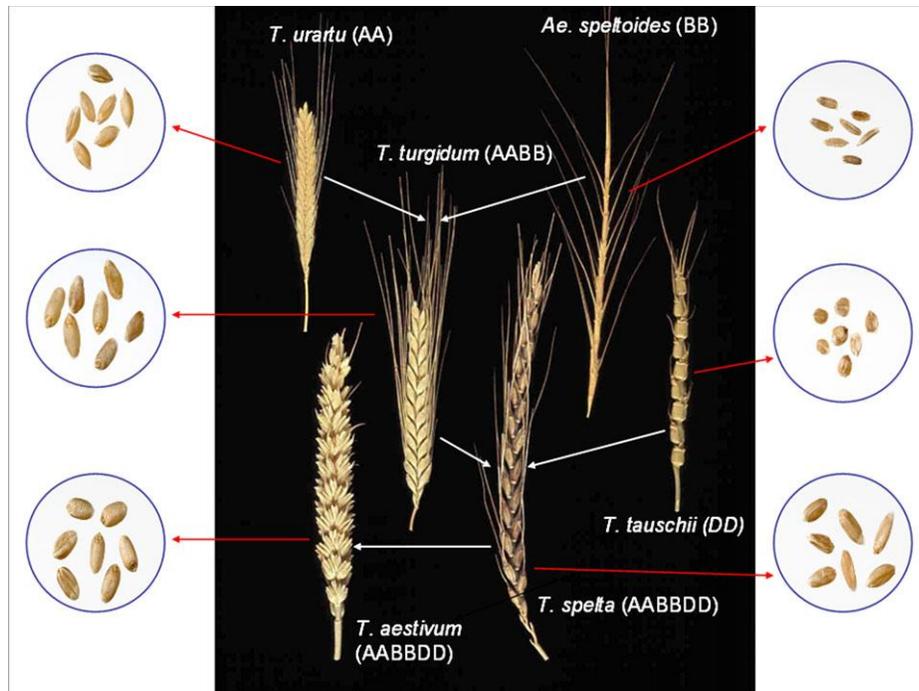


Figura 2. Relaciones evolutivas entre el genoma de los trigos harineros y duros y su relación con las especies silvestres diploides (Shewry, 2009).

2.3 Morfología del genero *Triticum* y *Aegilops*

2.3.1 *Triticum*

Las plantas del genero *Triticum* son anuales con hojas gruesas y espigas compactas, sus tallos erectos con una ramificación múltiple en la base de la corona con alturas variables en las especies y variedades modernas cultivadas. Las hojas tienen una forma linear-lanceolada (alargadas, rectas y terminadas en punta) con vaina, lígula y aurículas bien definida son de 1 a 2 cm de ancho; las espigas en su mayoría mide de 5 a 12 cm de largo, en ocasiones hay espigas mayores a los 12 cm. Los entrenudos del raquis son de 3 a 6 mm de largo; muestran de 2 a 5 espiguillas son anchas, glabras o pubescentes, la inflorescencia es una espiga compuesta por un raquis (eje escalonado) o tallo central de entrenudos cortos, sobre el cual van dispuestas 20 a 30 espiguillas en forma alterna y laxa o compacta,

presenta aristas largas o bien completamente ausentes que se le da el nombre de pelonas; de 2 a 5 espiguillas, multiflorales, solitarias y localizadas en forma plana en cada unión o articulación del raquis; la raquilla se desarticula por arriba de las glumas, en medio de las florecillas o en forma total. Las glumas son rígidas, aquilladas, con más de tres nervaduras y su pico termina abruptamente en forma de pico o dentada y con una o varias aristas; las lemas son anchas, aquilladas, muy asimétricas, con nervaduras múltiples y con una terminación abrupta en forma de pico o en una arista (Villaseñor y Espitia 2000).

El trigo posee una raíz fasciculada o raíz en cabellera, es decir, con numerosas ramificaciones, las cuales alcanzan en su mayoría una profundidad de 25 cm, llegando algunas de ellas hasta un metro de profundidad. El tallo es una caña hueca con 6 nudos que se alargan hacia la parte superior, alcanzando entre 0,5 a 2 metros de altura, es poco ramificado. Los granos son carióspsides que presentan forma ovalada con sus extremos redondeados. El germen sobresale en uno de ellos y en el otro hay un mechón de pelos finos. El resto del grano, denominado endospermo, es un depósito de alimentos para el embrión. A lo largo de la cara ventral del grano hay un surco: una invaginación de la aleurona y todas las cubiertas. En el fondo del surco hay una zona vascular fuertemente pigmentada. El pericarpio y la testa, juntamente con la capa aleurona, conforman el salvado de trigo. El grano de trigo contiene una parte de la proteína que se llama gluten. El gluten facilita la elaboración de levaduras de alta calidad, que son necesarias en la panificación (Robles, 1979).

2.3.2 Aegilops

Las plantas del genero *Aegilops* son anuales, de pequeña a mediana talla, con tallos erectos o geniculado-ascendentes. Hojas con limbo plano, corto y relativamente ancho; lígula

membranosa, corta (menor de 0.5 mm) y truncada. Inflorescencia en espiga terminal densa, con el raquis excavado, desprendiéndose entera en la madurez. Espiguillas hinchadas, plurifloras, de inserción dorsal. Con dos glumas, subiguales, igual o menor que la lema, coriáceas, de dorso redondeado y ápice truncado con 1-6 aristas o dientes escábridos. Lema membranosa en la parte inferior y coriácea en la superior, aristada o dentada. Pálea casi de la misma longitud que la lema, membranosa, elíptica, con 2 quillas ciliadas y ápice bidentado. Espiga oval-lanceolada, corta (puntos de inserción de las espiguillas próximos). Glumas con 4-6 aristas largas, y estas son tan largas como las aristas de las lemas. Espiga subcilíndrica, alargada (puntos de inserción de las espiguillas más separados), con la espiguilla final fértil y las aristas de las glumas de esta espiguilla son más largas que las de las espiguillas laterales. Glumas con 2-3 aristas largas, y estas son más largas que las aristas de las lemas (Kole, 2011).

2.4 Mejoramiento genético del trigo en México

El mejoramiento de trigo en México inicio a mediados de los años 40's, ha utilizado germoplasma diverso para incorporar genes favorables. Se seleccionaron segregantes en invierno y verano con diferentes fotoperiodos y se encontró la expresión de los genes Ppd1 y Ppd2 (Rajaram, 1995), obteniendo variedades con amplia adaptación en diversas partes del mundo, la roya del tallo se controló genéticamente en 1955 por medio del gen Sr2 (Borlaug, 1968). Los genes Rht1 y Rht2 provenientes de Norin 10 y son los que otorgan la fuente de enanismo, así que se logró reducir la altura de planta y en los años 60's liberaron cerca de 15 variedades semienanas que superaron las 4.5 t ha⁻¹ en el Noroeste de México pudiendo llegar hasta 8 t ha⁻¹ (Borlaug, 1969).

Durante los años ochenta se puso en práctica la recombinación de trigos de hábito de primavera con los de invierno, así como trigo y cebada, y se intensificó la recombinación del trigo con especies compatibles como *Triticum tauschii*, *Thinopyrum* spp. y *Triticum dicoccoides*, lo que permitió mejorar adaptación, estabilidad, rendimiento, resistencia a enfermedades, resistencia horizontal a la roya de la hoja (Villarreal, 1995).

Los resultados del mejoramiento genético de trigo en México se pueden sintetizar en la liberación de 234 variedades que han sido la plataforma de la producción nacional (Villaseñor, 2015).

En 2010 se impulsó el financiamiento y el mejoramiento genético del trigo mediante el apoyo del Fondo Sectorial SAGARPA CONACYT Proyecto Núm. 146 788, con una meta de liberar 25 variedades; en este proyecto de investigación denominado “sistema de mejoramiento genético para generar variedades resistentes a royas, de alto rendimiento y alta calidad para una producción sustentable de trigo en México” participan 44 investigadores del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas (COLPOS). Hasta el día de hoy se han probado líneas en más de 180 ambientes y ya se liberaron 14 variedades: Anatoly C20011, Bacali F2011, Luminaria F2013, Baroyeca Oro C2013, Quechhueca Oro C2013, Borlaug 100 F2014 y Alondra F2014. Están en proceso de registro: Bacorehuis “s”, Conatrigo “s”, Barobampo “s”, Conasist “s”, Don Carlos “s”, Valles “s” y Acolhua “s”. En el año 2014 y 2015 estaban en proceso de caracterización 24 líneas candidatas para liberar las mejores y más sobresalientes durante los años 2015 y 2016, se estima que sean entre 9 y 12 variedades (Villaseñor, 2015).

2.5 Importancia de los ancestros silvestres del trigo y su preservación

Los ancestros silvestres de plantas domesticadas son especies vegetales que tienen una relación genética a la especie domesticada. La diversidad genética que tienen acumulada los ancestros silvestres a través de millones de años de evolución natural es mayor que la de las especies domesticadas, la cual la han ido adquiriendo de fragmentos de esta diversidad con ayuda del hombre y su desarrollo durante los miles de años de su domesticación; los ancestros silvestres son organismos adaptados a los ambientes de su centro de origen en donde los domesticados no podrían sobrevivir (Casas y Parra 2007).

El flujo de genes que existe entre las poblaciones de ancestros silvestres y plantas domesticadas enriquece la variedad de plantas cultivadas, de allí la importancia de la incorporación de diversidad genética natural a las poblaciones de plantas domesticadas ya que es una fuente primaria de agrobiodiversidad que la agricultura tradicional ha conservado a través del tiempo de domesticación (Casas y Parra 2007).

La gran importancia de los ancestros del trigo, radica principalmente en que son una fuente de recursos genéticos que pueden ser utilizados como base para el mejoramiento genético ya que han sido cruzados con especies domesticadas y han encontrado variedades con resistencia a enfermedades, temperaturas extremas y tolerancia a estrés hídrico y por salinidad del suelo (Skovmand *et al.*, 1992).

En la actualidad una de las preocupaciones con los recursos genéticos es la pérdida de diversidad biológica debido a que existen escasas políticas de conservación, lo que involucra que se pierdan ancestros silvestres e incluso especies domesticadas de alguna región. Tal preocupación ha incentivado a programas mundiales de conservación *ex situ*, en

donde se incluye la red de bancos de germoplasma del Grupo Consultivo de Investigación Agrícola Internacional, en México se localiza uno de ellos (Casas y Parra 2007), en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) se encuentra el Banco de Germoplasma de maíz y trigo el cual alberga la colección más grande del mundo de estos dos cultivos.

La baja disponibilidad que se tiene de los recursos genéticos de los géneros de *Triticum* y *Aegilops* es su principal limitante, ya que su centro de origen se ubica en el Creciente Fértil, en donde solo en algunas regiones se pueden encontrar de forma natural creciendo como pastos silvestres. Sin embargo, en otros países como Irak, Siria y Turquía se están extinguiendo debido a los cambios climáticos, cambios de uso del suelo y a la situación social, política y económica (Dubcovsky and Dvorak, 2007).

2.5.1 Resistencia o tolerancia al estrés biótico

2.5.1.1 *Triticum*

Las especies diploides del genero *Triticum* como el *T. urartu*, *T. boeoticum* y *T. monococcum*, se han encontrado que tienen genes que confieren resistencia en lo que se refiere a roya de la hoja. Mientras que en las especies tetraploides como *T. dicoccoides* (resistencia a mildiu y roya de la hoja), *T. dicoccum* (resistencia a mildiu y roya de la hoja y el tallo), *T. carthlicum*, *T. polonicum* la cual se presume tiene la capacidad de producir un rendimiento más alto, con un número mayor de granos por espiga y además con la característica de producir hijuelos. En lo que respecta a las especies *T. timopheevi* y *T. araraticum*, que igual son tetraploides se confiere una valiosa resistencia a las principales enfermedades fúngicas. *T. araraticum* se encontró que tiene resistencia a la pudrición de la raíz (Monneveux *et al.*, 2000).

2.5.1.2 *Aegilops*

Todas las especies diploides así como las tetraploides del genero *Aegilops*, son resistentes a todas las enfermedades foliares, *Ae. ventricosa* muestra resistencia a *Septoria nodorum*, la especie *Ae. Speltoides* presenta algunas fuentes de resistencia a la sarna. La resistencia a *Heterodera avenae* está presente en *Ae. comosa*, *Ae. uniaristata* y *Ae. umbellulata*. *Ae. tauschii*, *Ae. cylindrica*, *Ae. ventricosa* y *Ae. geniculata* muestran resistencia a la mosca de Hessian, y al insecto verde, *Schizaphis graminum* (Monneveux *et al.*, 2000).

2.5.2 Tolerancia al estrés abiótico

Las especies más tolerantes a sequia son: *Ae. tauschii*, *Ae. umbellulata*, *Ae. columnaris*, *Ae. peregrina* y *Ae. triuncialis*, mientras que las especies más resistente al frio son *Ae. Tauschii*. y *T. timopheevi* siendo esta última un poco menos resistente que la primera; en lo que respecta a resistencia a condiciones de calor *Ae. speltoides* y *Ae. tauschii* se reportan como la más resistente; y las especies *T. dicoccum* y *T. dicoccoides*, en condiciones de campo son las que presentan mayor tolerancia a concentraciones elevadas de sal (Monneveux *et al.*, 2000).

2.6 Habito de crecimiento

En general las especies del género *Triticum* se clasifican de acuerdo a su hábito de crecimiento en hábito invernial, habito primavera y los facultativos; todas las especies del genero *Aegilops* de este tipo. Las especies de hábito invernial por lo regular se siembran en otoño, las plántulas emergen y amacollan antes de invierno pasando por un tiempo de inactividad durante el periodo de frio. Las plantas reanudan su crecimiento rápido en primavera y maduran en verano después de un periodo total de 9 a 11 meses. Además de que requieren de un periodo de vernalización antes de que pueda cambiar de fase vegetativa

a la fase reproductiva, la cual concluye con el embuche, espigamiento, floración y formación de semillas (Hanson, 1986).

Las especies de hábito de primavera tienen un ciclo de crecimiento continuo generalmente de 3 a 6 meses; sin un periodo de inactividad, pueden sobrevivir a temperaturas bajas sostenidas. En las regiones donde se presenta el invierno severo estos trigos se siembran en primavera después de la última helada. En otras áreas especialmente aquellas con clima Mediterráneo se siembran en otoño y crecen durante el invierno con temperaturas moderadas. Los trigos facultativos son intermedios en lo que se refiere a la tolerancia al frío de los ciclos de invierno y primavera. Sin embargo, son diferentes a los de invierno, ya que no requieren de la vernalización para florecer (Huerta y González 2000).

2.7 Requerimientos de vernalización y fotoperiodo

La fenología de trigo varía de manera considerable dependiendo del genotipo, la ubicación y la fecha de siembra, la respuesta a la vernalización es uno de los factores más importantes que afectan la adaptación ambiental de trigo; el sistema de clasificación primavera - invierno usado universalmente se relaciona más con el sistema de siembra a la que una línea de trigo se adapta que a la especificidad de la respuesta de una línea a la vernalización (Wang, 1995).

Los ancestros silvestres de los cereales domesticados están adaptados a las condiciones ambientales de la región del Creciente Fértil. Los primeros cereales que se domesticaron en esta región, aun conservaban los caracteres de fotoperiodo y vernalización de sus progenitores. Pero durante el proceso de domesticación y la expansión de la agricultura en el Creciente Fértil se fueron seleccionaron nuevos caracteres adaptables a nuevos entornos.

La reducción de la respuesta al fotoperiodo es importante en Europa y América del Norte, donde las estaciones de crecimiento son largas (Peng *et al.*, 2011).

La vernalización se define como la promoción o aceleración de la capacidad de floración por medio de un tratamiento de frío. Por lo tanto, un tratamiento de frío o vernalización no induce primordios florales, más bien acelera la capacidad para la posterior floración. La vernalización tampoco se refiere a la ruptura de la dormancia por el frío, como la formación de yemas florales después de la Vernalización o la promoción de la germinación de las semillas por el frío, conocida como estratificación (Michaels and Amasino, 2000).

Algunas plantas requieren tratamiento de vernalización, esto es exposición a bajas temperaturas durante un cierto periodo, para inducir la floración. Esta característica al parecer es la que protege a la flor de la destrucción por las temperaturas frías del invierno (Golovnina, 2010). Los requerimientos de vernalización y la sensibilidad a la cantidad de luz (fotoperiodo) son caracteres que se han venido heredando a las especies de los géneros de *Triticum* y *Aegilops* por parte de sus ancestros silvestres (Dubcovsky 2006).

La duración del tiempo de vernalización como la cantidad de luz y temperatura para promover la floración dependerá en su mayoría de la especie, el tiempo de vernalización por lo general va de 1 a 3 meses, el rango de temperaturas van de 1 a 7° C y en algunas especies hasta 10° C y en otros cereales, sin embargo, se pueden vernalizar a temperaturas tan bajas como - 6 ° C (Michaels and Amasino, 2000).

Muchos trigos que están adaptados a la siembra de primavera (trigo de primavera) pueden responder a la vernalización y trigos adaptados a siembra de otoño (trigo de invierno) varían marcadamente en su respuesta a la vernalización (Wang, 1995).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer un método que permita la regeneración *ex situ* de ancestros silvestres del trigo de especies de los géneros *Triticum* y *Aegilops*.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar dos métodos de vernalización para regeneración *ex situ* de ancestros silvestres del trigo de 4 especies de *Triticum* y 3 especies del *Aegilops*.

Caracterizar las especies del género *Triticum* y *Aegilops* mediante descriptores morfológicos y bioquímicos.

4. HIPOTESIS

El método de regeneración permitirá obtener semilla viable y en cantidad suficiente de las especies de estudio con alguno de los dos métodos de vernalización.

La caracterización morfológica y bioquímica de las especies de los géneros *Triticum* y *Aegilops*, permite la diferenciación entre ellas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Banco de Germoplasma e invernaderos del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), y en el Laboratorio de Bioquímica “María Luisa Ortega Delgado” del Colegio de Postgraduados, Texcoco, Estado de México, México.

5.1 Características del material biológico

Se utilizaron tres especies taxonómicas del género *Aegilops* (*Aegilops speltoides*, *Aegilops tauschii*, *Aegilops umbellulata*) y cuatro de *Triticum* (*Triticum urartu*, *Triticum spelta*, *Triticum dicoccoides*, *Triticum timopheevii*) las cuales se encuentran conservadas a -18° C en el Banco de Germoplasma del CIMMYT, se utilizaron 75 semillas por cada especie, 5 semillas por repetición.

5.2 Tratamientos

5.2.1 Vernalización de semilla (VS)

Se colocaron cinco semillas de cada especie en cajas de Petri sobre papel filtro Watman #4, se adicionaron 0.5 g de agua y se selló con Parafilm M®; se cubrieron con papel para mantener un ambiente de oscuridad y se metieron a una vernalizadora (marca CONVIRON modelo PGC20) por seis semanas a 6 ° C. Previamente, a la semilla se le aplicó un tratamiento químico con una mezcla de agroquímicos (Vitavax 200 SA, Dividend XL RTA, ADH y agua). Después de las seis semanas la semilla se sembró en macetas de 8 pulgadas de diámetro, se utilizó un sustrato de una mezcla esterilizada de peat moss y vermiculita o perlita (2:1), se colocaron en invernadero a una temperatura mínima de 10 °C por la noche y máxima de 27 °C en el día con ocho horas de iluminación al día y después de seis

semanas de haber sido trasplantadas se aumentó a 12 horas; la humedad relativa del invernadero se mantuvo entre 50 y 70 %.

5.2.2 Vernalización de plántulas (VP)

Se colocaron 5 semillas tratadas de cada especie en cajas de Petri sobre papel filtro Watman #1, se saturó con agua estéril y se ingresaron a una germinadora (Biotronette Plant Growth Chamber, marca Lab-Line Eqptruments, Inc.); después de tres días, la semilla germinada se sembró en macetas de plástico de (7 x 7 cm), utilizando como sustrato una mezcla esterilizada de peat moss y vermiculita o perlita (2:1), a los cinco días las plántulas se metieron a una vernalizadora (marca CONVIRON modelo PGC20) por seis semanas a 6° C y 8 horas luz. Las plántulas se trasplantaron de la misma forma que en el caso de la vernalización de semilla y se colocaron en el mismo invernadero con las condiciones de temperatura y humedad antes mencionadas.

5.2.3 Semilla sin vernalizar (SSV)

La semilla se sembró directamente en las macetas utilizando el mismo método que en los dos experimentos anteriores y se colocaron en el mismo invernadero con las mismas condiciones de temperatura y humedad. En el Cuadro 2 se resumen los tratamientos.

5.3 Caracterización Morfológica

Los descriptores morfológicos a evaluar de *Triticum* y *Aegilop* se seleccionaron de Bioversity International (IBPGR, 1978) y se muestran en el Cuadro 1. Los datos se tomaron revisando diariamente las plantas durante todo el desarrollo del cultivo desde la etapa vegetativa hasta la madurez de cosecha y se registraron con una tableta (Samsung Galaxy Note I sistema operativo Android 4.1.2) en la aplicación KDSmart específica para toma de datos en campo.

Cuadro 1. Descriptores morfológicos de *Triticum* y *Aegilops*.

Fase vegetativa	Descripción
Porte	Rastrero, arbustivo, erecto
Fase reproductiva	
Días espigamiento	Días transcurridos desde la siembra hasta el día en el que la espiga está completamente formada.
Tipo de espiga	Fusiforme, club
Tipo de barba	Pelona, intermedia, barbada
Pubescencia de gluma	Presente, ausente
Desarrollo de grano	
Días madurez	Días transcurridos desde la siembra hasta el día en el que el grano alcanza su madurez fisiológica.
Color de barba	Blanca, Amarilla, Roja, Negra
Color de gluma	Blanca, Amarilla, Roja, Negra
Color de tallo	Blanco, Amarillo, Rojo
Tamaño de espiga, barba, gluma y pedúnculo	Distancia expresada en centímetros (cm)
Altura	Altura desde la base de la planta hasta final de la espiga.
Semilla	
Número de semillas	Total
Color de semilla	Rojo, Blanco, Amarillo, Purpura

5.4 Caracterización Bioquímica

Se colecto una hoja en la etapa vegetativa, de cada muestra, y se conservaron a -20 °C después se congelaron a 80 °C para ser liofilizadas durante 72 horas, por último, las hojas secas se colocaron en tubos de 2 mL, se les coloco un balín de acero inoxidable de 4 mm de diámetro y se molieron en un agitador orbital a 400 rpm hasta obtener un polvo fino.

Se cuantificaron azúcares totales por el método colorimétrico de antrona, según lo descrito por Montreuil *et al.* (1997). Para determinar azúcares totales en las muestras estudiadas se tomó como referencia una curva de calibración de glucosa (1 mg mL^{-1}).

Se pesaron 10 mg de hoja y se realizaron 3 extracciones sucesivas con 8 ml de etanol al 80 % en baño maría con una temperatura de $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$, los extractos se concentraron por evaporación en una estufa a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se re-suspendieron en 1 mL de agua destilada y se hizo una dilución 1:10. Se colocaron 300 μL de solución estándar o muestra en tubos de ensaye y 300 μL de agua destilada, a un tubo se agregó 600 μL de agua (tubo blanco). A todos los tubos se les agregó 3 mL de solución de antrona fría, se metieron en hielo y se mezclaron durante 3 minutos; los tubos se pasaron a un baño de agua a $92 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, para detener la reacción se regresaron al hielo (10 minutos) y se midió la absorbancia de cada tubo a 625 nm en un espectrofotómetro JENWAY 6305. Los cálculos se realizaron utilizando la curva estándar de calibración y se expresaron en mg mL^{-1} de PF (peso fresco).

5.5 Diseño del Experimento

Se probaron 21 tratamientos con 5 repeticiones en cada tratamiento, el diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos, en donde los niveles fueron las siete especies diferentes y los factores el tipo de vernalización (VS, VP y SSV). Se realizaron análisis estadísticos en SAS (versión 9.1) y comparaciones de medias con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 2 se observan los descriptores evaluados en los cuales no se presentaron variaciones en las siete especies de ancestros silvestres del trigo, después de someterlos a los tres efectos (VS, VP, y SV). Estos resultados coincidieron con lo encontrado por Peng *et. al.* (2011), en su estudio sobre la evolución del trigo, *T. spelta* fue el único ancestro que no presento barba (pelona) en la espiga y la gluma de color blanca, solo *Aegilops umbellulata* tuvo la barba y gluma fue de color blanca, en lo que respecta en el color de semilla *Aegilops speltoides* fue morada y el resto café.

Cuadro 2. Descriptores no afectados con el tipo de vernalización VS y VP.

	Tipo de barba	Color de barba	Color de gluma	Color de semilla
<i>Aegilops speltoides</i>	Barbada	Rojo	Rojo	Purpura
<i>Aegilops tauschii</i>	Barbada	Rojo	Rojo	Café
<i>Aegilops umbellulata</i>	Barbada	Blanco	Blanco	Café
<i>T. urartu</i>	Barbada	Rojo	Rojo	Café
<i>T. dicoccoides</i>	Barbada	Rojo	Rojo	Café
<i>T. spelta</i>	Pelona		Blanco	Café
<i>T. timopheevii</i>	Barbada	Rojo	Rojo	Café

En la Figura 3 se observa que las especies *T. spelta* y *T. timopheevii* son significativamente más altas que el resto mientras que la más pequeña es la *Aegilops umbellulata*. En lo que respecta al tamaño de espiga, las especies presenta diferencia significativa a excepción de V2 y V6, siendo *T. spelta* la que presenta el tamaño de espiga

más grande de manera significativa; respecto al tamaño de gluma las especies que no presentaron diferencias significativas fueron V1 y V4. *T. dicoccoides* tiene los valores de gluma y barba significativamente más grandes que el resto de las especies, mientras que para el tamaño del pedúnculo la especie V6 presenta de manera significativa los valores más altos seguida por la especie V1 y V4. Los resultados anteriores con un nivel de significancia del 0.05.

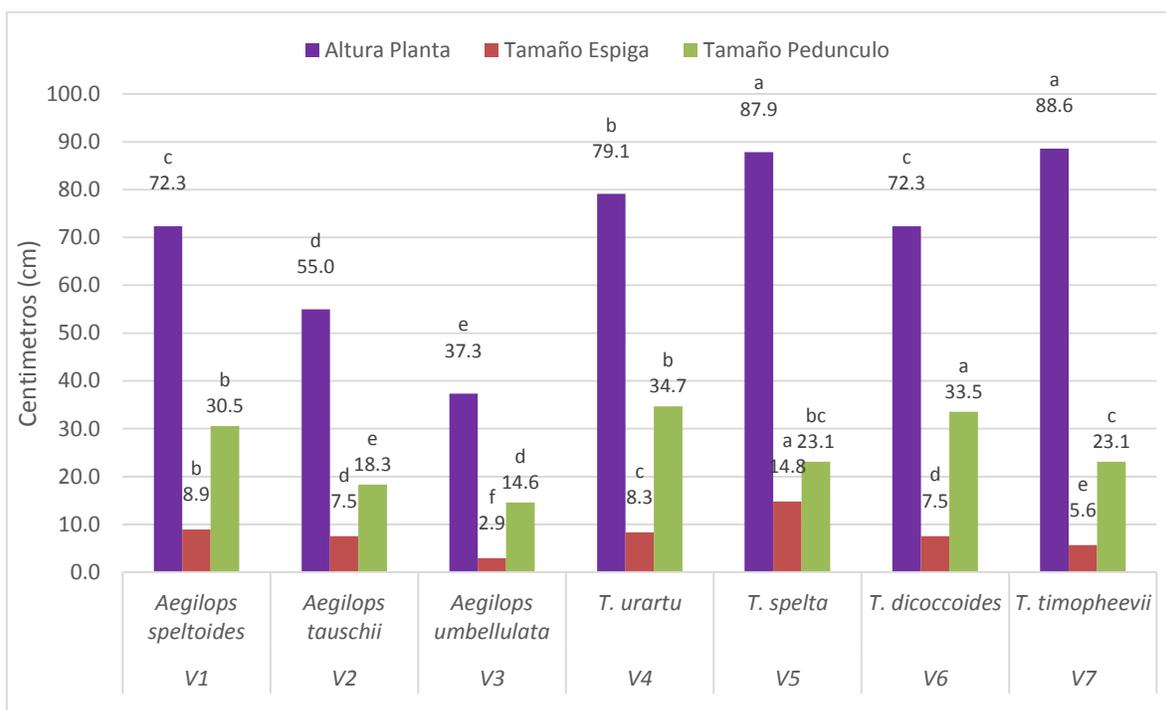


Figura 3. Efecto de las especies (V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7) sobre la altura de planta, el tamaño de espiga y pedúnculo. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.

En la Figura 4 se muestra la comparación del efecto de los diferentes tipos de vernalización en las variables de estudio. El tamaño de espiga y gluma fue mayor significativamente con el efecto de SSV, la barba con SSV y VS, y respecto al tamaño de pedúnculo se obtuvo con VS. En los datos de altura de planta observamos que el efecto de VS y SSV son mejores que VP los cuales son significativamente diferentes, los resultados anteriores con un nivel

de significancia del 0.05, esto se puede explicar debido a que el someter las plantas a un periodo de frío se busca la promoción de la floración y en este tiempo se retrasa el crecimiento de la planta pudiendo generar más follaje, algo que no ocurre con las plantas bajo los efectos de VS y SSV en donde siguen creciendo de manera normal y (Wang *et al.*, 1995).

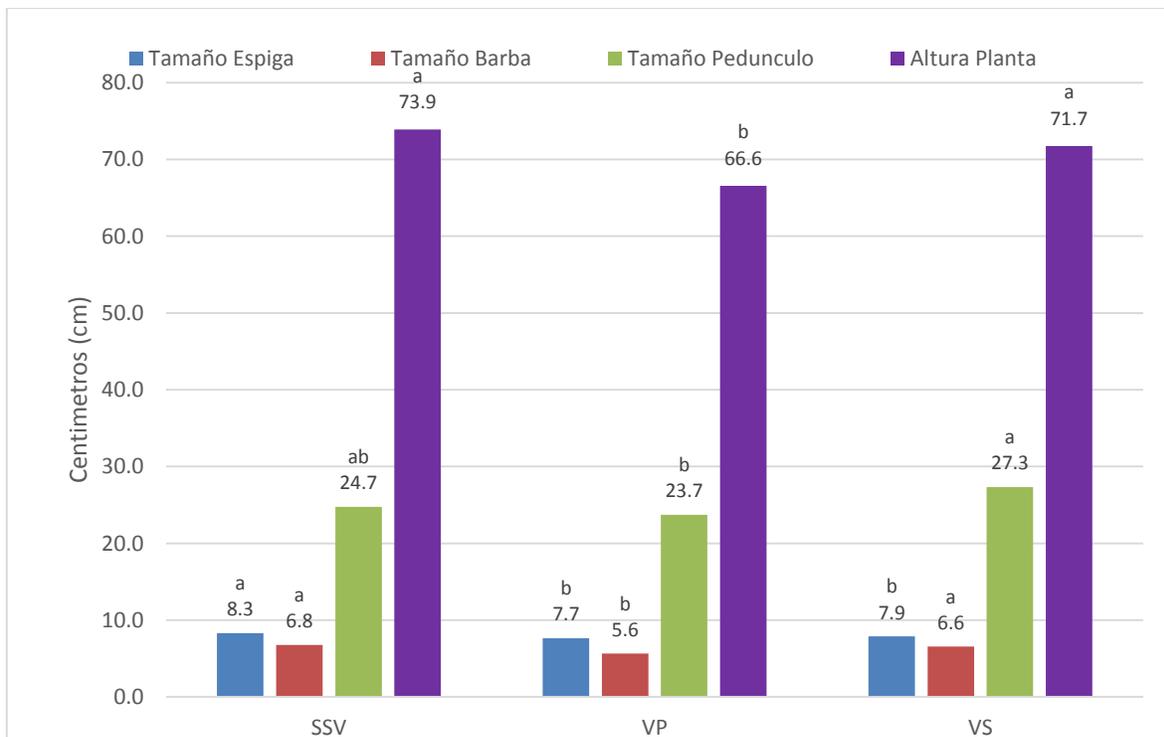


Figura 4. Efecto de la Vernalización VS, VP, SSV sobre la altura de planta y el tamaño de espiga, barba y pedúnculo. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.

En las Figuras 5 se observa que el efecto de las combinaciones de la especie con la vernalización en el tamaño de espiga, la especie *T. spelta* con SSV, VS y VP tiene los valores de altura significativamente mayores y *Ae. Umbellulata* con SSV, VS y VP los menores. Respecto al efecto de las combinaciones en la altura de la planta se observa que el género *Triticum* con SSV, VS y VP presenta diferencias significativas siendo estas las más

altas, seguidas por *Ae. speltoides* con SSV, VS y VP. Los resultados anteriores con un nivel de significancia del 0.05.

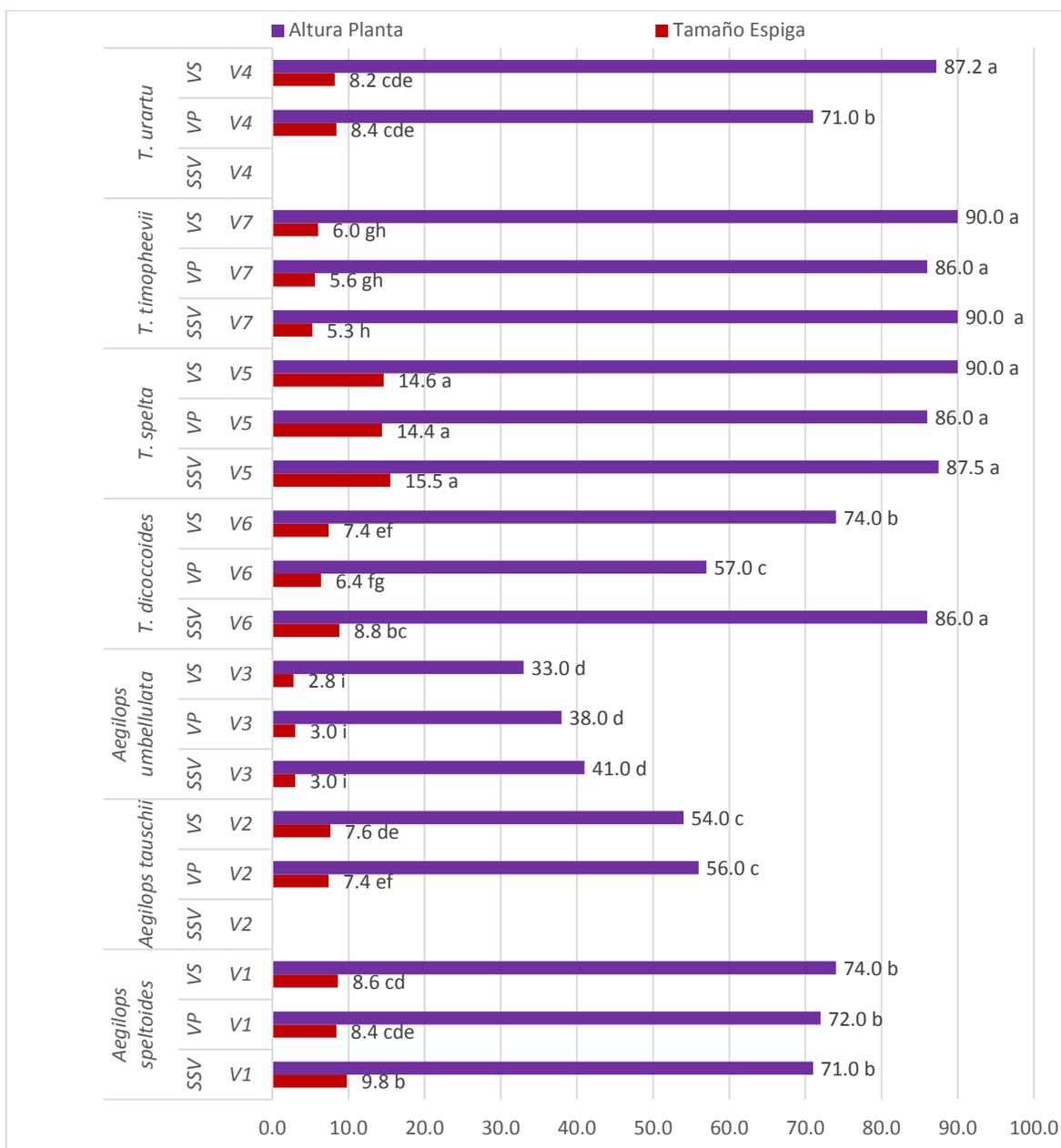


Figura 5. Efecto de las combinaciones especies V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 y vernalización VS, VP y SSV sobre la altura de planta y el tamaño de espiga, gluma, barba y pedúnculo en *Triticum* y *Aegilops*. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.

En la Figura 6 se observa que las especies son significativamente diferentes en cuanto a días a espigamiento y floración, encontrándose que la especie *Ae. speltoides* presenta diferencias significativas superiores al resto. De la misma manera en la Figura 7 se aprecia que el efecto de VP en días de floración y espigamiento es significativamente superior al efecto de SSV y VS. Los resultados anteriores con un nivel de significancia del 0.05. Esto puede ser explicado debido a que los requerimientos de vernalización para las especies de invierno se mantienen en estado vegetativo durante un tiempo prolongado con una mayor capacidad de producción fotosintética y biomasa en comparación con los de primavera que no tienen ningún requerimiento para la exposición a baja temperatura para florecer, lo que conlleva a que con la vernalización las plantas tarden más días en espigar y por consiguiente a florecer (Hüner, 2016).

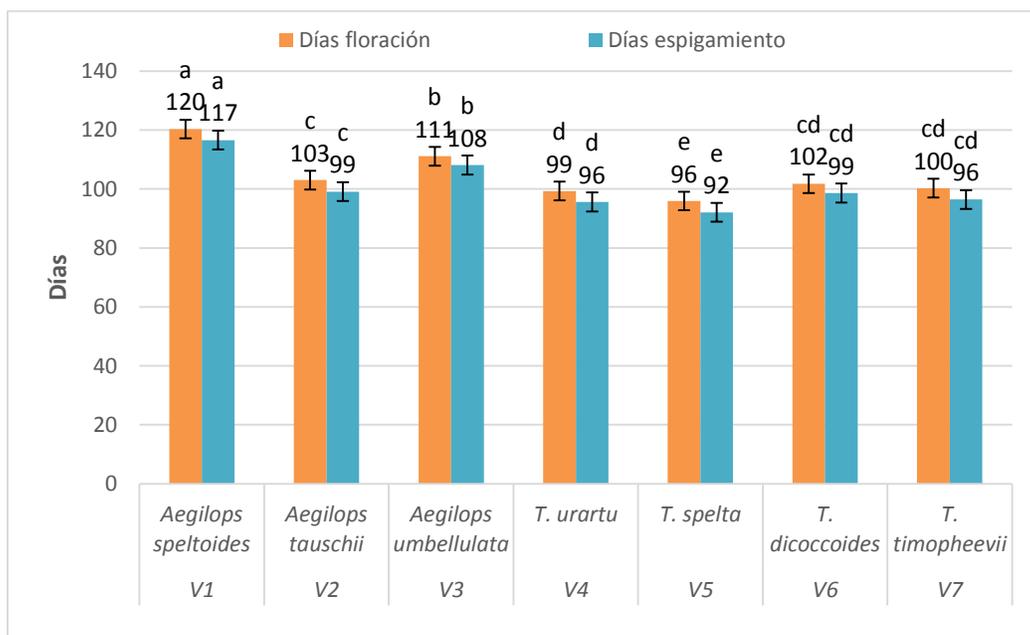


Figura 6. Efecto de las especies V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 sobre los días a floración y espigamiento, del genero *Triticum* y *Aegilops*. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un $P=0.05.2$

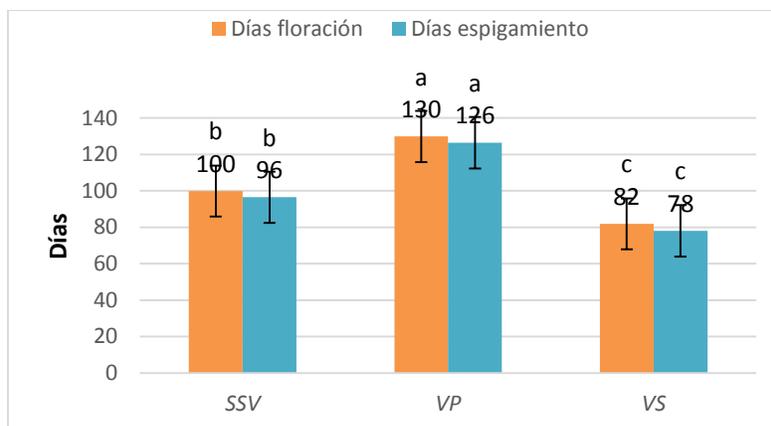


Figura 7. Efecto de la vernalización VS, VP y SSV sobre los días a floración y espigamiento, del género *Triticum* y *Aegilops*. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un $P=0.05$

A las instituciones, como el Banco de Germoplasma del CIMMYT uno de los datos más importantes que le interesa de una regeneración, es la cantidad de semilla recuperada; por la complejidad que conlleva, no es común recuperar un volumen grande de semilla, es por ello que se decidió registrar el número en lugar del peso.

En la Figuras 8 se expresa el número de semillas por el efecto de la especie, en donde se observa que en el género *Aegilops*, el número de semillas significativamente mayor lo tiene *Ae. tauschii* con 1641 semillas. Para el caso de *Triticum* es *T. spelta* con 1358 semillas y *Ae. speltoides* no se encontraron diferencias significativas entre estas dos especies; sin embargo, esta última si presenta diferencias significativas en número de semillas con el resto de las especies. El efecto de la vernalización VS, VP y SSV está representado en la Figura 9, el cual se observa que el efecto de VP en el número de semillas es significativamente diferente, con 3,959 semillas, al efecto de SSV y VS. Los resultados anteriores con un nivel de significancia del 0.05.

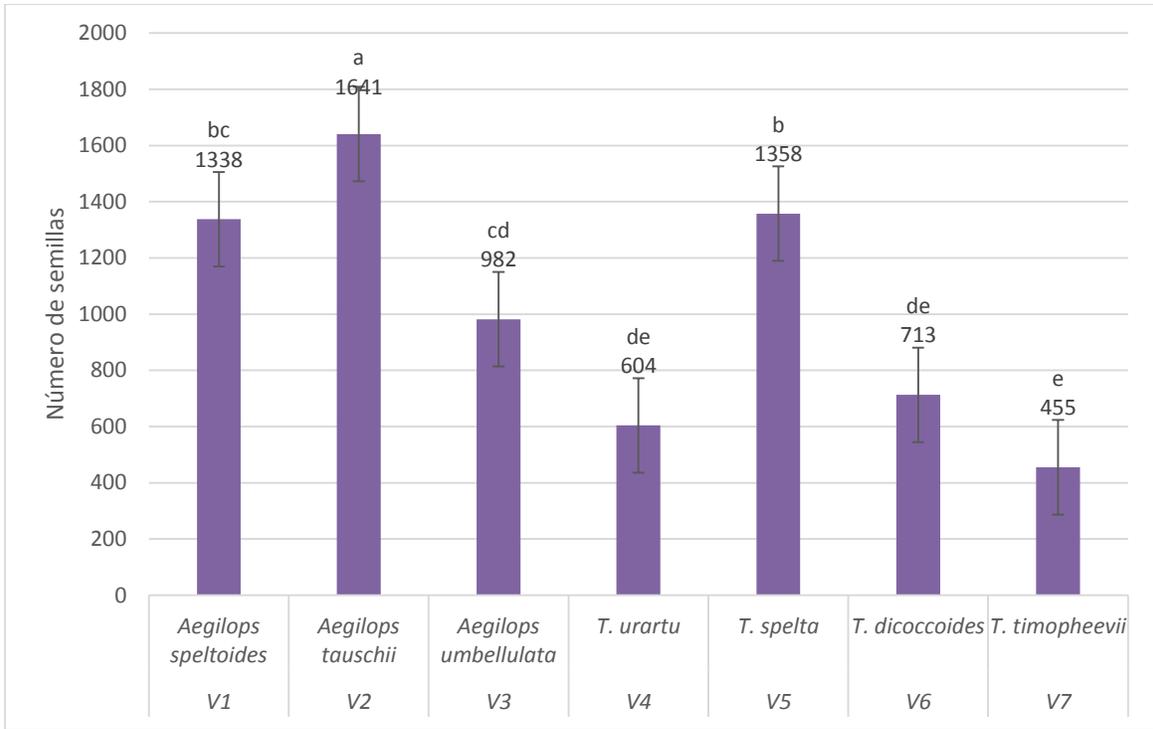


Figura 8. Efecto de las especies sobre el número de semillas del genero *Triticum* y *Aegilops*. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05

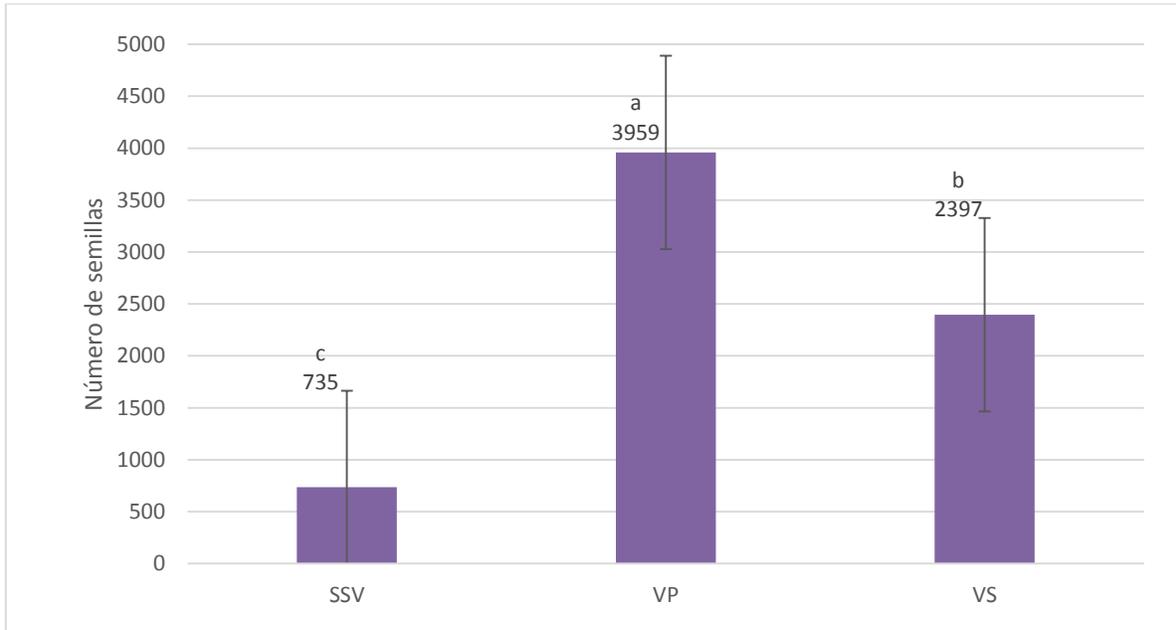


Figura 9. Efecto de la vernalización VS, VP, SSV sobre el número de semillas del genero *Triticum* y *Aegilops*. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05

En las Figuras 10 y 11 se encuentran los resultados obtenidos por medio de la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P < 0.05$), para el efecto de vernalización en cada especie y el efecto de la especie en cada vernalización, sobre el número de semillas.

En la Figura 10 podríamos concluir del efecto de vernalización en plántula (VP) en el número de semillas es significativamente mayor en las especies V1, V3 y V5; por lo que este tipo de vernalización es recomendable en las especies anteriormente mencionadas si se quiere obtener un mayor número de semillas. Para el caso de las especies V6 y V7 los resultados no muestran diferencias significativas del efecto de vernalización y finalmente para el caso de las especies V2 y V4 se encontró que el mejor efecto en el número de semillas se presenta con VS y VP, por lo que en este caso cualquier de estos dos tipos de vernalización son recomendables. Como se puede apreciar las especies del género *Aegilops* produjeron en términos generales el mayor número de semillas, eso se explica debido a que son de hábito silvestre y por lo tanto tienen la característica de amacollar, lo cual, les permite generar más espigas por cada planta y por lo tanto un número mayor de semillas. En cambio, de las especies del género *Triticum*, se recuperaron un menor número de semilla, esto es, porque dichas especies son ancestros que con el paso de la evolución han ido perdiendo características silvestres.

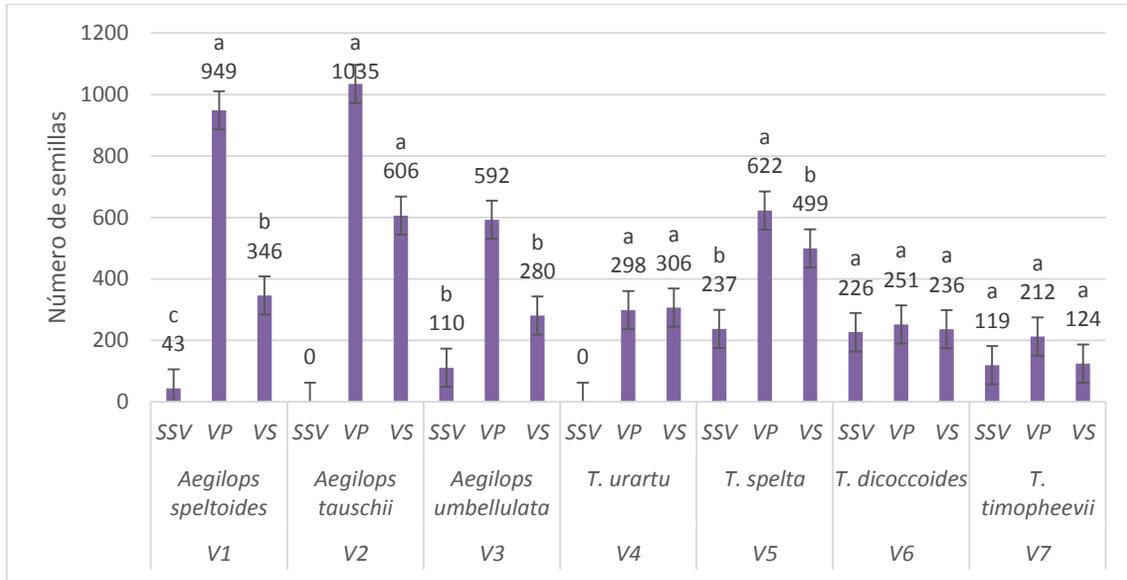


Figura 10. Efecto de la vernalización VS, VP, SSV para cada especie V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 en el número de semillas de los generos de *Triticum* y *Aegilops*. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.

En la Figura 11 podríamos concluir del efecto de la especie en cada vernalización que las especies que mejor se comportaron bajo el efecto de VS fueron *Aegilops tauschii*, y *T. spelta*; mientras que para el caso de VP fueron *Aegilops speltoides* y *Aegilops tauschii* y para el caso de SSV fue *T. spelta*, en las cuales se obtuvo significativamente el mayor número de semillas bajo sus diferentes efectos.

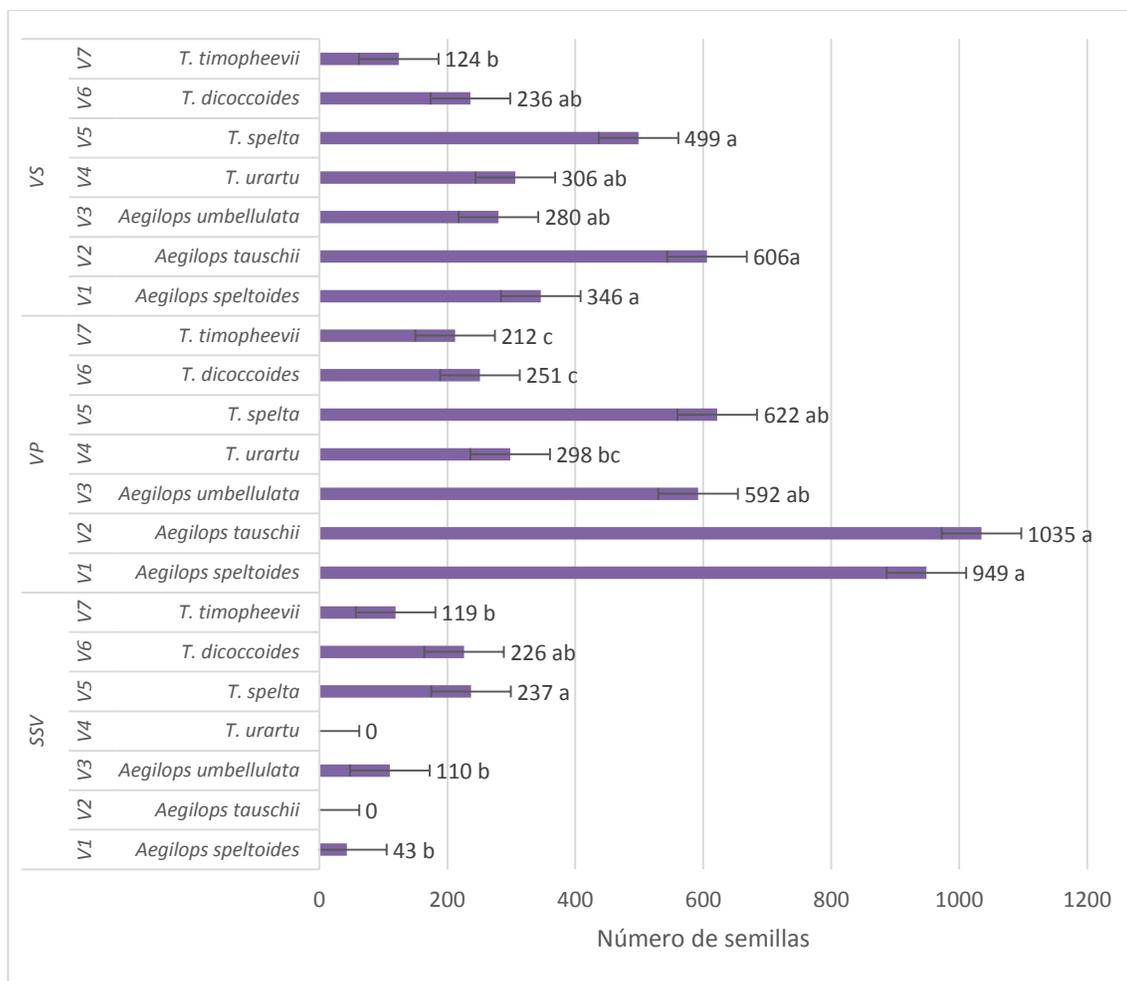


Figura 11. Efecto de las especie V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 en cada vernalización VS, VP, SSV sobre el número de semillas de los géneros de *Triticum* y *Aegilops*. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.

La Figura 12 presenta el efecto del tipo de vernalización en la concentración de azúcares totales en las hojas. Se encontró que el efecto de VS presentó diferencias significativas mayores ($21 \text{ mg g}^{-1} \text{ P.F.}$) que con SSV, sin encontrar diferencias significativas con VP, cual tuvo $18 \text{ mg g}^{-1} \text{ P.F.}$ Los resultados anteriores con un nivel de significancia del 0.05. Esto se puede explicar debido a que bajo estrés por frío, diferentes especies son capaces de ajustar su potencial osmótico mediante la acumulación de azúcares totales, por lo cual la concentración de azúcares solubles es mayor en plantas con un tratamiento de vernalización

(Vágújfalvi *et al.*, 1999). Dichos resultados concuerdan con lo descrito por Zhang *et al.*, 2017; donde mencionan que las plantas tratadas con un periodo de frio presentaron de manera significativa las concentraciones más altas de azucres solubles.

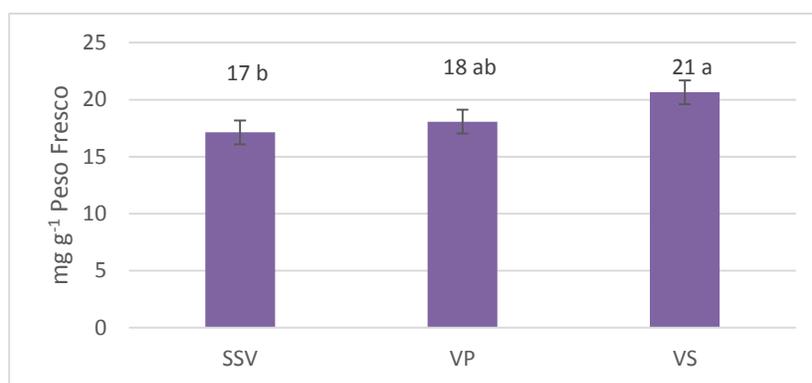


Figura 12. Efecto de VS, VP y SSV sobre la concentración de azucres totales (mg g⁻¹ PF) en hojas de especies del genero *Aegilops* y *Triticum* en estado vegetativo. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.

Las concentraciones de azucres totales, Figura 13, las cuales son significativamente diferentes y más altas son las especies *Ae. umbellulata* y *T. dicoccoides*, mientras que la más baja es *Ae. speltoides*. Los resultados anteriores con un nivel de significancia del 0.05.

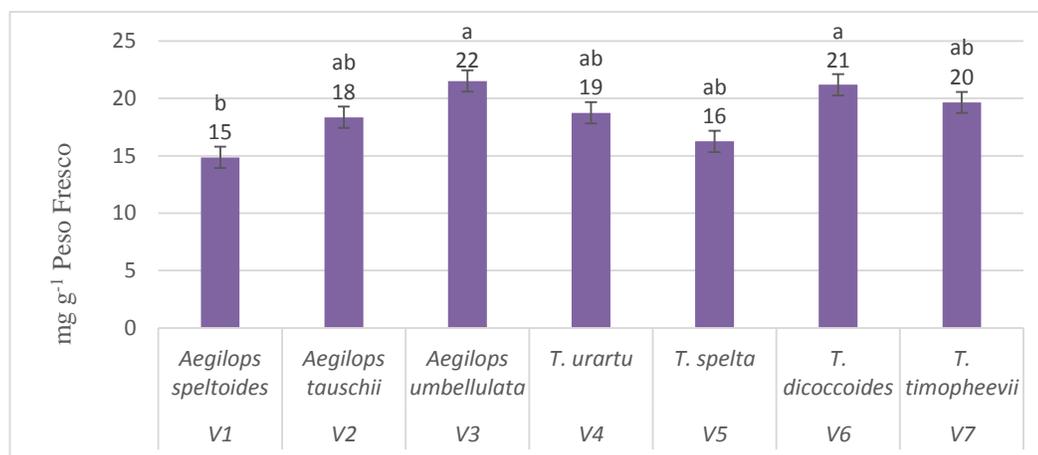


Figura 13. Efecto de las especies V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7 del genero *Aegilops* y *Triticum* sobre la concentración de azucres totales (mg g⁻¹ PF) en hojas de en estado vegetativo. Tratamientos con misma letra no existe diferencia significativa con un P=0.05.

7. CONCLUSIONES

Se estableció el método que permite la regeneración *ex situ* de ancestros silvestres del trigo de especies de los géneros *Triticum* y *Aegilops*.

El método de Vernalizar Plántula (VP) permite recuperar de manera significativa un número mayor de semillas en la mayoría de casos estudiados.

Para el caso específico de las especies V1, V3 y V5 se recomienda usar la vernalización en plántula (VP) para obtener un mayor número de semillas en el proceso de regeneración.

Para el caso de las especies V2 y V4 se recomienda cualquiera de los dos tipos de vernalización VS o VP.

La concentración de azúcares totales es mayor en la etapa vegetativa de las plantas tratadas con vernalización comparadas con las plantas provenientes del tratamiento de semilla sin vernalizar.

El método de Vernalizar Plántula (VP) o Vernalizar Semilla (VS) es eficaz para la regeneración de especies del género *Triticum*, tales como *T. urartu*, *T. dicoccoides* y *T. timopheevii*.

8. LITERATURA CITADA

- Borlaug, N. E. 1968. Wheat breeding and its impact on world food supply. In: proceedings 3th. Int. Wheat genetics symp. Finley, K. W. and Shephard, W. (Eds.). Canberra, Australia, pp. 1-36.
- Borlaug, N. E. 1969. Mejoramiento de trigo, su impacto en el abastecimiento mundial de alimentos. Sobretiro Núm. 2. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). El Batán, México. 40 p.
- Casas, A., y Parra, F. 2007. Agrobiodiversidad, parientes silvestres y cultura. LEISA revista de agroecología, 23(2):5-8.
- Kole, C. (Ed.). 2011. Wild crop relatives: Genomic and breeding resources: Cereals (Vol. 1). Springer Science & Business Media. 497 p.
- Dubcovsky, J. and Dvorak, J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat. *Science*, 316:1862-1865.
- Dubcovsky, J., Loukoianov, A., Fu, D., Valarik, M., Sanchez, A. and Yan, L. 2006. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes VRN1 and VRN2. *Plant Molecular Biology*, 60:469–480.
- Dvorak J., Luo M.C., Yang Z.L., Zhang H.B. 1998. The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(4):657-670
- Dvorak, J., Luo, M.-Ch. and Akhunov, E. D. 2011. N.I. Vavilov's Theory of Centres of Diversity in the Light of Current Understanding of Wheat Diversity, Domestication and Evolution. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 47, 2011 (Special Issue): S20–S27

- FAOSTAT (Food And Agriculture Organization Of The United Nations Statistics Division)
2014. Disponible en internet <http://faostat3.fao.org/home/S>
- Hanson, H., Borlaug, N. E. y Anderson, G. 1982. El trigo en el tercer mundo. CIMMYT. México. 166 p.
- Hüner, N. P., Dahal, K., Bode, R., Kurepin, L. V., & Ivanov, A. G. 2016. Photosynthetic acclimation, vernalization, crop productivity and ‘the grand design of photosynthesis’. Journal of plant physiology. *In Press, Corrected Proof, Available online 3 May 2016.*
- IBPGR, 1978. Descriptors for Wheat & *Aegilops*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy. 25 p.
- Levy, A. A. and Feldman, M. 2002. The impact of polyploidy on grass genome evolution. Plant Physiol, December 2002. 130:1587-1593.
- Michaels, S. D. y Amasino, R. M. 2000. Memories of winter: vernalization and the competence to flower. Plant, Cell and Environment, 23:1145–1153.
- Montreuil, J., Vliegenthart, J. F. G., & Schachter, H. 1997. Glycoproteins. Elsevier Science. 572 p.
- Moreno, I., Ramirez, A., Plana, R. e Iglesias, L. 2001. El cultivo del trigo. Algunos resultados de su producción en Cuba. Cultivos tropicales. 22 (4):55 – 67.
- Monneveux, P., Zaharieva, M., Rekika, D. 2000. The utilisation of *Triticum* and *Aegilops* species for the improvement of durum wheat. In: Royo C. (ed.), Nach it M. (ed.), DiFonzo N. (ed.), Arau s J.L. (ed.). Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges. Zaragoza, pp. 71 -81.
- Nesbitt, M. 2001. Wheat evolution: integrating archaeological and biological evidence. Wheat taxonomy: the legacy of John Percival, Vol. 3, Linnean, 3:37-59.

- Peng, J. H., Sun, D. y Nevo, E. 2011. Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Mol Breeding*, 28:281-301.
- Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., Berthelsen, K. 2006. Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39:70–82.
- Purvis, O.N. 1961. The physiological analysis of vernalization. In *Encyclopedia of Plant Physiology* (ed.W. Ruhland), pp. 76–122. Springer-Verlag, Berlin.
- Rajaram S. 1995. Wheat germoplasm improvement: historical perspectives, philosophy, objectives, and missions. In: wheat breeding at CIMMYT: commemorating 50 years of research in Mexico for global wheat improvement. Rajaram, S. and Hettel, G. P. (Eds.). Wheat special report Núm. 29. CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). México, D. F. pp 1-10.
- Robles, S. 1979. Producción de granos y forrajes. Ed. Limusa, 2a ed. México. 592 p.
- Rosegrant, M. W. and Agcaoili, M. 2010. Global food demand, supply, and price prospects to 2010. International Food Policy Research Institute, Washington, D. C. USA. pp. 62 – 87.
- Shewry, P. R. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany*. 60(6):1537 – 1553
- Singh, R. P., Hudson, D. P., Huerta, E. J., Jin, Y., Njau, P., Wanyera, R., Herrera, F. S. A. and Ward, R. W. 2008. Will stem rust destroy the world's wheat crop? *Advances Agron*. 98:271-309
- SIAP (Servicio De Información Agroalimentaria Y Pesquera) 2014. México.
Disponible en internet <http://www.siap.gob.mx/>

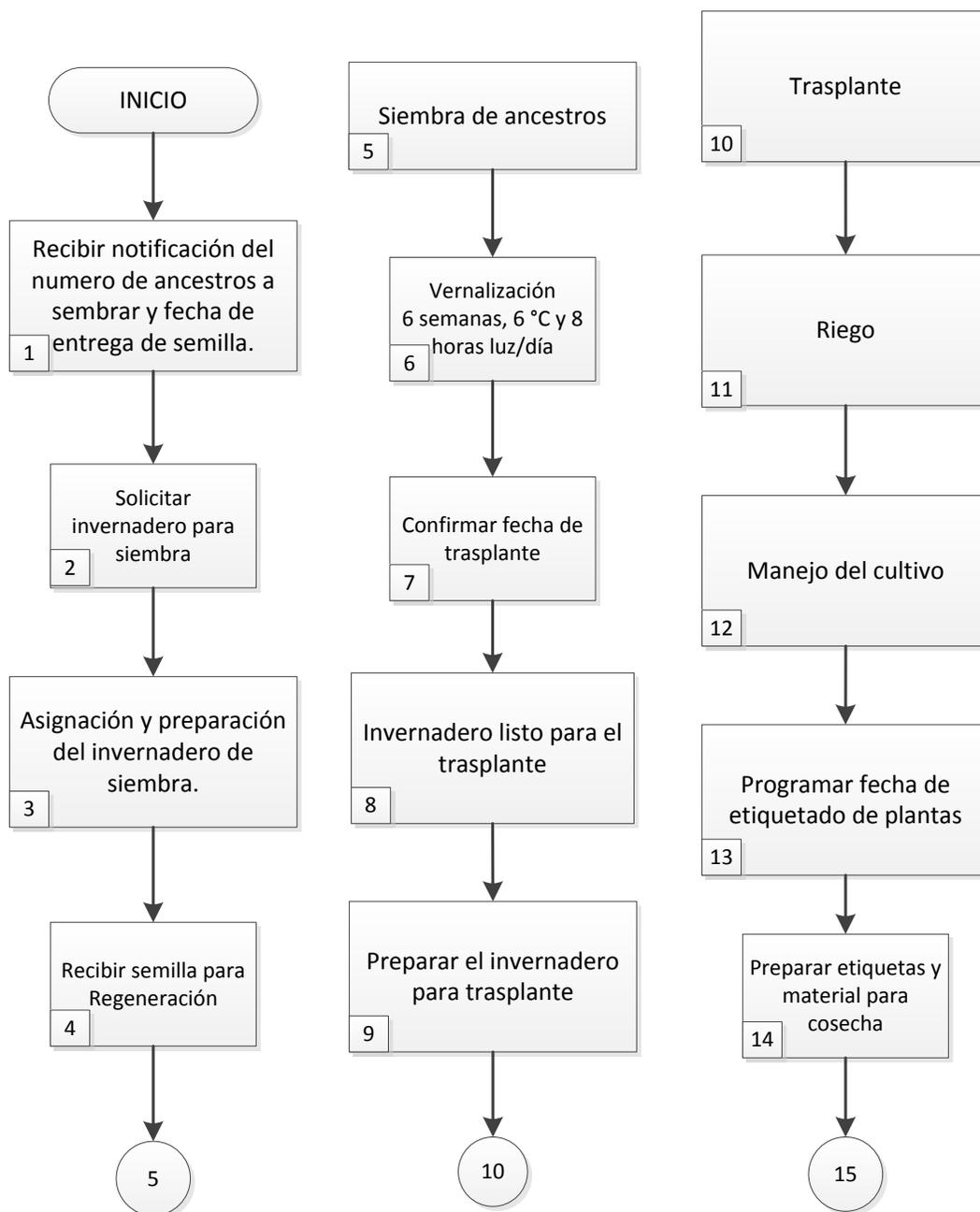
- Skovmand, B., G. Varughese y G.P. Hettel. 1992. Los recursos genéticos de trigo en el CIMMYT: Su conservación, enriquecimiento y distribución. México, D.F. CIMMYT.
- Vágújfalvi, A., Kerepesi, I., Galiba, G., Tischner, T., & Sutka, J. 1999. Frost hardiness depending on carbohydrate changes during cold acclimation in wheat. *Plant Science*, 144(2):85-92.
- Villarreal, R. L. 1995. Expanding the genetic base of CIMMYT bread wheat germoplasm. In: *Wheat breeding at CIMMYT: commemorating 50 years of research in Mexico for global wheat improvement*. Rajaram, S. and Hettel, G. P. (Eds.). Wheat special report Núm. 29. CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). México, D. F. pp 16-21.
- Villaseñor M., H. E. 2015. Sistema de mejoramiento genético de trigo en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. México, pp. 2183-2189.
- Villaseñor M., H.E y Espitia R., E. (eds.). 2000. *El trigo de temporal en México*. Chapingo, Estado de Méx., México, SAGAR, INIFAP, CIRCE, Campo Experimental Valle de México. 315 p. (Libro Técnico Núm.1)
- Wang, S. Y., Ward, R. W., Ritchie, J. T., Fischer, R. A., & Schulthess, U. 1995. Vernalization in wheat I. A model based on the interchangeability of plant age and vernalization duration. *Field Crops Research*, 41(2): 91-100.
- Wang, S. Y., War, R. W., Ritchie, J. T., Fisher, R. A., 1995. Vernalization in wheat II. Genetic variability for the interchangeability of plant age and vernalization duration. *Field Crops Research* 44:67-72.

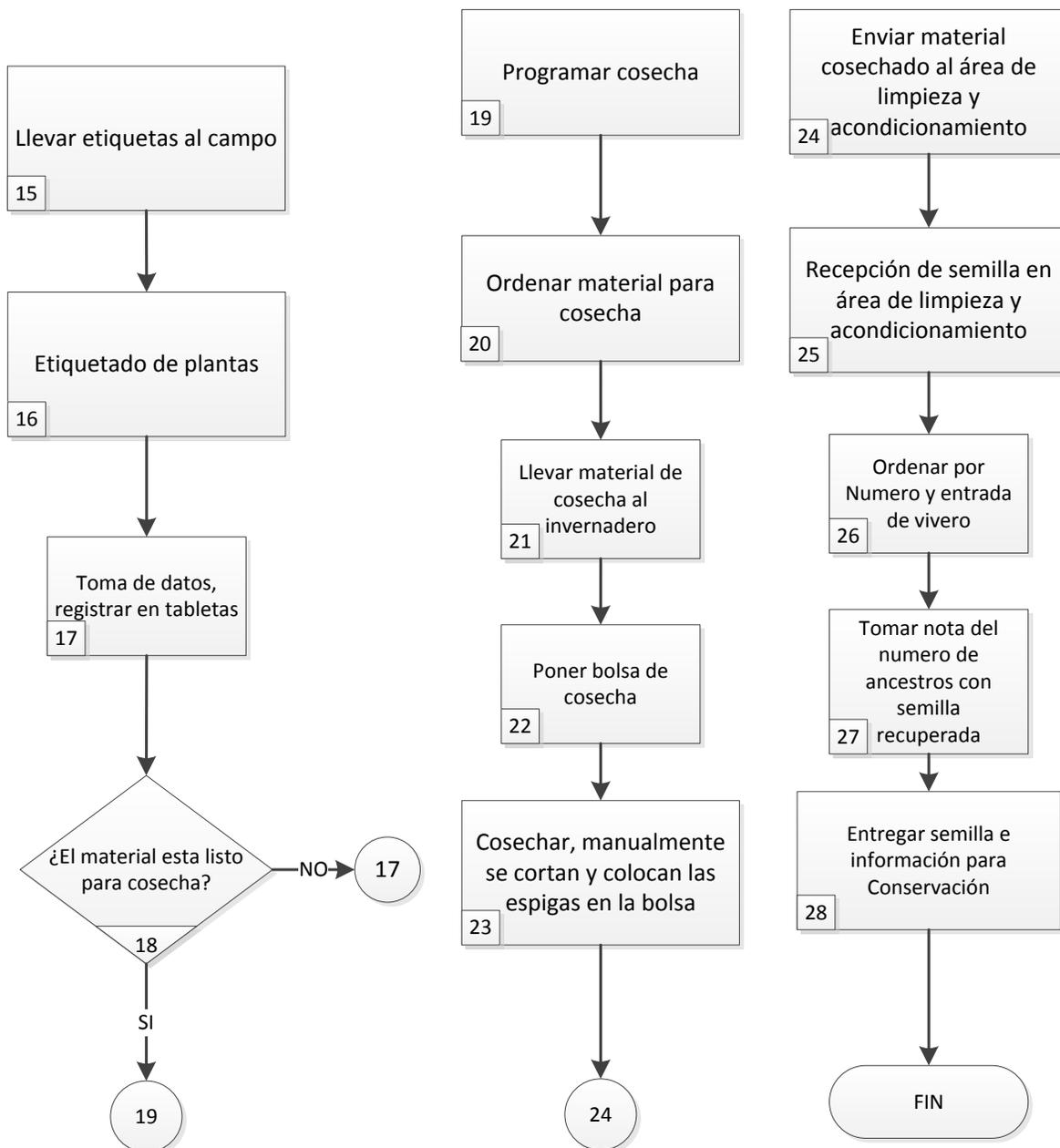
Zhang, B., Jia, D., Gao, Z., Dong, Q. and He, L. 2016. Physiological responses to low temperature in spring and winter wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 96: 1967–1973.

9. ANEXOS

9.1 Anexo I.

Diagrama de flujo del método de regeneración de ancestros silvestres del trigo de especies de *Triticum* y *Aegilops*.





9.2 Anexo II.

Descripción de actividades de la regeneración de ancestros silvestres de trigo de especies de *Triticum* y *Aegilops*.

1	Cuando se aproxime la fecha de siembra, se recibirá notificación con el número de ancestros a sembrar y superficie de invernadero requerida.
2	Con 3 meses de anticipación se solicita la superficie de invernadero, al encargado de estos.
3	Se asigna un invernadero con la superficie solicitada y se hacen las labores de acondicionamiento del invernadero (número de mesas y macetas, cantidad de sustrato a requerir) o bien si el trasplante se realizara directo en el suelo se efectúa la preparación del terreno (barbecho, rastreo, nivelación, surcado ya sea a una o doble hilera).
4	Se recibe la semilla de los ancestros silvestres que se van a regenerar y se revisa que coincida la lista que lleva adjunta.
5	La semilla se germina en cajas de Petri con papel filtro (previo se satura con agua destilada) durante 3 días y después se siembra en macetas de plástico de 7 x 7 cm con un sustrato esterilizado de una mezcla de peat – moss y vermiculita o perlita (2:1), se riegan con agua hasta saturar el sustrato.
6	Se ingresan las macetas a las vernalizadoras por seis semanas a 6° C y 8 horas luz.
7	Se confirma al encargado del invernadero la fecha de trasplante.
8	Se recibe notificación de que el invernadero esta listo para el trasplante.
9	Preparar y ordenar las macetas en donde se hará el trasplante, si es en suelo, marcar el terreno para siembra de acuerdo ha cómo se tiene planeado sembrar cada vivero.

10	Trasplanta cada una de las plántulas de todo el vivero. Al terminar notificar al encargado del invernadero que se ha terminado de trasplantar.
11	Aplicar riego hasta saturar el sustrato o el suelo.
12	Se tiene que estar pendiente del cuidado del manejo del cultivo en lo correspondiente a fertilización, riegos, control de malezas, control de plagas y enfermedades.
13	Programa el etiquetado de las plantas, cuando las plantas tengan 30 cm de altura.
14	Preparar etiquetas y material para manejo de cosecha y verifica con su número de vivero y entrada que se encuentre el material correcto y completo.
15	Llevar las etiquetas al invernadero o lote donde se encuentren las plantas a etiquetar.
16	Poner cada una de las etiquetas en la planta que corresponde.
17	Toma los datos de descriptores (caracteres) morfológicos de acuerdo a su etapa fenológica que se encuentre. Los datos se registran con una tableta (con sistema operativo Android) y que cuente instalada la aplicación KDSmart.
18	¿El material está listo para cosecha? SI -> Continuar con actividad No. 14 NO -> Continuar con actividad No. 16
19	Programa la fecha del inicio de la cosecha
20	Revisar que este completo y sea suficiente el material para cosecha, y poner las bolsas de cosecha en orden consecutivo de acuerdo a como esta sembrado el vivero. Nota: si todas las plantas aún no están listas para cosechar se seleccionan las bolsas de las plantas que ya se pueda cosechar.

21	Llevar el material de cosecha al invernadero o al campo donde esta el lote de siembra.
22	Colocar una estaca en cada una de las plantas, las que estén en madurez de cosecha se le engrapa la bolsa de cosecha en la parte superior de la estaca, teniendo cuidado de no romperla.
23	Ubicarse en la maceta o planta a cosechar, cuidadosamente se corta las espigas que ya estén en madurez de cosecha y se colocan en la bolsa de cosecha. Realiza esta actividad con todas las plantas que tengan espigas listas para cortar. Nota: esta actividad se realizará diariamente durante todo el tiempo que dure la cosecha para evitar que las espigas se desprendan solas y caigan al suelo.
24	Empacar las bolsas con espigas de todos el vivero en cajas de cartón, se aseguran y se trasladan al área de trabajo para ordenar el material cosechado.
25	Recibe material cosechado.
26	Se ordena el material cosechado por número de vivero y entrada en orden consecutivo.
27	Se registra en la tableta la semilla que se recuperó de los ancestros silvestres del trigo.
28	Se entrega semilla e información al área de limpieza y acondicionamiento de semilla. Con esta actividad termina el proceso de regeneración.