



Escuela Politécnica
Superior - Huesca
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

**Determinación de los posibles ancestros que originaron
las especies del clado Magrebí del subgénero
Schedonorus de las festucas de hojas anchas empleando
la técnica de hibridación *in situ*.**

Autor/es

David Ezquerro López

Director/es

Luis Angel Inda Aramendía

Ciencias ambientales

Escuela Politécnica Superior de Huesca

28/08/2015

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer especialmente al Doctor Luis Ángel Inda Aramendía, director de este trabajo, por el hecho de haber aceptado la tutoría del mismo, por sus consejos, su entrega, ayuda incondicional, dedicación, infinita paciencia y buenos momentos vividos.

En segundo lugar agradecer la colaboración de todos los integrantes del grupo Bioflora de la Escuela Politécnica Superior de Huesca, Diana López, Rubén Sancho, Pilar Catalán y Ernesto Pérez, así como a las técnicas de laboratorio Belén, Asunción y María Luisa por su ayuda, ánimos, consejos, compañía y buenos momentos vividos.

También, agradecer a todos los profesores de la Escuela Politécnica y al resto del personal de la misma por su entrega y dedicación.

Por otra parte, dar gracias a mi familia y a Sara Martínez, por su infinita ayuda y por estar conmigo siempre.

Finalmente gracias a todos los compañeros, especialmente a mis hermanos, Oriol Barón, Hector Pueyo y Miguel Ríos por su ayuda, compañía y buenos momentos.

Este trabajo va por vosotros, GRACIAS.

Contenido

Agradecimientos	3
Resumen.....	6
Abstract	6
Introducción	7
Posible origen de las especies del clado Magrebí	13
Fundamentos y usos de la hibridación fluorescente <i>in situ</i>	16
Objetivos	18
Objetivos específicos.....	18
Materiales y métodos	19
Obtención de embriones germinados y plantas adultas	19
Material vegetal utilizado.....	19
Germinación.....	19
Obtención de preparaciones microscópicas	20
Pretratamiento de los ápices radiculares.....	20
Fijación	21
Digestión enzimática	21
Extracción de meristemas.....	22
Búsqueda de cromosomas en metafase	22
Fijación de las preparaciones microscópicas	23
Preparación de las sondas de DNA ribosómico 5S y 25S	23
Preparación de medios de cultivo LB (Luria-Bertani) líquido y sólido	23
Siembra de bacterias en el medio sólido	24
Siembra de bacterias en el medio líquido.....	24
Extracción de DNA.....	25
Determinación del DNA extraído	25
Marcaje y lavado del DNA extraído.....	26
Marcaje región 5S por PCR.....	27
Lavado de DNA de la región 5S	27
Marcaje DNA 25S por “Nick Translation”	28
Lavado de DNA de la región 25S	28
Comprobación de la amplificación y detección de las regiones 5S y 25S mediante electroforesis.....	29
Realización de FISH (Hibridación Fluorescente <i>In Situ</i>).....	30
Pretratamiento del portaobjetos con cromosomas.....	31

Desnaturalización e hibridación	31
Lavado riguroso	32
Inmunodetección de la digoxigenina	32
Visualización	32
Resultados	34
Determinación del número cromosómico de las especies de trabajo.....	34
Puesta a punto de la técnica FISH para las especies de trabajo	36
Determinación del número de regiones 5S y 25S en las especies de estudio	38
Discusión	44
Conclusiones	48
Referencias bibliográficas	49
Anexo 1.....	53

Resumen

Los ancestros del clado Magrebí del subgénero *Schedonorus* de las festucas de hojas anchas son todavía desconocidos, posiblemente por la escasez de estudios realizados y/o por el desconocimiento de al menos un ancestro precursor del clado.

Con el presente trabajo, mediante el análisis de las regiones de DNA ribosomales 5S y 25S, empleando la Técnica de Hibridación Fluorescente In Situ (FISH), se ha podido deducir el posible origen de *Festuca arundinacea atlantigena* y de *Festuca arundinacea corsica*. La primera especie, pudo surgir de la duplicación del genoma de un híbrido originado por el cruce de *Festuca mairei* y *Festuca arundinacea fenas*, corroborando trabajos previos; mientras que la segunda, a partir de la duplicación del genoma de un individuo procedente del cruce de *Festuca pratensis* subsp. *pratensis* y *Festuca pratensis* subsp. *apennina*.

Palabras clave: FISH, *Festuca*, ancestro, híbrido, loci, *Festuca arundinacea atlantigena*, *Festuca arundinacea corsica*, *Festuca arundinacea letourneouxiana*, *Festuca arundinacea fenas*, *Festuca mairei*, *Festuca pratensis pratensis*, *Festuca pratensis apennina*, *Festuca arundinacea arundinacea*.

Abstract

The ancestors of the subgenus *Schedonorus* Maghreb clade of broad-leaved fescues are still unknown, possibly by the scarcity of studies and / or the lack of at least one precursor ancestor of the clade.

In this paper, by analyzing 5S and 25S ribosomal DNA regions using the technique of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), it has been possible to deduce the origin of *Festuca arundinacea atlantigena* and *Festuca arundinacea corsica*. The first species, could arise from genome duplication of an hybrid originated by the crossing of *Festuca arundinacea fenas* and *Festuca mairei*, confirming previous work; while the second, from genome duplication of an individual from the crossing of *Festuca pratensis* subsp. *pratensis* and *Festuca pratensis* subsp. *apennina*.

Key words: FISH, *Fescue*, ancestry, hybrid, loci, *Festuca arundinacea atlantigena*, *Festuca arundinacea corsica*, *Festuca arundinacea letourneouxiana*, *Festuca arundinacea fenas*, *Festuca mairei*, *Festuca pratensis pratensis*, *Festuca pratensis apennina*, *Festuca arundinacea arundinacea*.

Introducción

Dentro de la amplia familia de las gramíneas (Poaceae) se encuentra la subtribu Loliinae, conformada por el género *Festuca* L., (con 9 subgéneros y en torno a 500 especies) y 10 géneros más aliados (Catalan, 2006; Inda, Segarra-Moragues, Müller, Peterson, & Catalán, 2008). Este gran grupo (Loliinae) de pastos templados se encuentra distribuido por todo el mundo, excepto en la región antártica (Catalan, 2006), siendo la zona euroasiática el centro primario de diversificación (Devesa, Catalán, Cebolla, Müller, & Ortúñez, 2013). Tradicionalmente se ha dividido en dos subgrupos o linajes atendiendo a la anchura de las hojas de las especies que incluye (véase figura 1): el linaje de “hoja ancha” y el de “hoja fina” (Hackel, 1882, 1887), coincidiendo dicha división con estudios filogenéticos moleculares realizados posteriormente (Torrecilla & Catalán, 2002). Ambos linajes radiaron a mediados del Mioceno, hace aproximadamente 10,5 millones de años (Inda et al., 2008).

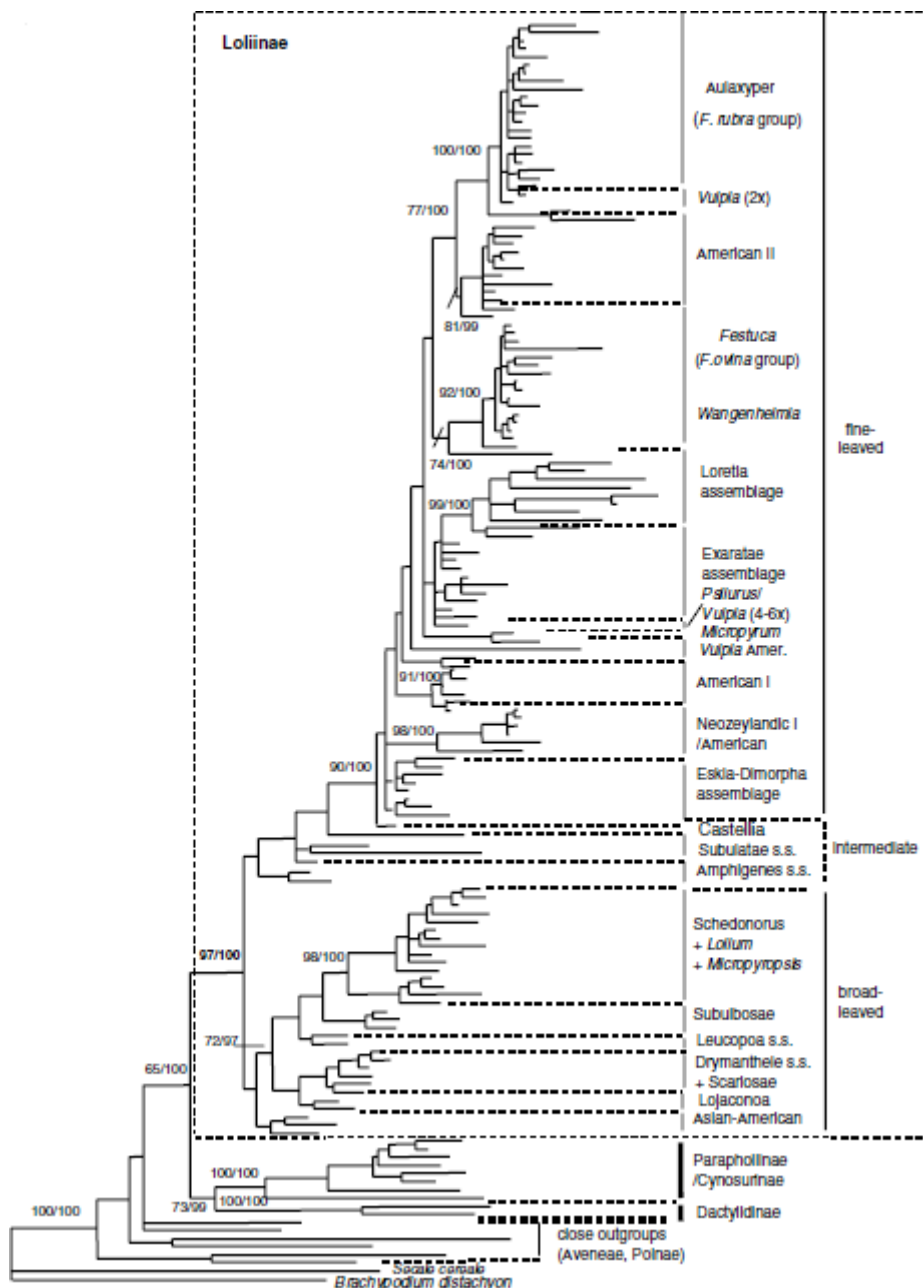


Figura 1: Árbol Bayesiano de la subtribu Loliinae a partir de datos nucleares (ITS) y cloroplásticos (TrnLf). Los índices sobre las ramas indican: índice de Bootstrap/Probabilidad posterior. Fuente: Inda et al., (2008).

Dentro del linaje de hoja ancha, se encuentra el complejo *Schedonorus* (P. Beauv) Petern.-*Lolium* L., con representantes de los géneros *Festuca*, *Lolium* y *Micropyropsis* Romero-Zarco & Cabezudo, cuyas especies son evolutivamente muy cercanas y con elevada facilidad de hibridación entre ellas. Además, éste puede dividirse en dos clados, dependiendo de la localización geográfica de las especies que abarcan y de caracteres moleculares: “clado Europeo” y “clado Magrebi” (véase figura 2) (Inda, Sanmartín, Buerki, & Catalán, 2013).

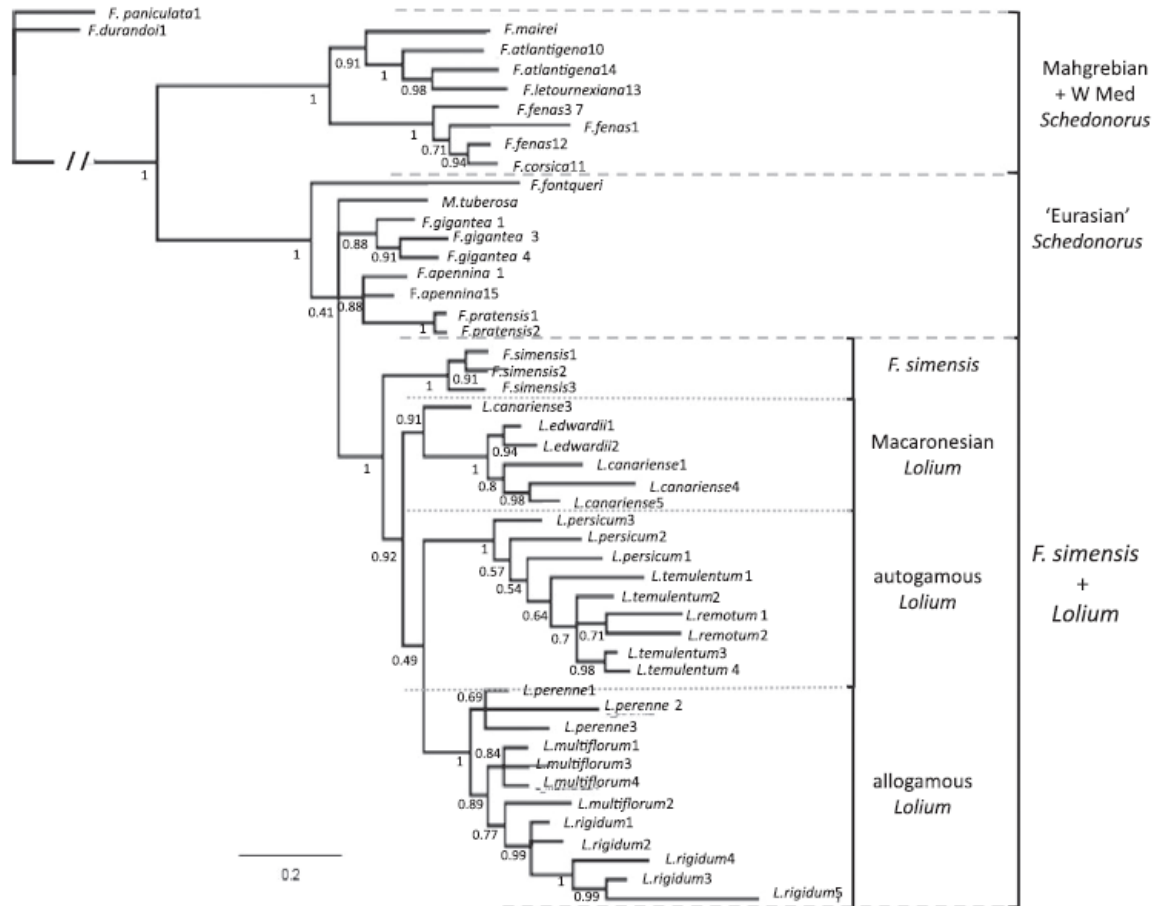


Figura 2: Árbol Bayesiano de datos nucleares y cloroplásticos del complejo *Schedonorus-Lolium* Fuente: Inda et al., (2013).

Concretamente el clado Magrebi, fue originado por un evento de dispersión de sus ancestros desde el Mediterráneo occidental hacia la zona del Atlas del noroeste de África, seguido de un fenómeno de especiación por poliploidización (favorecido por el aislamiento geográfico) durante el Plioceno temprano (Inda et al., 2013). Este, está compuesto únicamente por especies del género *Festuca*, a diferencia de su clado hermano que contiene especies de los géneros *Festuca*, *Lolium* y *Micropyropsis*.

El género *Festuca* particularmente, agrupa a un conjunto de especies de plantas que poseen una serie de características propias y comunes. Estas son: plantas mayoritariamente perennes o vivaces, que contienen una lígula de aspecto membranoso; inflorescencia en panícula; espiguillas hermafroditas con varias flores; glumas carenadas; flores con 3 estambres, 2 lodículas; ovario con 2 estigmas plumosos; raquilla articulada bajo cada flor; mácula hilar lineal (véase figura 3) (Kerguelén & Plonka, 1989). Las especies incluidas en este

género, contienen como número cromosómico básico $x=7$ y son en su mayoría de origen poliploide (70%), cuyos niveles de ploidía oscilan entre diploide ($2n=14$) y dodecaploide ($2n=84$) (Devesa et al., 2013).



Figura 3: *Festuca pratensis*; a: lígula, b: gluma inferior, c: espiguilla, d: gluma superior, e: lemas, f: anteras y estigma, g: pálea, h: lodículas, i-j: grano. Fuente: Hubbard, (1954).

Las especies o taxones que conforman este clado son las siguientes:

***Festuca arundinacea* Schreb. subsp. *atlantigena* (St.-Yves) Auquier:**

Planta con tallos de entorno a 100 cm de longitud, rígidos. Hojas con nervios prominentes, teniendo los principales más marcados que el resto, envainadoras, con escasos cilios en las aurículas. Estas presentan también capítulos de esclerénquima coincidiendo con la nervadura correspondiente y a ambos lados de todas o casi todas las venas (véase figura 4). Inflorescencia en panícula lineal, rígida y no muy abierta. Espiguillas de color verdoso con un tamaño comprendido entre 5-8,6 mm, y con más de 4 flores. Glumas desiguales, la superior de 5,3 x 2,1 mm. Lemas de 4-6,5 x 1,75-2,7 mm, acuminadas, con aristas de 1,5-2,5 mm. Ovario con algunos pelos largos (de 2-5) en su parte superior. Fruto en cariósipide con forma oblonga. Número cromosómico: $2n=8x=56$.

Localización: norte de África, zona del Atlas marroquí (véase figura 11)(Maire, 1955; Markgraf-Dannenberg, 1980; Saint-Yves, 1922).



Figura 4: Sección de la hoja de *Festuca arundinacea atlantigena*. Fuente: Borrill, (1972).

***Festuca arundinacea* Schreb. subsp. *córsica* (Hackel) Kerguélen:**

Planta cespitosa, rizomatosa. Con tallos de entre 50-100 cm de longitud. Presenta innovaciones extravaginales. Hojas envainadoras y auriculadas en la base. Limbo basal de entre 10-35 cm de longitud, plano, más o menos rígido, escabroso, de tonos verdes a glaucescentes y sin pruina. Limbo caulinar de 10-15 cm de largo, plano o enrollado. Sección de 1-3 mm de ancho, con numerosos nervios y costillas. Surcos intercostales poco profundos, esclerénquima en trabéculas a nivel de los nervios principales y formando columnas o islotes a nivel de los nervios secundarios. Se advierte la presencia también de columnas o trabéculas de esclerénquima en la cara adaxial (véase figura 5). Vainas ranuradas en torno a la base. Inflorescencia en panícula erecta, más o menos contraída, de un tamaño comprendido entre 12-25 cm de largo. Espiguillas de 8-10 mm de longitud, con 4-7 flores, de tonos verdes a glaucescentes. Glumas de 4-6 mm de longitud, lanceoladas, bidentadas. Lemas de 6,5-7,5 mm de largo, acuminadas, glabras y escabrosas. Aristas de 1-2 mm de largo, a veces mucronadas. Fruto en cariósipide de 3-3,5 mm. Número cromosómico: $2n=6x=42$.

Se encuentra en suelos silíceos, heliófilos, mesófilos a mesohidrófilos. Concretamente en prados, bordes de bosques, orillas de arroyos y de pantanos, costas, bordes de carreteras. Localización: Córcega (véase figura 11) (Kerguélen & Plonka, 1989; Portal, 1999).

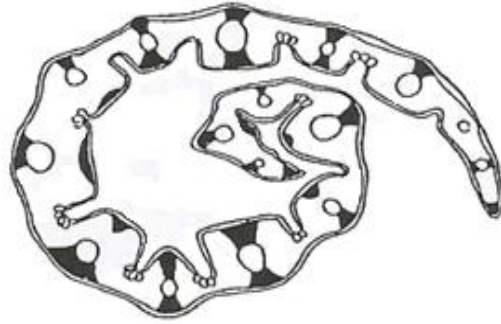


Figura 5: Sección de la hoja de *Festuca arundinacea còrsica*. Fuente: Kerguelén & Plonka, (1989).

***Festuca arundinacea* Schreb. subsp. *arundinacea* var. *letourneouxiana* (St.-Yves) Torrecilla et Catalán:**

Planta cespitosa, más o menos glaucescente. Presenta tallos de hasta 1 metro de altura, lisos bajo la panícula. Vainas marcescentes, más o menos coriáceas y no fibrosas. Hojas auriculadas en la base, con fascículos de esclerenquima externos e internos coincidentes con la nerviación correspondiente (véase figura 6). Limbos poco convolutos por desecación. Panícula grande, de 20-30 cm de longitud, con forma ovada-piramidal, y con las ramas inferiores multiespiculadas. Espiguillas comprimidas, con 4-8 flores (aunque pueden presentar 4-5). Cariópside oblonga. Ovario con 2-3 pelos largos en su parte superior. Número cromosómico $2n=10x=70$.

Habita en la zona noroeste de África (véase figura 11) (Borrill, 1972; Maire, 1955).

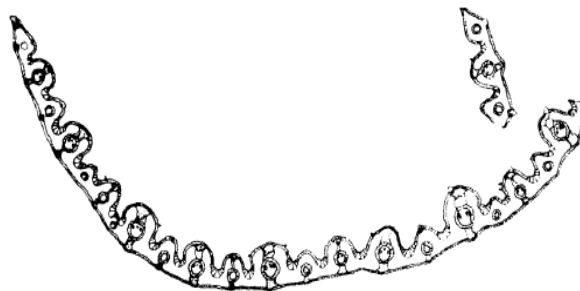


Figura 6: Sección de la hoja de *Festuca arundinacea letourneouxiana*. Fuente: Borrill, (1972).

***Festuca arundinacea* Schreb. subsp. *fenas* (Lagasca.) Arcang.:**

Planta con valor ganadero, perenne, cespitosa y rizomatosa. Con tallos de entre 40-100 cm. Innovaciones extravaginales. Hojas auriculadas con cilios cortos y densos. Limbo basal con un tamaño comprendido entre 6-30 cm, inicialmente planos pero se vuelven convolutos con rapidez (sobre todo durante la estación seca). Más rígidos en la madurez, sin pruina y glaucos. Limbo caulinar de entre 7-20 cm, plano inicialmente pero se vuelve convoluto con rapidez. Sección de 3-8 mm, lineal, con numerosos nervios y costillas. Surcos intercostales poco profundos, esclerenquima en trabéculas al nivel de los nervios principales y en islotes o

columnas al nivel de los nervios secundarios. Se advierte también la presencia de columnas o trabéculas en la cara adaxial (véase figura 7). Vainas ranuradas en torno a la base. Inflorescencia en panícula de 10-25 cm, contraída, rígida y no continua. Espiguillas de 10-15 mm con 3-10 flores. Glumas desiguales, la inferior de 3-6 mm. Lemas lanceoladas de 5-6 mm, 2-dentadas, con aristas de tamaño variable, desde apenas ser perceptibles hasta 4 mm, glabras. Presencia de lodículas. Ovario glabro. Fruto en cariósipide de 3 x 1,3 mm. Anteras de 2,4 a 3,3 mm. Número cromosómico: $2n=4x=28$.

Suele aparecen en suelos silíceos, calcáreos, heliófilos, mesófilos a mesoxerófilos. Habita en depresiones húmedas, praderas con presencia de aguas subterráneas. Localización: Zona sur y sureste de Europa (véase figura 11) (Gonzalez Bernaldez, 1986; Kerguélén & Plonka, 1989; Portal, 1999):



Figura 7: Sección de la hoja de *Festuca arundinacea fenas*. Fuente: Borrill, (1972).

***Festuca mairei* St.- Yves**

Planta perenne, cespitosa. Con tallos de entre 50-100 cm, erguidos, rígidos, delgados, lisos y ligeramente estriados. Innovaciones intravaginales. Hojas envainadoras, planas o envolventes, de unos 30-50 cm de longitud y 3-5 mm de ancho, rígidas, atenuadas en la punta. Nervadura con 7-9 nervios, los primarios muy prominentes, los secundarios no tanto. Nervio central de la lámina foliar conspicuo. Superficie de la hoja escabrosa, adaxialmente áspera y glabra. Márgenes de la lámina foliar escabrosos. Sección transversal ovalada, con haces de esclerenquima externo e interno separados y correspondientes a los nervios. Los externos confluentes con la nervadura y los internos con los nervios primarios y secundarios a través de un parénquima incoloro (véase figura 8). Presencia de 3-5 filas de células bulliformes en los surcos intercostales. Vainas marcescentes, no fibrosas, conservando sus limbos. Aurículas con o sin tricomas, redondeadas, no falciformes y de tonos marrones. Inflorescencia en panícula abierta, erguida, lineal, de unos 15-20 cm de largo, y con espiguillas casi hasta la base. Ramas de la panícula escabrosas, erectas y las inferiores geminadas. Espiguillas elípticas y comprimidas lateralmente, de unos 8 mm de longitud con 4-5 flores fértiles, verdes o con cierto tono rojizo y con flores menos desarrolladas en el ápice. Presentan tres anteras lineales de unos 3 mm de longitud. Raqueola escasamente escábrida en la parte posterior, con entrenudos de 0,8 mm. Glumas desiguales, persistentes de unos 4-4,5 mm de largo, escariosas casi en su totalidad. La inferior lanceolada, aguda y uninervia, y la superior más ampliamente lanceolada, truncada y con tres nervios. Lemas de unos 5,5-6 x 2,5 mm, ampliamente lanceoladas, comprimidas lateralmente, más o menos carenadas, y apenas mucronadas. Poseen cinco nervios que sobresalen vagamente. Palea

igual que la lema, con dos puntas en la parte superior (escotadura). Lígula membranosa de unos 2 mm de largo, truncada, ciliada en la parte superior y más o menos lacerada. Ovario glabro. Cariósipide con macula hilar hasta la mitad del grano. Número cromosómico: $2n=4x=28$.

Esta especie se encuentra en los bordes de los arroyos, praderas húmedas, zonas de montaña con pedregosidad. Localización: África del Norte (véase figura 11)(Clayton, Vorontsova, Harman, & Williamson, 2006; Maire, 1955).



Figura 8: Sección de la hoja de *Festuca mairei*. Fuente: Borrill, (1972).

Posible origen de las especies del clado Magrebí

El antepasado más reciente del complejo *Schedonorus-Lolium* se originó hace unos 9,2 millones de años (Mioceno), y la diversificación de los clados Europeo y Magrebí se produjo entre los periodos del Messiniense y Plioceno temprano (hace 5,8 millones de años y 4,9 millones de años respectivamente)(Inda et al., 2013). Los ancestros recientes que originaron el clado Magrebí son por ello todavía desconocidos.

Existen diversos autores que aportan hipótesis sobre el posible origen de las especies de este clado, como Chandrasekharan, Lewis, & Borrill, (1972) o Borrill, (1972) que afirman que *Festuca arundinacea atlantigena* puede provenir del cruce mediante alopoliploidización de *Festuca mairei* con *Festuca arundinacea fenas*. También, estudios basados en hibridación genómica *in situ* de especies, sugieren el origen alohexaploide de *Festuca arundinacea* Schreb *subsp. arundinacea* (hexaploide y perteneciente al clado Europeo) a partir de *Festuca pratensis* Huds. (diploide) y *Festuca arundinacea var. glaucescens* Boiss. (tetraploide) (Humphreys et al., 1995).

Por ello, es posible que individuos con un nivel de ploidía menor comprendidos en el complejo *Schedonorus-Lolium*, fueran los originarios del resto de las especies agrupadas en el clado Magrebí, a través de mecanismos de autoploidización y alopoliploidización.

Es por esto, que en este trabajo se plantea la hipótesis del origen de las especies del clado Magrebí con mayor nivel de ploidía a partir de aquellas con un nivel de ploidía menor (como son *Festuca mairei* y *Festuca arundinacea fenas*). Pero además, se incluyen en este estudio las especies *Festuca pratensis* Huds. (*subespecies pratensis* y *apennina*), y *Festuca*

arundinacea Schreb. *subsp. arundinacea*, todas del clado Europeo como posibles ancestros, debido a la cercanía evolutiva y morfológica que presentan con las especies de estudio. Y en el caso de *Festuca pratensis subsp. pratensis*, también por su bajo nivel de ploidía y su implicación en el origen de otros taxones del clado Europeo.

Las características de estas especies son las siguientes:

***Festuca pratensis* Huds. :**

Planta valiosa para el pastoreo, perenne, cespitosa y que forma grandes matas al crecer. Posee tallos de entre 30-120 cm de altura erectos o encorvados, de moderadamente delgados a gruesos, no ramificados y lisos. Las hojas son de tonos verdosos brillantes, sin tricomas y envainadoras, estrechándose hacia la punta, de hasta 45 cm de longitud. Son hojas planas, ásperas en los márgenes, cuya sección puede verse en la figura 9. Vainas redondeadas y lisas. Lígula de aproximadamente 1 mm, membranosa. Aurículas sin pelo en el ápice. Inflorescencia en panícula suelta, erecta o arqueada, lanceolada u ovada y más o menos asimétrica. Presenta una longitud de 10-35 cm, con tonos verdosos o morados. Sus ramas están generalmente emparejadas, son desiguales, esbeltas y ásperas. Las ramas más cortas contienen 1-3 espiguillas y las más largas 4-6. Pedicelos de hasta 5 mm de largo. Espiguillas cilíndricas, convirtiéndose en lanceoladas u oblongas, de 10-20 mm de longitud, con 5-14 flores. Glumas persistentes, de estrechamente lanceoladas a oblongas, un poco desiguales. La superior de 3-7 mm de largo. Lemas estrechamente oblongas o lanceoladas, puntiagudas, con 6-7 mm de longitud, firmes a excepción de los márgenes y la punta que son membranosos, 5-nervadas, lisas o un poco ásperas cerca de la punta. Páleas de la misma longitud que las lemas, con quillas ásperas. Anteras de 3-4 mm de largo. Ovario glabro.

- Subespecie *pratensis*: tallos de entre 30-70 cm y hojas de 3-5 mm de ancho. Vainas abiertas. Espiguillas de 9-11 mm de longitud. Lemas obtusas, no 2-dentadas en el ápice y sin aristas. Numero cromosómico $2n=2x=14$. Se puede localizar en Europa y Asia occidental (véase figura 11).
- Subespecie *apennina* (De Not.) Hegi: Tallos más altos, de hasta 90 cm. Hojas de 5-8 mm de ancho. Vainas cerradas hasta la mitad. Espiguillas de 9-13 mm. Lemas 2-dentadas en el ápice y aristadas. Numero cromosómico $2n=4x=28$. Se encuentra en la zona de los Alpes, Sicilia, zona noroeste de la antigua Yugoslavia y zona de los Cárpatos (véase figura 11) (Borrill, 1972; Hubbard, 1954; Markgraf-Dannenberg, 1980).

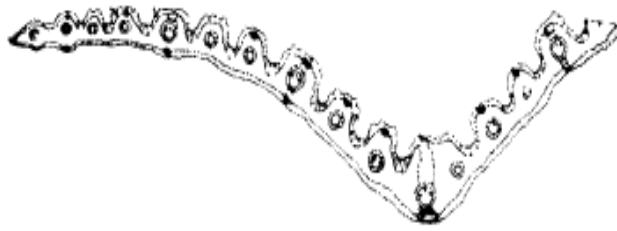


Figura 9: Sección de la hoja de *Festuca pratensis*. Fuente: Borrill, (1972).

***Festuca arundinacea* Schreb. Subsp. *arundinacea* var. *arundinacea*:**

Planta perenne, de 45-180 cm de altura, sin rizomas y a veces se encuentra formando grandes matas densas. Los tallos son erectos y por lo general gruesos, no ramificados, con 2-5 nudos, ásperos hacia la panícula o lisos. Hojas verdes, sección de 3-12 mm de ancho, con numerosos nervios y costillas, surcos intercostales poco profundos, esclerenquima en trabéculas a nivel de los nervios principales y formando columnas a nivel de los secundarios (véase figura 10). Vainas redondeadas en la parte posterior, lisas o rugosas, con pequeñas aurículas; pelos diminutos en las aurículas y en la unión con la hoja. Lígulas de hasta 2 mm de largo, membranosas. Panículas erectas o arqueadas, de lanceoladas a ovadas, sueltas, y abiertas o contraídas, de 10-50 cm de largo, verdes o moradas. El eje y las ramas son ásperos, por lo general estas últimas van emparejadas, con la más corta acompañada de 3 o más espiguillas. Pedicelos de hasta 8 mm de largo. Espiguillas elípticas u oblongas, 10-18 mm de largo, con 3-10 flores. Glumas persistentes, ligeramente desiguales o iguales, puntiagudas; la inferior estrechamente lanceolada, de 3-6 mm de largo y uninervia; la superior lanceolada o lanceolada-oblonga, de 4,5-7 mm de largo, y 3-nervada. Lemas superpuestas, lanceoladas u oblongo-lanceoladas en vista lateral, puntiagudas o no, de 6-9 mm de largo, ampliamente redondeadas en la parte posterior, sin aristas o con el nervio central continuando como una arista rugosa y fina de 1-4 mm de largo; firmes a excepción de los márgenes superiores membranosos, 5-nervada y ásperas especialmente en los nervios. Pálea tan largas como las lemas, con quillas ásperas. Las anteras de 3-4 mm de largo. Grano herméticamente encerrado por la lema y la palea. Número cromosómico $2n=6x=42$.

Se encuentra distribuida a lo largo de las islas británicas y por Europa y parte de Asia (véase figura 11). Se localiza en prados de baja altitud, por los márgenes de ríos y arroyos, suelos secos, calcáreos y arenosos, etc (Hubbard, 1954; Portal, 1999).

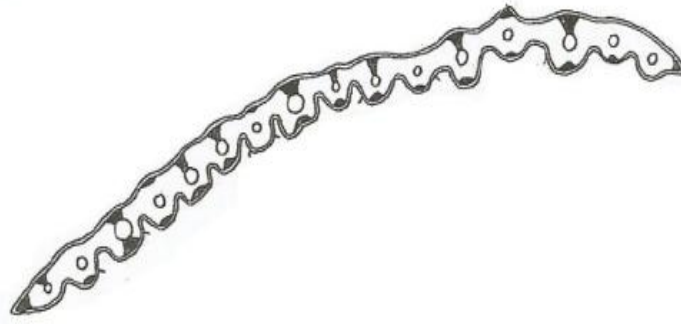


Figura 10: Corte de hoja de *Festuca arundinacea arundinacea*. Fuente: Portal, (1999).

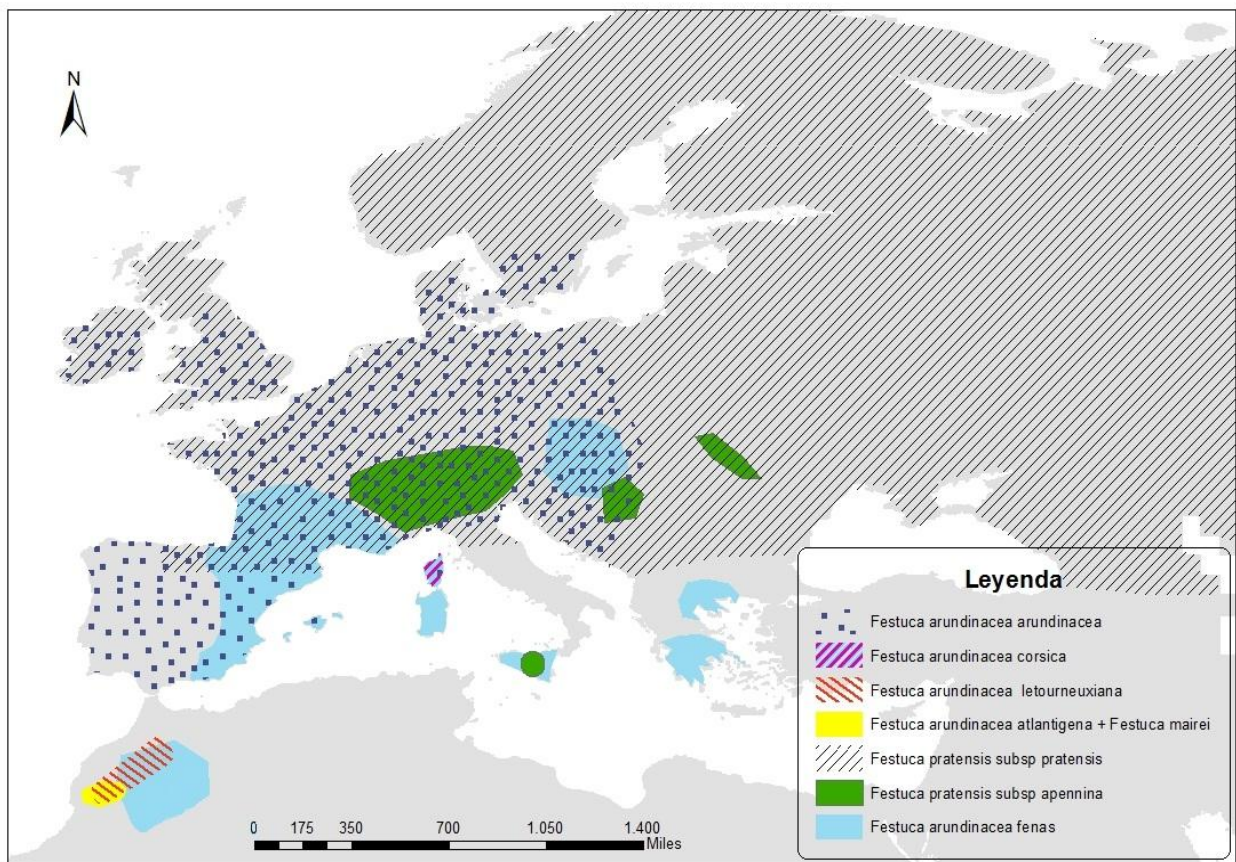


Figura 11: Mapa de distribución de las especies de estudio. Fuente: elaboración propia, con datos obtenidos de "Global Biodiversity Information Facility," (2015).

Fundamentos y usos de la hibridación fluorescente *in situ*

La técnica FISH, surgió por el progresivo perfeccionamiento de antiguas técnicas de hibridación, tales como las que empleaban sondas radiactivas de DNA y RNA; y también por la evolución producida en el campo de la citogenética en los últimos años, que permitió la aparición de innovaciones técnicas en microscopía, el desarrollo de métodos rápidos de

marcaje y detección de sondas, y la creación de softwares para el posterior tratamiento de las imágenes (Herrera, 2007).

El fundamento de esta novedosa técnica consiste en la hibridación de sondas o fragmentos de DNA marcados con determinados fluorocromos, sobre el DNA cromosómico de estudio, gracias a la complementariedad existente entre dicha sonda y las regiones de los cromosomas a estudiar. Estas sondas pueden marcarse con moléculas fluorescentes (método directo) o con moléculas no fluorescentes, que serán detectadas posteriormente con anticuerpos fluorescentes (método indirecto). La detección consiste en la exposición de las preparaciones microscópicas hibridadas con las sondas a luz ultravioleta, provocando la excitación de las moléculas fluorescentes, y como consecuencia la emisión de luz, cuya longitud de onda varía en función del fluorocromo empleado. Dicha emisión es captada por un microscopio de fluorescencia empleando los filtros adecuados a la longitud de onda que emite cada fluorocromo. Acto seguido, mediante la toma de microfotografías monocromáticas (una de cada sonda y otra de los cromosomas teñidos con DAPI) se realiza una superposición de cada imagen y se obtiene una final, que permite ver las regiones marcadas sobre los cromosomas (Herrera, 2007; Nederlof et al., 1989).

FISH, presenta numerosas aplicaciones, como el estudio del comportamiento cromosómico, la identificación de cromosomas específicos, la detección de secuencias específicas de DNA, posibilita también el estudio del genoma en híbridos, etc, todo ello con alta resolución y velocidad. Pero trae consigo algunas limitaciones como puede ser por ejemplo la sensibilidad de detección, que dependerá del tamaño de la secuencia de DNA empleada como sonda (Devi, Ko, & Seo, 2005; Herrera, 2007).

Objetivos

Con el presente trabajo, se pretende orientar sobre las posibles especies parentales que originaron las especies del clado Magrebí de las Festucas de hojas anchas, a través de la detección, cuantificación y análisis de regiones de DNA ribosomales altamente conservadas 5S y 25S empleando para ello la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Concretamente se han hibridado sondas de DNA previamente marcadas con fluorocromos, con el genoma de las especies de estudio, para posteriormente detectar con un microscopio de fluorescencia las regiones ribosomales marcadas.

Pero aparte de las especies pertenecientes al clado de estudio, se han considerado en este trabajo a *Festuca pratensis* (*subsp. pratensis* y *apennina*) y *Festuca arundinacea arundinacea* como posibles ancestros, por su cercanía evolutiva a las especies del clado, su nivel de ploidía y su consideración en trabajos previos.

Objetivos específicos

Para comprender el posible origen de las especies poliploides del clado Magrebí, se plantean los siguientes objetivos específicos a alcanzar:

- Determinar el número cromosómico de cada una de las especies de estudio.
- Puesta a punto de la técnica FISH para las especies de estudio.
- Realizar un conteo y análisis de las regiones 5S y 25S del DNA ribosómico en cada especie, para intentar establecer relaciones de parentesco entre ellas.

Materiales y métodos

La metodología y el material empleado para el desarrollo de este trabajo aparecen descritos a continuación, y clasificados a su vez en varias fases más concretas y ordenadas cronológicamente:

Obtención de embriones germinados y plantas adultas

La obtención de embriones germinados, plantas adultas y preparaciones microscópicas con cromosomas en metafase, se ha llevado a cabo en las fases que a continuación se describen y atendiendo a las directrices generales de los autores Jenkins & Hasterok, (2007); Valladolid, Blas, & Gonzáles, (2004):

Material vegetal utilizado

Las semillas empleadas para la realización de este trabajo han sido recibidas de los bancos de germoplasma Western Regional Plant Introduction Station (WRPIS) del Servicio de Agricultura de Estados Unidos (Pullman, U.S.A.), y Aberystwyth Genetic Resources (ABY) (Aberystwyth, Reino Unido) (véase tabla 1).

Lote/ población	Especie	Banco	Procedencia	Puestas a germinar	germinadas	I.G.
PI 283306	<i>Festuca pratensis</i>	WRPIS	Reino Unido (Inglaterra)	270	263	97,4%
ABY-BN 865	<i>Festuca arundinacea atlantigena</i>	ABY	desconocido	361	183	50,6%
ABY-BN 807	<i>Festuca arundinacea atlantigena</i>	ABY	Marruecos	120	56	46,6%
ABY-BN 1170	<i>Festuca arundinacea corsica</i>	ABY	Francia, Guyancourt (donación)	310	136	43,8%
ABY-BN 1175	<i>Festuca arundinacea corsica</i>	ABY	Bélgica, Liege (donación)	240	35	14,5%
PI289654	<i>Festuca arundinacea fenas</i>	WRPIS	España (donación)	280	261	93,2%
ABY-BN 354	<i>Festuca arundinacea fenas</i>	ABY	Francia (Rouen)	263	67	25,4%
ABY-BN 275	<i>Festuca arundinacea letourneouxiana</i>	ABY	Marruecos	200	74	37%
ABY-BN 400	<i>Festuca arundinacea letourneouxiana</i>	ABY	Marruecos	310	254	81,9%
PI 610941	<i>Festuca mairei</i>	WRPIS	Marruecos	320	302	94,3%
PI 283312	<i>Festuca mairei</i>	WRPIS	Suecia (donación)	390	219	56,1%

Tabla 1: Lotes de semillas empleadas, clasificadas según su procedencia e índice de germinación (I.G.). Fuente: elaboración propia.

Germinación

Las semillas inicialmente se introdujeron durante una hora en agua para agilizar el proceso de germinación, y posteriormente se traspasaron a placas Petri con papel de filtro absorbente en su interior (véase figura 12). Tras empapar el papel de filtro con agua, se

colocaron en oscuridad a temperatura ambiente, hasta que los embriones germinaron y tuvieron el tamaño adecuado para sus usos posteriores (una semana y media aproximadamente).



Figura 12: Placas Petri con semillas puestas a germinar. Fuente: elaboración propia.

Una vez que las semillas germinaron, se seleccionaron aquellas que poseían raíces de entre 1-2 centímetros de longitud aproximadamente, para la posterior extracción de meristemos.

Los embriones germinados destinados a la obtención de plantas adultas, para su determinación y caracterización, permanecieron más tiempo en la placa Petri hasta conseguir un mayor crecimiento del tallo y las raíces. Posteriormente fueron trasplantados a maceta (véase figura 13) para que continuasen creciendo (ya en invernadero).



Figura 13: Macetas con plántulas etiquetadas. Fuente: elaboración propia.

Obtención de preparaciones microscópicas

Pretratamiento de los ápices radiculares

Los embriones germinados seleccionados para la obtención de ápices radiculares, se introdujeron durante 24 horas como mínimo, en tubos Falcon de 15 ml con agua a 4 °C en su interior. Permitiendo así detener el proceso mitótico y fomentar una acumulación de células

metafásicas en los meristemas, puesto que es en esta fase donde los cromosomas poseen el mayor grado de condensación y pueden ser diferenciados entre sí.

Fijación

Tras sufrir el pretratamiento (24 horas en agua fría), los embriones fueron extraídos del agua para proceder a su fijación o interrupción rápida de los procesos vitales de los mismos. Para llevar a cabo esta fase se empleó la Disolución de Carnoy (metanol y ácido acético glacial, ambos de la marca Panreac, en proporción 3:1 en volumen respectivamente). Concretamente, se introdujeron los embriones durante 30 minutos en dicha mezcla y se mantuvieron en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se renovó esta, y se almacenaron de nuevo en oscuridad durante 4 horas.

Por último, para su conservación se introdujeron a -20 °C hasta su siguiente uso.

Digestión enzimática

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

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

El tampón citrato x10 está compuesto por:

- 0,84 g de ácido cítrico monohidratado (Panreac).
- 1,76 g de citrato trisódico dihidratado (Panreac).
- 100 ml de agua destilada.

Antes de usarse se diluyó 10 veces.

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

Tras eliminar el exceso de tampón de los ápices con papel absorbente, se colocaron estos en un bloque de vidrio para microscopio, sumergidos en una mezcla enzimática a 37 °C (temperatura óptima a la cual las enzimas digieren la muestra) durante dos horas. Dicha mezcla enzimática contenía:

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

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

Transcurridas las dos horas, se retiró la mezcla enzimática y se lavaron los ápices con tampón citrato 10mM de nuevo (eliminando así restos de la mezcla enzimática) quedando listos para la extracción de los meristemas.

Extracción de meristemas

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

Rápidamente, con agujas emangadas se retiró la cofia de la raíz y se liberó el tejido meristemático con ayuda de una lupa binocular Nikon SMZ800. Con una micropipeta se seleccionó el meristemo y se traspasó a un portaobjetos nuevo, lavado con etanol al 70 % (por cada portaobjetos se colocaron 2 ó 3 meristemas).

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

Con los meristemas en el portaobjetos, se colocó encima un cubreobjetos de vidrio de 20x20 mm y se le aplicó presión, facilitando la dispersión de los cromosomas.

Búsqueda de cromosomas en metafase

Para la obtención de preparaciones microscópicas adecuadas, que posteriormente se usaron en la técnica FISH, se escogieron los portaobjetos con al menos cinco células con cromosomas en metafase, perfectamente visibles, contables y fuera del núcleo celular.

Para ello, tras aplicar presión, se empleó un microscopio de contraste de fase ZEISS AX10-Lab. A1 (véase figura 14) para localizar los cromosomas.



Figura 14: Microscopio de contraste de fase. Fuente: elaboración propia.

Tras localizar al menos cinco juegos cromosómicos visibles, contables y fuera del núcleo celular, se procedió a marcar los portaobjetos seleccionados con el nombre de la especie, la calidad de visualización y los límites del cubreobjetos con un lápiz que marca el vidrio.

Fijación de las preparaciones microscópicas

Los portaobjetos con preparaciones adecuadas y marcados, se introdujeron en hielo seco (CO₂) inmediatamente después de localizar las células con cromosomas, para evitar que la entrada de aire deteriore y desplace las células presentes en la preparación. Permanecieron en hielo seco un mínimo de 30 minutos para permitir la fijación de los cromosomas al portaobjetos.

Se retiró después el cubreobjetos con una cuchilla, y se vertió encima de la preparación una mezcla de etanol absoluto (Panreac) y ácido acético glacial (Panreac) en proporción 3:1 en volumen. Esta mezcla permite una mayor fijación de los cromosomas.

Se sumergieron seguidamente los portaobjetos en etanol absoluto al 100 % durante 30 minutos en un recipiente de vidrio y en posición vertical.

Por último se extrajeron y se dejaron escurrir y secar para posteriormente almacenarlos a 4 °C para su posterior uso.

Preparación de las sondas de DNA ribosómico 5S y 25S

Las sondas complementarias a las regiones ribosómicas que se utilizaron, procedían de *Triticum aestivum*, para la región 5S y de *Arabidopsis thaliana*, para la 25S. Ambas estaban insertadas en clones de *Escherichia coli* (5S: pTa794; 25S: 25S rDNA de *A. thaliana*). Estas células fueron recibidas de la colección del Departamento de Citología de la Universidad de Silesia en Katowice, Polonia.

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

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

En primer lugar se elaboraron 500 ml de medio de cultivo que a continuación se describe, para posteriormente proceder a la preparación del medio sólido y del medio líquido. Dicho medio contenía:

- 5 g de triptona (digerido pancreático de caseína, Conda 1612).
- 2,5 g de extracto de levadura (Conda 1702).
- 2,5 g de cloruro de sodio (Panreac 121659).

Se vertieron dichas cantidades en un recipiente de vidrio y se enrasó después con agua MQ (agua doblemente destilada) hasta 400 ml, agitando después la preparación con agitador magnético. Posteriormente se fijó el pH de la mezcla en 7, usando ácido clorhídrico o sosa, y se enrasó de nuevo con agua MQ hasta 500 ml, obteniendo así la preparación a partir de la cual se elaboraron después ambos medios.

En dos frascos de Rous, se vertieron por un lado 3 g de agar (Conda) y 200 ml de la mezcla anterior en el primero para el medio sólido, y 300 ml de mezcla en el segundo para el líquido. Después se esterilizaron en autoclave.

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

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

Siembra de bacterias en el medio sólido

Empleando un asa de siembra y las bacterias que contenían las regiones de DNA ribosómico 5S y 25S, se realizó una siembra por agotamiento sobre el medio sólido contenido en las placas Petri. Al final, se obtuvieron dos placas con bacterias 5S y otras dos con bacterias 25S.

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

Siembra de bacterias en el medio líquido

El contenido de los tubos Falcon con el medio líquido, se repartió en 4 nuevos tubos de 15 ml, dos para cada tipo de bacteria.

Para la realización de la siembra bacteriana, se seleccionó una colonia con una punta de micropipeta, y se introdujo en el tubo Falcon correspondiente con medio líquido. Tras esta operación se obtuvieron 4 tubos Falcon con bacterias sembradas (2 con bacterias 5S y otras dos para 25S).

Los tubos con las puntas de micropipeta en su interior, se introdujeron en el agitador orbital (véase figura 15) a 37 °C durante una noche (en torno a 12 horas).



Figura 15: Agitador orbital. Fuente: elaboración propia.

Extracción de DNA

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

Se tomaron los tubos Falcon con las bacterias en medio líquido y se centrifugaron a 4000 revoluciones por minuto durante 4 minutos a temperatura ambiente, para favorecer su precipitación.

Posteriormente, se retiró el sobrenadante y las puntas de micropipeta, quedando las bacterias precipitadas en el fondo.

Empleando el Kit QIAprep Spin Miniprep Kit (50) de QIAgen se extrajo el DNA siguiendo el protocolo:

Con 500 μ l de un tampón de ruptura que contenía RNAsas presente en el Kit (tampón 1), se resuspendieron las bacterias y se rompieron las paredes celulares de las mismas, así, como el RNA.

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

Se vertieron después en cada tubo 400 μ l de un tampón detergente (tampón 2 del Kit) y se agitaron suavemente hasta conseguir que el contenido de los tubos se volviera azul.

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

Posteriormente se centrifugaron a 13500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se tomó el sobrenadante (que es donde se encuentra el DNA) y se traspasó a 2 nuevos tubos de 1,5 ml. El precipitado se desechó (ya que contenía las membranas, proteínas, paredes celulares, etc).

Se añadieron después 650 μ l de isopropanol (Panreac) a temperatura ambiente y se agitó suavemente durante 1,5 minutos, para luego centrifugar durante 20 minutos a 13500 rpm.

Se retiró el sobrenadante de nuevo y se añadieron 500 μ l de etanol al 70 % en volumen.

Posteriormente, se centrifugaron de nuevo los tubos a 13500 rpm durante 2 minutos y se retiró el sobrenadante, dejando evaporar el etanol restante.

Por último, se adicionaron 30 μ l de tampón EB (10mM Tris.Cl pH 8,5) en cada tubo y se almacenaron a 4 °C durante un día.

Determinación del DNA extraído

Empleando un fluorómetro Qubit 3.0 (Life technologies) (véase figura 16) se determinó la concentración de DNA extraído.

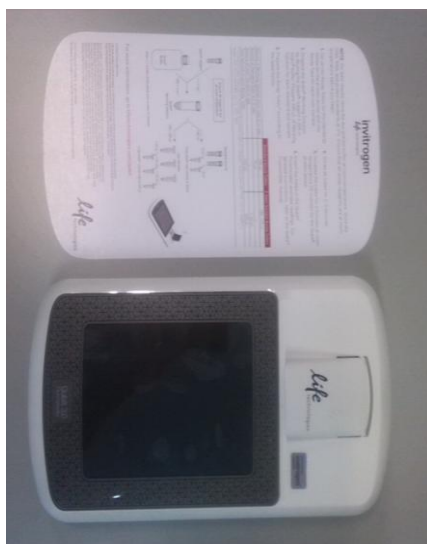


Figura 16: Qubit 3.0 Fluorometer. Fuente: elaboración propia.

Para ello, siguiendo el protocolo proporcionado por la empresa se realizó lo siguiente:

Se preparó inicialmente una “disolución de trabajo”, añadiendo:

- 1 μl de reactivo Qubit (disolución presente en el Kit) por cada muestra a analizar incluyendo dos estándares.
- 199 μl de tampón Qubit (disolución presente en el Kit) por cada muestra a analizar incluyendo dos estándares.

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

Tras elaborar la disolución de trabajo se prepararon las muestras y los estándares a analizar en tubos propios del Kit, en este caso se emplearon 4 y se adicionó a cada uno:

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

Cada uno de los tubos se enrasó a 200 μl con la disolución de trabajo preparada previamente, asegurando que el volumen final fuera el mismo.

Posteriormente, tras agitar cada uno durante dos segundos, se dejaron dos minutos de incubación antes de realizar la medición.

Finalmente, se introdujeron en el fluorómetro cada uno de los tubos, y se obtuvieron las concentraciones para las dos muestras de DNA.

Marcaje y lavado del DNA extraído

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

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

Dado el tamaño que presentaban ambas regiones extraídas, 5S: 410 pares de bases y 25S: 2,3 kilopares de bases, se realizó el marcaje de la región 5S por el método de PCR y la 25S por Nick translation (Hasterok, Langdom, Taylor, & Jenkins, 2002).

Marcaje región 5S por PCR

Se prepararon inicialmente las disoluciones necesarias para realizar la mezcla de reacción.

Con los nucleótidos y los cebadores preparados, se procedió a la elaboración de la mezcla de reacción en tubos eppendorf de 0,2 ml para proceder después a realizar el marcaje en el termociclador:

Mezcla de reacción:

- H₂O estéril y destilada (MQ): 25,5 µl
- Tampón x10 (Promega M1906): 5 µl
- MgCl₂ 25 mM(Promega A3514): 3 µl
- dATP (2,5 mM): 2 µl
- dCTP (2,5 mM): 2 µl
- dGTP (2,5 mM): 2 µl
- dTTP (2,5 mM): 3,25 µl
- Cebador directo (PVI-M13, 10 µM): 2 µl
- Cebador reverso (PVII-M13, 10 µM): 2 µl
- DNA (30 ng/ µl): 1 µl
- Digoxigenina-dUTP 1mM (Roche 11 093 088 910): 1,75 µl
- aTaq (Promega M124B): 0,5 µl

Obteniéndose un volumen final de **50 µl** (cantidad para marcar 8 preparaciones microscópicas).

Los tubos con la mezcla preparada, se introdujeron en un termociclador con el siguiente programa:

94 °C----1 minuto.	} Durante 35 ciclos
94 °C ---40 segundos	
55 °C----40 segundos.	
72 °C----1 minuto y 10 segundos.	
72 °C----5 minutos.	
4 °C	

Lavado de DNA de la región 5S

Para lavar el DNA marcado, se traspasó el contenido (50 µl) a tubos de 1,5 ml y se vertieron:

- 5 µl acetato de sodio 3 M (1/10).
- 137,5 µl de etanol 100 % frío (-20 °C).

Se mezcló el contenido de los tubos suavemente y se dejó incubar 30 minutos a -80 °C.

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

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

Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol restante introduciendo los tubos eppendorf en la estufa a 37 °C durante 15 minutos.

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

Marcaje DNA 25S por “Nick Translation”

Inicialmente se elaboraron los reactivos necesarios.

Se preparó la mezcla de reacción en tubos de 0,2 ml. Para ello se añadió en cada uno:

- dATP (0,4 mM): 2,5 µl
- dCTP (0,4 mM): 2,5 µl
- dGTP (0,4 mM): 2,5 µl
- dTTP (0,4 mM): 1,67 µl
- DNA (2 µg): 3 µl
- Tetrametil-rodamina-dUTP 1mM (Roche 11 534 378 910): 0,85 µl
- Mezcla de enzimas y buffer (Roche 11 745 808 910): 7 µl

Obteniéndose un volumen final de **20 µl**. Cantidad para marcar 8 preparaciones microscópicas.

Los tubos eppendorf con la mezcla preparada, se introdujeron en un termociclador con el siguiente programa:

15 °C----1 hora y 30 minutos.

65 °C ---10 minutos.

4 °C

Lavado de DNA de la región 25S

Para lavar el DNA marcado, se traspasó el contenido (20 µl) a tubos de 1,5 ml y se añadieron a cada tubo:

- 2 µl acetato de sodio 3 M (1/10).
- 55 µl de etanol 100 % frío (-20 °C).

Se mezcló el contenido de los tubos y se introdujeron 30 minutos a -80 °C.

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

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

Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y traspasaron los tubos eppendorf a la estufa a 37 °C durante 15 minutos para eliminar el etanol restante.

Finalmente se añadieron 10 µl de agua MQ, y tras agitar suavemente se almacenaron los tubos a 4 °C durante unas 12 horas, para que el DNA precipitado se resuspendiera.

Comprobación de la amplificación y detección de las regiones 5S y 25S mediante electroforesis

Para asegurar que la región 5S fue amplificada por PCR y que existía DNA en la muestra de la región 25S marcada, se procedió a la realización de una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para ello:

Inicialmente se preparó un gel de agarosa vertiendo en un frasco de vidrio:

- 0,5 g de agarosa (Conda).
- 50 ml de tampón tris acético EDTA (TAE) de pH 8,2 cuya composición es:
Para elaborar 2 L, 10x:
 - 242 g tris base [1M].
 - 34,02 g acetato de sodio [12 mM].
 - 80 ml de stock de EDTA 10 mM.
(Diluir 10 veces antes de usar).

Se calentó la mezcla hasta que la agarosa se fundió y tras enfriarse se añadieron 4 µl de tinte Midori Green.

La mezcla se vertió en una placa de electroforesis, y se dejó solidificar una vez colocados los peines.

El gel solidificado junto con la placa, se introdujeron en una cubeta de electroforesis y se cubrieron con tampón TAE (para poner en contacto los dos electrodos).

Se pipetearon las muestras mezcladas con sample buffer (tinte de carga) en los pocillos del gel, además de un marcador de peso molecular VI (Roche 11 062 590 001) compuesto por:

- 5 µl de agua MQ.
- 5 µl de stock de marcador VI.
- 5 µl de sample buffer cuya composición es:
 - 2,5 mg azul de bromofenol.
 - 0,8 ml EDTA 20 mM.
 - 4ml Glicerol.
 - Enrasar hasta 10 ml de H₂O.

Tras programar 100 voltios se dejaron correr las muestras 25 minutos.

Realización de FISH (Hibridación Fluorescente *In Situ*)

Para la realización de la técnica FISH se elaboraron inicialmente los reactivos necesarios:

- Tampón citrato sódico salino (20xSSC): para su elaboración se disolvieron 175,3 g NaCl (Panreac) y 88,3 g de citrato de sodio dihidratado (Panreac) en 800 ml de agua destilada estéril. Posteriormente, tras homogeneizar la mezcla, se ajustó el pH a 7 con ácido clorhídrico. Hecho esto, se enrasó hasta un litro con agua destilada estéril de nuevo y se esterilizó la mezcla en autoclave.
- Tampón fosfato sódico salino con pH 7 (10xPBS): para realizarlo se prepararon inicialmente dos disoluciones:
 - disolución a): se disolvieron 8,01 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac) y 36,82 g de NaCl (Panreac) en 450 ml de agua destilada.
 - disolución b): se disolvieron 1,56 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 8,18 g de NaCl (ambos de Panreac) en 100 ml de agua destilada.Seguidamente se ajustó la disolución a) hasta conseguir un pH de 7, empleando la disolución b). Por último se enrasó la mezcla hasta 500 ml con agua destilada y se esterilizó la mezcla en autoclave.
- Disolución de RNAsa A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$): se disolvieron 100 mg de RNAsa A (Sigma R-5503) en 1 ml de Tris-HCl 10 mM y 15 mM de NaCl. Se puso a hervir 15 minutos y se dejó enfriar. Por último se prepararon alícuotas de 20 μl en tubos de 2 ml y se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Para su uso, se añadieron a la mezcla 1980 μl de 2xSSC.
- Formaldehído libre de ácido al 1% en PBS: se mezclaron 174 ml de agua destilada estéril, 20 ml de 10xPBS y 6 ml de formaldehído al 36% libre de ácidos (Panreac 131328).
- Sulfato de dextrano al 50%: se disolvieron 5 g de sulfato de dextrano (Sigma D8906) en 10 ml de agua destilada estéril a $65\text{ }^\circ\text{C}$. Tras esterilizar la mezcla por filtración (con filtros de tamaño de poro de 22 μm) se realizaron alícuotas de 1 ml. La manipulación de dicha disolución se realizó a $50\text{ }^\circ\text{C}$ debido a su alta viscosidad.
- Dodecil-sulfato sódico al 10% (SDS 10%): se disolvieron 10 g de SDS (Sigma L4390) en 100 ml de agua destilada estéril y se esterilizó la mezcla por filtración.
- Tween/ 4xSSC: se diluyeron 2 ml de Tween 20 (Merk 8.22184.0500) en 798 ml de agua destilada estéril y se le añadieron 200 ml de 20xSSC.
- Leche desnatada bloqueante: se disolvieron 5 g de leche desnatada en polvo en 80 ml de agua destilada esterilizada y en 20 ml de 20xSSC. Se agitó, y se esterilizó la mezcla con filtros de tamaño de poro de 22 μm . Después se realizaron alícuotas de 2 ml.
- Anticuerpos anti-digoxigenina-FITC: se mezclaron 30 μl de anticuerpo anti-digoxigenina (Roche 11 207 741 910) con 270 μl de leche desnatada bloqueante.
- Medio DAPI-Vectashield: se disolvió 1 mg de 4',6-diamino-2-fenilindol (Thermo scientific 62248) en 10 ml de agua destilada estéril y se realizaron alícuotas de 1 ml. Para elaborar el medio se tomaron 2,5 μl de DAPI y se diluyeron en 97,5 μl de Vectashield (Vector Laboratories H-1000).
- Formamida desionizada: se mezclaron 200 ml de formamida 100% (Sigma F7503) con 10 g de resina de Amberlita (Merk IRN-150). Se agitó la mezcla durante 90 minutos y se filtró con papel de filtro.

Una vez preparados los reactivos se procedió a la selección de los portaobjetos con los cromosomas bien definidos.

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

Pretratamiento del portaobjetos con cromosomas

Inicialmente, se añadieron 200 μ l RNAsa A en cada portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos de plástico (hecho a partir de las bolsas de autoclave), dejándolos incubar 1 hora en cámara húmeda a 37 $^{\circ}$ C. Así se aseguró la eliminación del RNA presente en la preparación.

Después, se colocaron los portaobjetos en una cestilla de lavado con 2xSSC y se lavaron a temperatura ambiente 3 veces, durante 5 minutos cada vez (en el primer lavado se retiraron los cubreobjetos de plástico).

Los portaobjetos se fijaron con formaldehído al 1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron de nuevo con 2xSSC 3 veces, durante 5 minutos cada vez.

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

Desnaturalización e hibridación

Se preparó en oscuridad y en tubos eppendorf de 0,5 ml introducidos en hielo la mezcla de hibridación (cantidades especificadas para un portaobjetos):

Reactivo	μ l/portaobjetos
Formamida 100% desionizada	20
Sulfato de dextrano 50% (p/v)	8
20xSSC	4
SDS 10 % (p/v)	2
DNA bloqueante de Salmón (Sigma D9156)	1
DNA marcado 5S	2,5
DNA marcado 25S	2,5
Volumen total	40

Tabla 2: Reactivos empleados en la mezcla de hibridación. Fuente: elaboración propia.

Posteriormente, se agitó y desnaturalizó la mezcla a 75 $^{\circ}$ C durante 10 minutos.

Se colocó en hielo durante 10 minutos y se añadieron 38 μ l de la mezcla en cada portaobjetos.

Tras colocar un cubreobjetos de plástico, se introdujeron los portaobjetos en una placa de hibridación Boekel 28000 a 72 $^{\circ}$ C durante 4 minutos.

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

Lavado riguroso

Para eliminar el DNA marcado y no hibridado, se introdujeron los portaobjetos en 2xSSC a 42 °C, retirando suavemente los cubreobjetos de plástico.

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

Después, se lavaron de nuevo con 2xSSC, tres veces durante tres minutos cada una a 42 °C.

Y por último, se sumergieron en 2xSSC tres veces durante tres minutos cada vez a temperatura ambiente.

Inmunodetección de la digoxigenina

Para la detección de la digoxigenina, puesto que es un reactivo no fluorescente, se necesitó la adición de anticuerpos anti-digoxigenina-FITC, para que se unieran a las zonas marcadas con este reactivo, y permitieran así poder observarlas en el microscopio de fluorescencia.

Para ello, inicialmente se realizó un lavado de los portaobjetos durante 5 minutos con Tween/4xSSC a temperatura ambiente.

Se escurrieron y se añadieron 200 µl en cada porta de reactivo bloqueante (leche desnatada). Se colocaron cubreobjetos de plástico encima y se dejaron incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Transcurrido ese tiempo, se retiraron los cubreobjetos de plástico y se secaron escurriendo por el borde.

Se añadieron después, 45 µl del anticuerpo anti-digoxigenina-FITC por cada porta, colocando después nuevos cubreobjetos de plástico. Posteriormente se introdujeron en cámara húmeda a 37 °C durante 1 hora.

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

Visualización

Se deshidrataron los portaobjetos en etanol al 70 %, al 90% y al 100 % durante un minuto en cada alcohol y se dejaron secar en oscuridad a temperatura ambiente al menos quince minutos.

Se añadieron 9 µl por porta del medio DAPI-Vectashield y se colocó un cubreobjetos de vidrio (24x24 mm) lavado con etanol al 70%, evitando la aparición de burbujas y eliminando el exceso de mezcla presionando con papel de filtro absorbente.

Por último, se guardaron en oscuridad a 4 °C durante toda la noche.

Tras realizar la técnica FISH, se procedió a la localización de los grupos de cromosomas ya hibridados con las sondas, empleando un microscopio de fluorescencia Motic BA410 (véase figura 17).



Figura 17: Microscopio de fluorescencia. Fuente: elaboración propia.

Inicialmente, tras localizar los cromosomas se les realizaron tres fotografías: una en modo DAPI, otra en modo Rodamina, y por último en modo FITC. Hecho esto, empleando el software Wasabi se asoció a cada imagen la longitud de onda de emisión correspondiente (DAPI: 461 nm, que permite ver los cromosomas en azul; Rodamina: 615 nm, para ver las regiones 25S en rojo, FITC: 546 nm que posibilita ver las regiones 5S en verde). Las imágenes ya en color, se introdujeron en el programa de edición fotográfica Micrografx Picture Publisher y se realizó una superposición de las tres, para poder observar los cromosomas con las dos regiones teñidas al mismo tiempo. Pudiendo así determinar el número de regiones existentes en cada célula de las especies de estudio.

Resultados

Determinación del número cromosómico de las especies de trabajo

Tras la realización del conteo cromosómico de las especies de estudio, los resultados obtenidos fueron los siguientes (véanse tabla 3 y figuras 18, 19, 20, 21 y 22):

Lote/Población	Especie	Número cromosómico
ABY-BN 865	<i>Festuca arundinacea atlantigena</i>	56
ABY-BN 807	<i>Festuca arundinacea atlantigena</i>	56
ABY-BN 1170	<i>Festuca arundinacea corsica</i>	28
ABY-BN 1175	<i>Festuca arundinacea corsica</i>	42
PI 289654	<i>Festuca arundinacea fenas</i>	28
ABY-BN 354	<i>Festuca arundinacea fenas</i>	28
ABY-BN 275	<i>Festuca arundinacea letourneouxiana</i>	70
ABY-BN 400	<i>Festuca arundinacea letourneouxiana</i>	70
PI 610941	<i>Festuca mairei</i>	28
PI 283312	<i>Festuca mairei</i>	28

Tabla 3: Resumen del conteo cromosómico de las especies de estudio. Fuente: elaboración propia.

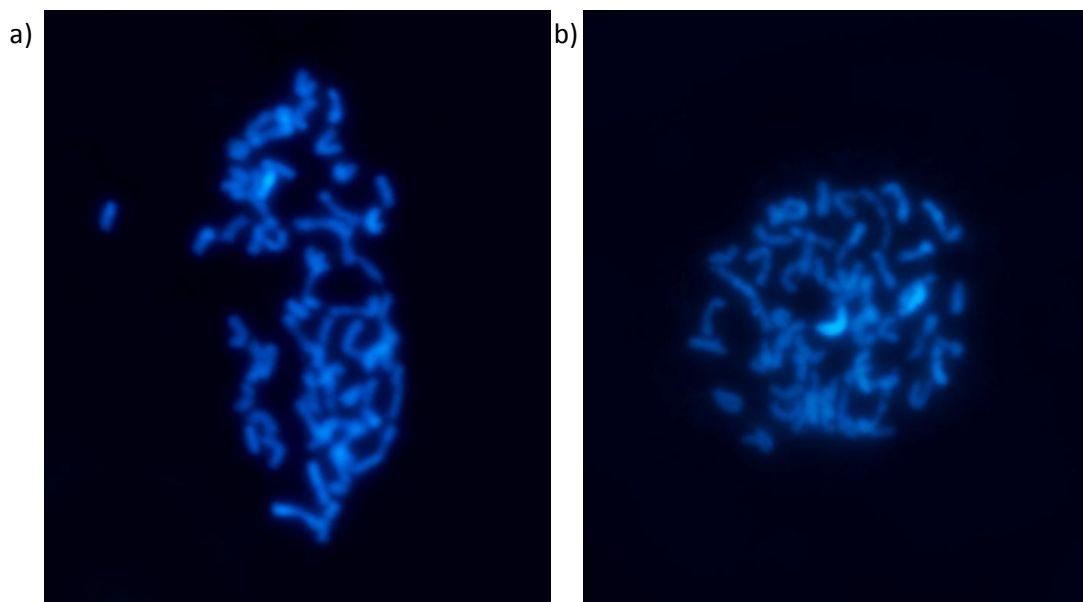


Figura 18: a) cromosomas con DAPI de *Festuca arundinacea atlantigena* del lote ABY-BN 865 ($2n=56$); b) cromosomas con DAPI de *Festuca arundinacea atlantigena* procedente de Marruecos del lote ABY-BN 807 ($2n=56$). Fuente: elaboración propia.

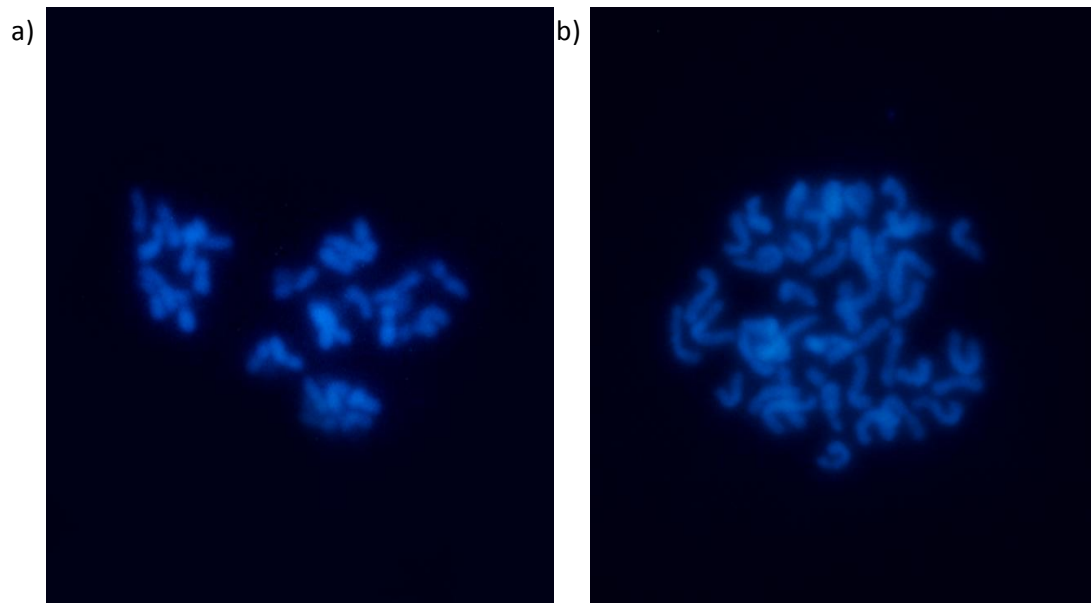


Figura 19: a) cromosomas con DAPI de *Festuca arundinacea còrsica* procedente de Francia lote ABY-BN 1170 ($2n=28$); b) cromosomas con DAPI de *Festuca arundinacea còrsica* de Bélgica lote ABY-BN 1175 ($2n=42$). Fuente: elaboración propia.

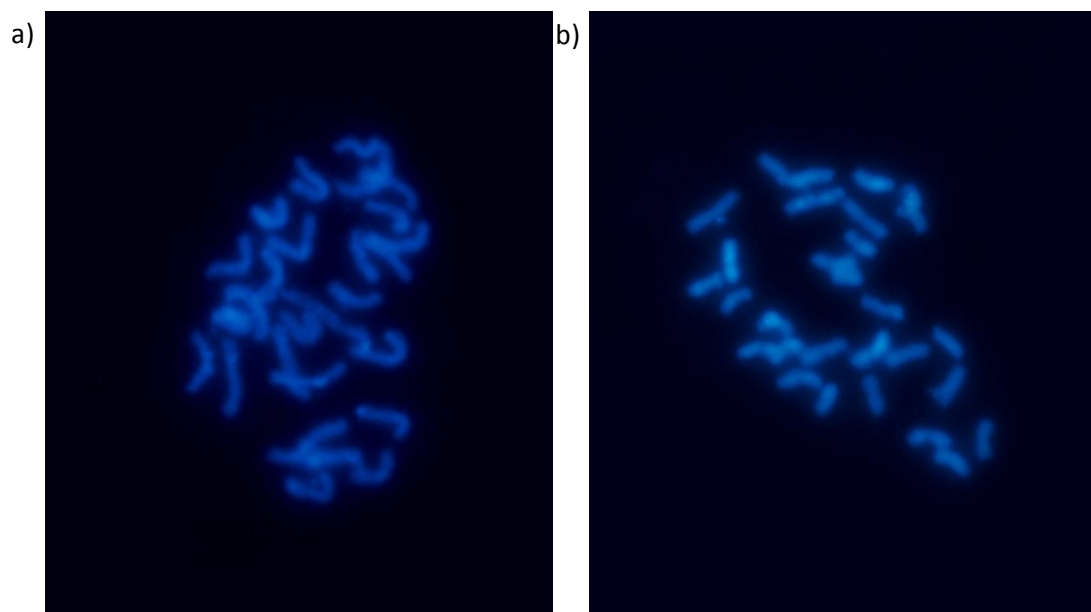


Figura 20: a) cromosomas con DAPI de *Festuca arundinacea fenas* de España lote PI 289654 ($2n=28$); b) cromosomas con DAPI de *Festuca arundinacea fenas* de Francia lote ABY-BN 354 ($2n=28$). Fuente: elaboración propia.

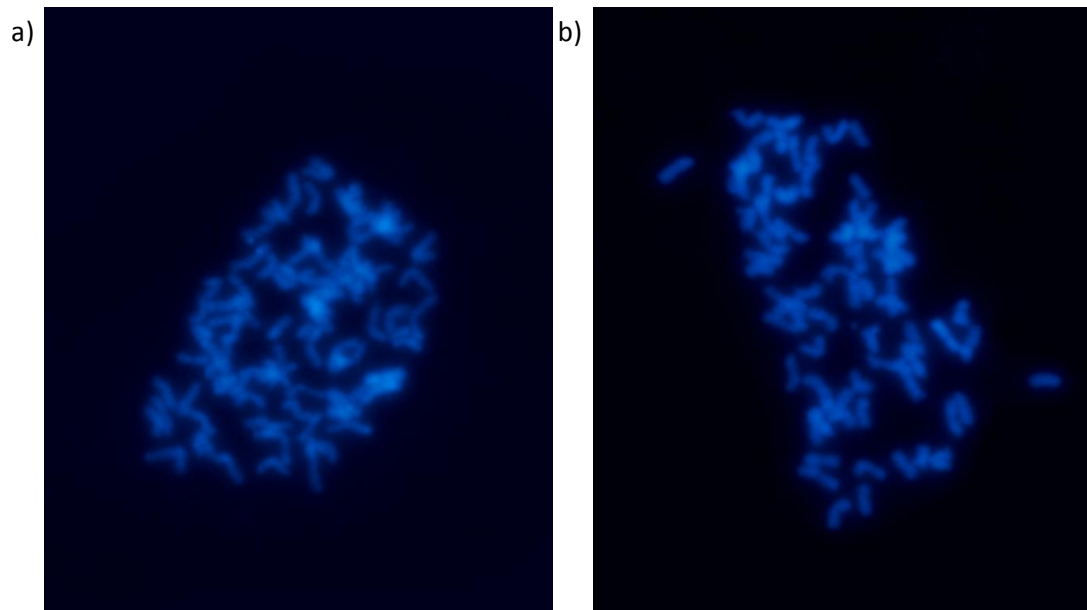


Figura 21: a) cromosomas con DAPI de *Festuca arundinacea letourneouxiana* de Marruecos lote ABY-BN 400 ($2n=70$); b) cromosomas con DAPI de *Festuca arundinacea letourneouxiana* de Marruecos lote ABY-BN 275 ($2n=70$). Fuente: elaboración propia.

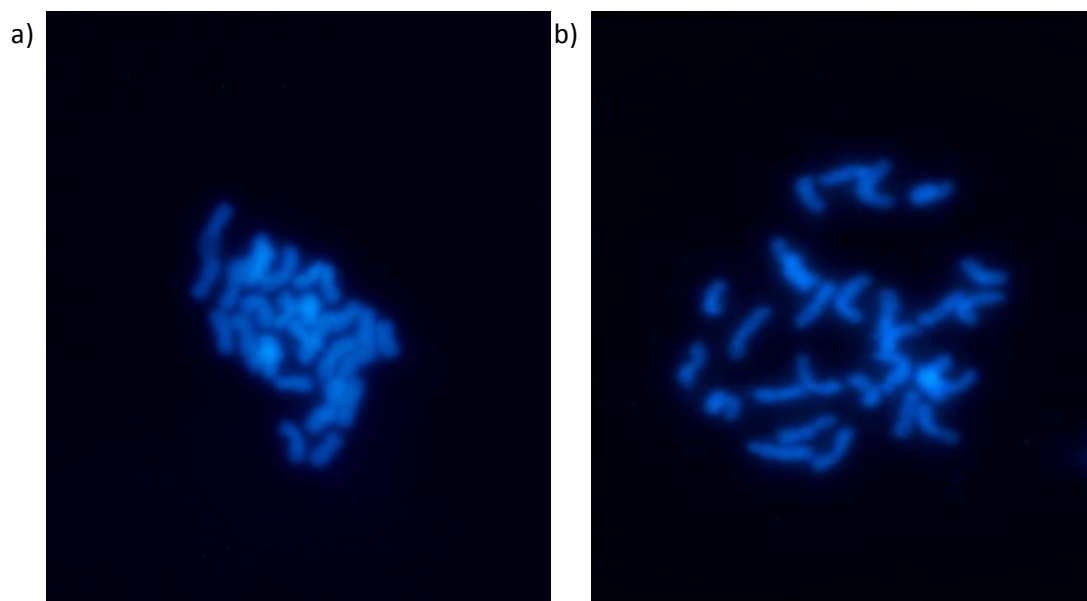


Figura 22: a) cromosomas con DAPI de *Festuca mairei* de Marruecos lote PI 610941 ($2n=28$); b) cromosomas con DAPI de *Festuca mairei* de Suecia lote PI 283312 ($2n=28$). Fuente: elaboración propia.

Puesta a punto de la técnica FISH para las especies de trabajo

Para la puesta a punto de esta técnica se realizaron varios ensayos introduciendo diversas modificaciones al protocolo original descrito por Jenkins & Hasterok (2007):

(1) FISH

Inicialmente se reprodujo el protocolo presente en el apartado materiales y métodos, con las siguientes modificaciones: los fluorocromos empleados para el marcaje de las sondas de DNA, se usaron a la inversa, es decir, la sonda empleada para la detección de la región 5S se marcó con tetrametil-rodamina-dUTP, y la empleada para la 25S con digoxigenina-dUTP. Los volúmenes empleados de formamida 100% y de dextrano 50% en la mezcla de reacción (fase de desnaturalización e hibridación) fueron de 12 μ l y 16 μ l respectivamente, propiciando una hibridación del 58% (Jenkins & Hasterok, 2007). El tiempo de incubación de las preparaciones microscópicas con la RNAsa a 37 °C fue de una hora. Y por último, la mezcla de anticuerpos anti-digoxigenina-FITC empleada estaba diluida 10 veces.

Los resultados obtenidos fueron totalmente inservibles (véase anexo 1), ya que las sondas de DNA marcadas con digoxigenina no hibridaron con los cromosomas de las preparaciones. Se observó también, la presencia de múltiples manchas que impedían el conteo de las regiones 5S (en este caso las únicas visibles), pudiendo deberse a la presencia de RNA en las preparaciones, fallos en el protocolo de lavado, contaminaciones bacterianas, uso de reactivos viejos, etc que propiciaban la aparición de falsos positivos.

(2) FISH

Para este ensayo se reprodujo el protocolo como en el caso anterior, empleando los mismos volúmenes de reactivos en la mezcla de reacción, pero las sondas fueron marcadas al revés: la región 5S con digoxigenina-dUTP y la región 25S con tetrametil-rodamina-dUTP, para intentar conseguir inicialmente la detección de ambas regiones en el microscopio.

Los resultados obtenidos en este ensayo fueron mejores que en el anterior, puesto que, ambas sondas hibridaron con los cromosomas de las preparaciones y pudieron ser detectadas en el microscopio de fluorescencia (véase anexo 1). A pesar de mejorar los resultados, seguían siendo inservibles, debido a las uniones inespecíficas y a la suciedad que presentaban.

(3) FISH

Para este, se incrementó el tiempo de incubación de la RNAsa a 37 °C a 1 hora y 15 minutos, para asegurar la completa eliminación del RNA de las preparaciones. Además, se aumentó el tiempo de incubación de las preparaciones microscópicas a 72 °C, hasta 4 minutos y 30 segundos, para comprobar si se producían mejoras en los resultados.

Hecho esto, se observó que seguía habiendo manchas inespecíficas y suciedad que impedían concretar el número de regiones marcadas, siendo estos resultados prácticamente iguales a los del ensayo anterior (véase anexo 1).

(4) FISH

Para esta prueba, se modificaron los volúmenes de formamida 100% y de sulfato de dextrano 50%, añadiendo 20 μ l y 8 μ l de cada reactivo respectivamente en la mezcla de reacción, provocando una hibridación de mayor rigor (77%) (Jenkins & Hasterok, 2007). Se modificó el lavado con formamida en la etapa de lavado riguroso, empleando formamida al 10% en

0,1xSSC. Se redujo también el tiempo de incubación a 37 °C de las preparaciones con los anticuerpos anti-digoxigenina-FITC a 1 hora. Todo ello para intentar reducir las uniones inespecíficas de las sondas al DNA de estudio (con el incremento de la formamida) y las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos empleando menor tiempo de incubación. Estos cambios permitirían la obtención de preparaciones más limpias y con las regiones de estudio más definidas.

Los resultados mejoraron, pero no permitían determinar el número de regiones de las especies (véase anexo 1).

(5) FISH

Las modificaciones introducidas en esta prueba fueron las siguientes: el reactivo bloqueante (leche desnatada) se filtró para eliminar impurezas de la misma. Se emplearon nuevos anticuerpos y se aumentó su dilución (1:14) para eliminar uniones inespecíficas. Se elaboró nueva formamida 100% y se empleó nuevo reactivo Vectashield (en el apartado de visualización), puesto que el uso de reactivos viejos puede provocar la obtención de resultados con suciedad, como se ha comentado ya.

En este caso, se obtuvieron muy buenos resultados, puesto que las preparaciones quedaban muy limpias tras realizar FISH y el número de regiones 5S y 25S podía ser contado perfectamente (véanse figuras del apartado siguiente).

Determinación del número de regiones 5S y 25S en las especies de estudio

El número de regiones de DNA ribosómico de las especies de estudio se puede observar en la tabla 4 y en las figuras que aparecen a continuación:

Lote/población	Especie	2n	Regiones 5S	Regiones 25S
ABY-BN 865	<i>Festuca arundinacea atlantigena</i>	56	12	10
ABY-BN 807	<i>Festuca arundinacea atlantigena</i>	56	12	10
ABY-BN 1175	<i>Festuca arundinacea corsica</i>	42	6	6
PI289654	<i>Festuca arundinacea fenas</i>	28	4	6
ABY-BN 354	<i>Festuca arundinacea fenas</i>	28	4	6
ABY-BN 275	<i>Festuca arundinacea letourneouxiana</i>	70	16	12
ABY-BN 400	<i>Festuca arundinacea letourneouxiana</i>	70	16	12
PI 610941	<i>Festuca mairei</i>	28	4	6
PI 283312	<i>Festuca mairei</i>	28	4	6

Tabla 4: Resumen del conteo de las regiones 5S y 25S en las especies de estudio. Fuente: elaboración propia.

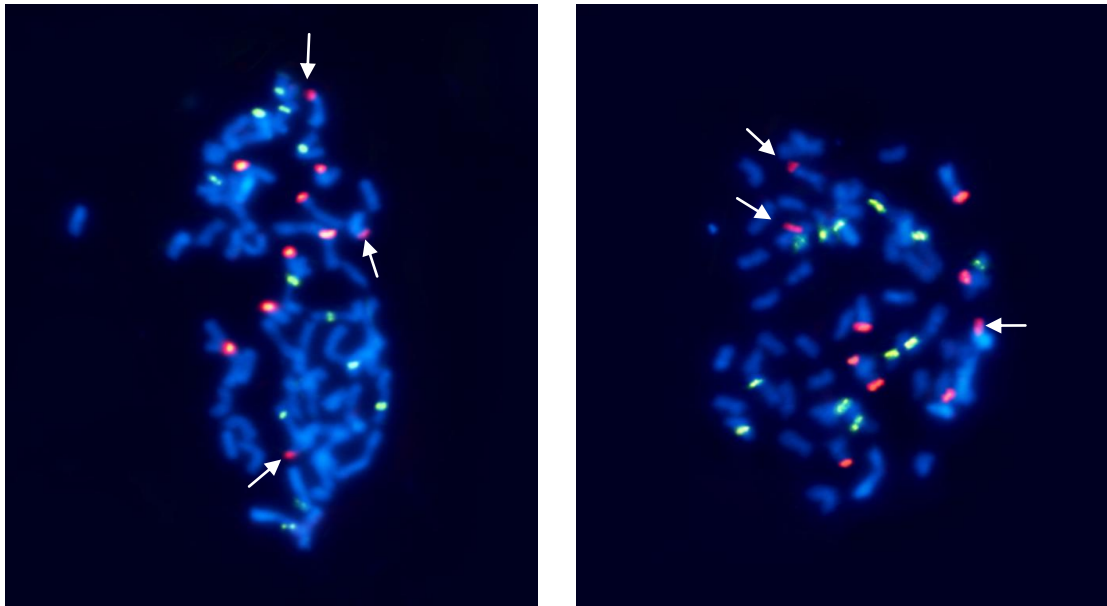


Figura 23: Imágenes de las regiones de DNA ribosómico 5S (en verde) y 25S (en rojo) de *Festuca arundinacea atlantigena* del lote ABY-BN 865. Fuente: elaboración propia.

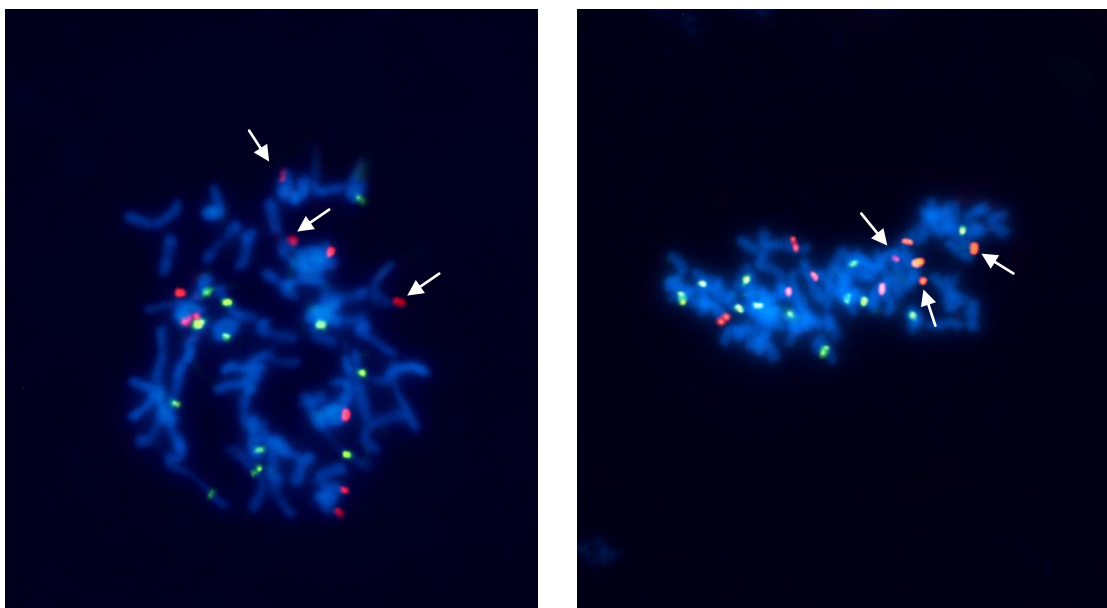


Figura 24: Imágenes de las regiones 5S (en verde) y 25S (en rojo) de *Festuca arundinacea atlantigena* procedente de Marruecos (lote ABY-BN 807). Fuente: elaboración propia.

Como se puede apreciar en las imágenes de las figuras 23 y 24, las especies de *Festuca arundinacea atlantigena* de ambas poblaciones poseen 12 regiones 5S localizadas en diferentes cromosomas y con una intensidad similar. Por otra parte contienen 10 regiones 25S de las cuales 7 se encuentran muy bien definidas, y 3 más tenues que el resto (indicadas con una flecha blanca), situadas también todas en cromosomas diferentes. El patrón descrito se repite en todas las imágenes observadas de esta especie.

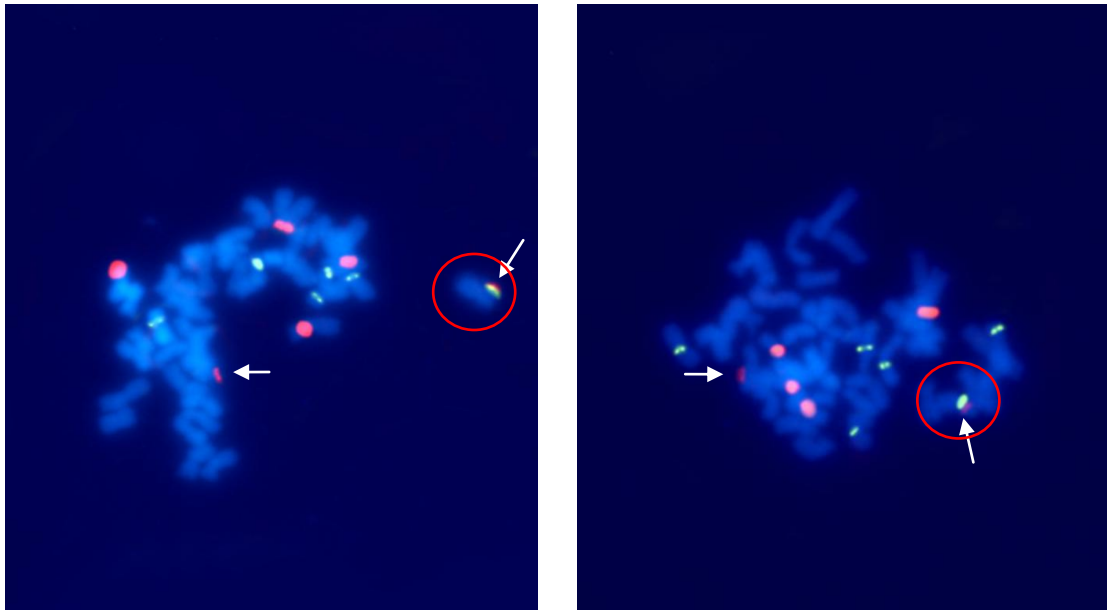


Figura 25: Regiones 5S (en verde) y 25S (en rojo) de *Festuca arundinacea corsica* procedente de Bélgica (lote ABY-BN 1175). Fuente: elaboración propia.

La especie *Festuca arundinacea corsica*, de la que únicamente hay imágenes de la población procedente de Bélgica, (ya que la procedente de Francia presentaba 28 cromosomas en lugar de 42), posee 6 regiones 5S muy bien definidas y 6 regiones 25S, de las cuales 4 son perfectamente visibles y definidas, y 2 son más tenues (indicadas con una flecha blanca). Uno de los cromosomas, presenta 1 región 5S y otra 25S prácticamente en la misma posición (marcado con un círculo rojo) (véase figura 25).

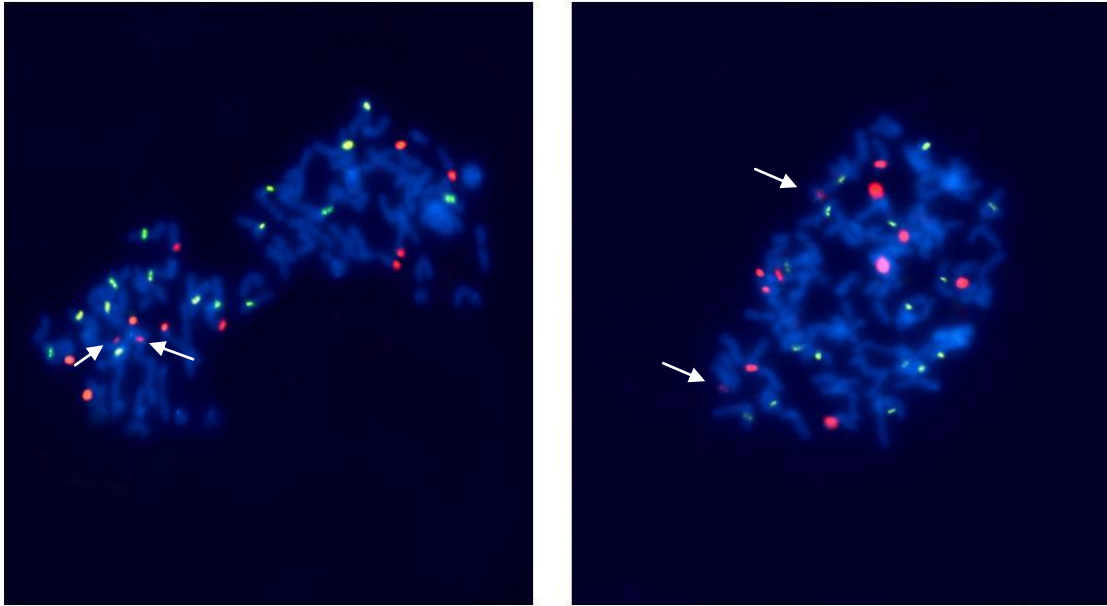


Figura 26: Regiones 5S (en verde) y 25S (en rojo) de *Festuca arundinacea letourneouxiana* procedente de Marruecos (lote ABY-BN 400). Fuente: elaboración propia.

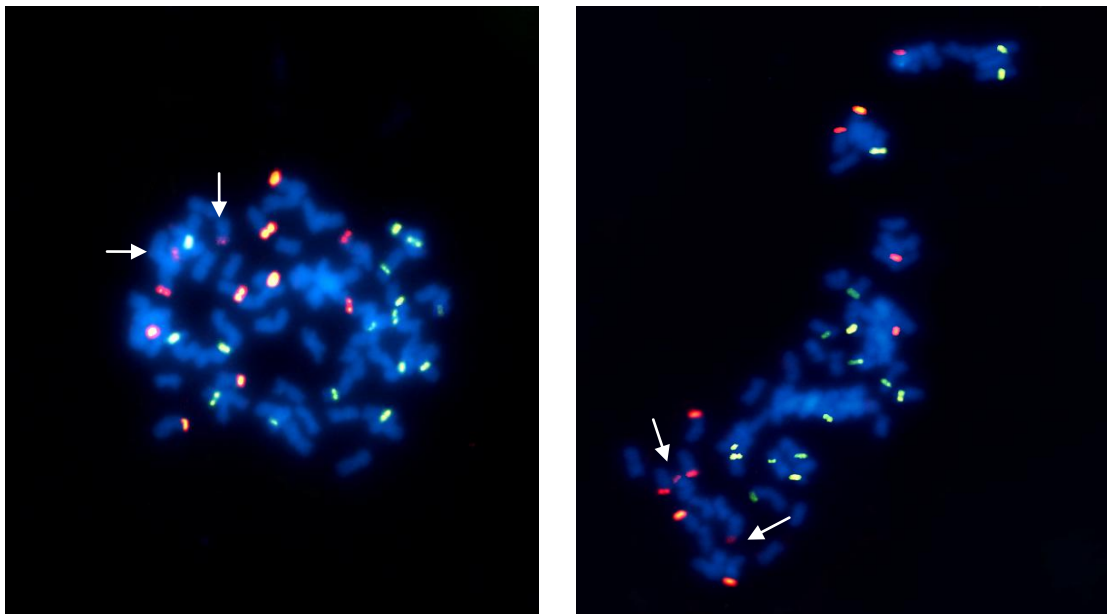


Figura 27: Regiones 5S (en verde) y 25S (en rojo) de *Festuca arundinacea letourneouxiana* de Marruecos (lote ABY-BN 275). Fuente: elaboración propia.

En este caso, observando las imágenes de las figuras 26 y 27 de especies de dos poblaciones de *Festuca arundinacea letourneouxiana* procedentes de Marruecos, se pueden contar 16 regiones 5S prácticamente con el mismo nivel de definición y 12 regiones 25S, de las cuales 10 están muy bien definidas, y 2 más tenues (indicadas con una flecha blanca). Todas las regiones se localizan en cromosomas diferentes.

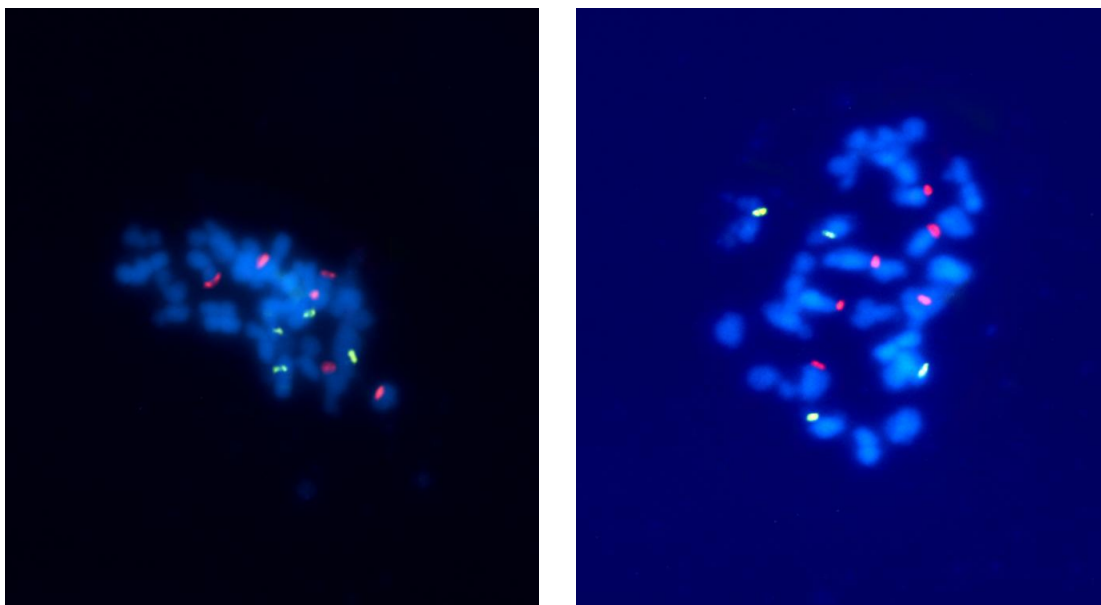


Figura 28: Regiones 5S (en verde) y 25S (en rojo) de *Festuca arundinacea fenas* procedente de España (lote PI 289654). Fuente: elaboración propia.

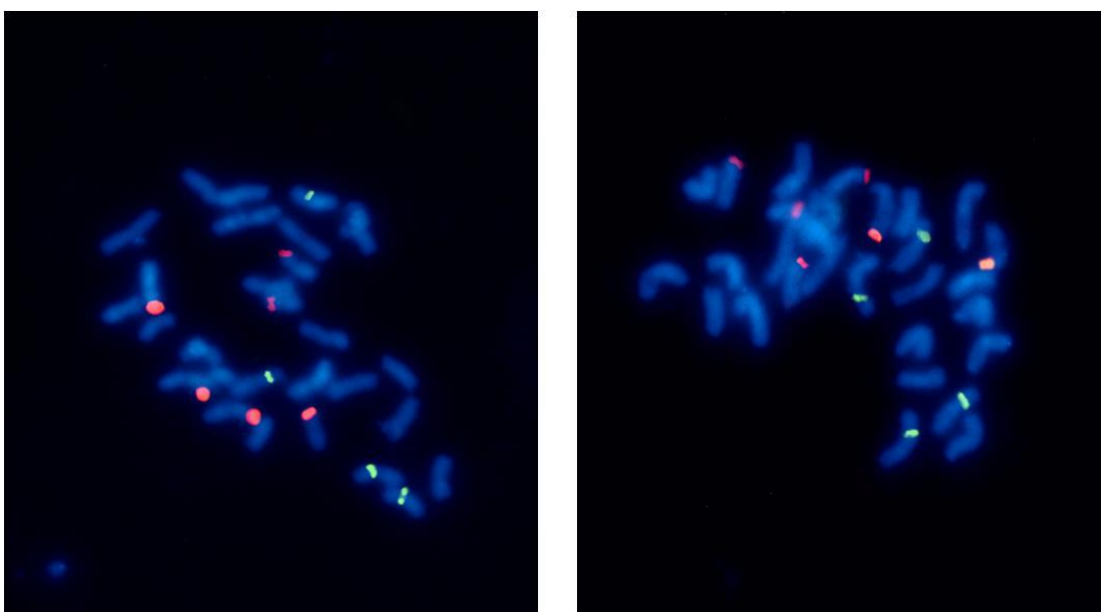


Figura 29: Regiones 5S (en verde) y 25S (en rojo) de *Festuca arundinacea fenas* de Francia (lote ABY-BN 354). Fuente: elaboración propia.

En cuanto a las especies de *Festuca arundinacea fenas* de ambas poblaciones, contienen 4 regiones 5S y 6 regiones 25S. Todas ellas localizadas en cromosomas diferentes y con una intensidad similar como se aprecia en las imágenes de las figuras 28 y 29.

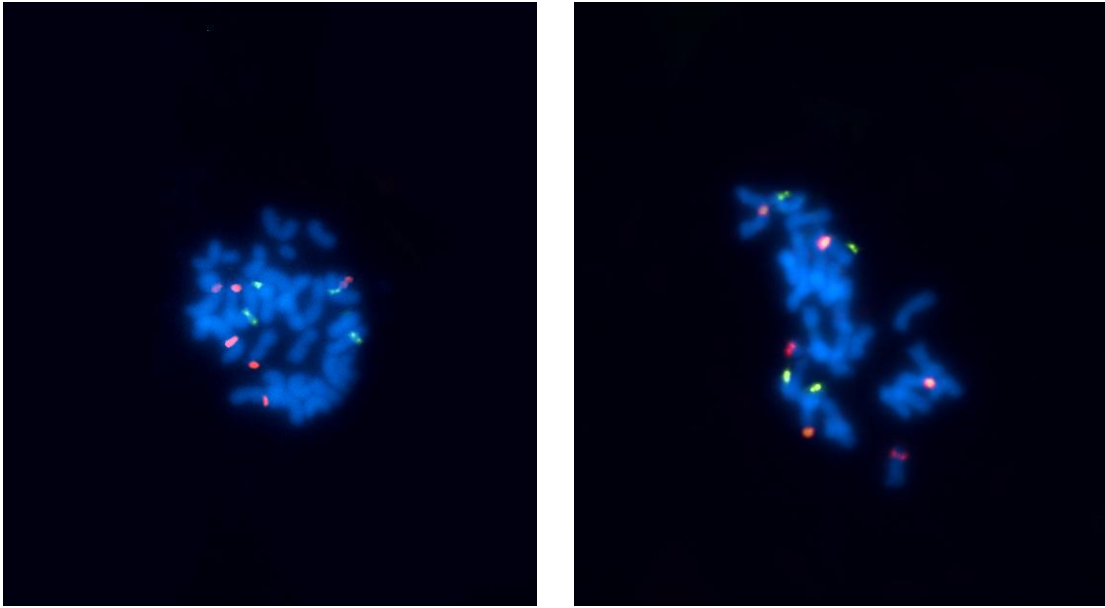


Figura 30: Regiones 5S (en verde) y 25S (en rojo) de *Festuca mairei* del lote PI 610941, procedente de Marruecos. Fuente: elaboración propia.

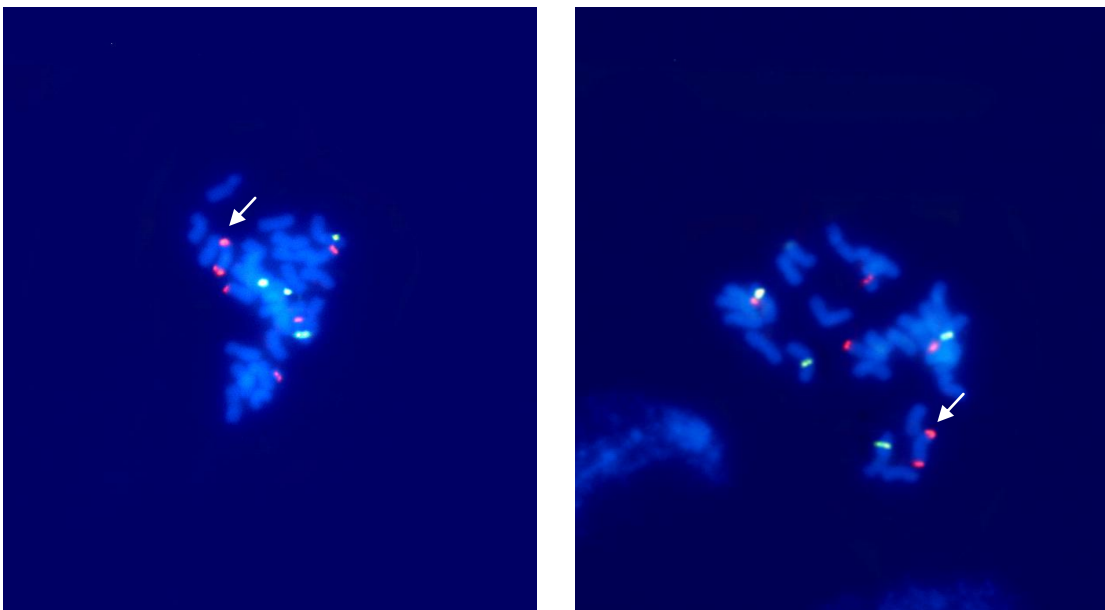


Figura 31: Regiones 5S (en verde) y 25S (en rojo) de *Festuca mairei* del lote PI 283312, procedente de Suecia. Fuente: elaboración propia.

Las especies de *Festuca mairei* de la población procedente de Marruecos presentan 4 regiones 5S y 6 regiones 25S, todas localizadas en diferentes cromosomas y con el mismo nivel de intensidad (véase figura 30).

Por otra parte, las especies de la población procedente de Suecia, contienen el mismo número de regiones 5S y 25S que las de la primera, pero uno de los cromosomas alberga 2 regiones 25S localizadas en sus extremos (señaladas con una flecha), como se puede ver en las imágenes de la figura 31.

Discusión

En cuanto a los resultados obtenidos referentes al número cromosómico de cada especie, cabe mencionar que a excepción de *Festuca arundinacea corsica*, procedente de Francia (lote ABY-BN 1170) con $2n=28$, todas las especies (de las dos poblaciones estudiadas) muestran el mismo número cromosómico descrito en la literatura (véase introducción). *Festuca arundinacea corsica* procedente de Francia, contenía 28 cromosomas en lugar de 42 (véase figura 19 a) como describen Kerguélen & Plonka, (1989) y Portal, (1999) para las festucas de Francia. Tras comprobar la sección de la hoja en las plantas cultivadas en invernadero, no se pudo diferenciar entre los dos taxones procedentes de las dos poblaciones, pero sí diferían de las secciones de las hojas de *Festuca mairei* y *Festuca arundinacea fenas*. Por ese motivo solo se estudiaron las regiones ribosomales de la población de *Festuca arundinacea corsica* $2n=42$.

Por otra parte señalar, que actualmente no existen estudios que determinen el número de regiones 5S y 25S existentes en las especies de mayor nivel de ploidía del clado Magrebí ("Plant rDNA database," 2015). Únicamente se han estudiado las regiones de las especies tetraploides (*Festuca mairei* y *Festuca arundinacea fenas*).

Thomas, Harper, Meredith, Morgan, & King, (1997) realizaron un estudio de los mismos loci analizados en este trabajo de diversas especies, entre las que se encuentran *Festuca mairei* y *Festuca arundinacea* var. *glaucescens*, considerada por diversos autores la misma especie que *Festuca arundinacea fenas* (Devesa et al., 2013). Según Thomas et al., (1997) el número de regiones 5S y 25S existentes en *Festuca mairei* es de 4 y 6 respectivamente, al igual que las especies de ambas poblaciones estudiadas en este trabajo. Concretamente, demuestran que las regiones 5S se localizan todas en cromosomas diferentes, a diferencia de las regiones 25S. De estas últimas, 2 se encuentran en un mismo cromosoma y las otras 4 restantes están situadas en cromosomas diferentes. Esta distribución se repite en las especies de la población procedente de Suecia (PI 283312) estudiada en este trabajo (véase figura 31). Las pertenecientes a la población marroquí (PI 610941), contienen todas las regiones 5S y 25S localizadas en diferentes cromosomas.

Por otro lado, dichos autores afirman también que *Festuca arundinacea glaucescens* presenta el mismo número de regiones 5S y 25S que *Festuca mairei*. Pero en este caso, la localización de los loci 25S cambia. Dos de ellos aparecen en cromosomas diferentes y los otros 4 se distribuyen por parejas en otros dos cromosomas, siendo además una región de cada cromosoma más tenue que la otra. Al comparar estos datos con los obtenidos en este estudio, se aprecia que el número de ambas regiones, además de la posición de los loci 5S coincide. Pero la localización de las regiones 25S no, ya que en las imágenes de las figuras 28 y 29 correspondientes a las especies de *Festuca arundinacea fenas* de España y Francia respectivamente, se observa que todas ellas se encuentran en cromosomas diferentes.

Analizando todos los resultados obtenidos para cada especie, se intentó la búsqueda de posibles relaciones de parentesco entre los individuos de mayor y menor nivel de ploidía, teniendo en cuenta el número de cromosomas, la localización geográfica y el número de regiones ribosomales de cada especie. También se tuvo en cuenta a *Festuca arundinacea arundinacea* ($2n=42$), descrita con 6 regiones 5S y 4 25S, *Festuca pratensis subsp. pratensis* ($2n=14$), con 2 regiones 5S y otras 2 25S (Thomas et al., 1997) y por último *Festuca pratensis*

subsp. *apennina* ($2n=28$), ya que suponiendo que proceda de *Festuca pratensis* subsp. *pratensis*, como afirman Borril, Kirby, & Morgan, (1977) y Harper, Thomas, Lovatt, & Thomas, (2004), contendrá el mismo número de regiones ribosomales (4 regiones 5S y 4 25S) que los autotetraploides artificiales de *Festuca pratensis* obtenidos por los autores Lideikytė, Pasakinskiene, & Lemeziene, (2008).

El origen de nuevas especies a partir de híbridos ya fue sugerido por (Kerner, 1894-1895). Winge, (1917, 1924) propuso la hipótesis de la anfiploidía, que afirma que una nueva especie puede surgir de un híbrido entre dos especies preexistentes, después de la duplicación del número de cromosomas. Esta hipótesis fue confirmada por otros investigadores en *Nicotiana* (Clausen & Goodspeed, 1925), *Raphanus-brassica* (Karpechenko, 1927), *Galeopsis* (Müntzing, 1930, 1932),...

Concretamente el uso de la técnica FISH para el estudio y obtención de relaciones filogenéticas entre especies, ha sido empleado anteriormente por diversos autores como: Lee, Do, & Seo, (1999) o Do & Seo, (2000) entre especies del género *Allium*; Harper et al., (2004) o Loureiro, Kopecký, Castro, Santos, & Silveira, (2007) en especies del género *Festuca* y Taketa, Ando, Takeda, Ichii, & von Bothmer, (2005) en especies del género *Hordeum*.

Las relaciones de parentesco que se pudieron extraer con los datos obtenidos son las siguientes:

1. Es posible, que *Festuca arundinacea atlantigena* ($2n=56$), tal y como afirman los autores Chandrasekharan & Thomas (1971) basándose en la síntesis de híbridos artificiales, proceda de la duplicación del genoma de un híbrido entre *Festuca mairei* ($2n=28$) y *Festuca arundinacea fenas* ($2n=28$). Puesto que los gametos de los supuestos parentales contendrían 2 regiones 5S y 3 regiones 25S, el híbrido resultante del cruce poseería 4 regiones 5S y 6 regiones 25S. Duplicando su genoma, el número de regiones sería el doble, es decir, pasaría a tener 8 regiones 5S y 12 regiones 25S, y el número de cromosomas que poseería el individuo finalmente sería de 56 (véase figura 32). El número cromosómico, coincide con los datos obtenidos en este estudio para *Festuca arundinacea atlantigena*. Pero el número de regiones 5S y 25S varían, ya que, el individuo resultante contendría 8 regiones 5S, en lugar de 12 y 12 regiones 25S en lugar de 10, como muestran los resultados. Este hecho, puede explicarse por la ocurrencia de cambios estructurales cromosómicos producidos en este caso por la aparición o inserción de cuatro regiones ribosomales 5S y la delección de 2 regiones 25S a lo largo del proceso de especiación. Este tipo de cambios ya fueron observados por los autores Thomas et al., (1997) al describir el origen de *Festuca arundinacea arundinacea* (especie del clado Europeo), y por Drapikowska et al., (2013) en especies del género *Anthoxanthum*.

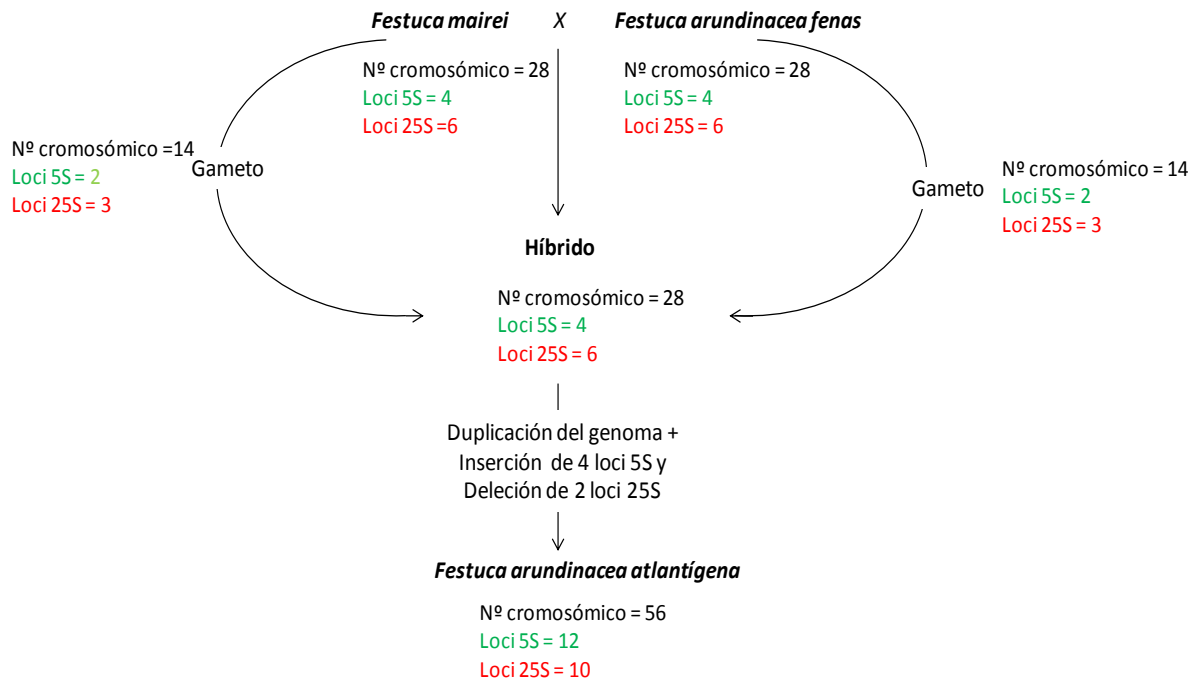


Figura 32: Resumen del origen de *Festuca arundinacea atlantigena*. Fuente: elaboración propia.

2. *Festuca arundinacea corsica* ($2n=6x=42$), podría provenir de la duplicación del genoma de una especie originada a partir del cruce de *Festuca pratensis* subsp. *apennina* ($2n=4x=28$) con *Festuca pratensis* subsp. *pratensis* ($2n=2x=14$). El número de regiones 5S y 25S presentes en la variedad tetraploide de *Festuca pratensis* es de 4 en ambos casos y las presentes en la especie diploide son la mitad, como ya se ha dicho. Por tanto, tras unirse sus gametos, el individuo resultante contendría 3 regiones de cada, y duplicando su genoma se convertirían en 6 (véase figura 33). Además el número cromosómico del individuo resultante sería de 42, coincidiendo con los resultados de la especie estudiada en este trabajo (*Festuca arundinacea corsica*). Por otro lado, la localización geográfica de ambas subespecies de *Festuca pratensis* y de *Festuca arundinacea corsica* harían viable esta hipótesis (véase apartado introducción).

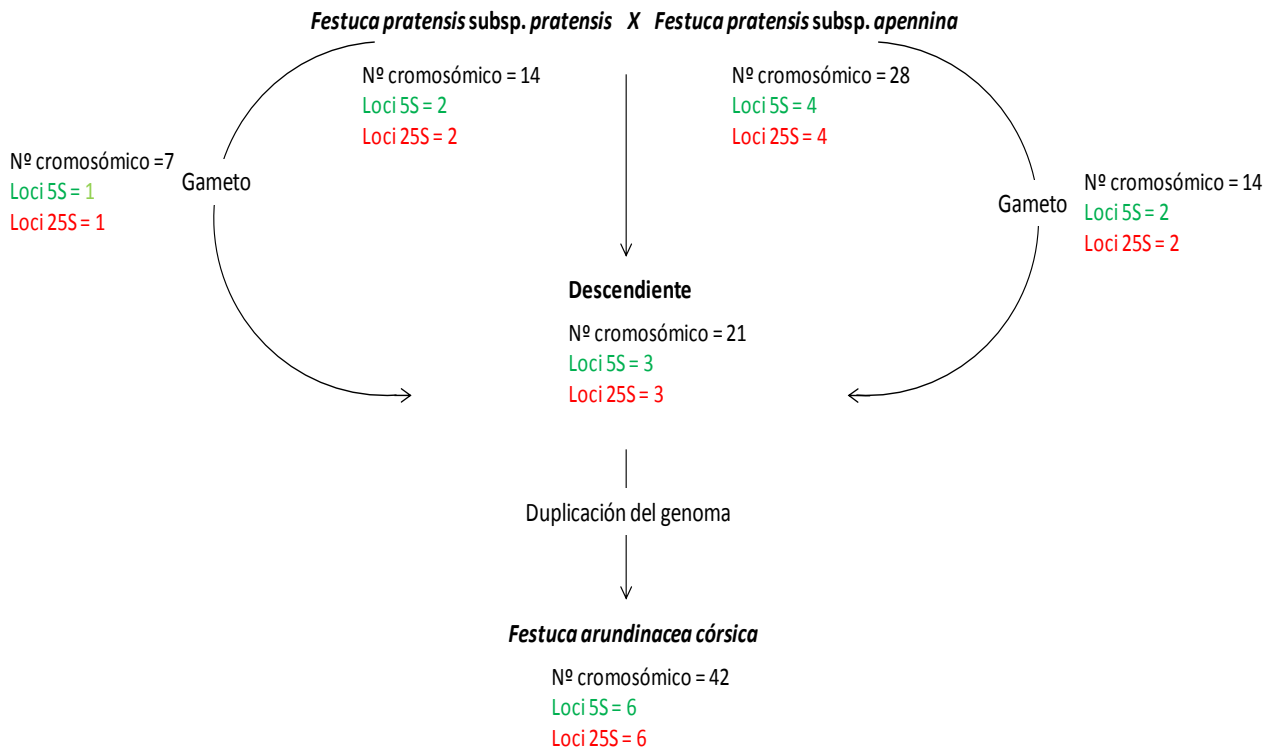


Figura 33: Resumen del origen de *Festuca arundinacea corsica*. Fuente: elaboración propia.

La explicación de tan solo dos posibles relaciones entre las especies de estudio podría deberse a dos razones: a la ocurrencia de cambios estructurales cromosómicos que implicaron deleciones o inserciones de fragmentos de genoma a lo largo de la especiación sufrida por los ancestros y/o descendientes del clado, como se ha comentado anteriormente; o bien por el desconocimiento de al menos uno de los ancestros precursores de las especies de mayor nivel de ploidía. Este hecho, implicaría que las especies de mayor nivel de ploidía, exceptuando *Festuca arundinacea corsica*, se originaron por alopoliploidización, es decir, con la intervención de especies diferentes. Pudiendo ser *Festuca mairei*, uno de los parentales para el caso del origen de *Festuca arundinacea letourneouxiana* tal y como afirma (Borrill, 1972), o Inda et al., (2013) en su análisis bayesiano del estudio de las regiones cloroplásticas y mitocondriales de las especies del clado de estudio.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. Las regiones ribosomales presentes en los taxones del clado Magrebí son:

- *Festuca arundinacea atlantigena*: 12 regiones 5S y 10 regiones 25S.
- *Festuca arundinacea corsica* (2n=42): 6 regiones 5S y 6 regiones 25S.
- *Festuca arundinacea letourneouxiana*: 16 regiones 5S y 12 regiones 25S.
- *Festuca arundinacea fenas*: 4 regiones 5S y 6 regiones 25S.
- *Festuca mairei*: 4 regiones 5S y 6 regiones 25S.

2. El origen de *Festuca arundinacea atlantigena* podría ser la duplicación del genoma de un híbrido entre *Festuca mairei* y *Festuca arundinacea fenas*, sufriendo posteriormente la inserción de 4 regiones 5S y la delección de 2 25S.

3. *Festuca arundinacea corsica*, podría provenir de la duplicación del genoma de un individuo originado por el cruce de un taxón de *Festuca pratensis* subsp. *pratensis* con *Festuca pratensis* subsp. *apennina*.

4. Por último, se podría afirmar que *Festuca arundinacea atlantigena* y *Festuca arundinacea letourneouxiana* presentan un origen aloploiploide.

Referencias bibliográficas

- Borril, M., Kirby, M., & Morgan, W. G. (1977). Studies in *Festuca*. 11. Interrelationships of some putative diploid ancestors of the polyploid broad-leaved fescues. *New Phytologist*, *78*, 661–674.
- Borrill, M. (1972). Studies in *Festuca* III. The contribution of *F. scariosa* to the evolution of polyploids in sections Bovinae and Scariosae. *New Phytologist*, *71*, 523–532.
- Catalan, P. (2006). Phylogeny and evolution of *Festuca* L. and related genera of subtribe Loliinae (Poeae, Poaceae). In A. K. Sharma & A. Sharma (Eds.), *Plant Genome. Biodiversity and Evolution* (Vol. 1D, pp. 255–303). Enfield: Science Publishers.
- Chandrasekharan, P., Lewis, E. J., & Borrill, M. (1972). Studies in *Festuca*. II. Fertility relationships between species of sections Bovinae and Scariosae, and their affinities with *Lolium*. *Genética*, *43*, 375–386.
- Chandrasekharan, P., & Thomas, H. (1971). Studies in *Festuca*. V. Cytogenetic relationships between species of Bovinae and Scariosae. *Z.PflZucht*, *65*, 345.
- Clausen, R. E., & Goodspeed, T. H. (1925). Interspecific hybridization in *Nicotiana*. II. A tetraploid *glutinosa-tabacum* hybrid, an experimental verification of Winge's hypothesis. *Genetics*, *10*, 278–284.
- Clayton, W. D., Vorontsova, M., Harman, K. T., & Williamson, H. (2006). GrassBase - The Online World Grass Flora. Retrieved April 19, 2015, from <http://www.kew.org/data/grasses-db/www/imp04701.htm>
- Devesa, J. A., Catalán, P., Cebolla, C., Müller, J., & Ortúñez, E. (2013). Checklist de *Festuca* L. (poaceae) en la península ibérica. *Lagascalia*, *33*, 183–274.
- Devi, J., Ko, J. M., & Seo, B. B. (2005). FISH and GISH: Modern cytogenetic techniques. *Indian Journal of Biotechnology*, *4*, 307–315.
- Do, G. S., & Seo, B. B. (2000). Phylogenetic relationships among *Allium* subg. *Rhizirideum* species based on the molecular variation of 5S rRNA genes. *Korean Journal of Biological Sciences*, *4*(1), 77–85.
- Drapikowska, M., Susek, K., Hasterok, R., Szkudlarz, P., Celka, Z., & Jackowiak, B. (2013). Variability of stomata and 45S and 5S rDNAs loci characteristics in two species of *Anthoxanthum* genus: *A. aristatum* and *A. odoratum* (Poaceae). *Acta Biologica Hungarica*, *64*(3), 352–363. doi:10.1556/ABiol.64.2013.3.8
- Global Biodiversity Information Facility. (2015). Retrieved April 20, 2015, from <http://www.gbif.org/>
- Gonzalez Bernaldez, F. (1986). *Gramineas pratenses de Madrid* (pp. 12–13). Madrid: Comunidad de Madrid.
- Hackel, E. (1882). *Monographia Festucarum Europaeorum* (p. 216). Berlín: Verlag von Theodor Fischer.

- Hackel, E. (1887). Gramineae. In A. Engler & E. Prantl (Eds.), *Die Natulichen Pflanzenfamilien 2* (pp. 1–97). Leipzig.
- Harper, J. A., Thomas, I. D., Lovatt, J. A., & Thomas, H. M. (2004). Physical mapping of rDNA sites in possible diploid progenitors of polyploid *Festuca* species. *Plant Systematics and Evolution*, *245*, 163–168.
- Hasterok, R., Langdom, T., Taylor, S., & Jenkins, G. (2002). Combinatorial labelling of DNA probes enables multicolour fluorescence in situ hybridisation in plants. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, *40*(3), 319–323.
- Herrera, J. C. (2007). La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana*, *25* (1), 26–35.
- Hubbard, C. E. (1954). *Grasses* (pp. 120–121). Bungay: Penguin books.
- Humphreys, M. W., Thomas, H. M., Morgan, W. G., Meredith, M. R., Harper, J. A., Thomas, H., Zwierzykowski, Z., Ghesquiére, M. (1995). Discriminating the ancestral progenitors of hexaploid *Festuca arundinacea* using genomic in situ hybridization. *Heredity*, *75*, 171–174.
- Inda, L. A., Segarra-Moragues, J. G., Müller, J., Peterson, P. M., & Catalán, P. (2008). Dated historical biogeography of the temperate Loliinae (Poaceae, Pooideae) grasses in the northern and southern hemispheres. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *46*(3), 932–957. doi:10.1016/j.ympev.2007.11.022
- Inda, L. A., Sanmartín, I., Buerki, S., & Catalán, P. (2013). Mediterranean origin and Miocene-Holocene Old World diversification of meadow fescues and ryegrasses (*Festuca* subgenus *Schedonorus* and *Lolium*). *Journal of Biogeography*, *41*(3), 600–614. doi:10.1111/jbi.12211
- Jenkins, G., & Hasterok, R. (2007). BAC 'landing' on chromosomes of *Brachypodium distachyon* for comparative genome alignment. *Nature Protocols*, *2*, 88–98. doi:10.1038/nprot.2006.490
- Karpechenko, G. (1927). Polyploid hybrids of *Raphanus sativus* L. x *Brassica oleracea* L. *Bulletin of Applied Botany, Genetics & Plant Breeding*, *17*, 305–410.
- Kerguélen, M., & Plonka, F. (1989). Les *Festuca* de la flore de France (corse comprise). *Bulletin de La Société Botanique Du Centre-Ouest, Nouvelle Série, Numéro spé.*
- Kerner, A. (1894-1895). *The Natural History of Plants*. Londres: Blackie & Sons.
- Lee, S. H., Do, G. S., & Seo, B. B. (1999). Chromosomal localization of 5S rRNA gene loci and the implications for relationships within the *Allium* complex. *Chromosome Research*, *7*(2), 89–93.
- Lideikytė, L., Pasakinskiene, I., & Lemeziene, N. (2008). Fish assessment of ribosomal dna sites in the chromosome sets of *Lolium*, *Festuca* and *Festulolium*. *Zemdirbyste-Agriculture*, *95*, 116–124.

- Loureiro, J., Kopecký, D., Castro, S., Santos, C., & Silveira, P. (2007). Flow cytometric and cytogenetic analyses of Iberian Peninsula *Festuca* spp. *Plant Systematics and Evolution*, 269(1-2), 89–105.
- Maire, R. (1955). *Flore de L'Afrique du Nord*. (P. Lechevalier, Ed.) (Vol. 3, pp. 165–167). París.
- Markgraf-Dannenber, I. (1980). *Festuca* L. In D. A. Tutin, T.G.; Heywood, V.H.; Burges, N.A.; Moore, D.M., Valentine, D. H.; Walters, S.M.; Webb (Ed.), *Flora europaea* (Vol. 5, pp. 125–153). Londres: Cambridge University Press.
- Müntzing, A. (1930). Outlines to a genetic monograph of the genus *Galeopsis*. With special reference to the nature and inheritance of partial sterility. *Hereditas*, 13, 185–341.
- Müntzing, A. (1932). Cytogenetic investigations on synthetic *Galeopsis* tetrahit. *Hereditas*, 16(1-2), 105–154.
- Nederlof, P. M., Robinson, D., Abuknesha, R., Wiegant, J., Hopman, a H., Tanke, H. J., & Raap, a K. (1989). Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry*, 10(1), 20–27. doi:10.1002/cyto.990100105
- Plant rDNA database. (2015). Retrieved August 10, 2015, from <http://www.plantrdnadatabase.com/>
- Portal, R. (1999). *Festuca de France*. (R. Portal, Ed.). Vals-près-le-Puy, France.
- Saint-Yves, A. (1922). Les *Festuca* (subg. *Eu-Festuca*) de l'Afrique du nord et des Iles Atlantiques. *Candollea*, 1, 1–63.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Apendice 2: media A2.1. Molecular Cloning: a laboratory manual*. (second.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Taketa, S., Ando, H., Takeda, K., Ichii, M., & Von Bothmer, R. (2005). Ancestry of American polyploid *Hordeum* species with the I genome inferred from 5S and 18S-25S rDNA. *Annals of Botany*, 96, 23–33.
- Thomas, H. M., Harper, J. A., Meredith, M. R., Morgan, W. G., & King, I. P. (1997). Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by in situ hybridization. *Genome*, 40(3), 406–410.
- Torrecilla, P., & Catalán, P. (2002). Phylogeny of Broad-leaved and Fine-leaved *Festuca* Lineages (Poaceae) based on Nuclear ITS Sequences. *Systematic Botany*, 27(2), 241–251.
- Valladolid, A., Blas, R., & Gonzáles, R. (2004). Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. In J. Seminario (Ed.), *Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003)* (pp. 95–99). Lima: Centro Internacional de la Papa.
- Winge, Ö. (1917). The chromosomes. Their numbers and general significance. *Comptes Rendus Des Travaux Du Laboratoire Carlsberg*, 13, 131–275.

Winge, Ö. (1924). Contributions to the knowledge of chromosome numbers in plants. *La Cellule*, 35, 304–324.

Anexo 1

Resultados de los ensayos realizados para la puesta a punto de la técnica FISH en las especies de estudio:

(1) FISH

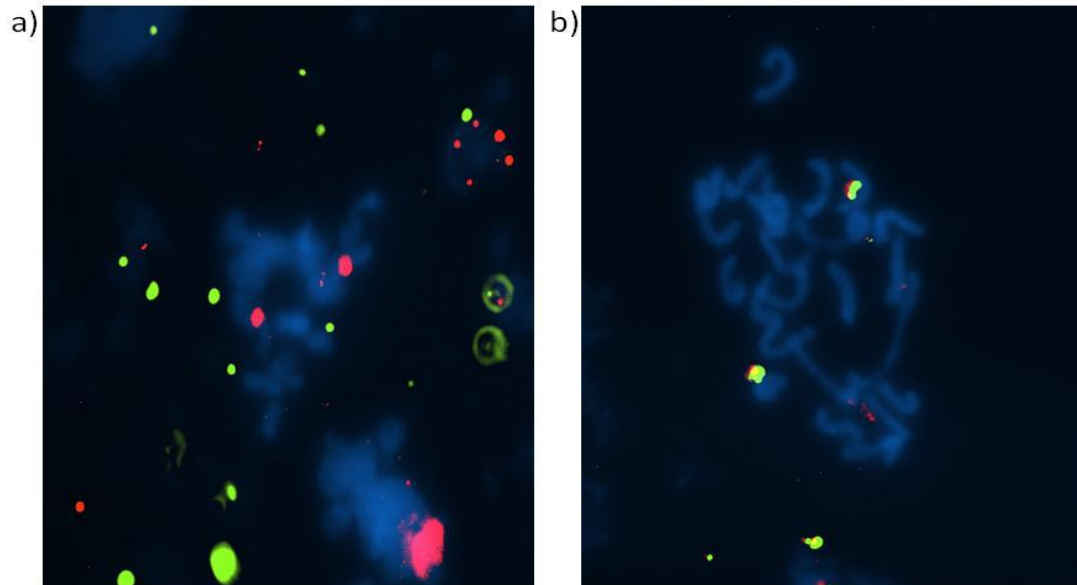


Figura 34: a) resultados de *Festuca mairei*, población de Suecia. b) resultados de *Festuca arundinacea fenas* población de España.

(2) FISH

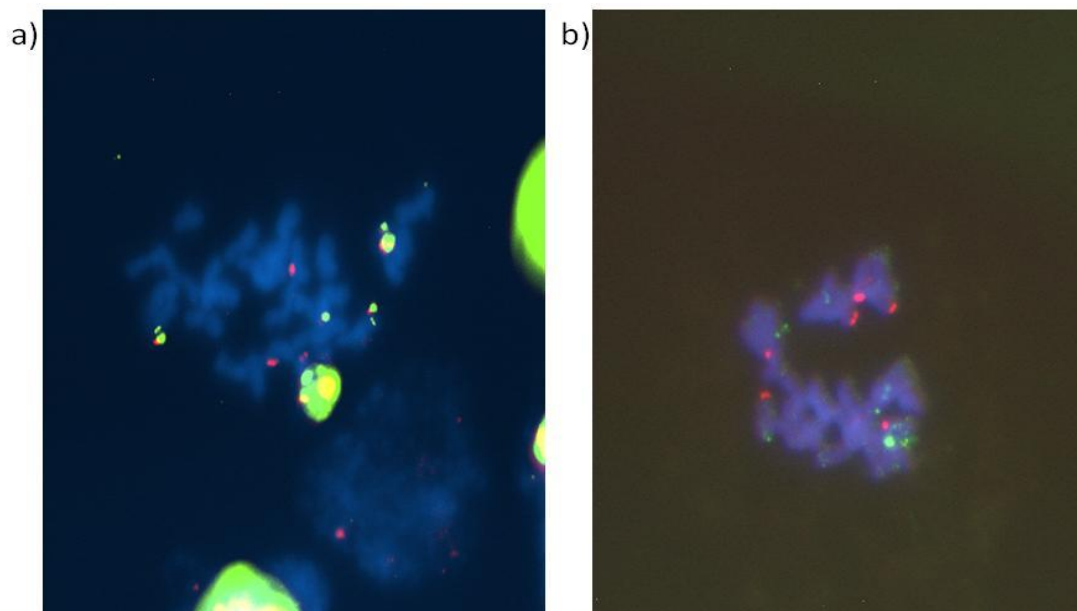


Figura 35: a) resultados de *Festuca mairei*, población de Suecia. b) resultados de *Festuca arundinacea fenas* población de España.

(3) FISH

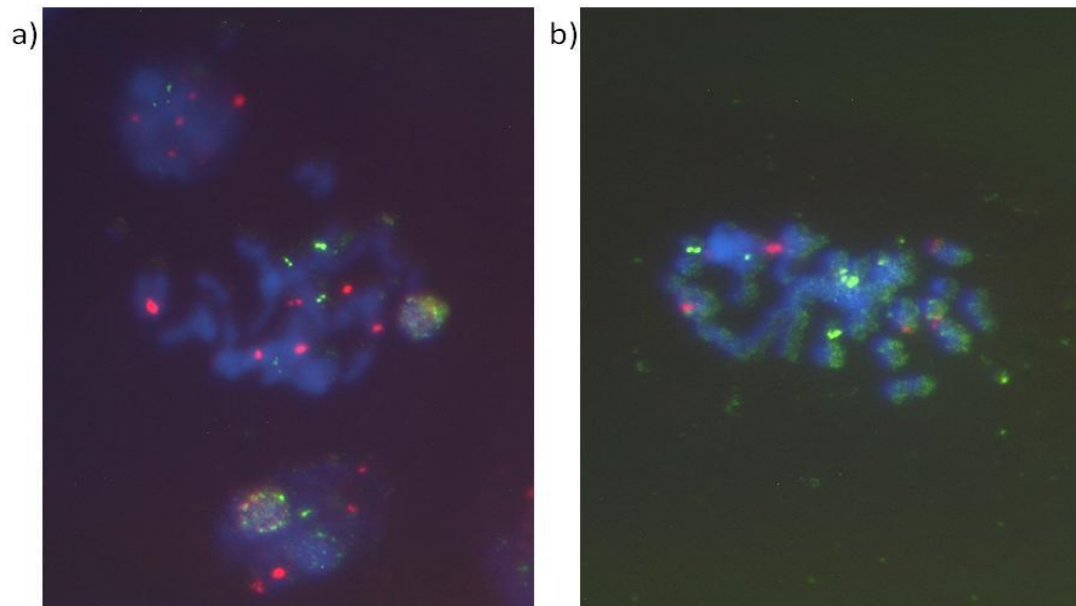


Figura 36: a) resultados de *Festuca mairei*, población de Suecia. b) resultados *Festuca arundinacea fenas* población de España.

(4) FISH

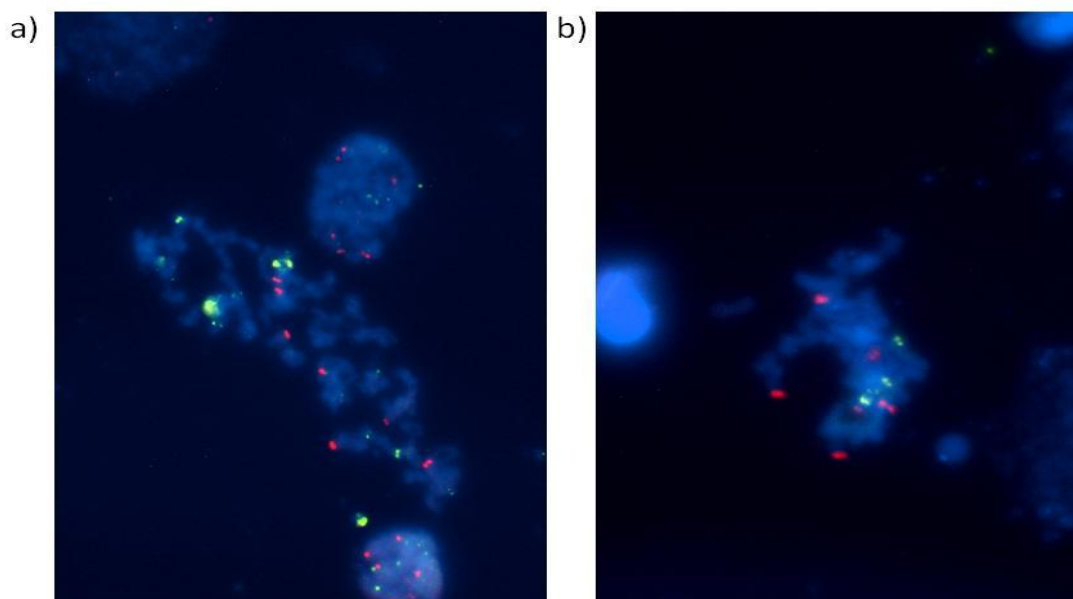


Figura 37: a) resultados de *Festuca arundinacea atlantigena* de la población de origen desconocido. b) resultados *Festuca arundinacea fenas* población procedente de España.