



Escuela Politécnica
Superior - Huesca
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Disploidía en *Brachypodium pinnatum* y
Brachypodium rupestre

Disploidy in *Brachypodium pinnatum* and
Brachypodium rupestre

Autor

Rubén Gorgojo Díaz

Director

Luis Ángel Inda Aramendía

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer al doctor Luis Ángel Inda Aramendía, director de este trabajo, su enorme dedicación e infinita paciencia durante la realización del mismo y su gran labor docente por inculcar la idea de trabajar por y para la ciencia y su apoyo a continuar con mi formación.

En segundo lugar, agradecer la colaboración de todos los integrantes del grupo Bioflora de la Escuela Politécnica Superior de Huesca: Pilar Catalán, Ernesto Pérez, Antonio Díaz, M^a Fernanda Moreno, Rubén Sancho y a mi compañera de laboratorio Bea Montes; así como a las técnicas de laboratorio Belén y Asunción por su ayuda y continuos ánimos.

Finalmente agradecer a mi familia por estar siempre ahí apoyándome.

Gracias, de corazón.

ÍNDICE

Resumen.....	7
Abstract.....	9
Introducción.....	11
Descripción del género <i>Brachypodium</i> P. Beauv.....	11
Clave de especies de <i>Brachypodium</i>	12
<i>Brachypodium pinnatum</i> y <i>Brachypodium rupeste</i>	15
Identificación de las especies.....	20
Número cromosómico.....	21
Técnica de hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	22
Regiones organizadoras nucleolares (NOR).....	22
Tamaño genómico mediante citometría de flujo.....	23
Objetivos.....	27
Objetivos específicos.....	27
Materiales y métodos.....	29
Taxones estudiados, códigos y procedencia.....	29
Reconocimiento micromorfológico de las especies: mediante moldes foliares y secciones transversales.....	31
Obtención de ápices radiculares: mediante la germinación de semillas o mediante realización de cultivos hidropónico.....	33
Tratamiento de los ápices para la obtención de meristemos.....	36
Extracción de meristemos, búsqueda de cromosomas y fijación.....	37
Preparación de las sondas de ADN ribosómico 5S y 25S para FISH.....	38
Extracción.....	38
Marcaje.....	42
Marcaje por PCR de la sonda 5S.....	43
Marcaje por “Nick Traslation” de la sonda 25S.....	44
Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	45
Pretratamiento de portaobjetos con cromosomas.....	47
Desnaturalización e hibridación de las sondas.....	47
Lavado riguroso.....	48
Inmunodetección de la digoxigenina.....	48
Visualización.....	49
Detección de regiones organizadoras nucleolares (NORs).....	51

Determinación del número cromosómico (2n).....	51
Determinación del tamaño genómico por citometría de flujo.....	52
Resultados.....	55
Secciones transversales y moldes foliares de <i>B. pinntaum</i> y <i>B. rupestre</i>	55
Relación entre el tamaño genómico y número cromosómico en <i>B. pinnatum</i>	60
Relación entre el tamaño genómico y número cromosómico en <i>B. rupestre</i>	62
Detección del número de regiones ribosomales en <i>B. pinnatum</i>	63
Detección del número de regiones ribosomales en <i>B. rupestre</i>	64
Regiones organizadoras nucleolares (NORs) de <i>B. pinnatum</i>	66
Regiones organizadoras nucleolares (NORs) de <i>B. rupestre</i>	66
Discusión.....	69
Conclusión.....	79
Bibliografía.....	81
Anexo I: Micromorfología y descripción de <i>B. phoenicoides</i>	85
Anexo II: Datos de cortes transversales.....	87
Anexo III: Imágenes de moldes foliares.....	91
Anexo IV: Datos citometría de flujo e histogramas.....	95
Anexo V: Imágenes conteo cromosómico de <i>B. pinnatum</i>	101
Anexo VI: Imágenes conteo cromosómico de <i>B. rupestre</i>	103

RESUMEN

El género *Brachypodium*, perteneciente a las gramíneas, se distribuye por los cinco continentes del mundo y su estudio se está poniendo de relevancia por ser un buen modelo de monocotiledoneas. En este trabajo se han estudiado dos especies dentro de este género, *Brachypodium pinnatum* (L.) P. Beauv y *Brachypodium rupestre* (Host) Roem. & Schult. Se han realizado varias pruebas micromorfológicas y citogenéticas con el fin de encontrar caracteres discriminantes entre ambas.

Se han estudiado un total de 10 taxones de *B. pinnatum*: un diploide (2x) con $2n=16$, tres diploides (2x) con $2n=18$ y seis tetraploides (4x) con $2n=28$. También se han estudiado 16 taxones de *B. rupestre*: tres diploides (2x) con $2n=18$, nueve tetraploides (4x) con $2n=28$ y cuatro "hexaploides" (6x) con $2n=38$.

Para la identificación de las especies se han realizado cortes transversales de las hojas y moldes foliares del envés y del haz, determinando que la presencia de pelos espinosos en el envés es un buen carácter para este fin. Aun así, se han encontrado resultados poco resolutivos.

Se ha contado el número cromosómico de los taxones a partir de cromosomas metafásicos de células radiculares. Todos los números cromosómicos encontrados coinciden con los descritos hasta ahora por otros autores, a excepción de los *B. rupestre* "hexaploides". Para esta especie con esta ploidía se atribuyen 36 cromosomas, en nuestro caso se han contabilizado 38. También se ha medido el tamaño genómico (TG) 2C, de células somáticas de las hojas, mediante citometría de flujo. Ambas especies presentan tamaños similares para mismas ploidías. Con valores de alrededor de 0,8-0,9 pg para los diploides, 1,4-1,5 pg para los tetraploides y 2,2-2,3 pg para los "hexaploides". Estos TG coinciden con otros trabajos que han empleado esta misma técnica.

Se han identificado las regiones ribosomales 5S y 25S del ADN mediante la técnica de Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH). Ambas especies presentan el mismo número de regiones 5S para una misma ploidía. Encontramos dos sitios de hibridación para la región 5S en el caso de los diploides, cuatro sitios para los tetraploides y seis sitios para los "hexaploides". Se concluye por tanto que el número de regiones no puede ser empleado como carácter diferenciador entre ambas especies. Pero puede servir para plantear hipótesis sobre posibles

parentescos y relación con otras especies de *Brachypodium* de las cuales se conoce su número cromosómico y regiones ribosomales 5S.

Un posible parental de los alotetraploides de ambas especies de estudio podría ser *B. distachyon* (o algo similar) con $2n=10$. El otro parental sería un diploide de cada una de las especies o un ancestro común del núcleo-perenne con $2n=18$.

El origen de los “hexaploides” de *B. rupestre* podría ser una aloploidía formada por la unión de *B. distachyon* (o algo similar) $2n=10$ con un diploide de *B. rupestre* $2n=18$ y con otro ancestro desconocido con $2n=10$.

Palabras clave: citometría de flujo, filogenia, FISH, número cromosómico, ploidía, regiones ribosomales, tamaño genómico.

ABSTRACT

The genus *Brachypodium*, belonging to the grasses, is distributed throughout the five continents of the world and its study is becoming relevant because it is a good model of monocotyledons. In this work we have studied two species within this genus, *Brachypodium pinnatum* (L.) P. Beauv and *Brachypodium rupestre* (Host) Roem. & Schult. Several micromorphological and cytogenetic tests have been carried out in order to find discriminating characters between both.

A total of 10 taxa of *B. pinnatum* have been studied: one diploid (2x) with $2n = 16$, three diploids (2x) with $2n = 18$ and six tetraploids (4x) with $2n = 28$. 16 taxa of *B. rupestre* have also been studied: three diploids (2x) with $2n = 18$, nine tetraploids (4x) with $2n = 28$ and four "hexaploids" (6x) with $2n = 38$ (not described before).

For the identification of the species, cross sections of the leaves and foliar molds of the underside and the beam have been made, determining that the presence of spiny hairs on the underside is a good character for this purpose. Even so, results that are not very resolute have been found.

The chromosomal number of the taxa has been counted from metaphasic chromosomes of root cells. All chromosome numbers found coincide with those described so far by other authors, with the exception of *B. rupestre* "hexaploides". For this species with this ploidy 36 chromosomes are attributed, in our case 38 have been counted. The genomic size (TG) 2C, of somatic cells of the leaves, has also been measured by flow cytometry. Both species have similar sizes for same ploidies. The values around 0,8-0,9 pg for diploids, 1,4-1,5 pg for tetraploids and 2,2-2,3 pg for "hexaploids". These values coincide with other works that have used this same technique.

The 5S and 25S ribosomal regions of the DNA have been identified by the In Situ Fluorescent Hybridization (FISH) technique. Both species have the same number of 5S regions for the same ploidy. We found two hybridization sites for the 5S region in the case of the diploids, four sites for the tetraploids and six sites for the "hexaploids". It is concluded therefore that the number of regions can not be used as a distinguishing feature between both species. But it can be used to propose hypotheses about possible relationships and relationship with other *Brachypodium* species of which its chromosome number and 5S ribosomal regions are known.

A possible parental of the allotetraploids of both species of study could be *B. distachyon* (or something similar) with $2n = 10$. The other parent would be a diploid of each of the species or a common ancestor of the perennial nucleus with $2n = 18$.

The origin of the "hexaploides" of *B. rupestre* could be an aloploiploidy formed by the union of *B. distachyon* (or something similar) $2n = 10$ with a diploid of *B. rupestre* $2n = 18$ and with another unknown ancestor with $2n = 10$.

Key words: flow cytometry, phylogeny, FISH, chromosomal number, ploidy, ribosomal regions, genomic size.

INTRODUCCION

Descripción del género *Brachypodium* P. Beauv.

El género *Brachypodium* P. Beauv está siendo utilizado como modelo de estudio genético de especies de cereales templados, pastos forrajeros y cultivos empleados como biocombustible. Estos cereales tienen gran importancia económica, como pueden ser el trigo o la cebada. La elección de este género se basa en varios criterios que lo convierten en un buen modelo de estudio: principalmente porque posee uno de los genomas de monocotiledóneas gramíneas más pequeños. El número de cromosomas dentro del género varían de $2n=10$ en *Brachypodium distachyon* (L.) P Beauv, hasta $2n=46$ en *Brachypodium boissieri* Nym (Schippmann, 1991).

En el caso de las especies anuales comprenden principalmente ADN repetitivo de copia única o baja (IBI, 2010) y su autofertilidad asegura la generación de líneas puras endogámicas en dos generaciones (Vogel et al., 2009). Otra característica importante es su relación más cercana (Catalán et al., 1997; GPWG, 2001) con las especies de Triticeae (*Triticum* spp., *Hordeum* spp.) lo que implica una mayor importancia y posibilidad de análisis comparativos de la expresión génica y sus mecanismos reguladores (Mur et al., 2011), y poder realizar estudios de caracteres de relevancia agronómica.

Brachypodium es un género de plantas herbáceas perteneciente a la familia de las Poaceas, compuesto por 20 taxones distribuidos a nivel mundial, de los cuales hay: 17 especies, 1 variedad y 2 citotipos no descritos (ver figura 1). En este estudio se trabaja con *B. pinnatum* y *B. rupestre*, dos especies perennes que están muy relacionadas, tanto morfológicamente como filogenéticamente (Catalán et al., 2015).

Según Flora Europea (Smith, 1980), el género se describe como plantas perennes o anuales, raramente leñosas, con rizomas a menudo extensamente ramificados. Con inflorescencias, un racimo de espiguillas dísticas, alternas, pediceladas. Espiguillas 1(-3) en cada nudo, generalmente con numerosas flores. Glumas desiguales, más cortas que la inflorescencia más baja. Glumas y lemas acuminadas, mucronadas o con un ápice apical recto o débilmente flexo. La palea igual o un poco más corta que la lema, emarginada o truncada, las quillas ciliadas o escabrosas. Ovario peludo en el ápice. Semillas de estrechamente elípticas a oblanceoladas con hilo lineal.

La clave de las diferentes especies europeas de *Brachypodium* es la siguiente (modificado de Schippmann, 1991).

Clave de especies de *Brachypodium* (Schippmann, 1991).

1. Planta anual, anteras de aproximadamente 1 mm de largo, pedicelo de la espiguilla de 0,4 -0,8 mm de longitud, flores más o menos patentes y espiguilla con el extremo distal ensanchado.....grupo ***B. distachyon***
- 1'. Planta perenne, anteras de 3-6 mm de longitud, pedicelo de la espiguilla de más de 0,8 mm, flores adpresas al raquis de la espiguilla y espiguilla estrechándose hacia el ápice.....2
2. Caña con 12-23 nudos, la inflorescencia racemosa sobrepasa en unos 1,5-6 cm la vaina de la hoja superior, hojas agrupadas en la mitad superior de la caña. Endemismo de las Islas Canarias.....***B. arbuscula***
- 2'. Caña con 2-8 nudos, la inflorescencia racemosa sobrepasa en 6-30 cm a la vaina de la hoja envainadora superior, hojas distribuidas uniformemente.....3
3. Plantas sin rizomas o muy cortos, cespitosa, lema con un arista de 5-14 mm de longitud, inflorescencia racemosa colgante en la madurez.....***B. sylvaticum***
- 3'. Plantas con rizomas largos y finos, formando desde céspedes sueltos a compactos, lema con una arista de hasta 6 mm de largo, inflorescencia racemosa erecta.....4
4. Longitud de la caña de 10 a 45 cm, hojas de las cañas no florecidas dísticas (como en dos filas), limbo de la hoja de 1,2 a 7 cm de largo, racimo con 1-4 (7) espiguillas. La sección transversal de la hoja presenta nervios redondeados. Área mediterránea.....5
- 4'. Longitud de la caña de 40 a 100 cm, la disposición de las hojas no es claramente dística, limbo de la hoja de 10 a 40 (80) cm de largo, racimo con 5-10 (13) espiguillas. Superficie adaxial (inferior) de la hoja plana o con costillas prominentes; si las tiene, de forma rectangular en la sección transversal.....6
5. Hoja con el ápice agudo, limbo de la hoja de los brotes no florecidos de 2-7 cm de longitud. Inflorescencia racemosa con (1) 2-4 (7) espiguillas, gluma superior aguda o con una arista de hasta 0,5 mm, arista de la lema de 0,5 -2 mm casi siempre, la sección transversal de la hoja muestra la disposición de los haces vasculares no

- simétricos sin una capa de esclerénquima continuo de la epidermis en la parte abaxial de la hoja.....**B. retusum**
- 5'. Hoja con el ápice obtuso, limbo de la hoja de los brotes no florecidos de 1,2 -3 cm de longitud, racimo con (1) 2 espiguillas, gluma superior sin aristas, obtusa o mucronada, arista de la lema casi siempre de 2-4 mm, la sección transversal de la hoja muestra una disposición simétrica de los haces vasculares con una capa de esclerénquima continuo (o interrumpido parcialmente) sobre la epidermis de la cara abaxial. Endémico del sur de España.....**B. boissieri**
6. Sección de la hoja con nervios prominentes y rectangulares, hojas rígidamente erectas, generalmente involuta y junciforme, las partes no florecidas de la planta sin brotes alargados.....**B. phoenicoides**
- 6'. Sección de la hoja con nervios no prominentes, hojas flácidas, involutas (encorvada hacia la cara interna) o plana, (las partes no florales con brotes alargados).....7
7. Cara abaxial de la hoja cubierta con pequeños pelos espinosos dirigidos hacia el ápice de la hoja (amplificación 20-50 x), sin brillo y áspera, la lígula de la 2ª hoja de la caña de (1) 1,6-2,8 (2,9) mm de larga, hojas planas y verde oscuro, lema generalmente pelosa.....**B. pinnatum**
- 7'. Cara abaxial de la hoja casi carente de pelos espinosos (que están restringidos a las zonas costales de las costillas), claramente brillante y lisa o ligeramente escabrosa, la lígula de la 2ª hoja de la caña de (0,4) 1-1,8 (2,4) mm de larga, hojas involutas o planas, ligeramente verdes, lema generalmente glabro.....**B. rupestre**

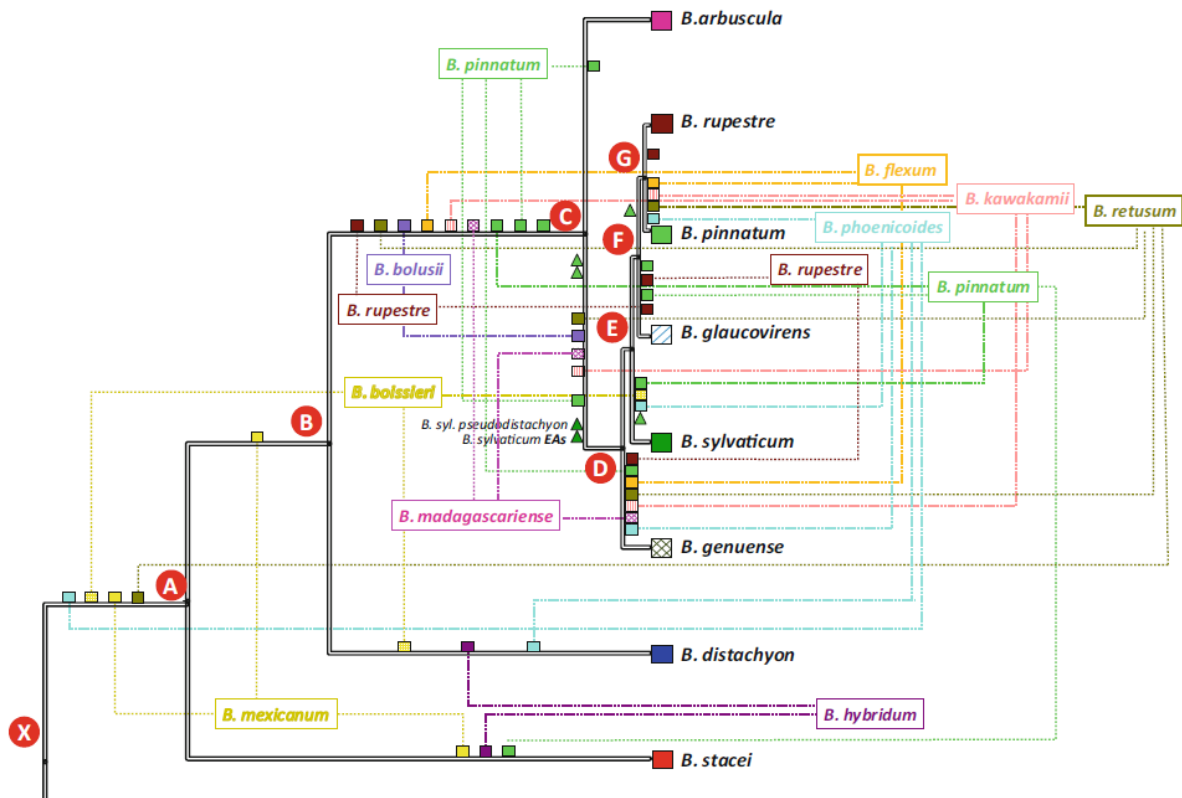


Figura 1. Árbol multispecífico de especies de *Brachypodium* obtenido a partir del estudio de cuatro genes. Se encuentran insertadas las copias alélicas de los alopoliploide (líneas discontinuas) en las ramas del árbol esqueleto diploide (líneas continuas), para cada alelo poliploide por locus. Fuente: (Catalán et al., 2015).

La figura 1 muestra la relación entre las diferentes especies del género. Para su construcción se realizó un análisis evolutivo preliminar de *Brachypodium* (Catalán et al., 2015). Se injertaron alelos poliploides en un árbol de especies diploides utilizando criterios de evolución mínima con el objetivo de crear un escenario general que explique el supuesto origen de las especies poliploides. Fue necesario un análisis estadístico para corregir el exceso de copias alélicas injertadas en varias ramas del esqueleto del árbol de las especies diploides con el fin de inferir correctamente los orígenes y los patrones de hibridación de los genomas homólogos presentes en los alopoliploides. Con el objetivo de inferir el rango de ascendencia y el tiempo de divergencia de los linajes diploides más cercanos, se ha usado un enfoque que maneja de forma independiente cada genoma homólogo. Se emplearon tres secuencias nucleares: dos regiones de ADN ribosómico (ETS e ITS), una única copia GIGANTEA (GI) y dos regiones plastídicas (ndhF y trnL) para reconstruir la filogenia del género. Así se construyeron

árboles con cada alelo en distintas posiciones y se aceptó el que menor longitud tenía según el método de evolución mínima.

Centrándose en las dos especies estudiadas en este trabajo se observa que *Brachypodium rupestre* (Host) Roem & Schult y *Brachypodium pinnatum* (L.) P. Beauv son de más reciente aparición (ver figura 1) pero sin que tengamos un escenario totalmente resuelto para divergencia (Catalán et al., 1997; Catalán et al., 2012; Catalán & Olmstead, 2000). Los genes nucleares estudiados coinciden con esta hipótesis, pero también se muestran copias homólogas de tetraploides de *B. pinnatum* y *B. rupestre* en la rama del árbol anterior a la aparición del conjunto de especies perennes (núcleo-perenne).

***Brachypodium pinnatum* y *Brachypodium rupestre*.**

En Flora Europea (Smith, 1980), *B. pinnatum* (L.) Beauv está considerado como un taxón con dos subespecies. Rizomatoso, a veces subcespitoso. Tallos 40-120 cm, erectos, pubescentes en los nodos. Hojas 10-40 cm x 3-6 (-8) mm, plana o algo convoluta, escasamente peluda en la parte superior, escábrida por debajo; lígula 2 mm, truncada. Racimo 7-20 cm, erecto, con hasta 15 espiguillas. Espiguillas rollizas, lineales, algo patentes especialmente antes de la madurez, con 8-24 flores. Gluma inferior 3-6 mm, la superior 5-8 mm. Lema oblongo-lanceolado; arista erecta. Anteras 3,5-5,5 mm.

- Subsp. *pinnatum*: hojas verdes. Espiguillas 18-40 mm generalmente rectas, lema 7-11 mm, generalmente con algunos pelos cortos. Arista 1-6 mm. $2n=28$.
- Subsp. *rupestre*: (Host) Schübler & Martens. (*B. rupestre* (Host) Roemer & Schultes): hojas algo glaucas. Espiguillas 30-50 mm generalmente falcadas. Lema 9-11 mm, glabra. Arista de no más de 3 mm. $2n=14$.

El género ha sido revisado por Schippmann (1991) quien, siguiendo trabajos anteriores de Scholz (1968), D'Ovidio & Lucchese (1986) y Schippmann (1986), dividió el complejo en dos especies. Cuyas descripciones son:

- *B. pinnatum*: Hierba perenne con largos brotes subterráneos, tallo (35-) 55-90 (-125) cm de altura, lígulas (1-)1,6-2,5(-2,4) mm de largo, hojas con el limbo extendido, hojas del tallo (13-)15-20(-23) cm de largo, patentes, romas, verde oscuro, envés no

brillante. Racimo con (6-)7-10(-13) espiguillas, lemas peludas hasta 0,5 mm de largo, a veces completamente glabras (ver figura 2).

Anatomía de la hoja: las costillas de la lámina de la hoja en la sección transversal son poco prominentes, epidermis abaxial con células cortas en forma de mancuerna, numerosas espinas sobre todo en el envés (ver figura 3).

Número cromosómico: $2n=14, 16, 18, 20, 28, 36$.

- *B. rupestre*: Hierba perenne con largos brotes subterráneos, tallo (30-)50-95(-125) cm de altura, lígulas (0,4-)1-1,8(-2,4) mm de largo, limbo de las hojas revuelto o extendido, pico lanceolado, verde claro, envés brillante, extensión de la hoja (9-)15-30(-40) cm de largo. Racimo con (5-)7-10(-11) espiguillas, lemas glabros, a veces peloso hasta 0,4 mm en los márgenes (ver figura 4).

Anatomía de la hoja: Las costillas de la lámina de la hoja en la sección transversal son poco prominentes, las células cortas de la epidermis abaxial nunca tienen forma de pesa, los campos intercostales sin pelos puntiagudos (ver figura 5).

Número cromosómico: $2n=14, 18, 28, 36$.



Figura 2. Morfología de *B. pinnatum*. a) lígula, b) espiguilla, c y d) semilla. Fuente: Schippmann (1991).

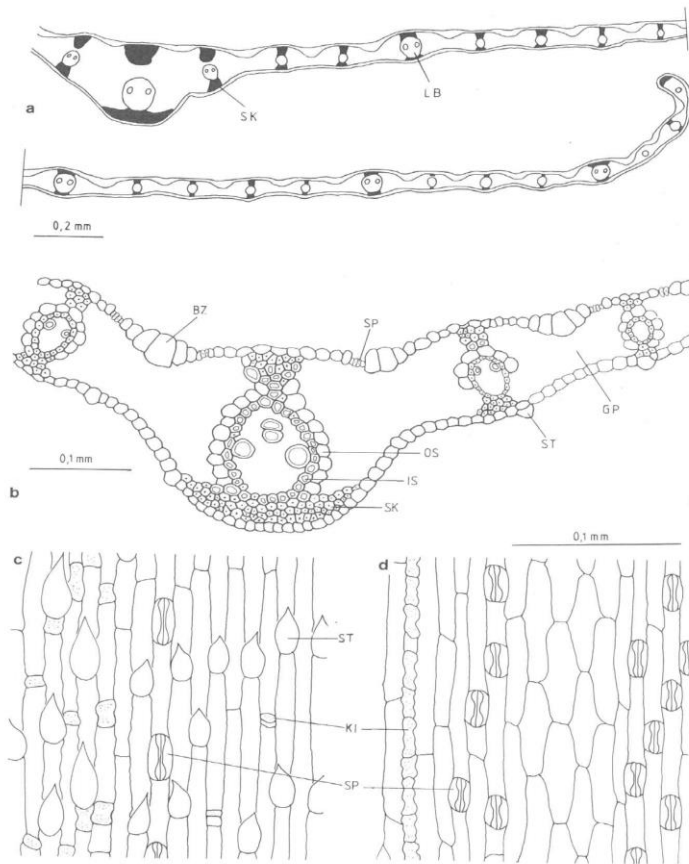


Figura 3. Micromorfología foliar de *B. pinnatum*. a y b) corte transversal de la hoja; c) visión de la epidermis del envés foliar; d) visión de la epidermis del haz foliar. SK=esclerenquima, LB=haz vascular, BZ=célula buliforme, SP=estoma, IS=vaina esclerenquimática, OS=vaina parenquimática, ST=pelo espinoso, GP=parénquima. Fuente: Schippmann (1991).



Mapa 1. Distribución de *B. pinnatum*. Fuente: Schippmann (1991).

B. pinnatum aparece ampliamente en pastizales extensos, secos y soleados, en cunetas de carretera, en terraplenes ferroviarios y en bosques dispersos. La especie es amante de la luz y prefiere suelos calcáreos y neutros.

En Europa Central, la especie se encuentra a unos 900 m sobre el nivel del mar, raramente en los Alpes, pero se ha llegado a encontrar hasta los 2000 m. En el Mediterráneo oriental se desvía hacia elevaciones más altas, (Yugoslavia 1000-1700 m, Grecia 1200-2000 m) (Schippmann, 1991) (ver mapa 1).



Figura 4. Morfología de *B. rupestris*. a) lígula, b) espiguilla, c y d) semilla. Fuente: Schippmann (1991).

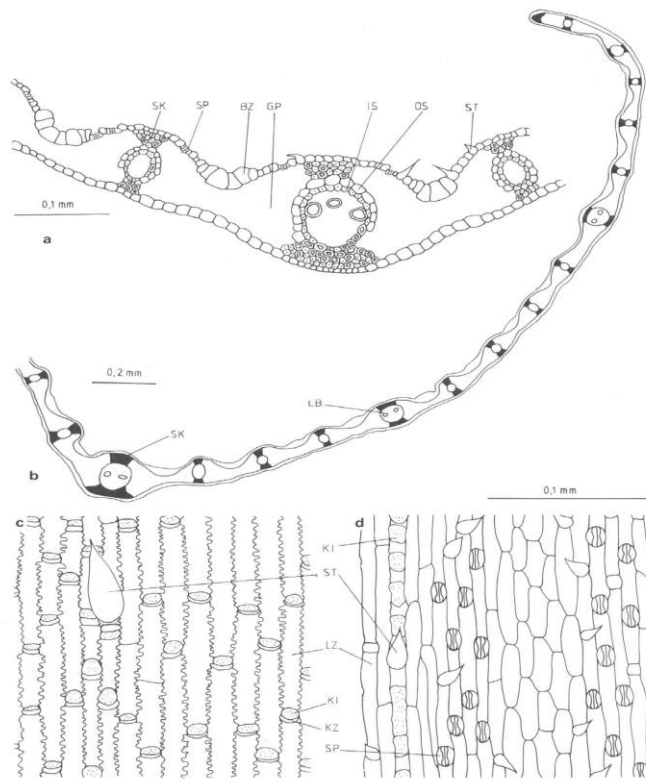


Figura 5. Micromorfología foliar de *B. rupestris*. a y b) corte transversal de la hoja; c) visión de la epidermis del envés foliar; d) visión de la epidermis del haz foliar. SK=esclerenquima, LB=haz vascular, BZ=célula buliforme, SP=estoma, IS=vaina esclerenquimática, OS=vaina parenquimática, ST=pelo espinoso, GP=parénquima. Fuente: Schippmann (1991).



Mapa 2. Mapa Distribución de *B. rupestris*. Fuente: Schippmann (1991).

B. rupestre aparece en Europa Central a altitudes de 200 a 900 m, en los Alpes hasta 1800 m, en pastizales semiáridos, prados pobres y pastos, a lo largo de senderos y bordes de caminos, en bosques dispersos o en sus bordes (en España, por ejemplo, aparece en los bosques de *Fagus sylvatica*, en Portugal, en bosques de *Quercus pyrenaica* o *Castanea sativa*). La especie prefiere suelos calcáreos. En la región del Mediterráneo occidental se extiende a altitudes de aproximadamente 1300 m. En Grecia se encuentra la especie en altitudes de 1300 a 1900 m en bosques de hayas y pinos preferiblemente en puntos claros o bordes del bosque (ver mapa 2). También está claramente ligado a la cal en Alemania (Schippmann, 1991).

Identificación de las especies.

Para la identificación de las especies anuales dentro del género, se ha observado que en ciertos trabajos se emplea el estudio estadístico de caracteres morfométricos; demostrando que cinco de estos pueden utilizados como discriminantes entre las especies anuales desarrolladas en condiciones controladas en invernadero. Estos son, la longitud de las células estomáticas de la hoja, longitud del grano de polen, longitud de la gluma superior, longitud de la lema y de la arista (Catalán et al., 2012). Así pues, aunque la identificación de estas especies puede realizarse a partir de estos caracteres fenotípicos, regiones de ADN y caracteres citogenéticos (Catalán et al., 2012; López-Álvarez et al., 2012) su directa identificación no siempre es sencilla. Esto es debido a que en poblaciones silvestres aparecen superposiciones fenotípicas, variación de algunos caracteres y un tamaño genómico similar. Esto genera dudas e identificaciones erróneas de las diferentes especies.

Debido a que estas dos especies de estudio son perennes, no han llegado a desarrollar inflorescencias durante el periodo de trabajo. Esto hubiera facilitado su identificación. Para confirmar la identificación realizada por otros autores previamente se han buscado caracteres foliares que puedan ser discriminantes entre ambas especies. Según Schippmann (1991), estos son rugosidad de las células del el envés, posible presencia de estomas en el envés, presencia o ausencia de pelos espinosos en las zonas costales e intercostales del envés y presencia o ausencia de pelos en el haz. *B. pinnatum* presenta células lisas en el envés, mientras que en *B. rupestre* son rugosas. *B. pinnatum* suele presentar estomas en el envés, mientras que en *B. rupestre* es más inusual. En cuanto a la presencia de pelos espinosos en el envés, si éstos están presentes tanto en la zona costal como intercostal, estaríamos antes *B. pinnatum*;

mientras que si solo se disponen en la zona costal, estaríamos ante *B. rupestre*. *B. pinnatum* presenta pocos o inexistentes pelos en el haz, mientras que *B. rupestre* posee gran cantidad (ver figuras 3 y 5). Para observar estos caracteres se han realizado moldes foliares tanto del envés como del haz.

Se ha realizado otra prueba empleando las hojas, que, si bien no permite la identificación de las especies, sirve para descartar otro *Brachypodium* como es *Brachypodium phoenicoides* (L.) Roem & Schult (ver figura 6 en anexo I). Esta prueba consiste en la observación de secciones transversales de las hojas realizando unos cortes. Los caracteres observados en estos cortes son: la presencia o ausencia de macropelos tanto en el haz como en el envés (distinguir estos macropelos de los pelos espinosos, más pequeños, descritos hasta ahora) y la continuidad o discontinuidad del esclerénquima entre los haces vasculares.

Número cromosómico (2n).

Una característica que se podría emplear para identificar las especies sería mediante el número de cromosomas. Esto tiene importancia taxonómica puesto que, por regla general, se mantiene constante dentro de una especie. Sin embargo, en el reino vegetal, hay muchos casos en los que el número de cromosomas varía dentro de la misma especie sin que haya una correlación entre esta variación y la variabilidad de los caracteres morfológicos. Hay veces en que el número de cromosomas varía entre las especies de un mismo género, pero sin guardar una relación euploide entre sí; es decir, existe presencia de distinto número básico dentro del género. Es lo que se conoce como disploidía. La existencia de disploidía en un grupo de especies relacionadas se debe al aumento o disminución de cromosomas a partir de especies diploides ancestrales. En estos casos la identificación no puede apoyarse en datos cariológicos, salvo que existan diferencias morfológicas de los cromosomas (Valdés, 1997). Esto se podría hacer analizando cariotipos (posición relativa del centrómero en los cromosomas y longitud de las cromátidas) pero debido al pequeño tamaño y uniformidad de los cromosomas en las dos especies de *Brachypodium* estudiadas en este trabajo, esto no es posible. De todo esto, se deduce la dificultad que implica la correcta identificación de estas especies, utilizando el número cromosómico. Para el conteo de los cromosomas se ha empleado la tinción con DAPI de los cromosomas en metafase de células meristemáticas de las raíces.

Técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Se ha recurrido a otras técnicas citogenéticas de marcaje con sondas de los cromosomas para ver si es posible su identificación de este modo.

El método empleado para marcar los cromosomas ha sido la técnica de hibridación *in situ*; concretamente la técnica FISH (fluorescence *in situ* hybridization), que consiste en la detección de una región concreta de ADN en los cromosomas de una célula. Estas regiones son ADN ribosomal (5S y 25S). En otros trabajos estas regiones han sido utilizadas como puntos de referencia en el estudio de la relación cromosómica entre las especies de varios géneros, por ejemplo, en *Avena* (Linares et al., 1996), *Hordeum* (Taketa et al., 2005) u *Oryza* (Chung et al., 2008).

Regiones organizadoras nucleolares (NOR).

De entre todas las regiones ribosomales, presentes en los cromosomas, hay algunas que participan activamente en la formación de nucléolos. Estas son llamadas regiones organizadoras nucleolares, término propuesto por McClintock (1934). Son regiones que se presentan como constricciones secundarias que ocupan normalmente una posición subterminal de cromosomas metafásicos mitóticos.

Con las técnicas citológicas convencionales el NOR se presenta como una región heteropictónica negativa. Pero es a partir de 1975 cuando, debido al comportamiento citogenético del NOR, cuando se desarrollan métodos de tinción argéntica. Esto permite teñir de forma diferencial las regiones NOR (Ag-NOR) de cromosomas de animales y posteriormente de cromosomas de plantas. Más tarde se demostró que estas zonas marcadas con plata se correspondían exactamente con los lugares de hibridación *in situ* con ARNr y que su tamaño era proporcional a la cantidad de sonda radiactiva hibridada (Lacadena, 1996). Es decir, que en estas zonas está ocurriendo activamente la transcripción para formar ribosomas. Según esto, la diferencia entre FISH y NOR es que la primera técnica detecta todas las secuencias ribosomales 5S y 25S del genoma, mientras que la tinción argéntica únicamente detecta las regiones activas de estos mismos genes.

En este trabajo se emplea la tinción con nitrato de plata. Como se ha dicho, con esta técnica, son teñidos únicamente aquellos NORs activos en la interfase o en la metafase mitótica. Esto permite analizar la actividad génica de las regiones de ADNr mediante microscopía óptica convencional.

Tamaño genómico mediante citometría de flujo.

Determinar el tamaño genómico es más fácil y rápido que determinar el número de cromosomas. El término tamaño genómico es la cantidad de ADN en el genoma holoploide (el conjunto de cromosomas complementarios, n , independientemente del grado de ploidía, aneuploidía...) de un organismo, así como en los genomas monoploides constitutivos en poliploides. A su vez, el valor-C es el contenido de ADN de un genoma holoploide con número cromosómico n (Dolezel et al., 2005). Esto permite relacionar n y el valor-C; siendo $2C$, lo que se determina realmente al medir el tamaño genómico de una célula somática ($2n$) en fase celular G1. Más adelante se verá la variación de este valor con respecto a la fase celular en que se puede encontrar una célula. Debido a la dificultad que implica el conteo de los cromosomas por su pequeño tamaño; el cálculo del tamaño genómico permite determinar, en cierto modo, el número de cromosomas por esta relación entre $2C$ y $2n$. El tamaño genómico puede calcularse por densitometría o por citometría de flujo. En este trabajo se ha empleado citometría de flujo con tinción de yoduro de propidio.

Las aplicaciones de la citometría de flujo en la investigación y las aplicaciones industriales del análisis del tamaño genómico incluyen:

- Control de la estabilidad de la ploidía (por ejemplo, micropropagación in vitro o conformidad de lotes de semillas).
- Detección de plantas haploides (por ejemplo, producción de dihaploides en el cultivo de cereales).
- Selección de plantas diploides (por ejemplo, selección de plantas diploides después de la transformación genética).
- Detección de plantas triploides (por ejemplo, producción de semillas híbridas).
- Detección de nuevos niveles de ploidía (por ejemplo, producción de tetraploides).

- Cribado de híbridos interespecíficos.
- Detección de plantas aneuploides.
- Determinación del tamaño genómico.

El principio de esta técnica consiste en la medición individualizada de células de manera muy rápida al hacerlas pasar por un capilar en un sistema de flujo o torrente líquido. Un láser impacta con las células, el cual se desvía según las características de las mismas. Esta variación del láser es captada por unos receptores específicos que transforman esta luz en pulsos de voltaje. Gracias a un programa informático estos datos son codificados e interpretados. La representación de estos datos da como resultado una serie de histogramas. La fiabilidad de estos aparatos es muy alta y su utilidad muy versátil.

Además, a estas células se les pueden acoplar moléculas fluorescentes que se excitan a cierta longitud de onda del láser dando una respuesta fluorescente mayor.

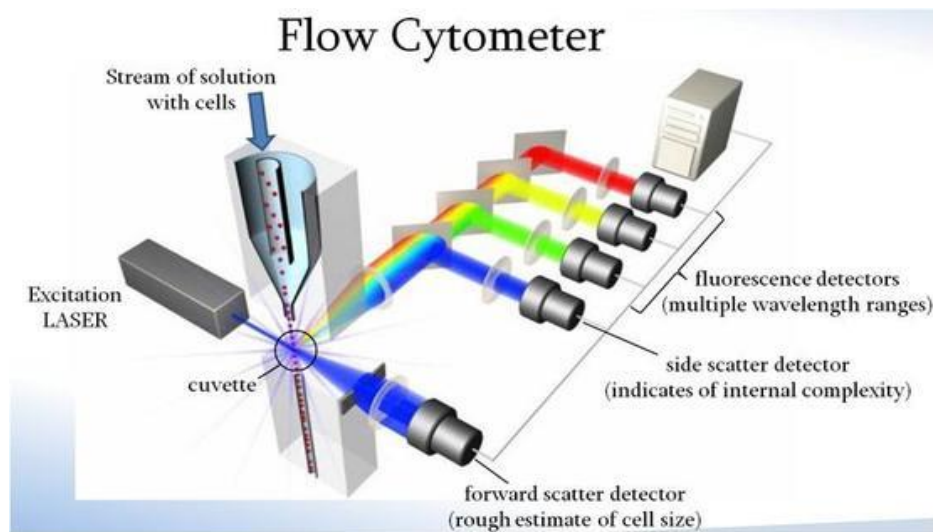


Figura 7. Componentes principales citómetro de flujo. Fuente: Invitrogen, Flow Cytometry.

Estas moléculas fluorescentes o fluorocromos que son capaces de unirse estequiométricamente al DNA, intercalándose en ácidos nucleicos de la doble hebra, permiten la cuantificación del DNA. Algunos ejemplos de estos fluorocromos son: bromuro de etidio, naranja de acridina, DAPI o yoduro de propidio. Así es posible medir la cantidad de DNA en el núcleo celular o las diferentes fases del ciclo celular, por ejemplo. Esta variación del láser

transformada en voltaje permite calcular la cantidad de DNA en picogramos (pg), gracias a la comparación con un patrón de tamaño genómico conocido.

El resultado obtenido son una serie de histogramas que muestran el pico de la muestra en comparación con un patrón de tamaño genómico conocido y permite el cálculo del tamaño genómico de la muestra problema. Los picos o curvas que presentan estos histogramas se ajustan a una distribución normal y que representan el contenido de ADN frente al número de células analizadas. El contenido de ADN de una célula varía según la fase celular en que se encuentra. En fase G0 o G1 el contenido es $2n$ y lo que se determina es $2C$; mientras que en la fase G2 el contenido de ADN se encuentra duplicado y lo que se determina es $4C$. Las células que inician la fase S se superponen con las de la G1, mientras que las que están en la fase final de S se superponen con la G2. Los factores que afectan a la amplitud de los picos son los mismos, independientemente de la fase celular en que se encuentren las células, por lo que hay que identificar correctamente los picos de los histogramas para diferenciar G1 y G2.

OBJETIVOS

Los objetivos generales del trabajo son:

- Identificar una relación entre el número de cromosomas y el tamaño genómico de las especies estudiadas.
- Estudiar las diferencias en el número de regiones ribosomales 5S y 25S en estas especies.

Se pretende esclarecer la relación con posibles ancestros diploides del género; además de averiguar si el número de estas regiones ribosomales puede ser empleado como carácter discriminante entre especies.

Objetivos específicos:

- Determinar el tamaño genómico (2C) en varios taxones de ambas especies.
- Determinar el número de cromosomas (2n).
- Identificar las regiones ribosomales 5S y 25S en los cromosomas.
- Identificación de las regiones organizadoras nucleolares (NORs).

MATERIALES Y MÉTODOS

Taxones estudiados, códigos y procedencia.

Los taxones estudiados y su procedencia se muestran en la tabla 1, además se indica el código asignado a cada uno de ellos, los cuales se van a usar para referirse a cada taxón concreto de aquí en adelante.

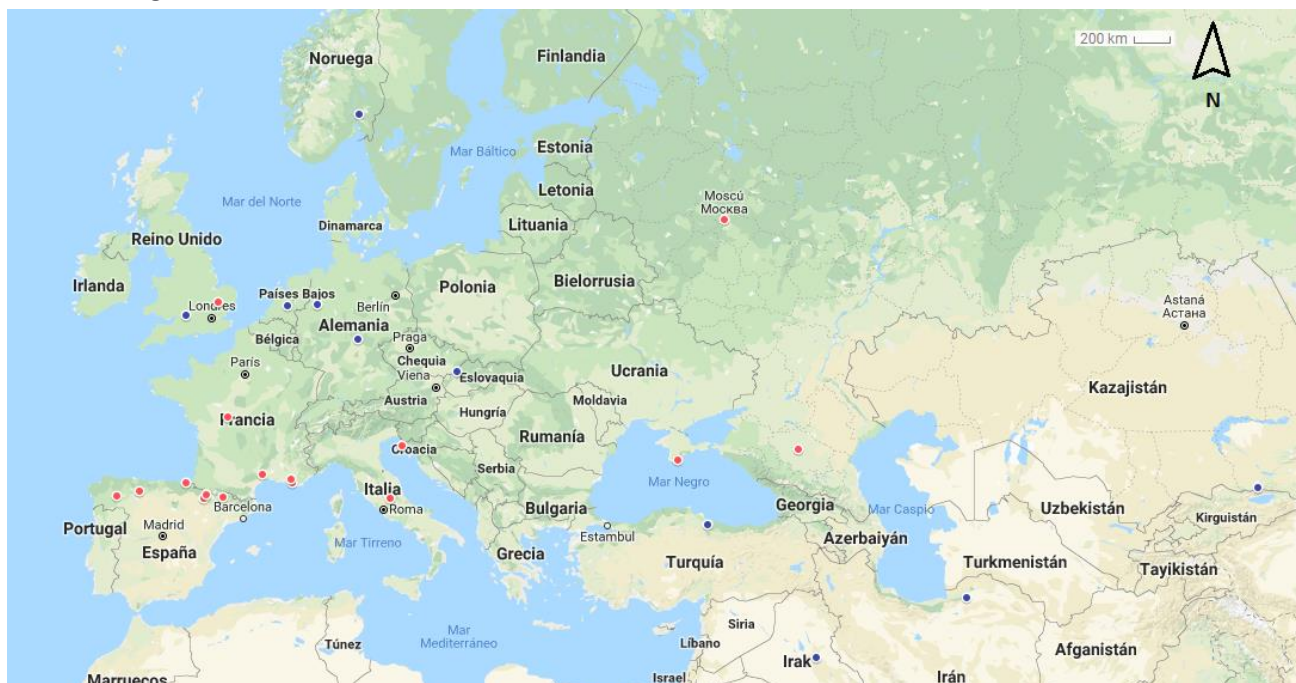
Tabla 1. Procedencia y códigos de semillas empleadas (los códigos USDA_PI proceden del U.S National Plant Germplasm System). Fuente: elaboración propia.

Código	País	Código de adhesión/Localidad/ coordenadas/ Identificación
Bpin 34	Reino Unido	United Kingdom: England, North Wiltshire, Clattinger Farm, 51.64510278 -1.99083333, 92m, 23. September. 2017, Leg Clive Stace. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Bpin 502	Iraq	USDA_PI 185135, from Katowice. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Bpin 505	Noruega	USDA_PI 345964. Donors: Botanical Garden. 10-Sep-1969. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Bpin 512	Italia	USDA_PI 251803. Locality: Terminillo Italy. Collectors: Gentry, Howard Scott, Crops Research Division - USDA-ARS. Donated. 10-Oct-1958. Maryland United States. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Bpin 513	Grecia	USDA_PI 249722. Locality: From south of Grevena. Collectors: Gentry, Howard Scott, Crops Research Division - USDA-ARS. Donated. 06-Aug-1958. Maryland United States. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Bpin 514	Turquía	USDA_PI 206677. Locality: from 25 km south of Samsun. Donated. 01-Apr-1953. Maryland United States Godfrey, R. K., USDA- Bureau of Plant Industry. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Bpin 515	Kazajistán	USDA_PI 440176. 14-Aug-1977. Kazakhstan. Locality: Near Medeo Ice-skating Arena, 15km south of Alma Ata. Collectors: Dewey, Douglas R., USDA-ARS y Plummer, A.P., USDA. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Bpin 519	Alemania	IPK-GRA 3351, D: Botanischer Garten Universität Halle/Saale: 1053/94. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Bpin 520	Países Bajos	Scherpenzeel, Leg. Ger Londo. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Bpin 523	República Checa	ECN 14G3900002. Reserva Natural de Hutê. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Bpin 524	Irán	USDA_PI 229676. Locality: From La Mortala Gardens, Ventimiglia. Accession was donated. 01-Nov-1955. Maryland United States. Donors: Gentry, Howard Scott, Crops Research División-USDA-ARS. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Bpin 525	Irán	USDA_PI 230114 From 54 miles east of Gorgan. <i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv.
Brup 5	España	Huesca: Jaca, Castiello de Jaca: Aratorés, 1020 m, 42° 39'15.95" N 0° 34'03.90"W, marl loams, scrubs and grassland, 5.June.2013, Pilar Catalán. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.
Brup7	Rusia	USDA_PI 316170. Former Soviet Union. Donated: 23-Aug-1966. Austr. Capital Terr., Australia. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult. subsp. rupestre.
Brup 8	Rusia	USDA_PI 440173. Russia, Stavropol krai, Svetlograd, Gofirskoye, Former Soviet Union, 01-Aug-1977, Near Gofitskoye Village, 35km southeast of Svetlograd, Collectors: D. Dewey, A. Plummer. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult. subsp. rupestre.
Brup 10	Reino Unido	United Kingdom: England, Cambridgeshire, New Market, Devil's Ditch, 52.227035N 0.367545E, 45m, grasslands, 23.october.2017, Leg Clive Stace. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.
Brup 182	Croacia	Istria, coordenadas: 45.2745, 13.89018. C. A. Stace. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.
Brup 434	Ucrania/Rusia	USDA_PI 639821. Collected. 31-Jul-1999. Krym Ukraine. Locality: Near and around Nikita Botanical Habitat: South slope, rocky Latitude: 44 grados. 30 minutos. 38 segundos. North (44.51083333), Longitude: 34 deg. 13 min. 59 sec. East (34.23333333). Elevation: 300 meters. Collectors: Bockelman, Harold E., USDA, ARS, Johnson, Richard C., USDA-ARS, Boguslavskiy, Roman, National Centre for Plant Genetic Resources of Ukraine and Korzhenevsky, Vladislav, State Nikitsky Botanical Gardens. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.
Brup 439-1	España	Huesca: Jaca, S. Juan de la Peña, Bco. Carboneras, 42°30'58"N 0°41'29"W, 1100m, <i>Pinus sylvestris</i> forest. 29/09/2016, L. Villar & L. A. Inda. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.
Brup 441-5	España	Leon, Campohermoso, 30TUN0098247547 [Datum WGS84], 1067m, grasslands. 01/10/2016, C. Acedo & F. Llamas 439 (LEB 102.306 voucher). <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.

Brup 442-2	España	Huesca: Ribagorza Oriental: Aneto, 42°33'13.54"N 0°44'24.21"E, 1434m, limestone outcrops, base of rock crevices, <i>Genista scorpius</i> , <i>Achnatherum calamagrostis</i> , 08/11/2016, P. Catalán. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.
Brup 443-1	España	Guipuzcoa: San Sebastian: Igeldo, 43°19'16.92"N 2°00'37.15"E, 170m, sandstone outcrops, grasslands and heathlands, <i>Ulex</i> , <i>Erica</i> , near the sea, north facing slopes. 12/02/2017, P. Catalán. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.
Brup 444	España	Lugo: Seoane do Caurel: Alto do Couto, 29TPH5620 42°36'52.29"N, 7°05'46.65"W, 1320m, pasture grasslands, limestones, 26/02/2017, G. Sahuquillo, A. Cora & E. Sahuquillo. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.
Brup 445	Francia	Indre, Lureuil, France. July 2017. C. A.Stace. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.
Brup 605-1	Francia	83 Var. Pourrières. Ctra de Pourrières a Rians. UTM 31T x: 7207 y: 48243. 472 m. Bosque aclarado de <i>Quercus humilis</i> . Leg. J. Ascaso et E. Pérez. pl. 7450jam. 01-07-2017. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.
Brup 606-2	Francia	34 Hérault. Causse de la Selle. Ctra. D4 entre Causse de la Selle et Saint Jean de Fos. UTM 31T x: 5493 y: 48483. 310 m. Bosque de <i>Quercus ilex</i> aclarado sobre calizas. Leg. J. Ascaso et E. Pérez. pl. 7461Jam. 02-07-2017. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.
Brup 600-3	Francia	83 Var. Nans les Pins. D80, de Nans les Pins a Sainte-Baume. UTM 31T x: 7243 y: 48025. 670 m. Bosque aclarado de <i>Quercus humilis</i> y <i>Q. ilex</i> . Leg. J. Ascaso et E. Pérez. pl. 7436Jam. 29-06-2017. <i>Brachypodium rupestre</i> (Host) Roem. & Schult.

Dos de los taxones presentes en la tabla 1, Brup 7 y Brup 8, están identificados como *Brachypodium rupestre* (Host) Roem. & Schult. Subsp. *rupestre*. Se ha mantenido esta identificación incluyéndolas con el resto de *Brachypodium rupestre* (Host) Roem. & Schult a la hora de presentar los datos.

Es importante recalcar la heterogeneidad de la calidad de las semillas y su diferente éxito de germinación según su procedencia; no obstante, estas habían estado guardadas en silicagel en la nevera hasta su uso.



Mapa 3. Localización de taxones estudiados. En color azul *B. pinnatum* y en color rojo *B. rupestre*. Fuente: elaboración propia.

Como se ve en el mapa 3, la distribución de los taxones estudiados es muy amplia dentro de Europa. En el caso de *B. pinnatum* (color azul), se extienden más por el norte en la parte occidental del continente, desde la República Checa hasta latitudes como Noruega y en la parte oriental se desplaza a latitudes más bajas apareciendo en Turquía, Irán y Kazajistán. En el caso de *B. rupestre* (color rojo), el muestreo parece establecerse en una franja latitudinal más o menos constante, desde España hasta la zona de Rusia, en la península de Crimea; a excepción de un caso que aparece en Reino Unido. Por falta de información geográfica de varios taxones, Brup 7, Bpin 502 y Bpin 505, se han decidido situarlos en la capital correspondiente a cada país.

Reconocimiento micromorfológico de las especies: mediante moldes foliares y secciones transversales.

Se corta la segunda hoja desde la base de las plantas en vivo y se identifica al haz y el envés. Se realizan moldes de ambas partes, por lo que se reserva un trozo de esa misma hoja para realizar el molde del haz y otro trozo de la misma hoja para el envés. A continuación, se extiende una capa de esmalte de uñas transparente sobre la superficie foliar. Se deja secar entre 5 y 10 minutos y se pasa a colocar una tira de cinta adhesiva transparente sobre el esmalte y presionando con cuidado sin tocar la impresión foliar. Tras esto, se retira la cinta adhesiva, en la cual queda adherida una capa de esmalte de uñas con el molde de la epidermis foliar (ver imagen 1). Se colocan las cintas adhesivas con el esmalte en un portaobjetos identificando bien cada superficie foliar y retirando la cinta sobrante. Igualmente se etiqueta el portaobjetos con el código de la especie estudiada. La preparación ya está lista para observar al microscopio.

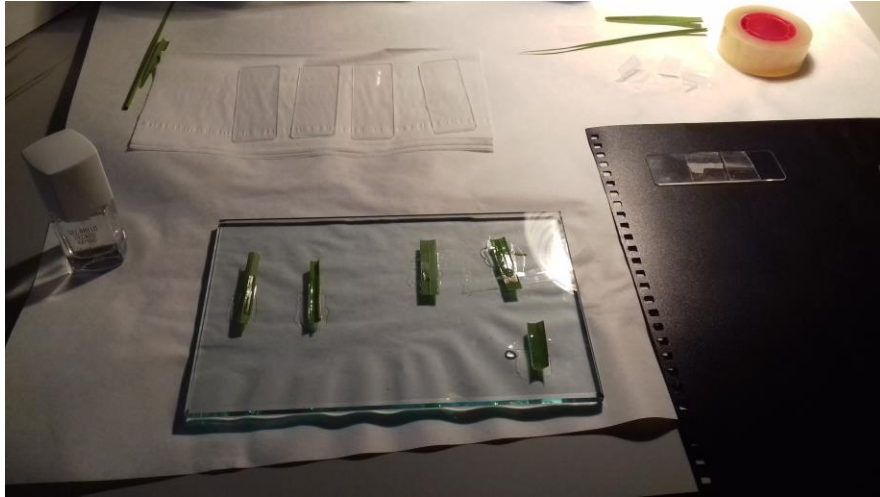


Imagen 1. Procedimiento para la obtención de moldes foliares. Fuente: elaboración propia.

Para obtener las secciones transversales foliares, se realizan cortes de menos de medio milímetro y de forma perpendicular a la dirección del nervio central de la hoja. Se realiza sobre un portaobjetos y con una pipeta se añaden unas gotas de agua sobre los cortes. A continuación se coloca un cubreobjetos sobre la preparación. Las secciones obtenidas deben estar de pie, es decir, que no se apoyen en el portaobjetos ni con el haz, ni con el envés.

Se pasa a visualizar las preparaciones en el microscopio de campo claro. Los caracteres que se observan en la sección transversal de la hoja son: la presencia o ausencia de macropelos tanto en el haz como en el envés y la continuidad o discontinuidad del esclerénquima entre costillas. Además se realizan mediciones de la altura de las costillas central o más grande y de la contigua hacia la derecha con base de referencia en envés, así como la altura de los valles correspondientes a cada una de las costillas incluidas las células buliformes (ver imagen 2). Se calcula el cociente entre la altura de las costillas y sus valles, central y contiguo en este caso, para poder comparar los datos. Estas medidas se realizan con la regla graduada provista en el objetivo del propio microscopio. Se utiliza el objetivo X5 de aumento; con lo que cada pequeña división de la regla equivale a 0,02 mm. En *B. pinnatum* y *B. rupestre* se identifica claramente esta costilla central, mientras que en *B. phoenicoides* al no ser simétrica esta costilla no es tan clara por lo que se toma la de mayor tamaño como costilla central.

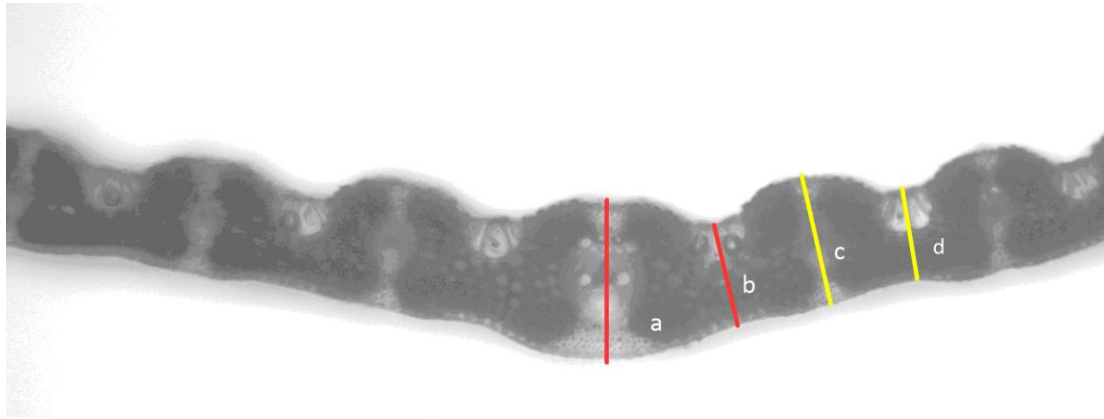


Imagen 2. Corte transversal de Brup 439. En rojo medidas centrales y en amarillo medidas contiguas. a) altura de la costilla central, b) altura del valle central, c) altura de la costilla contigua, d) altura del valle contiguo. Fuente: elaboración propia.

Obtención de ápices radiculares: mediante la germinación de semillas o mediante la realización de cultivos hidropónicos.

Para la obtención de estos ápices se han seguido dos vías:

La primera de ellas consiste en la germinación de las semillas. Para ello se colocan en placas de Petri provistas de papel de filtro absorbente previamente humectado (ver imagen 3) y guardadas en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente.

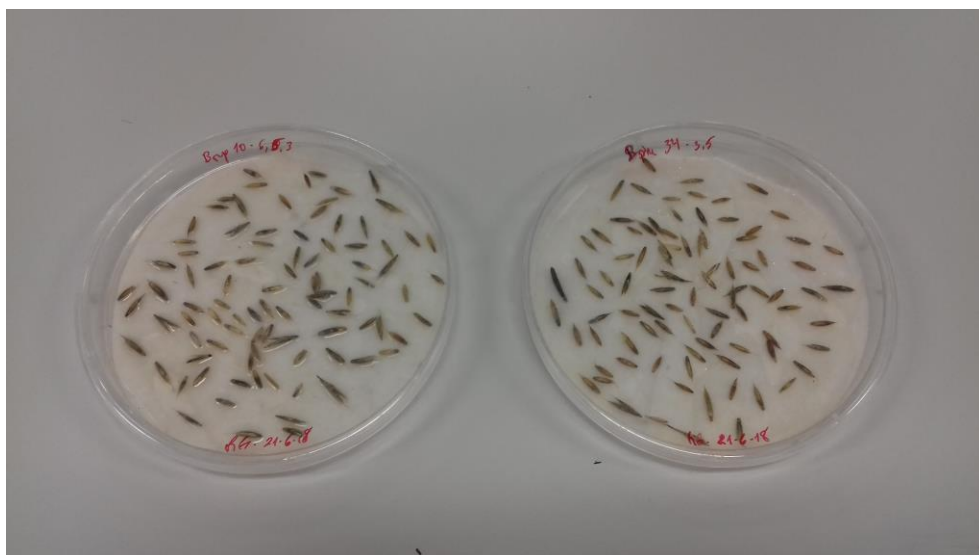


Imagen 3. Germinación de semillas en placas de Petri. Rotuladas con el código, fecha y nombre del investigador. Fuente: elaboración propia.

Se debe esperar hasta que los embriones germinados tengan un tamaño de su parte radicular adecuado, es decir, entre 1 y 1,5 cm aproximadamente de longitud para la obtención de un mayor número posible de células en división mitótica. Este tiempo es muy variable siendo entre 5 y 13 días.

En los taxones en los que no se poseía plantas adultas necesarias para pruebas posteriores (identificación o tamaño genómico) se reservó un número de semillas germinadas para la obtención de plantas. En estos casos las semillas permanecen más días en las placas de Petri, desarrollando raíces de mayor longitud y se plantan en macetas y son llevadas al invernadero para su crecimiento.

La segunda vía de obtención de estos meristemas consiste en la realización de cultivos hidropónicos a partir de plantas adultas (ver imagen 4). Este método fue necesario en aquellas semillas inviables para la germinación o incluso por la falta de semillas.



Imagen 4. Realización cultivo hidropónico. Fuente: elaboración propia.

Se extraen los individuos de la maceta y se separan uno a uno (con la dificultad que conlleva esta labor por tratarse de una planta con desarrollo rizomatoso). A continuación se eliminan las partes muertas, se lava bajo el chorro de agua del grifo y se cortan las raíces y los extremos superiores de las hojas. Los individuos separados y lavados se colocan uno a uno en las bases de poliestireno expandido con agujeros preparadas para tal fin. Para finalizar se

rellena la cubeta con 10 litros de agua destilada a la que se han añadido las sales necesarias para el crecimiento de las plantas. En las tablas 2 y 3 se indican las sales empleadas y sus cantidades, con datos obtenidos de Sachs (1887) para realizar el medio con adición de micronutrientes.

Tabla 2. Sales y concentración solución total de macronutrientes. Fuente: elaboración propia.

Macronutrientes	Concentración (gr/l)
KNO ₃	1
Ca ₃ (PO ₄) ₂	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
CaSO ₄	0,5
NaCl	0,25
FeSO ₄	0,005

Tabla 3. Sales y concentraciones para solución stock de micronutrientes. Fuente: elaboración propia.

Micronutrientes	Concentración solución stock (gr/l)
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81
ZnCl ₂	0,11
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,05
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,025
EDTA 2Na ₂ H ₂ O	0,017

En el caso de los macronutrientes es necesario realizar los cálculos para los 10 litros necesarios. Para los micronutrientes se preparan una solución stock de 200 ml (conservar en nevera a 4 °C) y se vierten 2 ml/l de esta solución stock sobre los 10 litros totales.

Estos cultivos se dejan en la cámara de cultivo con unas condiciones de temperatura adecuadas (22 °C) y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad al día. Además se introduce burbujeo de aire para favorecer la oxigenación de las raíces. Es necesario revisar periódicamente el crecimiento radicular y cortar las mismas cuando tengan un tamaño adecuado de aproximadamente 1 centímetro.

Sea cual sea la vía de obtención de estas radículas, se debe realizar un tratamiento de las mismas con el fin de obtener preparaciones microscópicas en las que poder encontrar los cromosomas metafísicos libres. Este tratamiento (fijación) consiste en colocar los meristemas

en tubos Falcon de 15 ml con agua fría (4 °C) durante al menos 24 h y guardados en nevera a 4 °C para inhibir el crecimiento. Trascurrido este tiempo se retira el agua y se rellena con solución de Carnoy (metanol:ácido acético=3:1) preparado en campana, dejándolos en oscuridad a temperatura ambiente durante media hora. Trascurrida esta media hora se retira esta solución y se vuelve a rellenar con nueva solución de Carnoy, guardándolos a temperatura ambiente durante 4 horas. Posteriormente se guardaran lo tubos a -20 °C hasta su uso.

Tratamiento de los ápices para la obtención de meristemas.

Para la obtención del tejido meristemático es necesario realizar una digestión enzimática, con la que se destruye la pared celular y la pectina de las uniones intercelulares. Se comienza retirando la solución de Carnoy en la que se encuentran los embriones germinados o las raíces obtenidas del cultivo hidropónico; estos se sumergen en un tampón citrato 10 mM y con un pH de 4,8.

La composición de este tampón x10 es:

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

A la hora de usarse se diluye 10 veces con agua destilada.

Se realizan 3 lavados de 5 minutos en este tampón. Tras estos lavados se elimina el exceso del tampón secando los ápices en papel secante. A continuación se colocan en un bloque de vidrio con la mezcla enzimática y se introducen a la estufa a 37 °C durante 2 horas.

La composición de dicha mezcla encimática es:

- 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 alícuotas de 1 ml para su uso.

Pasado el tiempo de digestión se retira cuidadosamente con una pipeta de cristal la mezcla enzimática del bloque de vidrio y se rellena de nuevo con tampón citrato 10 mM.

Extracción de meristemas, búsqueda de cromosomas y fijación.

Se seleccionan los ápices radiculares inmersos en la disolución tampón citrato y con ayuda de una pipeta de cristal se colocan sobre un portaobjetos. Se retira el tampón citrato y se vierte una gota de ácido acético glacial al 45% sobre cada ápice, con lo que se digieren los tejidos externos y se facilita tanto la visualización del meristemo como su extracción.

Rápidamente, pues este tejido meristemático comienza enseguida a perder color y a volverse casi invisible, con ayuda de unas agujas enmangadas se retira la cofia de la raíz y se liberó el tejido meristemático utilizando la lupa binocular (Nikon SMZ800). Se recoge el meristemo con micropipeta y se traspasa a otro portaobjetos previamente lavado con etanol al 70%. En cada uno de estos portaobjetos se colocan 3 o 4 meristemas. A continuación se coloca un cubreobjetos de vidrio de 24x24 mm, también lavado con etanol al 70%, aplicando cierta presión para facilitar la dispersión de los cromosomas. Antes de realizar la fijación se observan las preparaciones con microscopio de contraste de fases, ZEISS AXON, (ver imagen 5) para localizar los cromosomas y ver la calidad de las preparaciones. Si se observan al menos 5 grupos de cromosomas fuera del núcleo y que se puedan contar se procede a marcar los límites del cubre objetos con un bolígrafo de punta de diamante rayando el cristal con cuidado de no mover el cubre y se indica el código del taxón en cuestión y la calidad de la preparación.



Imagen 5. Microscopio de contraste de fases (ZEISS, AXON). Fuente: elaboración propia.

Para realizar la fijación se introducen las preparaciones en hielo seco (CO_2) inmediatamente tras su visualización y marcaje con el bolígrafo de diamante, para evitar que las posibles burbujas o corrientes desplacen los cromosomas. Deben permanecer, al menos, durante media hora sobre el hielo seco. Después se retira el cubreobjetos con una cuchilla y se realizan varios lavados con una mezcla de etanol absoluto (Panreac) y ácido acético glacial (Panreac) en proporción 3:1 en volumen, para una mayor fijación de los cromosomas. A continuación se sumergen los portaobjetos en etanol absoluto 100% durante media hora en recipientes de vidrio, asegurándose de que la parte donde se encontraba el cubreobjetos queda totalmente sumergida. Por último se sacan del recipiente de vidrio, se escurren y se dejan secar a temperatura ambiente para después almacenarlos a $4\text{ }^\circ\text{C}$ en cajas para portaobjetos.

Preparación de las sondas de ADN ribosómico 5S y 25S para FISH.

Extracción.

Las sondas utilizadas complementarias a las regiones que se quieren detectar proceden de *Triticum aestivum*, para la región 5S y de *Arabidopsis thaliana*, para la 25S. Ambas están insertadas en clones de *Escherichia coli* (5S: pTa794; 25S: 25S rDNA de *A. thaliana*). Este

material fue cedido de la colección del Departamento de Citología de la Universidad de Silesia en Katowice, Polonia.

El primer paso es realizar un cultivo de estas bacterias, *Escherichia coli*, en un medio LB (Luria-Bertani) con pequeñas variaciones (Sambrook et al., 1989). Se debe realizar tanto en medio líquido como en medio sólido. La composición de dicho medio para la preparación de 500 ml es la siguiente:

- 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 disuelven dichas cantidades en un vaso de precipitados mediante agitación magnética con 400 ml de agua doblemente destilada (MQ) y esterilizada. Es necesario ajustar el pH a 7, por ser el más óptimo para el desarrollo de estas bacterias, mediante el uso de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH). A continuación de trasvasa la mezcla a una botella aforada y se enrasa a los 500 ml buscados con agua MQ.

A partir de esta mezcla se preparan los medios sólidos y líquidos. En el primer caso se añaden 3 gramos de agar (Conda) en botellas de Schott y 200 ml del medio de cultivo LB. Para el segundo caso 300 ml de mezcla sin agar. Se esterilizan los medios con autoclave.

La mezcla destinada al medio sólido se vierte en placas de Petri, cuando aún está líquido, en campana de flujo laminar dejando que solidifique con las placas semitapadas. Tras esto se sellan con parafilm y se guardan a 4 °C. La mezcla para el medio líquido se reparte en tubos Falcon estériles de 50 ml y se guardan también a 4 °C debidamente sellados.

El siguiente paso consiste en la siembra de las bacterias que contienen las regiones ribosomales de estudio en las placas Petri, para lo cual se emplea un asa de siembra esterilizada a la llama y bajo campana de flujo laminar. El tipo de siembra es por agotamiento obteniéndose finalmente dos placas con bacterias para la región 5S y otras dos con bacterias para la región 25S. Se introducen dichas placas en la estufa a 37 °C durante una noche para el desarrollo de colonias.

A continuación se hace una nueva siembra en medio líquido de las colonias desarrolladas. Para ello se reparte el medio líquido guardado en tubos Falcon estériles de 50 ml. Tras esto se selecciona una colonia de cada placa tomándola con una punta de micropipeta

y dejando la punta de plástico de la micropipeta dentro de los nuevos tubos. Así se obtienen tubos Falcon con bacterias 5S y tubos Falcon con bacterias 25S. En este caso para el desarrollo bacteriano se colocan dichos tubos en el agitador orbital a 37 °C durante 12 horas. (Ver imagen 6).



Imagen 6. Agitador orbital. Fuente: elaboración propia.

El siguiente paso consiste en una extracción de DNA de las bacterias desarrolladas en el medio líquido, empleando el Kit QIAprep Spin Miniprep Kit (50) de QIAgen.

Primeramente se centrifugan los tubos Falcon a 4000 rpm durante 4 minutos, provocando la precipitación de las bacterias. A continuación se retira y desecha el sobrenadante y las puntas de micropipetas que contenían los tubos.

Sólo queda seguir las instrucciones del Kit:

- Se resuspenden las bacterias en 500 µl de tampón de ruptura que contiene RNAsas (tampón 1), rompiendo la pared celular y el RNA presente.
- El contenido de cada tubo Falcon con las bacterias en suspensión, se traspara a 2 tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se dejan 3 minutos para que actúe el tampón.
- Se añaden en cada tubo 400 µl de un tampón detergente (tampón 2) y se agita suavemente hasta conseguir una coloración azul.
- Se añaden 400 µl de tampón 3. Se realiza agitando suavemente durante 3-4 minutos, hasta que la mezcla se torna blanca. Cuando esto sucede se introducen los tubos en hielo para detener la reacción.

- Se centrifugan los tubos a 13500 rpm durante 10 minutos. Se toma el sobrenadante que es donde se encuentra el ADN para traspassarlo a 2 nuevos tubos de 1,5 ml. Se desecha el precipitado el cual contiene proteínas, membranas y lípidos de la pared celular que no nos interesan.
- Se añaden 650 μ l de isopropanol (Panreac) y se agita suavemente durante 1,5 minutos para después centrifugar durante 20 minutos a 13500 rpm.
- Se vuelve a retirar el sobrenadante y se añaden 500 μ l de etanol al 70% en volumen.
- Se centrifuga de nuevo los tubos a 13500 rpm durante 2 minutos y se retira el sobrenadante, se dejan los tubos abiertos para evaporar el posible etanol residual.
- 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.

Para realizar el posterior marcaje de las sondas es preciso conocer la concentración del ADN extraído, para ello se emplea el fluorómetro Qubit 3.0 (Life technologies) (Ver imagen 7).



Imagen 7. Qubit 3.0 Fluorometer. Fuente: elaboración propia.

Se sigue el protocolo proporcionado por la empresa comercial (Invitrogen, life technologies) del aparato de medida:

- En primer lugar se debe preparar la llamada “disolución de trabajo”. Esta consiste en 1 μ l de reactivo Qubit (disolución presente en el Kit) y 199 μ l de tampón Qubit (disolución presente en el Kit) por cada muestra a analizar. También hay que preparar para dos estándares. El aparato utiliza los estándares para realizar una recta de calibrado que le permite calcular la concentración de DNA de la muestra problema. En

este caso se escogieron los estándares necesarios para realizar la medición en el modo “Broad range” (2-1000 ng).

- En otros tubos de Ependorff propios para este aparato, llamados Qubit, se añade 1 μ l de la muestra problema, ya sean para el caso de la sonda 5S o 25S, y 10 μ l para los dos estándares. Todos ellos se rellenan con la “solución de trabajo” hasta los 200 μ l. Hay que asegurarse que el volumen final es el mismo en todos los tubos para obtener medidas reales de concentración. Esta mezcla se agita durante 2 segundos y se esperan 2 minutos de incubación antes de pasar a realizar la medida.
- El último paso consiste en meter los tubos Qubit en el orden indicado por el aparato; primero el estándar 1, luego el estándar 2 y finalmente la muestra problema. En la pantalla se muestra la concentración obtenida; es necesario indicar al aparato el volumen de muestra empleado, en este caso 1 μ l.

Marcaje.

El siguiente paso consiste en el marcaje del ADN extraído para cada sonda. Debido a la diferencia de tamaño de las sondas, se deben emplear dos técnicas diferentes para su marcaje atendiendo a los siguientes criterios:

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

Dado que el tamaño para cada región es de: 410 pares de bases para la región 5S y 2,3 Kpb para la región 25S, se emplea la técnica por PCR en el primer caso y Nick translation para la segunda (Hasterok et al., 2002).

Marcaje por PCR de la región 5S.

Al igual que para una PCR corriente se debe preparar la mezcla de reacción con los siguientes componentes:

- 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
- Taq. polimerasa (Promega M124B): 0,5 µl

Los desoxinucleótidos empleados se preparan previamente a la concentración indicada, al igual que los cebadores, a partir de material comercial. La mezcla se realiza en tubos Eppendorf para termociclador de 0,2 ml obteniéndose un volumen final de 50 µl.

Estos tubos se introducen en el termociclador, indicando el volumen final y con el siguiente programa:

94 °C----1 minuto.

94 °C ---40 segundos

55 °C----40 segundos.

72 °C----1 minuto y 10 segundos.

72 °C----5 minutos.

4 °C

} Durante 35 ciclos

Es necesario lavar el resultado obtenido en la PCR para eliminar los elementos de la mezcla que no interesan y quedarse sólo con las réplicas marcadas.

Se traspasan los 50 μ l a tubos de 1,5 ml y se añaden 5 μ l de acetato de sodio 3 M (para una proporción final de 1/10) y 137,5 μ l de etanol absoluto 100% subenfriado a -20 $^{\circ}$ C (es decir, 2,75 veces el volumen inicial de 50 μ l). Todo ello mezclando el contenido suavemente y dejando incubar 30 minutos a -80 $^{\circ}$ C.

Transcurrido ese tiempo se centrifuga a 14000 rpm durante 30 minutos para después retirar cuidadosamente el sobrenadante con micropipeta.

Se añaden 50 μ l de etanol 70% subenfriado a -20 $^{\circ}$ C y se centrifuga nuevamente a 14000 rpm durante 15 minutos. Se retira de igual modo el sobrenadante y se introducen los tubos abiertos en la estufa a 37 $^{\circ}$ C durante 15 minutos para evaporar completamente el etanol.

Finalmente se resuspende el precipitado con 10 μ l de agua MQ agitando suavemente para después dejarlo en oscuridad a 4 $^{\circ}$ C durante unas 12 horas.

Marcaje por “Nick Translation” de la región 25S.

Al igual que en el caso anterior se debe preparar una mezcla de reacción con los siguientes reactivos y concentraciones:

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

Se obtiene así, un volumen final de 20 μ l en tubos de 0,2 ml.

Se introducen dichos tubos en el termociclador, indicando el volumen final y con el siguiente programa:

15 °C----1 hora y 30 minutos.

65 °C ---10 minutos.

4 °C

El lavado se realiza de igual modo que para la sonda 5S respetando las concentraciones y proporciones de los reactivos, teniendo en cuenta que el volumen inicial en este caso es de 20 µl.

Hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Además de las sondas y las preparaciones microscópicas obtenidas, se requieren otros reactivos cuya elaboración se detalla a continuación.

- Tampón citrato sódico salino (20xSSC): para su elaboración se disuelven 175,3 g de NaCl (Panreac) y 88,3 g de citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)2\text{H}_2\text{O}$) (Panreac) en 800 ml de agua destilada MQ. Posteriormente, tras homogeneizar la mezcla, se ajustó el pH a 7 con ácido clorhídrico. Hecho esto, se enrasó hasta un litro con agua MQ 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 disuelven 8,01 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_42\text{H}_2\text{O}$ (Panreac) y 36,82 g de NaCl (Panreac) en 450 ml de agua destilada.
 - Disolución b): se disuelven 1,56 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_42\text{H}_2\text{O}$ y 8,18 g de NaCl (ambos de Panreac) en 100 ml de agua destilada.Seguidamente se ajusta la disolución a) hasta conseguir un pH de 7, empleando la disolución b). Por último se enrasa la mezcla hasta 500 ml con agua destilada y se esteriliza la mezcla en autoclave.
- Disolución de RNAsa A (100 µg/ml): se disuelven 10 mg de RNAsa A (Sigma R-5503) en 1 ml de Tris-HCl 10 mM y 15 mM de NaCl. Se pone a hervir 15 minutos y se deja enfriar. Por último, se prepararan alícuotas de 20 µl en tubos de 2 ml y se almacenan a -20 °C. Para su uso, se añadieron a la mezcla 1980 µl de 2xSSC.

- Formaldehido libre de ácido al 1% en PBS: se mezclan 87 ml de agua destilada estéril, 10 ml de 10xPBS y 3 ml de formaldehido al 36% libre de ácidos (Panreac 131328).
- Sulfato de dextrano al 50%: se disuelven 5 g de sulfato de dextrano (Sigma D8906) en 10 ml de agua destilada estéril a 65 °C (temperatura a la que este compuesto es más fluido facilitando su manipulación). Tras esterilizar la mezcla por filtración (con filtros de tamaño de poro de 0,22 µm) se realizan alícuotas de 1 ml.
- Dodecil-sulfato sódico al 10% (SDS 10%): se disuelven 10 g de SDS (Sigma L4390) en 100 ml de agua destilada estéril y se esteriliza la mezcla por filtración.
- Tween/ 4xSSC: se diluyen 2 ml de Tween 20 (Merk 8.22184.0500) en 798 ml de agua destilada estéril y se le añaden 200 ml de 20xSSC.
- Leche desnatada bloqueante: se disuelven 5 g de leche desnatada en polvo en 80 ml de agua destilada esterilizada y en 20 ml de 20xSSC. Se agita, y se esteriliza la mezcla con filtros de tamaño de poro de 0,22 µm. Después se realizaron alícuotas de 2 ml.
- Anticuerpos anti-digoxigenina-FITC: se mezclan 30 µl de anticuerpo anti-digoxigenina (Roche 11 207 741 910) con 270 µl de leche desnatada bloqueante.
- Medio DAPI-Vectashield: se disuelve 1 mg de 4',6-diamino-2-fenilindol (Thermo scientific 62248) en 10 ml de agua destilada estéril y se realizan alícuotas de 1 ml. Para elaborar el medio se toman 2,5 µl de DAPI y se diluyen en 97,5 µl de Vectashield (Vector Laboratories H-1000).
- Formamida desionizada: se mezclan 200 ml de formamida 100% (Sigma F7503) con 10 g de resina de Amberlita (Merk IRN-150). Se agita la mezcla durante 90 minutos y se filtra con papel de filtro.

Con todos estos reactivos preparados se procede a seleccionar las preparaciones microscópicas. El protocolo que se describe a continuación es una modificación del descrito por Jenkins & Hasterok (2007).

Pretratamiento del portaobjetos con cromosomas.

En primer lugar se realiza un pretratamiento a las preparaciones mediante la adición de 200 µl de RNAsa a cada uno de ellas y se coloca un cubre de polietileno, para incubarlos en cámara húmeda a 37 °C durante 1 hora. La finalidad es destruir el RNA presente.

Transcurrido este tiempo, las preparaciones se introducen en cubetas de lavado con medio 2xSSC a temperatura ambiente, 3 veces durante 5 minutos cada vez (3x5 minutos). Es en el primero de estos lavados cuando se retira cuidadosamente con ayuda de unas pinzas el cubre de plástico que debe desprenderse con facilidad.

A continuación se realiza otro lavado empleando una nueva cubeta, como en el caso anterior, pero con formaldehído al 1% en PBS durante 10 minutos y a temperatura ambiente. Esto hace que se fije más, si cabe, la preparación. Seguidamente se vuelve a lavar con 2xSSC, 3x5 minutos.

Finalmente se introducen las preparaciones en etanol al 70%, 90% y 100%; en ese orden y durante 3 minutos en cada una y se dejan secar a temperatura ambiente para deshidratarlas.

Desnaturalización e hibridación de las sondas.

A partir de este punto es necesario trabajar en oscuridad para evitar degradar las sondas marcadas con los fluorocromos fotosensibles. Se prepara la mezcla con los siguientes reactivos en tubos Eppendorf de 0,5 ml y se guarda en hielo:

Tabla 4. Mezcla reactivos para FISH. Fuente: elaboración propia.

Reactivos	µl /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
DNA marcado 25S	2
Volumen total	39

Se completa con agua MQ estéril hasta obtener un volumen final de 40 μ l. Estas cantidades están referidas a un solo portaobjetos.

Se agita la mezcla para homogenizar su contenido y se introduce en el baño seco a 75 $^{\circ}$ C durante 10 minutos para desnaturalizarla. Pasado este tiempo se coloca en hielo durante otros 10 minutos, tapándolo para evitar que le dé la luz.

Se añaden 38 μ l de la mezcla por cada portaobjetos y se coloca un cubre de plástico. Se llevan los portas a la placa de hibridación Boekel 28000, programándola para que alcance 72 $^{\circ}$ C, temperatura a la que debe permanecer durante 4 minutos. Es importante controlar este tiempo con precisión para evitar quemar la muestra en caso de estar más tiempo o no realizarse bien la hibridación en caso de estar menos tiempo del debido. Tras este tiempo de hibridación se programa nuevamente el aparato para que descienda la temperatura hasta los 37 $^{\circ}$ C. Puesto que la placa empleada no tiene sistema propio de refrigeración, es necesario colocar bloques de hielo sobre él para poder alcanzar la temperatura de enfriamiento. Por último se introducen los portaobjetos en cámara húmeda en la estufa a 37 $^{\circ}$ C durante 16 horas, favoreciendo más aun la hibridación de las sondas en el DNA.

Lavado riguroso.

El siguiente paso consiste en hacer un lavado del material no hibridado, introduciendo la cestilla con los portaobjetos en cubetas de lavado en 2xSSC a 42 $^{\circ}$ C y retirando el cubre de plástico. A continuación se introducen en la disolución de formamida al 10% en 0,1xSSC; 2 x 5 minutos. Se sigue con lavados de nuevo en 2xSSC; 3 x 3 minutos. Estos lavados se hacen en baño húmedo a 42 $^{\circ}$ C de temperatura. Se continúa con otros 3 x 3 minutos de lavado en 2xSSC, esta vez a temperatura ambiente.

Inmunodetección de la digoxigenina

La digoxigenina no genera fluorescencia, por eso se añaden anticuerpos anti-digoxigenina-FITC que se unen a las zonas antigénicas, la digoxigenina. Esta tiene unida una molécula fluorescente, isocianato de fluoresceína o FITC.

Para esto, se realiza un lavado con Tween/4xSSC durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se escurren los portaobjetos y se añaden 250 µl de reactivo bloqueante, leche desnatada previamente centrifugada a 10000 rpm durante 3 minutos. Se coloca un cubre de plástico y se dejan en cámara húmeda 45 minutos a temperatura ambiente. Es importante no dejar que se sequen las preparaciones para que las proteínas de la leche se adhieran correctamente al portaobjetos.

Posteriormente se retira el cubre de plástico y se escurren los portaobjetos inclinándolos apoyados sobre un uno de sus bordes. A continuación se añaden 40 µl del anticuerpo anti-digoxigenina-FITC a cada uno de los portaobjetos, para después volver a colocar nuevos cubres de plástico y meterlos en cámara húmeda durante 1 hora a 37 °C.

Por último se lava de nuevo con Tween/4xSSC, 3x8 minutos a 37 °C en baño húmedo. Se retira cuidadosamente el cubre en el primero de estos tres lavados.

Antes de teñir con DAPI, lo primero es deshidratar los portaobjetos con etanol al 70, 90 y 100% en ese orden y durante un minuto en cada uno de ellos. Tras esto, se dejan secar a temperatura ambiente y en oscuridad para no dañar los fluorocromos.

Visualización.

Se añaden 9 µl de medio DAPI-Vectashield a cada portaobjetos y se coloca sobre ellos un cubre de vidrio de 24x24 mm previamente lavado con etanol al 70% y secado. Se presiona ligeramente con el dedo sobre un papel de filtro evitando deslizamientos del cubre y la formación de burbujas. Las preparaciones se guardan en carpetas de portaobjetos en oscuridad a 4 °C durante al menos 12 horas para que el DAPI tiña correctamente.



Imagen 8. Microscopio de fluorescencia (Motic BA410). Fuente: elaboración propia.

Para ver el resultado de la tinción e hibridación de las sondas se observan las preparaciones con el microscopio de fluorescencia Motic BA410 (ver imagen 8). Esto se debe hacer en oscuridad. Desde el objetivo de menor aumento vamos enfocando hasta llegar al objetivo de 100x aumentos que se emplea con aceite de inmersión y con el cual pueden llegar a distinguirse y contarse los cromosomas. El microscopio está provisto de un regulador de la longitud de onda que llega a la preparación, permitiendo ajustarse en 3 modos diferentes, uno para el DAPI, otro para la Rhodamina y otro para FITC. Estas longitudes de onda son las apropiadas para excitar cada uno de los diferentes fluorocromos empleados, obteniéndose señales sólo de cada una de ellas con la longitud de onda de emisión correspondiente. El microscopio está provisto de una cámara, con lo que se pueden tomar imágenes de las visualizaciones. Estas imágenes se toman por separado para cada longitud de onda ajustando los parámetros necesarios de contraste, realce o luminosidad del programa informático Motic Live Imaging Module; estas imágenes se obtienen en blanco y negro. Al tomar la foto, automáticamente se traspasan al programa Motic.plus 2.0 desde donde se guardan en formato "tif" con el nombre correspondiente al taxón en cuestión y la longitud de onda. Se emplea otro programa, Wasabi, para realizar la tinción y el montaje del conjunto de las tres fotos pertenecientes a cada grupo de cromosoma fotografiado. Los colores son azul para DAPI, rojo para la Rhodamina y verde para FITC. El resultado es una imagen final donde se cuentan los cromosomas en color azul y se aprecian puntos sobre ellos en color rojo o verde pertenecientes a las regiones 25S y 5S respectivamente.

Detección de Regiones Organizadoras Nucleolares (NORs).

La detección de las regiones NOR se realiza mediante tinción con nitrato de plata y observación en el microscopio óptico de campo claro siguiendo el protocolo descrito por Idziak & Hasterok (2008).

El primer paso es sumergir los portaobjetos con los meristemas fijados en tampón borato 10 mM durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se dejan secar al aire. Para la preparación del tampón borato se disuelven 1,9 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua destilada ajustando el pH a 9,2. Este reactivo se guarda en nevera a 4 °C.

A continuación se colocan 50 µl de nitrato de plata, al 50% p/v en agua MQ, sobre cada portaobjetos y se cubre con un cubre de nylon para incubarlo en cámara húmeda a 42 °C durante 30 minutos. La disolución de nitrato de plata se prepara en el momento de usarse y se centrifuga a 10.000 rpm durante 4 minutos.

Seguidamente se lavan los portaobjetos sumergiéndolos en cubetas de lavado con agua destilada, 2 veces durante 5 minutos cada vez.

Finalmente se dejan secar en oscuridad durante al menos 30 minutos y se añaden 20 µl de glicerol a cada portaobjetos cubriendo con un cubre de cristal de 24 mm x 24 mm previamente lavado con etanol al 70%. Se presiona ligeramente con papel de filtro eliminando el exceso de glicerol.

Las preparaciones ya están listas para observar al microscopio de campo claro y tomar fotografías de los resultados.

Determinación del número cromosómico (2n).

En el caso de la determinación únicamente del número de cromosomas, se realiza la tinción con DAPI de las preparaciones dedicadas a este fin, del mismo modo que en el último paso de la técnica del FISH (visualización). Añadiendo directamente 9 µl de medio DAPI-Vectashield a cada portaobjetos y se coloca sobre ellos un cubre de vidrio de 24x24 mm previamente lavado con etanol al 70% y secado. Se presiona ligeramente con el dedo sobre un papel de filtro evitando deslizamientos del cubre y la formación de burbujas. Se realiza en oscuridad. Las preparaciones se guardan en carpetas de portaobjetos en oscuridad a 4 °C durante al menos 12 horas para que el DAPI tiña correctamente los cromosomas.

Se emplea el microscopio de fluorescencia, utilizando únicamente la longitud de onda de 416 nm que permite ver de color azul los cromosomas.

Determinación del tamaño genómico por citometría de flujo.

Para determinar el tamaño genómico se ha empleado el citómetro de flujo (Ploidy Analyser de Susmex).

El material de partida para este análisis consiste en células somáticas de las hojas de individuos adultos. Lo primero es preparar una solución con los núcleos que contendrá conjuntamente, tanto la muestra problema como el patrón más adecuado para ese taxón concreto con el que compararlo. Los patrones empleados son los siguientes:

Tabla 5. Tamaños genómicos de patrones empleados en citometría de flujo. Fuente: elaboración propia.

Patrón	Tamaño genómico (pg/2C)
<i>Solanum lycopersicum</i> L. "Stupické polní rané"	1,96 (Dolezel et al., 2007)
<i>Raphanus sativus</i> L. "Saxa"	1,11 (Dolezel et al., 2007)
<i>Brachypodium ruprestre</i> 435	0,82 (grupo Bioflora EPSH)

La elección de uno u otro patrón se hace en relación al tamaño genómico de la muestra problema, atendiendo a que la diferencia con el patrón no puede ser tres veces superior, ni una vez y media veces inferior, para obtener histogramas fiables. Otro factor a tener en cuenta es la existencia de posibles picos pertenecientes a la G2 de ciertas células de los individuos; estos picos pueden superponerse con el pico del patrón falseando la medida.

Para cada taxón y su patrón es necesario poner a punto un programa o configuración adecuada para optimizar las regiones donde se sitúan los picos (G1) del histograma. La medición del pico se hace con flujo de 0,2 μ l/s.



Imagen 9. Citómetro de flujo Sysmex Ploidy Analyser. Fuente: elaboración propia.

Los reactivos y protocolo seguido es el siguiente (Dolezel et al., 2007):

- Solución Otto I: mezclar Tween 20 al 0,5% en volumen en ácido cítrico 0,1 M. Se filtra a través de un filtro de 0,22 μm de tamaño del poro. La solución se guarda en nevera a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- Solución Otto II: realizar una disolución 0,4 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y filtrar con filtro de 0,22 μm de tamaño de poro. Guardar a temperatura ambiente.
- Solución de Yoduro de Propidio (IP): disolver 1 mg/ml de IP y filtrar con filtro de 0,22 μm de tamaño de poro para eliminar pequeñas partículas. Guardar a -20 $^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de 1 ml. Es importante no volver a congelar tras su uso, en este caso se guardará a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- Solución de RNasaA: se disuelve 1 mg/ml de RNasa y se calienta a 90 $^{\circ}\text{C}$ en baño húmedo durante 15 minutos; con esto se consigue inactivar la posible presencia de DNasa que es más inestable al aumento de temperatura que la RNasa. Filtrar con filtro de 0,22 μm de tamaño de poro para eliminar pequeñas partículas. Guardar a -20 $^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de 1 ml. Es importante no volver a congelar tras su uso, en este caso se guardará a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Se tratan conjuntamente los trozos de hoja de la muestra problema y del patrón. La cantidad de hoja a tomar debe comprender una superficie aproximada de 0,5 cm^2 en cada caso y evita coger hojas enfermas, secas o con la presencia de parásitos, ápices o peciolos. Para

cada medida se toma una nueva hoja y se corta el extremo superior para reducir la cantidad de células en G2. Con la ayuda de una cuchilla se cortan estos trozos de hoja y se coloca en una placa de Petri de cristal. Se añaden 0,5 ml de solución Otto I con la micropipeta, esta solución debe estar fría. Con ayuda de la cuchilla se corta bien todo el tejido presente en la placa. Con una micropipeta se recoge esta solución y se filtra por un filtro (30 μm de tamaño de poro).

A continuación, se añade 1 ml, sobre ese mismo filtro, de una mezcla preparada en un tubo de Falcon, que contiene 900 μl de Otto II, 50 μl de RNasa A y 50 μl de IP, previamente preparados. Todas estas cantidades están referidas para una sola medida. Se deja actuar la reacción durante 3 minutos.

Con el citómetro encendido y la configuración pertinente cargada se procede a realizar un lavado inicial (llamado primer) y para el cual se deben seguir las instrucciones proporcionadas por el aparato (introducir solución descontaminadora y presionar continuar; desconectar la solución y continuar; colocar de nuevo solución descontaminadora y continuar y finalmente colocar shift y continuar).

Se introduce el tubo con la mezcla realizada en el citómetro y se procede a realizar la medida. En el histograma van apareciendo los picos pertenecientes a la muestra y al patrón. El programa da datos de las partículas o núcleos que van pasando, una media de la altura del pico y un coeficiente de variación de esa media. La medida es el paso de 5000 núcleos en total de manera equitativa entre la muestra y el patrón. Deben obtenerse picos bien definidos y estrechos y con unos coeficientes de variación menores de 3. Tras terminar la medición se anotan los datos y se guarda el histograma. Entre medición y medición es necesario realizar un lavado y al terminar también se realiza un lavado final siguiendo las instrucciones indicadas.

Para cada taxón se realizan 2 medidas diarias, en 3 días diferentes; obteniéndose un total de 6 medidas. El dato final será la media entre estas medidas.

RESULTADOS

Secciones transversales y moldes foliares de *B. pinnatum* y *B. rupestre*.

Para comprobar la identificación de las dos especies estudiadas en este trabajo se realizaron cortes transversales de las hojas y moldes de la epidermis foliar, tanto del haz como del envés.

Se presentan las tablas 6 y 7 con los datos obtenidos de los cortes transversales para ambas especies. Además se realizaron cortes de *B. phoenicoides* (ver tabla 8), con el fin de comparar la micromorfología foliar de *B. phoenicoides* con las dos especies de estudio y descartar que alguna de ellas fuera *B. phoenicoides*. En todos los casos se destaca el cociente entre la altura de la costilla contigua y su valle, sobre el cociente central. (Los datos empelados para realizar las medias se muestran en las tablas 22, 23 y 24 del Anexo II).

Tabla 6. Datos secciones transversales de *B. pinnatum*. El color azul corresponde al taxón diploide con $2n=16$, el color marrón a los diploides con $2n=18$ y el color verde a los tetraploides con $2n=28$. SK=esclerénquima, D=discontinua. CV=coeficiente de variación. Fuente: elaboración propia.

Código	Ploidía	Presencia de macropelos	SK	Media Cociente Central	CV Central (%)	Media Cociente Contiguo	CV Contiguo (%)
Bpin 502	2x	No	D	2,67 ± 0,52	19,55	2,25 ± 0,18	8,17
Bpin 515	2x	No	D	1,8 ± 0,21	11,62	2,03 ± 0,3	14,66
Bpin 525	2x	Si	C	1,69 ± 0,48	28,23	2,23 ± 0,59	26,64
Bpin 505	2x	No	D	1,57 ± 0,28	18,01	1,33 ± 0,22	16,37
Bpin 513	4x	No	D	1,64 ± 0,06	3,49	1,51 ± 0,16	10,45
Bpin 514	4x	No	D	1,47 ± 0,07	5,09	1,4 ± 0,07	5,25
Bpin 520	4x	No	D	1,32 ± 0,09	6,94	1,68 ± 0,2	12,18
Bpin 34	4x	No	D	1,97 ± 0,34	17,27	1,71 ± 0,33	19,22
Bpin 519	4x	No	D	1,47 ± 0,12	8	1,51 ± 0,08	5,31

La tabla 6 recoge los datos obtenidos en la realización de los cortes transversales de las hojas de los taxones estudiados de *B. pinnatum*. La primera columna indica el código de cada taxón y la segunda su ploidía. La tercera columna muestra la presencia o ausencia de macropelos tanto en el haz como en el envés al observar los cortes en el microscopio. Destacar que nos referimos a macropelos, mayores que los pelos espinosos descritos hasta ahora. Solo en un caso hay presencia de macropelos, en el taxón Bpin 525 (ver imagen 10: A2 y A3). La

cuarta columna hace referencia a la esclerénquima; en todos los casos se presenta continua entre los haces vasculares. Se ha realizado el cociente entre las alturas de las costillas y su valle correspondiente, indicadas como media cociente central para la costilla y valle centrales y media cociente contiguo para la costilla y valle inmediatamente más próxima a la central. Además se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación de estas medias. La media del cociente de la costilla contigua para el taxón diploide con $2n=16$ es de 2,25; para los diploides con $2n=18$ es de 1,86 y para los tetraploides es de 1,51. Los coeficientes de variación fluctúan mucho, siendo el mayor de un 26,64% y el menor de 5,25%.

Tabla 7. Datos secciones transversales de *B. rupeste*. El color marrón corresponde a los taxones diploide con $2n=18$, el color verde a los tetraploides con $2n=28$ y el color granate a los "hexaploides" con $2n=38$. SK=esclerénquima, D=discontinua. CV=coeficiente de variación. Fuente: elaboración propia.

Código	Ploidía	Presencia de macropelos	SK	Media Cociente Central	CV Central (%)	Media Cociente Contiguo	CV Contiguo (%)
Bpin 512	2x	No	D	2,15 ± 0,48	22,33	1,79 ± 0,16	8,94
Brup 434	2X	No	D	1,56 ± 0,12	7,69	1,45 ± 0,1	6,9
Brup 8	2x	No	D	2,09 ± 0,17	8,13	1,69 ± 0,06	3,4
Brup 439	4X	No	D	1,61 ± 0,25	15,53	1,38 ± 0,16	11,59
Brup 443	4X	No	D	1,54 ± 0,05	3,25	1,36 ± 0,12	8,82
Brup 445	4X	No	D	1,31 ± 0,05	3,82	1,4 ± 0,11	7,86
Brup 7	4x	No	D	1,49 ± 0,06	4,26	1,52 ± 0,12	7,73
Brup 5	4X	No	D	1,47 ± 0,09	6,12	1,43 ± 0,18	12,59
Brup 10	4X	No	D	1,8 ± 0,14	7,78	1,42 ± 0,4	2,82
Brup 182	¿6x?	No	D	1,48 ± 0,39	26,35	1,4 ± 0,26	18,57
Brup 600	¿6x?	No	D	1,72 ± 0,14	8,14	1,38 ± 0,18	13,04
Brup 605	¿6x?	No	D	1,39 ± 0,12	8,63	1,37 ± 0,15	10,95
Brup 606	¿6x?	No	D	1,5 ± 0,13	8,67	1,46 ± 0,13	8,9

La tabla 7 muestra los datos obtenidos en la realización de los cortes transversales de las hojas de los taxones estudiados de *B. rupeste*. La esclerénquima aparece discontinua entre los haces vasculares en todos los casos. La media del cociente de la costilla contigua para los taxones diploides es de 1,62; para los tetraploides es de 1,39 y para los "hexaploides" es de 1,4. El mayor coeficiente de variación es de 18,57% y el menor de 2,82%.

Se puede ver como en la tabla 7 aparece un taxón, Bpin 512, que en un principio se creía que era *B. pinnatum* pero como se ve a continuación, al analizar sus moldes foliares se ha determinado que se trata de *B. rupestre*.

Tabla 8. Datos secciones transversales de *B. phoenicoides*. El color verde corresponde a un tetraploides con $2n=28^1$. SK=esclerénquima, D=discontinua. CV=coeficiente de variación. 1 (Robertson, 1981). Fuente: elaboración propia.

Código	Ploidía	Presencia de macropelos	SK	Media Cociente Central	CV Central (%)	Media Cociente Contiguo	CV Contiguo (%)
Bpho 6	4x ¹	Si	C	1,73 ± 0,4	22,92	2,89 ± 0,42	15,03

La tabla 8 muestra los datos obtenidos en la realización del corte transversales de un taxón de *B. phoenicoides*. Este es el Bpho 6. Hay presencia de estos macropelos. La esclerénquima se ve continua entre los haces vasculares. La medida del cociente de la costilla contigua es de 2,82; significativamente superior a las especies *B. pinnatum* y *B. rupestre*. El coeficiente de variación de las nuestras estudiadas es algo elevado 15,03%.

De forma cualitativa, las costillas se encuentran bien marcadas en *B. phoenicoides* (ver imagen 9).

A continuación se muestran las tablas 9 y 10, que recogen los caracteres estudiados en los moldes foliares para cada taxón de cada una de las especies.

Tabla 9. Datos moldes foliares de *B. pinnatum*. Fuente: elaboración propia.

Código	Ploidía	Células del envés (rugosas/lisas)	Presencia de estomas en el envés	Pelos espinosos en el envés (todo/zonas costales)	Pelos espinosos en el haz (abundantes/pocos/inexistentes)
Bpin 502	2x	Llisas	Si	Todo	Abundantes
Bpin 505	2x	Llisas	Si	Todo	Inexistentes
Bpin 515	2x	Llisas	Si	Todo	Pocos
Bpin 525	2x	Rugosas	No	Todo	Abundantes
Bpin 513	4x	Llisas	No	Todo	Pocos
Bpin 514	4x	Rugosas	Si	Todo	Pocos
Bpin 519	4x	Llisas	Si	Todo	Inexistentes
Bpin 520	4x	Rugosas	Si	Todo	Pocos
Bpin 34	4x	Lisas	Si	Zona costal	Inexistentes

La tabla 9 recoge los diferentes caracteres observados en los moldes foliares realizados para los diferentes taxones de *B. pinnatum*. Los caracteres propios de *B. pinnatum* son: células

lisas conformando el envés, presencia de estomas en el envés, pelos espinosos tanto en la zona costal como intercostal del envés e inexistencia o poca presencia de pelos en el haz.

Existen no correlaciones con estos caracteres tipo en algunos de los taxones (partes en rojo), siendo el carácter que más se ajusta a todos los taxones el de presencia de pelos espinoso en todo el envés foliar. Solo un caso, Bpin 34, presenta pelos espinoso únicamente en la zona costal, pero coincidiendo en los demás caracteres.

Tabla 10. Datos moldes foliares de *B. rupestre*. El color verde indica la coincidencia y el color rojo la no coincidencia de los caracteres estudiados en comparación con la bibliografía consultada (Schippmann, 1991). Fuente: elaboración propia.

Código	Ploidía	Células del envés rugosas/lisas	Presencia de estomas en el envés	Pelos espinosos en el envés (todo/zona costale)	Pelos espinosos en el haz (abundantes/pocos/inexistentes)
Brup 434	2x	Rugosas	No	Zona costal	Abundantes
Bpin 512	2x	Rugosas	No	Zona costal	Abundantes
Brup 8	2x	Rugosas	Si	Todo	Abundantes
Brup 442	4x	Rugosas	Si	Zona costal	Abundantes
Brup 443	4x	Rugosas	Si	Zona costal	Pocos
Brup 445	4x	Rugosas	No	Zona costal	Abundantes
Brup 7	4x	Lisas	Si	Todo	Abundantes
Brup 444	4x	Rugosas	Si	Zona costal	Abundantes
Brup 5	4x	Rugosas	Si	Zona costal	Abundantes
Brup 439	4x	Rugosas	Si	Zona costal	Pocos
Brup 10	4x	Lisas	Si	Zona costal	Pocos
Brup 606	¿6x?	Rugosas	Si	Zona costal	Abundantes
Brup 605	¿6x?	Rugosas	No	Zona costal	Abundantes
Brup 600	¿6x?	Rugosas	Si	Zona costal	Abundantes
Brup 182	¿6x?	Rugosas	Si	Zona costal	Inexistentes

La tabla 10 recoge los diferentes caracteres observados en los moldes foliares realizados para los diferentes taxones de *B. rupestre*. Los caracteres propios de *B. rupestre* son: células rugosas conformando el envés, no presencia de estomas en el envés, pelos espinosos solo en la zona costal del envés y abundancia de pelos en el haz.

Excepto Brup 7 y Brup 8, el resto de taxones presentan pelos espinosos únicamente en la zona costal del envés. Se han identificado como *B. rupestre* un taxón identificado inicialmente como *B. pinnatum*. Este es Bpin 512 y como se aprecia en la tabla 10 coinciden todos los caracteres con los propios para *B. rupestre*.

A continuación se presentan una serie de imágenes de algunos de las secciones transversales y moldes foliares realizados. (Además ver anexo III).

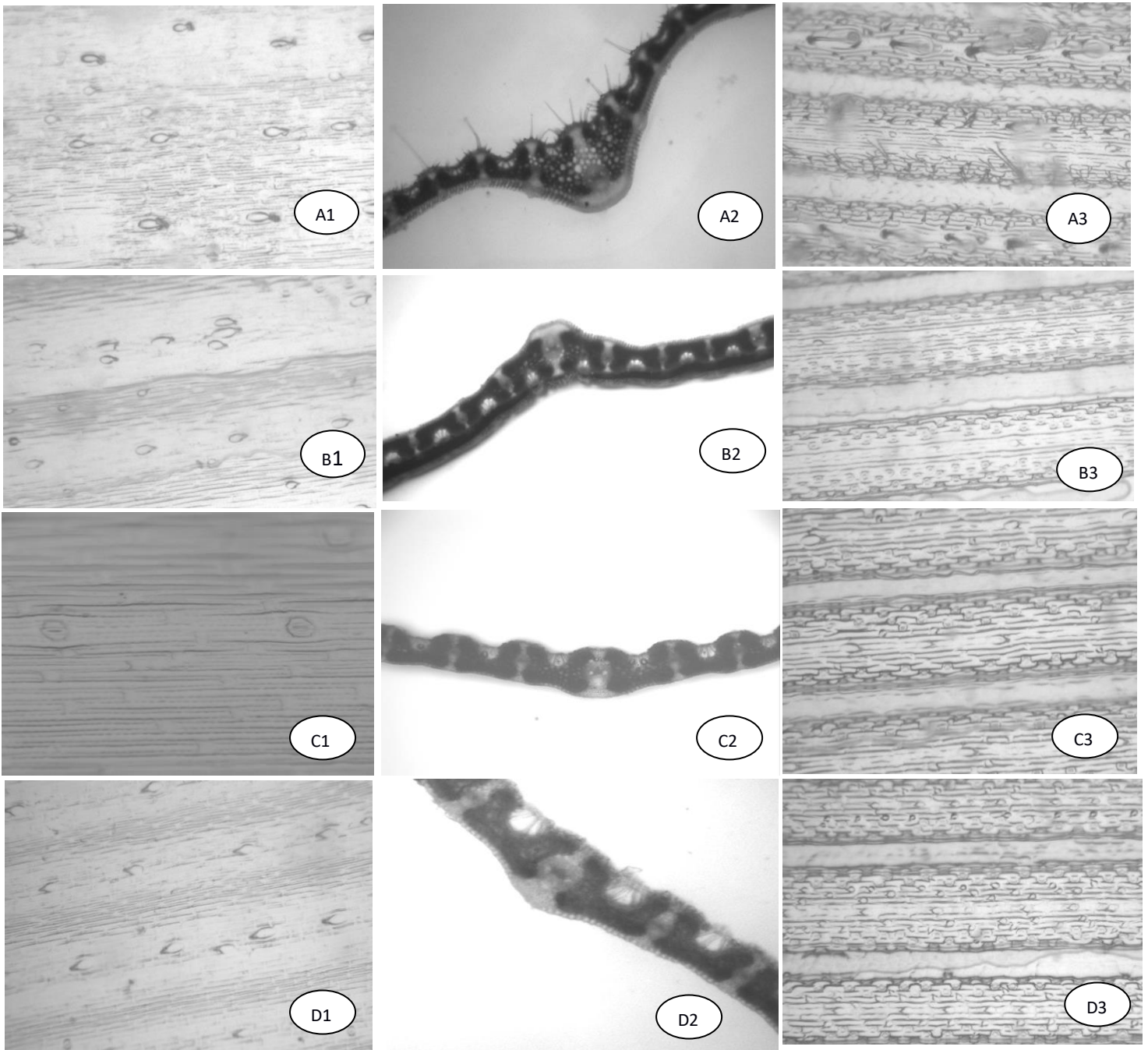


Imagen 10. Moldes foliares del envés (1), secciones transversales (2) y moldes foliares del haz (3) para Bpin 525 (A), Bpin 514 (B), Brup 439 (C) y Brup 605 (D). Fuente: elaboración propia

En la imagen 10 se pueden ver las características descritas y recogidas en las tablas 6, 7, 9 y 10 para alguno de los taxones estudiados.

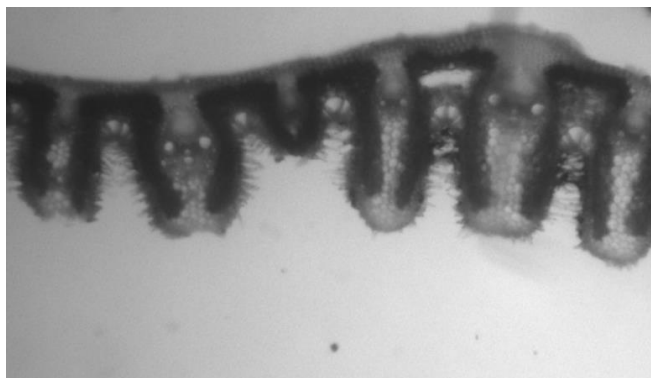


Imagen 11. Sección transversal de Bpho 6. Fuente elaboración propia.

La imagen 11 muestra un corte transversales de *B. phoenicoides*. Se ve claramente las costillas bien marcadas, la presencia de macropelos y la continuidad del esclerénquima entre los haces vasculares.

Relación entre tamaño genómico y número cromosómico en *B. pinnatum*.

El conjunto de datos, mediciones e histogramas realizados con el citómetro de flujo para construir las tablas 11 y 12 se presentan en el anexo IV.

Tabla 11. Relación tamaño genómico y número cromosómico en *B. pinnatum*. El color azul corresponde al taxón diploide con $2n=16$, el color marrón a los diploides con $2n=18$ y el color verde a los tetraploides con $2n=28$. 1 (realizado anteriormente en Grupo Bioflora EPSH, 2018). Fuente: elaboración propia.

Código	Procedencia	Ploidía	Nº cromosómico (2n)	Tamaño genómico (2C) pg
Bpin 502	Iraq	2x	16	0,968 ± 0,013 ¹
Bpin 505	Noruega	2x	18	0,822 ± 0,009
Bpin 515	Kazajistán	2x	18	0,815 ± 0,004
Bpin 525	Irán	2x	18	0,939 ± 0,020
Bpin 513	Grecia	4x	28	1,453 ± 0,026
Bpin 514	Turquía	4x	28	1,537 ± 0,012
Bpin 519	Alemania	4x	28	1,471 ± 0,044
Bpin 520	Países Bajos	4x	28	1,499 ± 0,014 ¹
Bpin 523	República Checa	4x	28	1,435 ± 0,019
Bpin 34	Reino Unido	4x	28	1,449 ± 0,018

La tabla 11 muestra el número de cromosomas (2n) y el tamaño genómico (2C) para los taxones de *B. pinnatum* estudiados. Además incluye la supuesta ploidía y el país de

procedencia. Se analizó un diploide con 16 cromosomas, cuatro diploides con 18 cromosomas y siete tetraploides con 28 cromosomas. Los tamaños genómicos (2C) del taxón diploides con 16 cromosomas es de unos 0,96 pg, para los diploides con 18 es de alrededor de 0,86 pg y para los tetraploides alrededor de 1,48 pg. Las desviaciones estándar son bajas en todos los casos.

Hay un caso, *B. pinnatum* 502, que aun teniendo 16 cromosomas solamente, presenta un tamaño genómico mayor que los diploides de la misma especie con 18.

Las imágenes del conteo de cromosomas en *B. pinntaum* se muestran en las imágenes 12, 13 y 14 y en el anexo V.

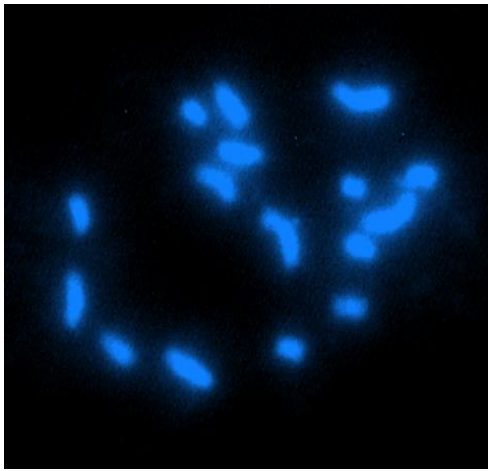


Imagen 12. Bpin 502. 2n=16.
Fuente: elaboración propia.

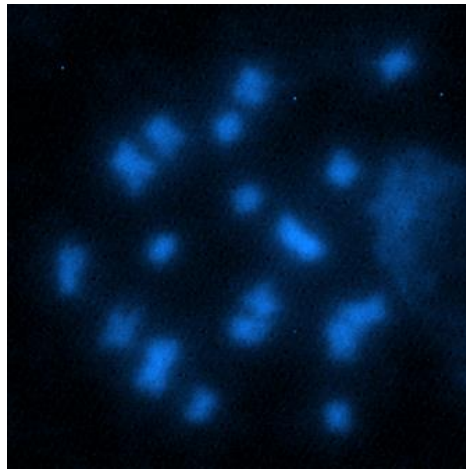


Imagen 13. Bpin 515. 2n=18.
Fuente: elaboración propia.

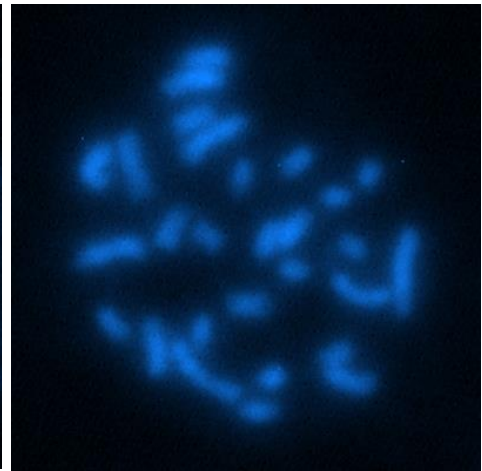


Imagen 14. Bpin 513. 2n=28.
Fuente: elaboración propia.

Relación entre tamaño genómico y número cromosómico en *B. rupestre*.

Tabla 12. Relación tamaño genómico y número cromosómico en *B. rupestre*. El color marrón corresponde a los taxones diploide con $2n=18$, el color verde a los tetraploides con $2n=28$ y el color granate a los "hexaploides" con $2n=38$. 1 (realizado anteriormente en Grupo Bioflora EPSH, 2018). Fuente: elaboración propia.

Código	Procedencia	Ploidía	Nº cromosómico (2n)	Tamaño genómico (2C) pg
Brup 434	Ucrania/Rusia	2x	18	0,951 ± 0,003
Bpin 512	Italia	2x	18	0,84 ± 0,015
Brup 8	Rusia	2x	18	0,931 ± 0,015
Brup 442-2	España (Huesca, Aneto)	4x	28	1,56 ± 0,03
Brup 443-1	España (Guipuzcoa)	4x	28	1,498 ± 0,012
Brup 445	Francia	4x	28	1,519 ± 0,039
Brup 444	España (Lugo)	4x	28	1,492 ± 0,021
Brup 441-5	España (León)	4x	28	1,483 ± 0,008
Brup 5	España (Huesca, Aratorés)	4x	28	1,469 ± 0,037 ¹
Brup 439-1	España (Huesca, San Juan de la Peña)	4x	28	1,55 ± 0,022
Brup 7	Rusia	4x	28	1,562 ± 0,016
Brup 10	Reino Unido	4x	28	1,4324 ± 0,017
Brup 606-2	Francia	¿6x?	38	2,33 ± 0,043
Brup 605-1	Francia	¿6x?	38	2,265 ± 0,013
Brup 600-3	Francia	¿6x?	38	2,216 ± 0,013
Brup 182	Croacia	¿6x?	38	2,258 ± 0,026

La tabla 12, muestra el número de cromosomas (2n) y el tamaño genómico (2C) para los taxones de *B. rupestre*. Nos encontramos dos diploides con 18 cromosomas, ocho tetraploides con 28 cromosomas y cuatro "hexaploides" de 38 cromosomas. Los tamaños genómicos (2C) de los taxones diploides es de unos 0,9 pg; los tetraploides alrededor de 1,51 pg y los "hexaploides" de unos 2,26 pg. Las desviaciones estándar son bajas en todos los casos.

Las imágenes del conteo de cromosomas en *B. rupestre* se muestran en las imágenes 15, 16 y 17 y en el anexo VI.

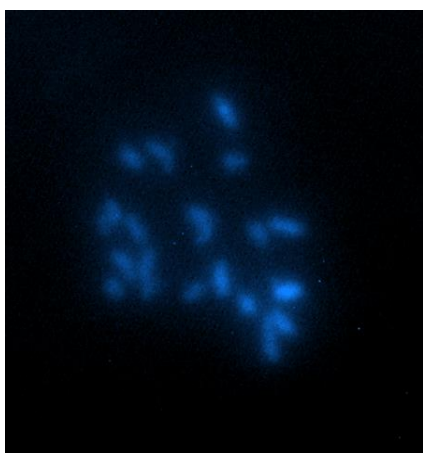


Imagen 15. Brup 434. $2n=18$.
Fuente: elaboración propia.

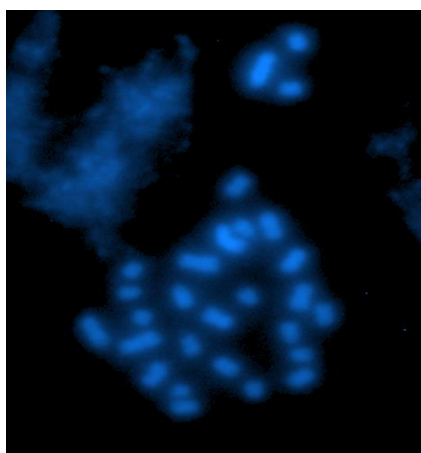


Imagen 16. Brup 444. $2n=28$.
Fuente: elaboración propia.

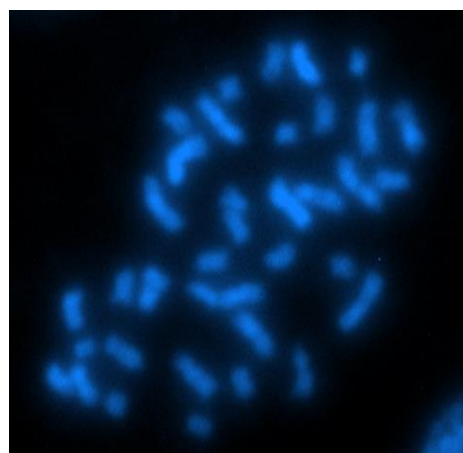


Imagen 17. Brup 182. $2n=38$.
Fuente: elaboración propia.

Determinación del número de regiones ribosomales en *B. pinnatum*.

Tabla 13. Regiones ribosomas 5S y 25S de *B. pinnatum*. Fuente: elaboración propia.

Código	Ploidía	Nº cromosómico (2n)	Nº regiones 5s	Nº regiones 25s
Bpin 502	2x	16	2	2
Bpin 505	2x	18	2	4
Bpin 514	4x	28	4	4
Bpin 520	4x	28	4	4
Bpin 34	4x	28	4	4

La tabla 13 recoge el número de regiones ribosomales encontradas para los diferentes taxones de *B. pinnatum* estudiados. Bpin 502, con 16 cromosomas presenta dos regiones 5S y otras dos regiones 25S. El otro diploide de 18 cromosomas, Bpin 505, poseen dos regiones 5s y cuatro regiones 25S. En el caso de los tetraploides, tiene cuatro regiones 5S y cuatro regiones 25S.

Las imágenes de FISH en las que se determinan las regiones ribosomales de *B. pinntaum* se muestran en la imagen 18.

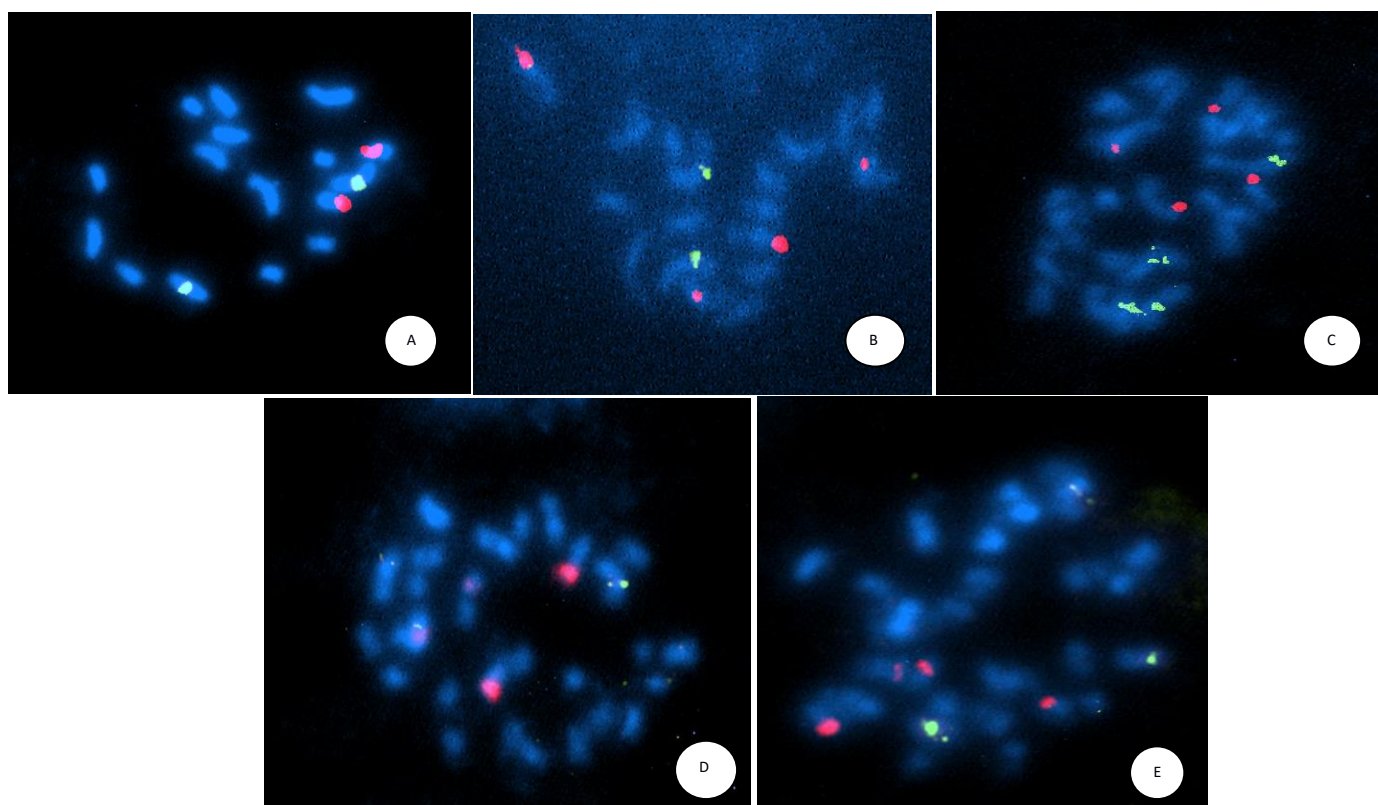


Imagen 18. Regiones ribosomales detectadas con FISH en los taxones de *B. pinnatum*. Sondas 5S (verde) y 25S (rojo) para Bpin 502 2n=16 (A), Bpin 505 2n=18 (B), Bpin 514 2n=28 (C), Bpin 520 2n=28 (D) y Bpin 34 2n=28 (E). Fuente: elaboración propia.

Determinación del número de regiones ribosomales en *B. rupestre*.

Tabla 14. Regiones ribosomas 5S y 25S de *B. rupestre*. Fuente: elaboración propia.

Código	Ploidía	Nº cromosómico (2n)	Nº regiones 5S	Nº regiones 25S
Brup 434	2x	18	2	4
Bpin 512	2x	18	2	4
Brup 8	2x	18	2	2
Brup 7	4x	28	4	4
Brup 5	4x	28	4	4
Brup 10	4x	28	4	4
Brup 605-1	¿6x?	38	6	5-6
Brup 600-3	¿6x?	38	6	6
Brup 182	¿6x?	38	6	5-6

La tabla 14 recoge el número de regiones ribosomales encontradas para los diferentes taxones de *B. rupestre* estudiados. Los diploides Brup 434 y Bpin 512 presentan dos regiones 5S y cuatro regiones 25S mientras que el otros diploide, Brup 8 posee dos regiones 5S y otras dos regiones 25S. En el caso del tetraploides todos tiene cuatro regiones 5S y cuatro regiones 25S. Y en el caso de los “hexaploides” poseen seis regiones 5S y cinco o seis regiones 25S.

Las imágenes de FISH en las que se determinan las regiones ribosomales de *B. pinntaum* se muestran en la imagen 19.

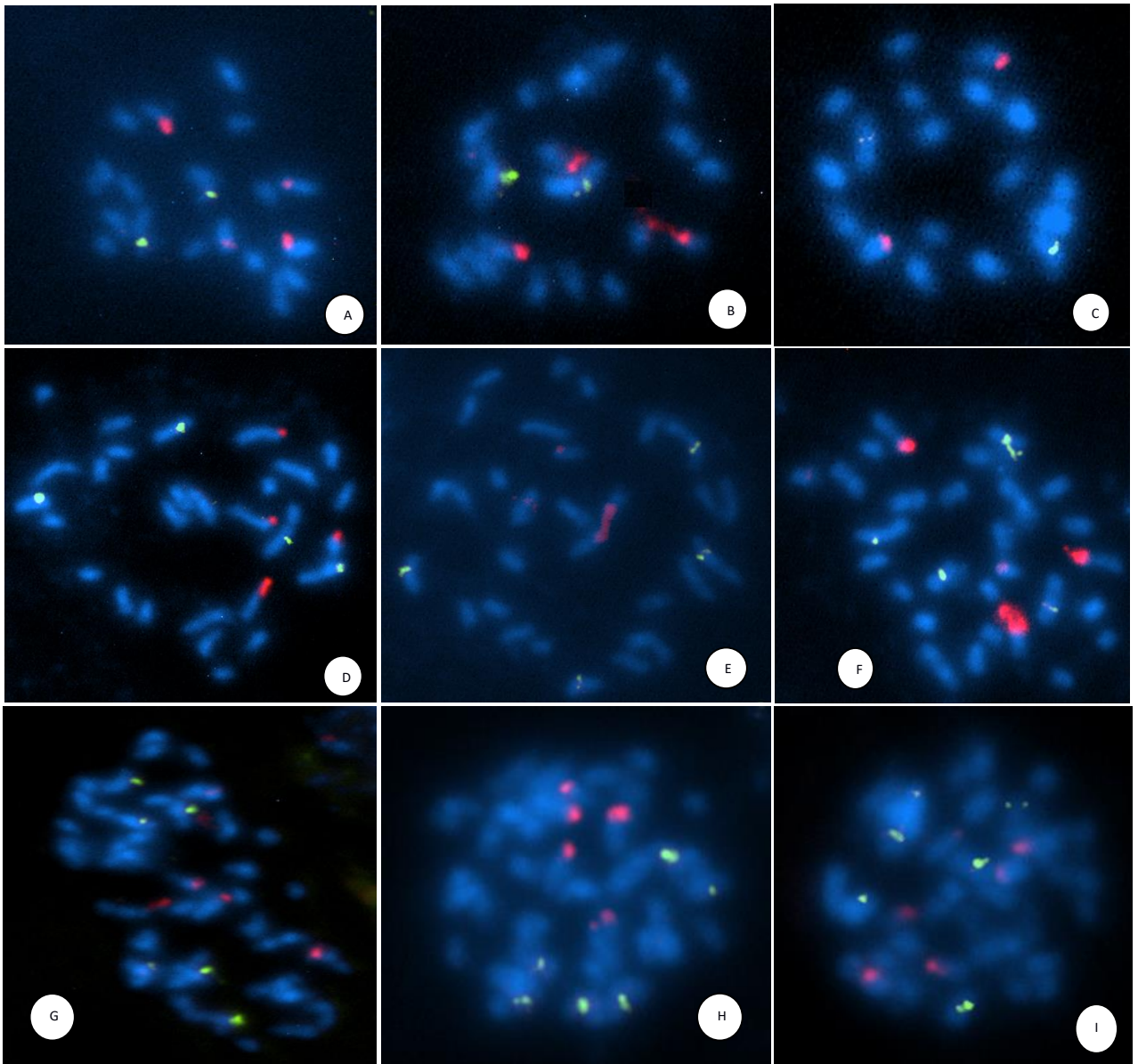


Imagen 19. Regiones ribosomales detectadas con FISH en los taxones de *B. rupestre*. Sondas 5S (verde) y 25S (rojo) para Brup 434 2n=18 (A), Bpin 512 2n=18 (B), Brup 8 2n=18 (C), Brup7 2n=28 (D), Brup 5 2n=28 (E), Brup 10 2n=28 (F), Brup 605 2n=38 (G), Brup 600 2n=38 (H) y Brup 182 2n=38 (I). Fuente: elaboración propia.

Regiones organizadoras nucleolares (NORs) de *B. pinnatum*.

Las regiones organizadoras nucleolares teñidas con el procedimiento de nitrato de plata no dan resultados muy claros para poder contar estas regiones como se puede observar en las imágenes 20 y 21.

Tabla 15. Regiones organizadoras nucleolares de *B. pinnatum*. Fuente: elaboración propia.

Código	Ploidía	Nº cromosómico (2n)	NORs
Bpin 502	2x	16	2
Bpin 34	4x	28	4

El número de regiones organizadoras nucleolares para el *B. pinnatum* diploides parece ser de dos. Mientras que para el tetraploide parece ser de cuatro.

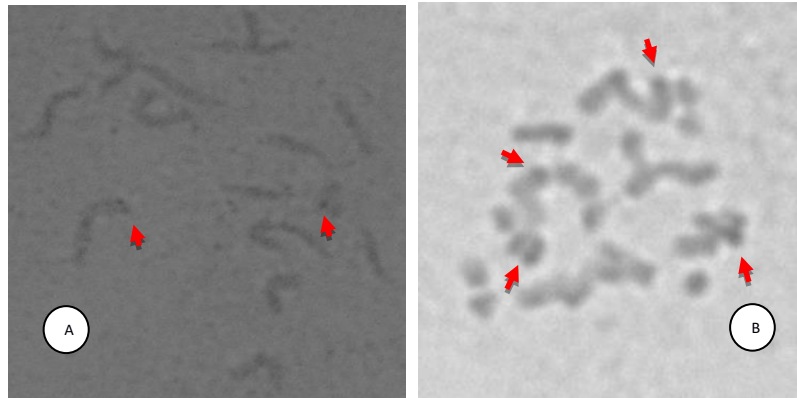


Imagen 20. Regiones organizadoras, señaladas con flechas rojas, para Bpin 502 (A) y Bpin 34 (B). Fuente: elaboración propia.

Regiones organizadoras nucleolares (NORs) de *B. rupestre*.

Tabla 16. Regiones organizadoras nucleolares de *B. rupestre*. Fuente: elaboración propia.

Código	Ploidía	Nº cromosómico (2n)	Regiones NORs
Brup 434	2x	18	2-3
Bpin 512	2x	18	2
Brup 8	2x	18	2-3
Brup7	4x	28	3-4
Brup 5	4x	28	4
Brup 605-1	¿6x?	38	4
Brup 182	¿6x?	38	4-5

El número de regiones organizadoras nucleolares para los *B. rupestre* diploides parece ser de dos o tres. Mientras que para el tetraploides parece ser de cuatro. Y para los “hexaploides” cuatro o cinco.

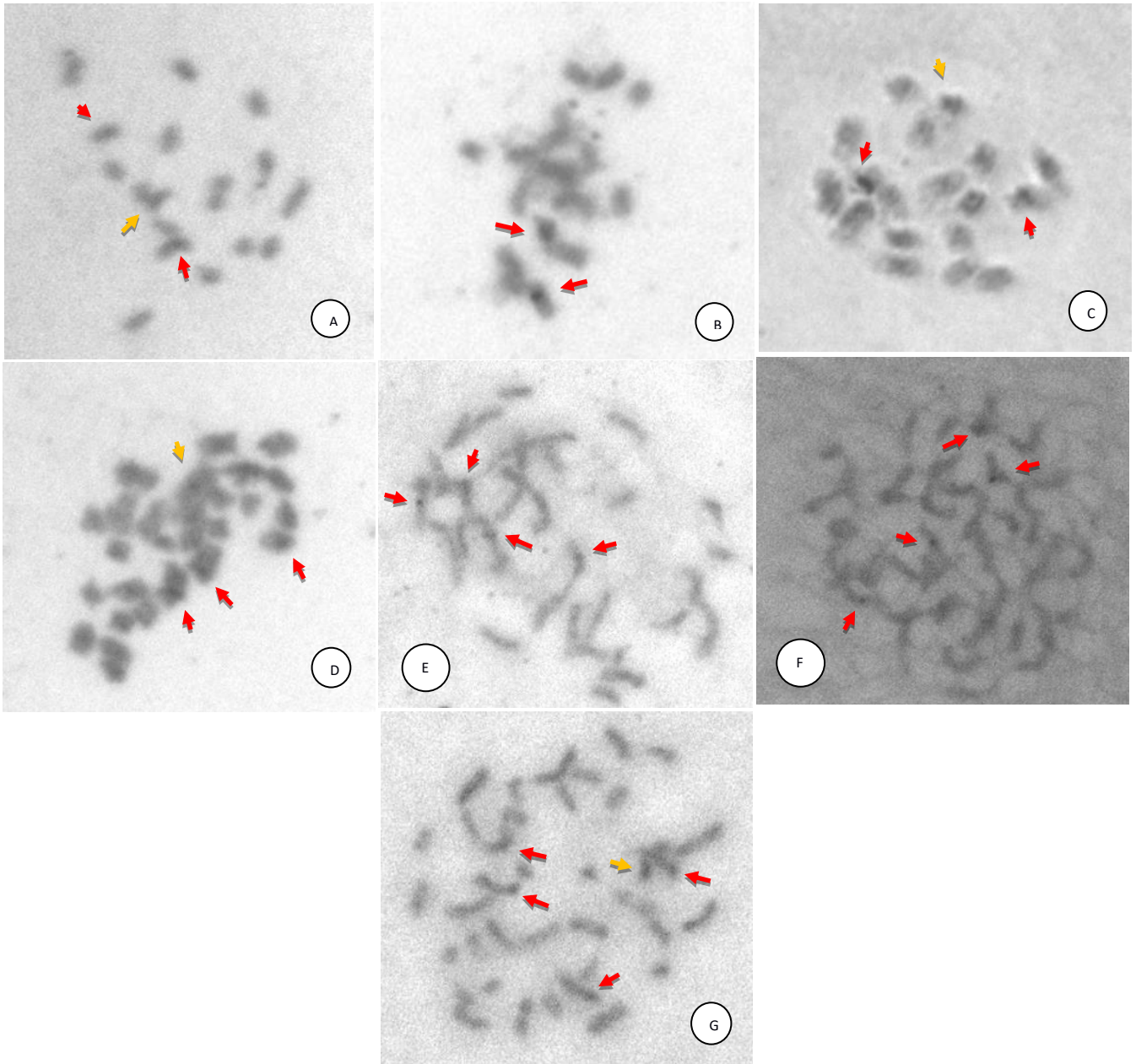


Imagen 21. Regiones organizadoras, señaladas con flechas rojas, las flechas amarillas indican duda sobre la presencia de región. para Brup 434 (A), Bpin 512 (B), Brup 8 (C), Brup 7 (D), Brup 5 (E), Brup 605 (F), Brup 182 (G). Fuente: elaboración propia.

DISCUSIÓN

Diferenciación de los taxones estudiados de las especies de: *Brachypodium pinnatum* y *Brachypodium rupestre*.

En este trabajo se han utilizado muestras (plantas y semillas) adquiridas de muy diferente procedencia dependiendo de su origen. En un principio se confió en la identificación realizada por los recolectores. Sin embargo al descubrir un *B. rupestre* con 38 cromosomas nos hizo replantearnos si la identificación habría sido correcta.

Por eso se realizaron cortes transversales de hojas. Esto nos servía para descartar *B. phoenicoides* del conjunto de nuestras muestras, por ser la especie más parecida a las especies estudiadas. No se trataba de *B. phoenicoides*, pues ninguna presenta esclerénquima continua propio de *B. phoenicoides*, ni unas costillas tan marcadas. Hay *B. rupestre* con 38 cromosomas en algunas muestras de Francia y en la de Croacia.

Estos taxones *B. pinnatum* y *B. rupestre* presentan ciertas dificultades en la identificación, puesta de manifiesta por autores como Cope & Grey (2009) o su designación con diferentes categorías como subespecies en Flora Europea (Smith, 1980) o especies en la monografía de Schippmann sobre el género (Schippmann, 1991).

Dado que no poseíamos pliegos con partes florales de todas las muestras se recurrió a la observación de caracteres micromorfológicos de las hojas para confirmar la identificación de los taxones estudiados. Separar las muestras en las dos especies de estudio de este trabajo, ha resultado difícil de realizar. El carácter perenne de las mismas y su lento crecimiento, hace que no se haya dispuesto de partes reproductivas en algunos casos, como se ha mencionado, estas estructuras reflejan datos más esclarecedores a la hora de identificar. Uno de los caracteres foliares de los estudiados en este trabajo, la distribución de pelos en el envés foliar, ha resultado ser el más relevante en esta labor. Esto no nos ha permitido identificar como *B. rupestre* un taxón, Bpin 512, considerado antes *B. pinnatum*. Destacar que este taxón no se encuentra disponible actualmente en la página de consulta U. S. National Plant Germplasm System. Además si atendemos a su localización geográfica es más factible nuestra identificación que la anterior; pues en el caso de Bpin 512 se encuentra en el centro de Italia, más propio de esta especie.

El resto de taxones estudiados no ha cambiado la identificación realizada por los recolectores. A pesar de estos análisis existen dos casos en los que se dudaba su identificación, Bpin 34 y Brup 10, ambos son de Inglaterra, único país en los que tenemos muestras de ambas especies. Los resultados de los moldes generan dudas en su identificación por lo que se decidió mantener su identificación previa. Hay que recalcar que las semillas de estos taxones fueron las últimas en recibirse por lo que, tras su germinación y crecimiento paso poco tiempo, no pudiendo desarrollarse inflorescencia. Se realizaron los moldes de hojas con estas plántulas, lo que ha podido influir en la cantidad de pelos espinosos que presentan.

El carácter de la distribución de pelos en el envés ha sido uno de los caracteres más esclarecedores. Se deberían realizar más pruebas, no solo con el fin de realizar una identificación más fehaciente, sino para ver las posibles variaciones dentro de cada especie según su ploidía. Se cree que se pueden tratar de especies crípticas que debido a su reciente aparición (ver figura 1), no presentando caracteres macromorfológicos diferentemente marcados.

Disploidía en *Brachypodium*: las especies *Brachypodium pinnatum* y *Brachypodium rupestre*.

La disploidía es el fenómeno por el que las especies dentro de un género presentan una dotación cromosómica básica diferente. Aun considerando solo estos dos especies *B. pinnatum* tiene taxones diploides con 16 y 18 cromosomas, con $x=8$ y 9 respectivamente; taxones tetraploides con 28 cromosomas, con $x=7+7$ ó $9+5$. Los mismos números básicos (x) podrían tener los taxones de *B. rupestre*, existiendo diploides con 18 cromosomas, tetraploides con 28 y "hexaploides" con 38 y $x=7+7+5$ ó $9+5+5$ ó $10+9$. En esta última posibilidad se consideraría como tetraploide.

El número cromosómico de los taxones estudiados, en ambas especies coinciden con lo descrito hasta ahora por otros autores (Schippmann, 1991). A excepción de los "hexaploides" de *B. rupestre*. Este número cromosómico no había sido descrito para esta especie.

Los grupos biológicos más antiguos y evolucionados, han llegado a formar auténticas especies, bien establecidas, mientras otros grupos más recientes forman poblaciones en las que la hibridación, el intercambio genético...producen una plasticidad morfológica tal que hace difícil encontrar discontinuidades reales en el conjunto (Castroviejo, 2004).

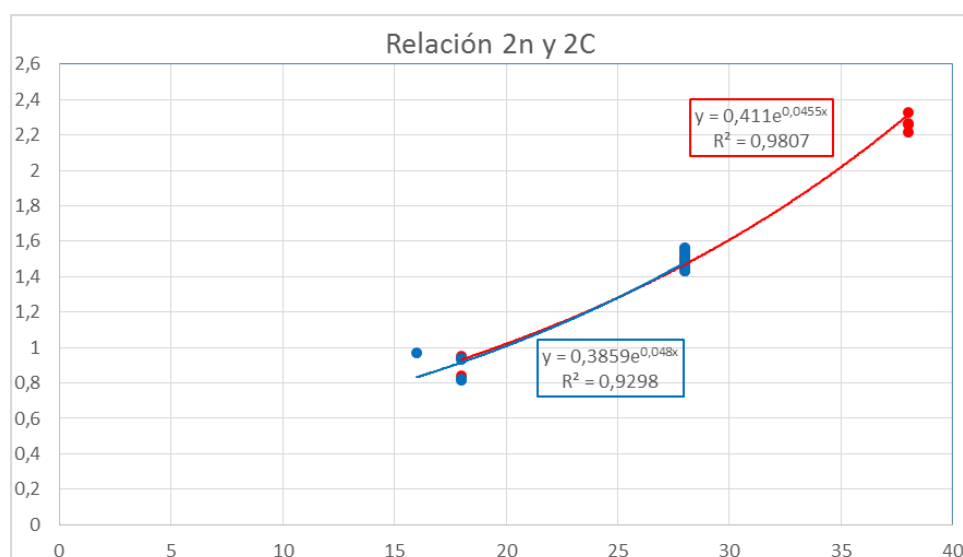
En el caso extremo se puede dar lugar a especies crípticas o especies gemelas, que son aquellas especies que son extremadamente similares en apariencia pero genéticamente se encuentran aisladas (fruto de ese proceso reciente de diferenciación).

Esta diferenciación genética puede ser mostrada por el diferente número cromosómico, impidiendo la reproducción entre taxones en los que no puede haber un emparejamiento homólogo de los cromosomas. A no ser que se produzca especiación por hibridación alopoliploide y duplicación cromosómica.

Se ha querido estudiar si existe relación entre esta ploidía o número cromosómico y la distribución de los taxones estudiados. No se ha encontrado ningún patrón definido en este sentido dentro del conjunto estudiado. Destacar como en España únicamente encontramos *B. rupestre* con 28 cromosomas, dentro de las poblaciones estudiadas.

Relación entre el número cromosómico y el tamaño genómico

La relación entre el número de cromosomas y el tamaño genómico se muestra en la gráfica 1. Se han representado las dos especies juntas, con el fin de comparar la línea de tendencia seguidas por ambas (azul para *B. pinnatum* y rojo para *B. rupestre*). Se ve como existe superposición de puntos en los taxones de ambas especies con mismo número de cromosomas. Se ha decidido representar con una línea de tendencia exponencial por presentar valores de R^2 más cercanos a 1. Ambas curvas prácticamente coinciden.



Gráfica 1. Relación entre número de cromosomas, 2n (eje x) tamaño genómico, 2C (eje y). El color azul pertenece a *B. pinnatum* y en color rojo a *B. rupestre*. Fuente elaboración propia.

También se ha creído oportuno comparar esta relación con los datos obtenidos por otros autores para las dos especies de estudio de este trabajo.

Tabla 17. Tamaños genómicos de *B. pinnatum*. En color morado taxones estudiados por otros autores y en color azul los propios. En color gris coincidencia de código de procedencia de semillas. 1 Wolny & Hasterok, 2009. Fuente elaboración propia.

Código	País	Nº Cromosómico (2n)	TG (pg)
PI 230114	Irán	18 ¹	0.882 ± 0.005 ¹
PI 345982	Noruega	18 ¹	0.881 ± 0.027 ¹
Bpin 505	Noruega	18	0,822 ± 0,009
Bpin 515	Kazajistán	18	0,815 ± 0,004
Bpin 525	Irán	18	0,939 ± 0,020
Brup 8	Rusia	18	0,931 ± 0,015
PI 4193	Alemania	28 ¹	1.462 ± 0.007 ¹
PI 249722	Grecia	28	1.547 ± 0.064
PI 251445	Turquía	28 ¹	1.574 ± 0.038 ¹
PI 430277	Irlanda	28 ¹	1.532 ± 0.037 ¹
Bpin 513	Grecia	28	1,453 ± 0,026
Bpin 514	Turquía	28	1,537 ± 0,012
Bpin 519	Alemania	28	1,471 ± 0,044
Bpin 520	Países Bajos	28	1,499 ± 0,014
Bpin 523	República Checa	28	1,435 ± 0,019
Bpin 34	Reino Unido	28	1,449 ± 0,018
Brup 7	Rusia	28	1,562 ± 0,016

Como se puede ver en la tabla 17 los valores son similares comparando los de Wolny & Hasterok (2009), con los nuestros. Solo se han mostrado los datos propios de los *B. pinnatum* cuyo número cromosómico coincide con los estudiados por estos autores. La diferencia entre los valores hallados y los ya publicados es de unos 0,1 pg. Además las desviaciones estándar son similares en ambos casos.

Tabla 18. Tamaños genómicos *B. rupestre*. En color morado por otros autores y en color azul los propios. En color gris coincidencia de código de procedencia de semillas. 1 Wolny & Hasterok, 2009. Fuente elaboración propia.

Código	País	Nº Cromosómico (2n)	TG (pg)
PI 4196	Grecia	18 ¹	0,843 0,011 ¹
PI 440172	Rusia	18 ¹	0,747 0,009 ¹
Brup 434	Ucrania/Rusia	18	0,951 ± 0,003
Bpin 512	Italia	18	0,84 ± 0,015

La tabla 18 también presenta valores similares en comparación con los datos estos autores para las especies diploides. No se han encontrado mediciones por otros autores de *B. pinntaum* tetraploides ni “hexaploides”.

Regiones ribosomales y posible origen de *B. pinntatum* y *B. rupestre*.

Mediante otra técnica citogenética, Genomic *In situ* Hybridization (GISH), Wolny & Hasterock (2009) revelaron que *B. pinntaum* (2n=28) podría ser un híbrido interespecífico de *B. distachyon* o un ancestro parecido (2n=10) y *B. pinntaum* (2n=18). Nuestro trabajo se ha limitado a las regiones ribosomales determinadas mediante FISH.

Tabla 19. Comparación del número de regiones ribosomales 5S y 25S de taxones de *B. pinnatum*. En color morado por otros autores y en azul los porpios. 1 Wolny & Hasterock 2009. Fuente: elaboración propia.

Identificación	Código	País	Nº Cromosómico (2n)	Nº regiones 5S	Nº regiones 25S
<i>Brachypodium pinnatum</i>	Bpin 502	Iraq	16	2	2
	PI 230114	Irán	18 ¹	2 ¹	2-3 ¹
	PI 345982	Noruega	18 ¹	2 ¹	2 ¹
	Bpin 505	Noruega	18	2	4
	PI 4193	Alemania	28 ¹	4 ¹	4 ¹
	PI 249722	Grecia	28	4	4
	PI 251445	Turquía	28 ¹	4 ¹	4 ¹
	PI 430277	Irlanda	28 ¹	4 ¹	4 ¹
	Bpin 514	Turquía	28	4	4
	Bpin 520	Países Bajos	28	4	4
	Bpin 34	Reino Unido	28	4	4

Como se puede ver en la tabla 19, para *B. pinnatum*, en el caso de los tetraploides coinciden el número de regiones ribosomales determinadas en este trabajo con los datos de otros autores (Wolny & Hasterock, 2009). En el caso de los diploides coinciden el número de regiones 5S en todos los casos y solo el taxón Bpin 505 presenta cuatro regiones 25S, frente a las dos o tres del resto de taxones diploides.

Para el caso de *B. rupestre*, tabla 20, las regiones 5S coinciden en todos los casos, siendo de dos para los diploides, cuatro para los tetraploides y seis para los “hexaploides”.

Tabla 20. Comparación del número de regiones ribosomales 5S y 25S de taxones de *B. rupestre*. En color morado por otros autores y en azul los propios. 1 Wolny & Hasterock 2009. Fuente: elaboración propia.

Identificación	Código	País	Nº Cromosómico (2n)	Nº regions 5S	Nº regiones 25S
<i>Brachypodium rupestre</i> subsp. <i>rupestre</i>	Brup 8 (PI 440173)	Rusia	18	2	2
	PI 440172	Rusia	18 ¹	2 ¹	2 ¹
<i>Brachypodium rupestre</i>	Brup 434	Ucrania/Rusia	18	2	4
	Bpin 512	Italia	18	2	4
	PI 4196	Grecia	18 ¹	2 ¹	4 ¹
	Brup 5	España	28	4	4
	Brup 10	Inglaterra	28	4	4
<i>Brachypodium rupestre</i> subsp. <i>rupestre</i>	Brup 7	Rusia	28	4	4
<i>Brachypodium rupestre</i>	Brup 605-1	Francia	38	6	5-6
	Brup 600-3	Francia	38	6	6
	Brup 182	Croacia	38	6	5-6

En ningún caso el número de regiones ribosomales puede ser utilizado como carácter discriminante entre ambas especies. Por otro lado, puede ser un carácter importante para concluir la ploidía de los taxones, conociendo el número de estas regiones en posibles parentescos.

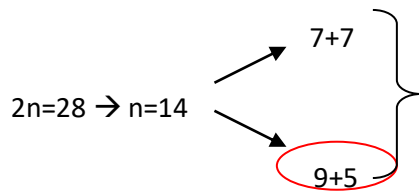
Teniendo en cuenta el conjunto de posibles números básicos descritos para *Brachypodium*: x=5, 7, 8 y 9 (Robertson, 1981), el número cromosómico de las muestras analizadas y el número de regiones 5S; se ha pretendido justificar la ploidía y números básicos de los casos estudiados en este trabajo.

Tabla 21. Números básicos supuestos en ambas especies. Fuente: elaboración propia.

Especie	Nº cromosómico	Ploidía	Nº básico
<i>Brachypodium pinnatum</i>	16	2x	8
	18	2x	9
	28	4x	9+5
<i>Brachypodium rupestre</i> o <i>Brachypodium rupestre</i> subsp. <i>rupestre</i>	18	2x	9
	28	4x	9+5
	38	¿6x?	¿9+5+5?

Se muestran únicamente los diferentes casos estudiados. Para los diploides, ya sean *B. pinnatum* o *B. rupestre*, no existe duda sobre su ploidía y número básico; siendo 8 en el caso tener 16 cromosomas y 9 en el caso de tener 18.

Para los tetraploides las únicas combinaciones posibles los números básicos descritos para los taxones estudiados serían:



Si suponemos que los tetraploides provienen de un diploide de las respectivas especies, el número básico 9 se tiene que mantener. El 5 podría provenir de *Brachypodium distachyon* o algo parecido con $2n=10$ (Catalán et al., 2012).

Además nos podemos apoyar en la distribución de *B. distachyon*, presente en sitios comunes a nuestras muestras de *B. pinnatum* y de *B. rupestre* (ver mapa 4).

Esta propuesta también fue sugerida por Betekhtin et al., (2014) para quien el posible origen de *B. pinnatum* y *B. rupestre* era un cruce entre un diploide tipo *B. distachyon* ($x=5$) y un diploide tipo “núcleo-perenne” ($x=9$).



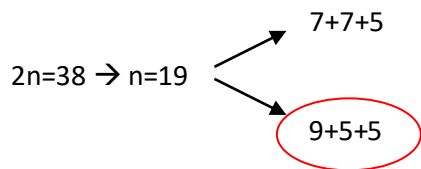
Mapa 4. Distribución de *B. distachyon*. Fuente: Schippmann (1991).

En el caso de los *B. rupestre* “hexaploides” con 38 cromosomas lo primero es explicar por qué se cree que tienen esa ploidía y no otra. Pues también podrían ser tetraploides $2n=4x=38$, esto daría $n=9+10$. Este 10 provendría de *Brachypodium stacei* Catalán, Joch Müll, Mur & Langdon, con $2n=20$. Se ha descartado esta posibilidad porque esta especie posee dos

regiones 5S (Catalán et al., 2012) y si se suman el número de regiones aportadas por un *B. rupestre* ($2n=18$ y dos regiones 5S) y las dos de *B. stacei*, hacen un total de cuatro regiones 5S, lo que no coinciden con las seis regiones 5S contabilizadas en estos *B. rupestres* con 38 cromosomas.

Hay que tener en cuenta que el número de regiones ribosomales se puede ver afectado por deleciones, lo que supondría una pérdida en el número de estas regiones; mientras el individuo mantenga un mínimo de cada una de las regiones podría tener células perfectamente funcionales.

Si suponemos entonces que tienen el siguiente grado de ploidía, es decir, hexaploides, las posibilidades en este caso son:



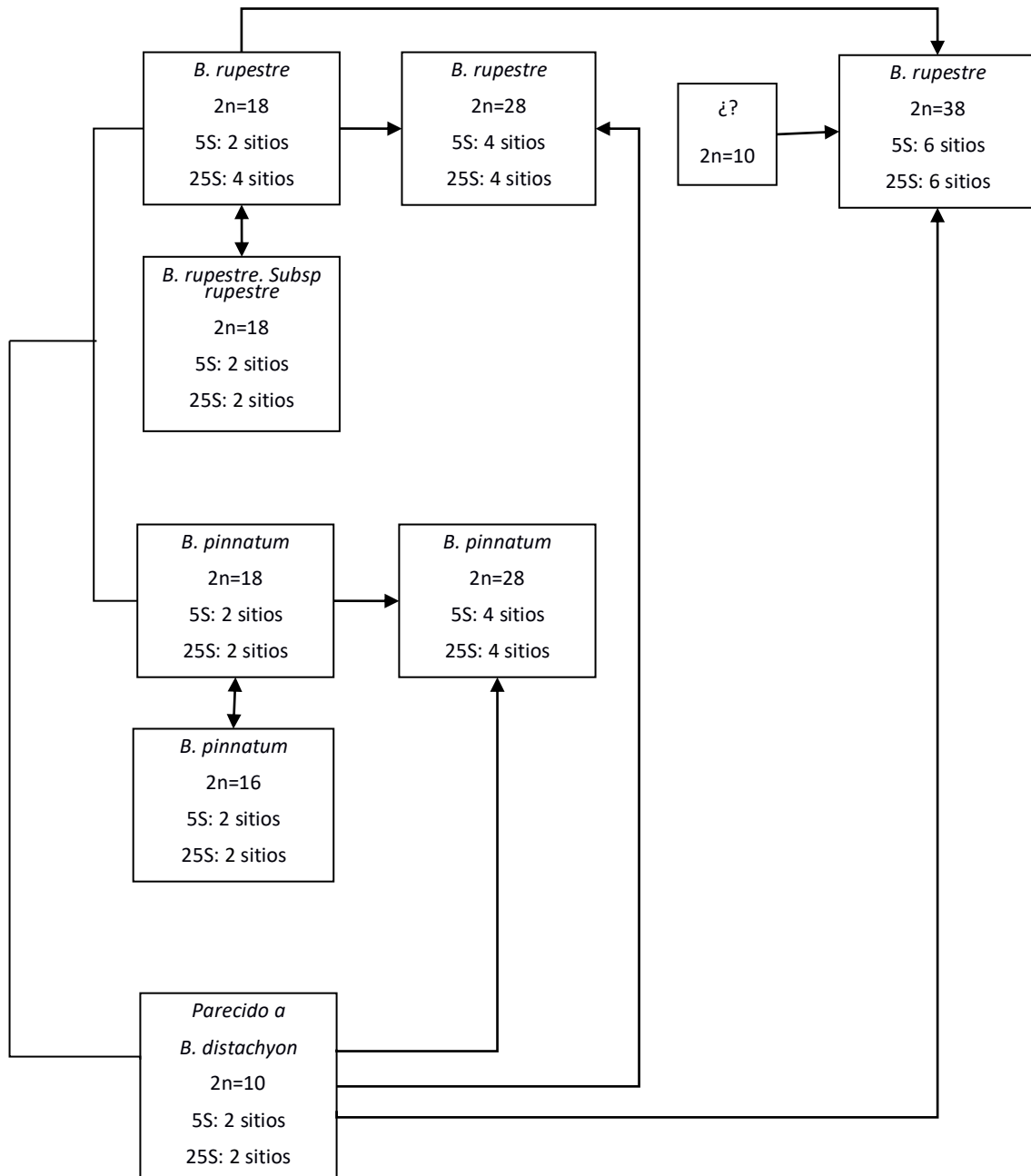
Si se quiere mantener 9 como un número básico en esta combinación, que serían aportados por otro *B. rupestre* diploide con $2n=18$, la opción a escoger sería la de abajo. La procedencia de uno de los 5 podría ser algo como *B. distachyon* pero queda la incógnita de los otros 5.

La existencia de disploidía dentro del género de *Brachypodium* se hace patente si observamos los datos obtenidos y los supuestos números básicos calculados. Es debido al aumento o disminución de cromosomas de especies diploides ancestrales por lo que ocurre esto. Como es el caso del *B. pinnatum* de 16 cromosomas, pudiendo haber aparecido por pérdida de cromosomas de otro diploide con 18 cromosomas.

Teniendo en cuenta los números básicos, el número de cromosomas y el número de regiones ribosomales 5S y 25S; se ha construido un diagrama hipotético de posibles parentescos de las dos especies de *Brachypodium* estudiadas en este trabajo.

Parte de esta hipótesis es apoyada por Sancho (2018), en donde se han estudiado un conjunto de 397 genes ortólogos de varios taxones y ecotipos de *Brachypodium* mapeados frente a genes de referencia de *B. distachyon*, *B. stacei* y *B. sylvaticum*. Esto ha presentado escenarios de hibridación complejos para los subgenomas homólogos presentes en algunas especies de *Brachypodium* aloploplides. La hibridación interespecífica seguida por la

duplicación del genoma parece ser el escenario predominante para la mayoría de estas combinaciones de genomas. Uno de estos alotetraploide del núcleo-perenne más recientemente evolucionado, *B. rupestre* ($2n=28$), presenta copias tipo *B. distachyon*, relacionándolo como un posible parental.



Comparación del número de regiones ribosomales con el número de regiones organizadoras nucleolares (NORs).

Como se ha mencionado los resultados obtenidos con la técnica de tinción de plata de los cromosomas para hallar las regiones organizadoras nucleolares no han dado buenos resultados, no detectándose en muchos casos claramente estas regiones.

No se ha encontrado información de otros autores sobre estas regiones para las dos especies de estudio de este trabajo.

Tabla 22. Relación número de regiones 5S+25S y NORs. Fuente: elaboración propia.

Especie	Ploidía	Nº cromosomas	5S + 25S (FISH)	NORs
<i>Brachypodium pinnatum</i>	2x	16	4	2
	4x	28	8	4
<i>Brachypodium rupestre</i>	2x	18	6	2-3
			4	
	4x	28	8	3-4
	¿6x?	38	11-12	4-5

Como ya se ha dicho, los resultados de las regiones nucleolares no son muy claros, pero a pesar de eso se ha querido comparar el número de las mismas con el total de regiones ribosomales detectadas con la técnica de FISH. En principio, un menor número de regiones 5S+25S se relacionan con menores números de regiones NORs, no obstante, en el caso de los “hexaploides”, a pesar de poseer más regiones ribosomales no presentan más regiones que los tetraploides. Esto es porque los individuos, a pesar de poseer un alto número de estas regiones, como en el caso de los “hexaploides”, pueden ser totalmente viables y tener células funcionales con el empleo de un número menor de estas regiones con respecto del total.

CONCLUSIONES

- Uno de los caracteres micromorfológicos que permiten diferenciar *B. pinnatum* de *B. rupestre* es la presencia de pelos espinosos en todo el envés en *B. pinnatum*.
- En el muestreo Euroasiático de *B. pinntaum* (desde el Reino Unido a Kazajistán, de Noruega a Irán) se han encontrado especies diploides con $2n=16$ de tamaño genómico (2C) 0,9 pg, diploides con $2n=18$ de tamaño genómico 0,86 pg y tetraploides con $2n=28$ de tamaño genómico 1,48 pg.
- *B. rupestre* presenta, en las muestras recolectadas principalmente en España, Francia, Italia y Rusia, diploides con $2n=18$ de tamaño genómico (2C) 0,9 pg, tetraploides con $2n=28$ de tamaño genómico 1,5 pg y un nuevo citotipo (no conocido hasta ahora) con $2n=38$ posiblemente “hexaploide” y de tamaño genómico 2,26 pg.
- Los citotipos de *B. pinnatum* estudiados presentan cuando $2n=2x=16$ dos regiones ribosomales 5S y dos regiones 25S; cuando $2n=2x=18$ dos regiones 5S y cuatro regiones 25S y cuando $2n=4x=28$ tienen cuatro regiones 5S y cuatro regiones 25S.
- Los citotipos de *B. rupestre* presentan cuando $2n=2x=18$ dos regiones 5S y dos o cuatro regiones 25S, cuando $2n=4x=28$ cuatro regiones 5S y cuatro regiones 25S y cuando $2n=6x=38$ seis regiones 5S y cinco o seis regiones 25S.
- El número de regiones ribosomales no puede ser empleado como carácter diferenciador entre ambas especies.
- *B. distachyon* (o algo similar), parece ser un ancestro común de *B. pinnatum* y *B. rupestre* tetraploides.

BIBLIOGRAFÍA

- Betekhtin A., Jenkins G., Hasterok R. 2014.** Reconstructing the Evolution of *Brachypodium* Genome Using Comparative Chromosome Painting. *PLoS ONE*, 9.
- Catalán P., López-Álvarez D., Díaz-Perez A., Sancho R., and López-Herranz M^a L. 2015.** Phylogeny and Evolution of the Genus *Brachypodium*. *Genetics and Genomics of Brachypodium. Plant Genetics and Genomics: Crops Models* (ed. by J.P. Vogel), pp 9-38.
- Catalán P., Müller J., Hasterock R., Jenkins G., Mur, L.A., Langdon, T., Betekhtin A., Siwinska D., Pimentel M. & López-Alvarez D. 2012.** Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Annals of Botany*, 109: 385-405.
- Catalán P. & Olmstead R. G. 2000.** Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P. Beauv. (Poaceae) from combined sequences of chloroplast *ndhF* gene and nuclear ITS. *Plant Systematics and Evolution*, 220: 1-19.
- Catalán P., Kellogg E. A., Olmstead R. G. 1997.** Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8: 1-18.
- Castroviejo S. 2004.** De familias, géneros y especies. Ed Real Academia de Ciencias Exactas, Física y Naturales.
- Chung M. C., Lee Y. I., Cheng Y. Y., Chou Y. J., Lu C. F. 2008.** Chromosomal polymorphism of ribosomal genes in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 745-753.
- Cope T. & Gray A. 2009.** Grasses of the British Isles. Ed Botanical Society of the British Isles.
- Dolezel J. & Bartos J. 2005.** Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95: 99-110.
- Dolezel J. Greilhuber J., Lysákt M. A. & Bennett M. D. 2005.** The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms “genome size” and “C-value” to Describe Nuclear DNA Contents. *Annals of Botany* 95: 255-260.
- Dolez J. Greilhuber J. & Suda J. 2007.** Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*, vol.2 nº9.
- D’ovidio R. & Lucchese F. 1986.** Chromosomal reces in the *Brachypodium rupestre* complex in Italy. *Annali di Botanica*, 44: 175-180.

- GPWG. The Grass Phylogeny Working Group. 2001.** Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88: 373-457.
- 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.
- IBI. International Brachypodium Initiative. 2010.** Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 463: 763-8.
- Idziak D. & Hasterok R. 2008.** Cytogenetic evidence of nucleolar dominance in allotetraploid species of *Brachypodium*. *Genome*, 51: 387-391.
- Jenkins G. & Hastero R. (2007).** BAC 'landing' on chromosomes of *Brachypodium distachyon* for comparative genome alignment. *Nature Protocols*, 2: 88-98.
- Juan L., Castillo N., Fernando Kawaguchi P., Jaime Madariaga B., Oscar Venegas R., Eduardo Lacannelier F., Sandro Ocampo R., Marcelo Castillo N. 1999.** Aspectos que afectan el análisis de contenido de ADN por citometría de flujo. *Revista Médica de Chile*. v127, n11 Santiago.
- Lacadena J. R. 1996.** Citogenética Ed Complutense, Madrid pp: 113-116.
- Linares C., Gonzalez J.M., Ferrer E., Fominaya A. 1996.** The use of double fluorescence in situ hybridization to physically map the positions of 5S-rDNA genes in relation to the chromosomal location of 18S-5.8S-26S rDNA and a C genome specific DNA sequence in the genus *Avena*. *Genome*, 39: 535-542.
- López-Alvarez D., López-Herranz M. L., Betekhtin A. & Catalán P. 2012.** A DNA Barcoding Method to Discriminate between the Model Plant *Brachypodium distachyon* and Its Close Relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *PLoS ONE*, 7.
- McClintock B. 1934.** The relation of a particular chromosomal element to the development of the nuclei in *Zea mays*. *Geitschrift fur Gellforschung und mikroskopische anatomie*, 21: 294-328.
- Mur L.A., Allainguillaume J., Catalán P., Hasterok R., Jenkins G., Lesniewska K., Thomas I., Vogel J. 2011.** Exploiting the *Brachypodium* Tool Box in cereal and grass research. *New Phytologist*, 191: 334-47.

- Robertson IH. 1981.** Chromosome numbers in *Brachypodium* Beauv. (Gramineae). *Genetica* 56: 55-60.
- Sachs J. 1887.** *Lectures on Physiology of plants*. Faredon Press, Oxford.
- 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.
- Schippmann U. 1986.** Über *Brachypodium rupestre* (Host) Roemer & Schultes in Bayern. Unterscheidung und Verbreitung. *Ber Bayer Bot Ges*, 57: 53-56, München.
- Schippmann U. 1991.** Revision der europäischen Arten der Gattung *Brachypodium* Palisot de Beauvois (Poaceae). *Boissiera*, 45: 1-250.
- Scholz H. 1968.** Die Artbestimmung im *Brachypodium pinnatum* Komplex. *Willdenowia* 5: 113-118, Berlín Dahlem.
- Smith P. M. 1980.** 45. *Brachypodium* P. Beauv en Tutín T. G. et al. (Eds) "*Flora Europea*" 5: 189-190.
- Taketa S., Ando H., Taketa 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.
- Valdes B. 1997.** Cap 5. Caracteres taxonómicos: citología y citogenética. En Izco et al. 1998. Botánica. Ed. Mcraw-Hill. Interamericana, pp: 133-139.
- Vogel J.P., Tuna M., Budak H., Huo N.X., Gu Y.Q., Steinwand M.A. 2009.** Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biology*, 9: 88.
- Wolny E. & Hasterok R. 2009.** Comparative cytogenetic analysis of the genomes of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. *Annals of Botany*, 104: 873-881.

Anexo I: Micromorfología y descripción de *B. phoenicoides*.

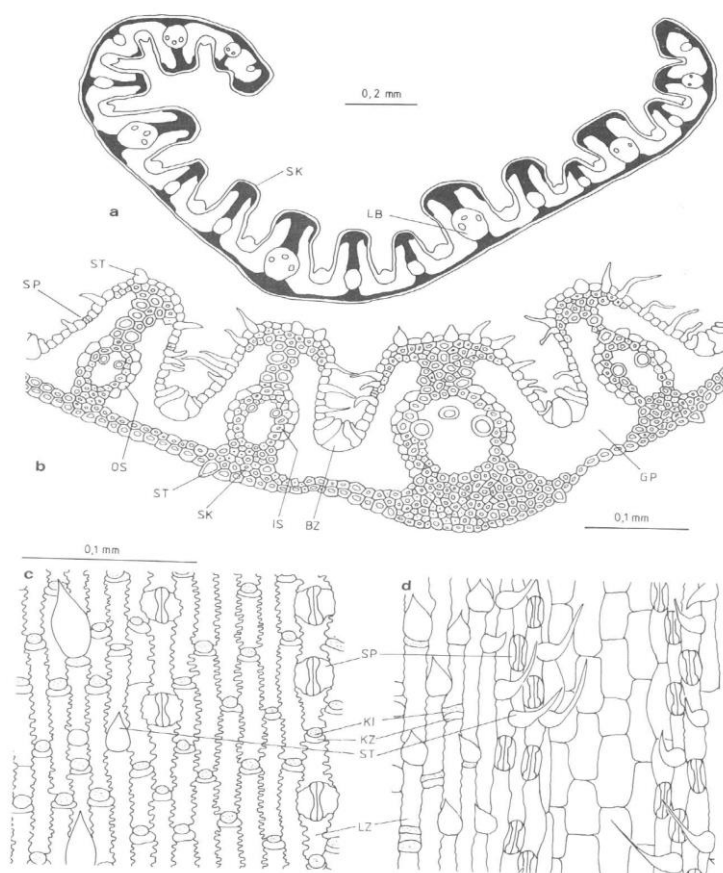


Figura 6. Micromorfología foliar de *B. phoenicoides*. a y b) corte transversal de la hoja; c) visión de la epidermis del envés foliar; d) visión de la epidermis del haz foliar. SK=esclerenquima, LB=haz vascular, BZ=célula buliforme, SP=estoma, IS=vaina esclerenquimática, OS=vaina parenquimática, ST=pelo espinoso, GP=parénquima. Fuente: Schippmann (1991).

B. phoenicoides (L.) Roemer & Schultes. Rizomas ramificados; tallos (40-)50-80(-100) cm, erectos. Hojas de 10-40 cm x 3-5 mm, planas, más o menos flácidas o convolutas y algo rígidas, de 1-1,5 mm de grosor, con algunos nervios más prominentes que otros. Lígula 1-1,5 mm. Racimo 15-20(-30) cm, estrecho, erecto, de 6-9 (-13) espiguillas esparcidas. Espiguillas (20-)30-60(-80) mm, lineales, a menudo falcadas. Gluma inferior de 4-6 mm y gluma superior de 5-7,5 mm, mucronada o muy poco aristado. Lema 8-10 mm, ovado-lanceolado, estrechándose en el ápice, mucronado o muy poco aristado. Cuando están presentes estas aristas 1-2,5 mm. Anteras 4-6 mm. (Smith, 1980).

Anexo II: Datos de cortes transversales.

Tabla 22. Datos de los cortes transversales de taxones de *B. pinnatum*. Fuente: elaboración propia.

Código	Ploidía	Altura costilla central (mm)	Altura valle central (mm)	Altura costilla contigua (mm)	Altura valle contiguo (mm)	Cociente costilla/valle central	Cociente costilla/valle contiguo
Bpin 502	2x	0,42	0,16	0,2	0,09	2,63	2,22
		0,4	0,2	0,22	0,1	2	2,2
		0,38	0,16	0,2	0,08	2,38	2,5
		0,3	0,09	0,16	0,08	3,33	2
		0,3	0,1	0,14	0,06	3	2,33
Bpin 515	2x	0,12	0,06	0,08	0,04	2,00	2,00
		0,14	0,08	0,08	0,04	1,75	2,00
		0,14	0,08	0,1	0,06	1,75	1,67
		0,12	0,08	0,1	0,04	1,50	2,50
		0,12	0,06	0,08	0,04	2,00	2,00
Bpin 525	2x	0,32	0,22	0,22	0,13	1,45	1,69
		0,34	0,24	0,18	0,12	1,42	1,5
		0,36	0,18	0,22	0,09	2	2,44
		0,38	0,16	0,22	0,08	2,38	2,75
		0,22	0,18	0,22	0,08	1,22	2,75
Bpin 505	2x	0,14	0,1	0,12	0,07	1,40	1,71
		0,12	0,07	0,1	0,08	1,71	1,25
		0,16	0,12	0,12	0,1	1,33	1,20
		0,16	0,08	0,1	0,08	2,00	1,25
		0,14	0,1	0,11	0,09	1,40	1,22
Bpin 513	4x	0,24	0,14	0,13	0,1	1,71	1,30
		0,2	0,12	0,1	0,06	1,67	1,67
		0,22	0,14	0,1	0,06	1,57	1,67
		0,2	0,12	0,12	0,08	1,67	1,50
		0,24	0,15	0,1	0,07	1,60	1,43
Bpin 514	4x	0,24	0,16	0,16	0,12	1,50	1,33
		0,23	0,15	0,14	0,1	1,53	1,40
		0,22	0,16	0,16	0,11	1,38	1,45
		0,26	0,17	0,16	0,12	1,53	1,33
		0,28	0,2	0,18	0,12	1,40	1,50
Bpin 520	4x	0,24	0,2	0,22	0,14	1,20	1,57
		0,26	0,2	0,23	0,13	1,30	1,77
		0,26	0,2	0,22	0,12	1,30	1,83
		0,24	0,18	0,22	0,16	1,33	1,38
		0,32	0,22	0,26	0,14	1,45	1,86
Bpin 34	4x	0,26	0,12	0,16	0,08	2,17	2,00
		0,28	0,18	0,2	0,16	1,56	1,25
		0,24	0,1	0,16	0,08	2,40	2,00
		0,28	0,14	0,18	0,12	2,00	1,50
		0,24	0,14	0,18	0,1	1,71	1,80
Bpin 519	4x	0,18	0,13	0,12	0,08	1,38	1,50
		0,18	0,11	0,12	0,08	1,64	1,50
		0,16	0,12	0,13	0,08	1,33	1,63
		0,18	0,12	0,14	0,1	1,50	1,40
		0,18	0,12	0,12	0,08	1,50	1,50

Tabla 23. Datos de los cortes transversales de taxones de *B. rupestre*. Fuente: elaboración propia.

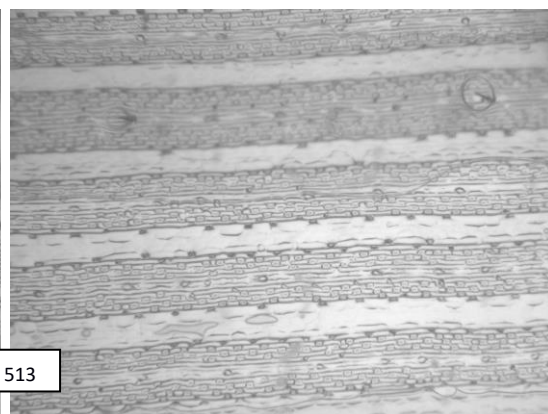
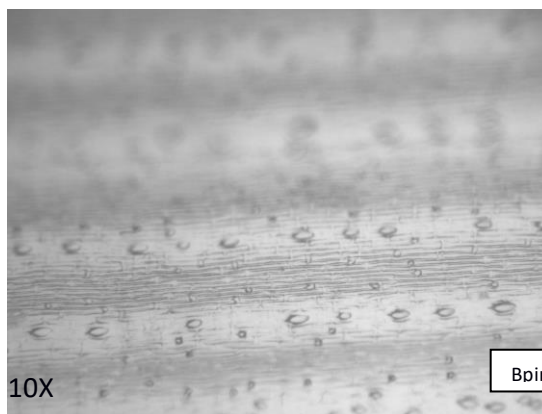
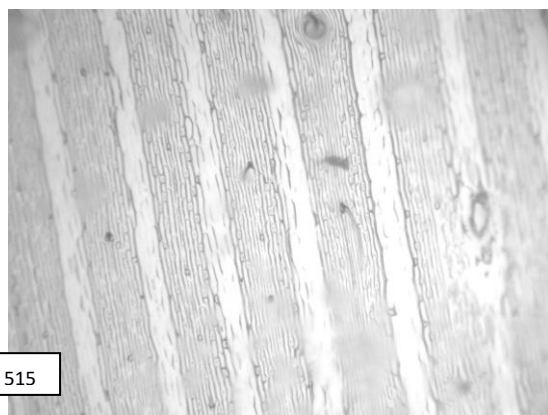
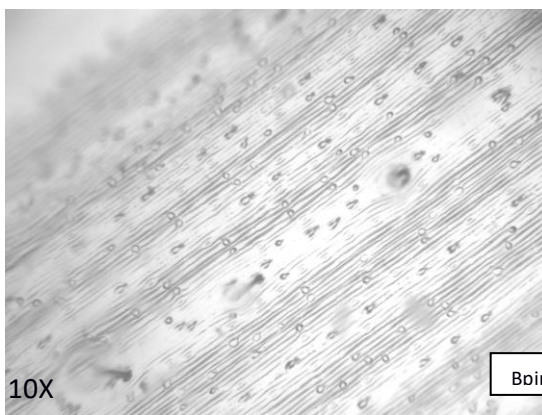
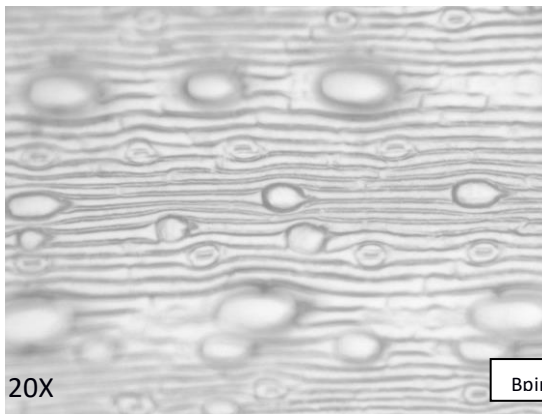
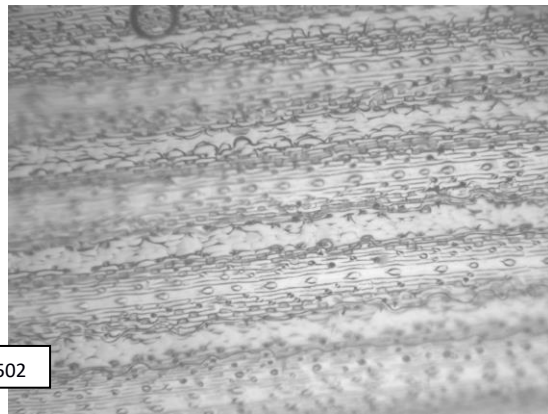
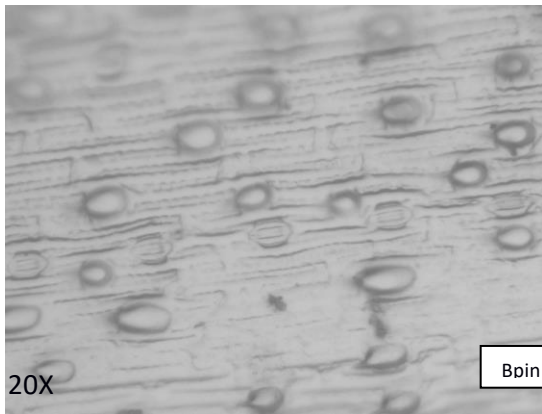
Código	Ploidía	Altura costilla central (mm)	Altura valle central (mm)	Altura costilla contigua (mm)	Altura valle contiguo (mm)	Cociente costilla/valle central	Cociente costilla/valle contiguo
Bpin 512	2x	0,22	0,12	0,14	0,07	1,83	2
		0,24	0,08	0,1	0,06	3	1,67
		0,25	0,12	0,15	0,08	2,08	1,88
		0,26	0,14	0,18	0,1	1,86	1,8
		0,26	0,13	0,16	0,1	2	1,6
Brup 434	2X	0,2	0,12	0,14	0,1	1,67	1,4
		0,2	0,12	0,13	0,08	1,67	1,63
		0,22	0,14	0,14	0,1	1,57	1,4
		0,24	0,16	0,14	0,1	1,5	1,4
		0,22	0,16	0,14	0,1	1,38	1,4
Brup 8	2x	0,22	0,1	0,12	0,07	2,20	1,71
		0,22	0,1	0,13	0,08	2,20	1,63
		0,22	0,1	0,12	0,07	2,20	1,71
		0,22	0,12	0,14	0,08	1,83	1,75
		0,24	0,12	0,13	0,08	2,00	1,63
Brup 439	4X	0,18	0,1	0,12	0,1	1,8	1,2
		0,2	0,12	0,18	0,12	1,67	1,5
		0,18	0,1	0,14	0,09	1,8	1,56
		0,24	0,15	0,2	0,14	1,6	1,43
		0,24	0,2	0,22	0,18	1,2	1,22
Brup 443	4X	0,22	0,14	0,13	0,09	1,57	1,44
		0,22	0,14	0,12	0,08	1,57	1,5
		0,22	0,14	0,14	0,1	1,57	1,4
		0,23	0,15	0,12	0,1	1,53	1,2
		0,22	0,15	0,14	0,11	1,47	1,27
Brup 445	4X	0,28	0,22	0,18	0,14	1,27	1,29
		0,28	0,2	0,18	0,12	1,4	1,5
		0,26	0,2	0,18	0,12	1,3	1,5
		0,28	0,22	0,2	0,14	1,27	1,43
		0,26	0,2	0,18	0,14	1,3	1,29
Brup 7	4x	0,32	0,22	0,24	0,18	1,45	1,33
		0,32	0,22	0,23	0,14	1,45	1,64
		0,32	0,2	0,22	0,14	1,60	1,57
		0,32	0,22	0,21	0,14	1,45	1,50
		0,31	0,21	0,22	0,14	1,48	1,57
Brup 5	4X	0,26	0,18	0,22	0,14	1,44	1,57
		0,26	0,16	0,2	0,12	1,63	1,67
		0,26	0,18	0,2	0,16	1,44	1,25
		0,28	0,2	0,26	0,2	1,4	1,3
		0,26	0,18	0,22	0,16	1,44	1,38
Brup 10	4X	0,18	0,11	0,12	0,08	1,64	1,5
		0,22	0,12	0,14	0,1	1,83	1,4
		0,22	0,13	0,14	0,1	1,69	1,4
		0,24	0,12	0,14	0,1	2	1,4
		0,22	0,12	0,14	0,1	1,83	1,4
Brup 182	¿6x?	0,24	0,12	0,18	0,14	2	1,29
		0,36	0,2	0,22	0,16	1,8	1,38
		0,28	0,24	0,24	0,22	1,17	1,09
		0,22	0,18	0,18	0,1	1,22	1,8
		0,24	0,2	0,2	0,14	1,2	1,43
Brup 600	¿6x?	0,24	0,16	0,2	0,12	1,5	1,67
		0,24	0,14	0,16	0,12	1,71	1,33
		0,26	0,14	0,16	0,12	1,86	1,33
		0,22	0,12	0,14	0,1	1,83	1,4
		0,24	0,14	0,14	0,12	1,71	1,17
Brup 605	¿6x?	0,22	0,14	0,18	0,13	1,57	1,38
		0,22	0,16	0,18	0,12	1,38	1,5
		0,22	0,16	0,16	0,14	1,38	1,14

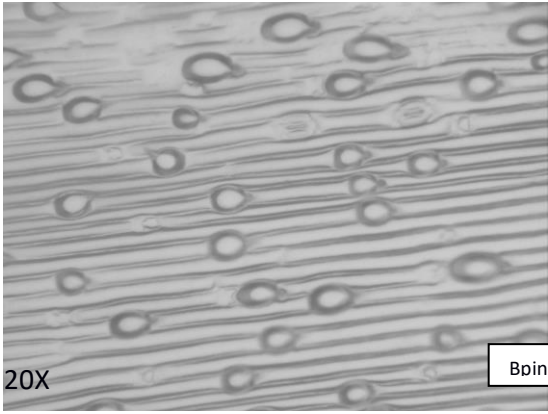
		0,2	0,16	0,18	0,12	1,25	1,5
		0,22	0,16	0,16	0,12	1,38	1,33
Brup 606	¿6x?	0,18	0,14	0,16	0,12	1,29	1,33
		0,16	0,1	0,16	0,12	1,6	1,33
		0,18	0,12	0,16	0,1	1,5	1,6
		0,18	0,12	0,16	0,11	1,5	1,45
		0,16	0,1	0,16	0,1	1,6	1,6

Tabla 24. Datos de los cortes transversales del taxón de *B. phoenicoides*. Fuente: elaboración propia.

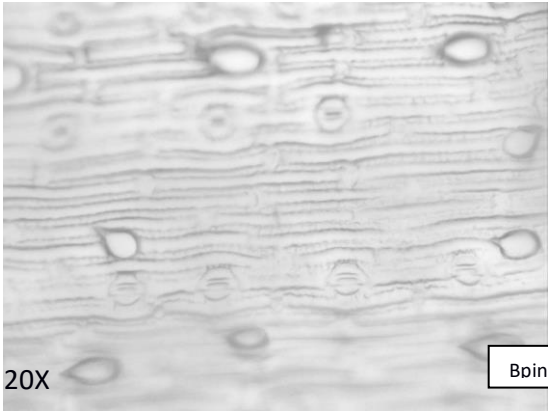
Código	Ploidía	Altura costilla Central (mm)	Altura valle Central (mm)	Altura costilla Contigua (mm)	Altura valle Contiguo (mm)	Cociente costilla/valle central	Cociente costilla/valle contiguo
Bpho 6	4x ¹	0,44	0,2	0,38	0,12	2,20	3,17
		0,5	0,3	0,44	0,2	1,67	2,20
		0,38	0,24	0,36	0,12	1,58	3,00
		0,4	0,34	0,38	0,12	1,18	3,17
		0,44	0,22	0,36	0,14	2,00	2,57

Anexo III: Imágenes de moldes foliares.

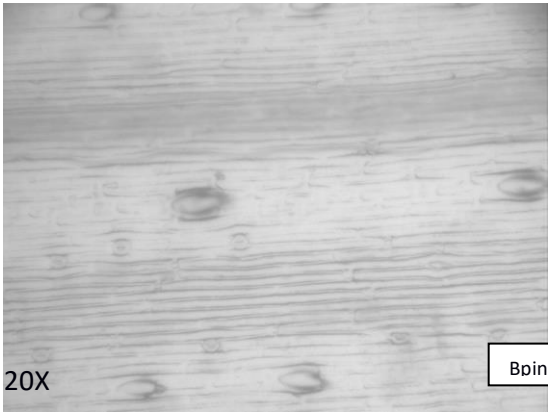
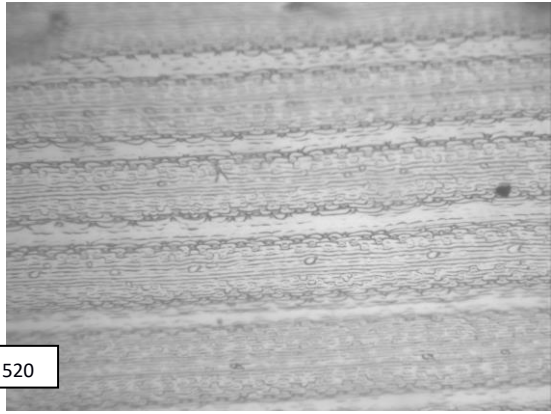




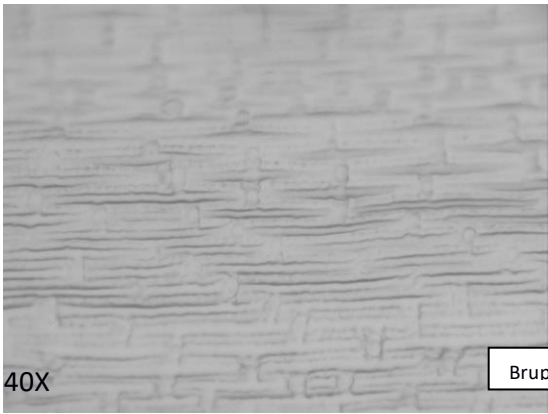
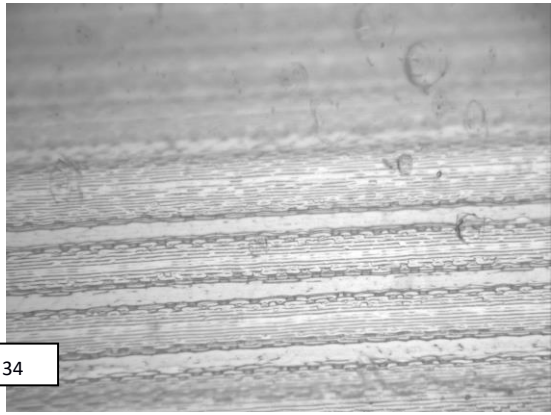
Bdin 519



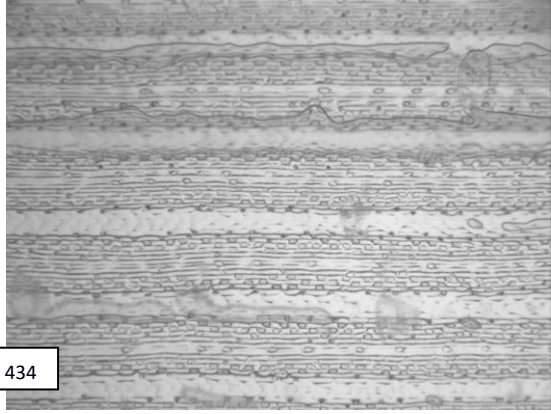
Bdin 520

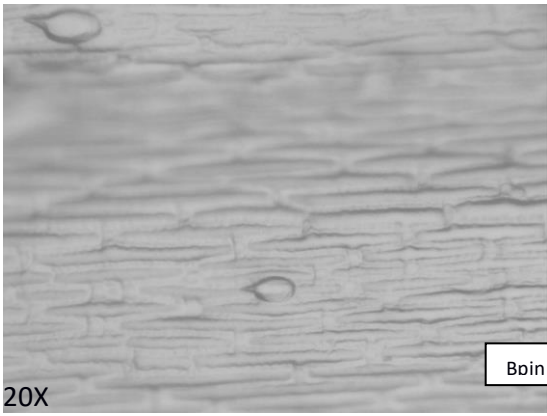


Bdin 34



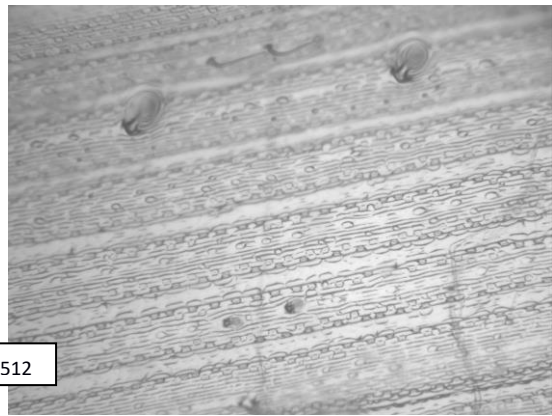
Brup 434





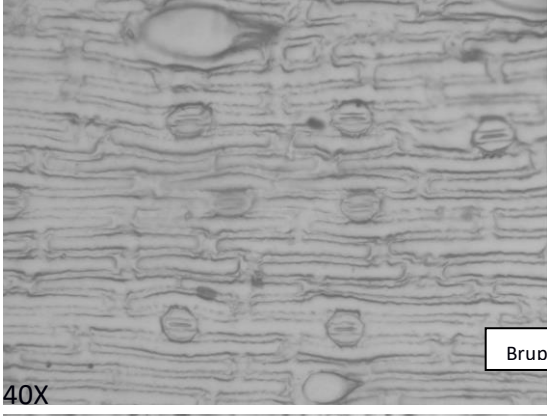
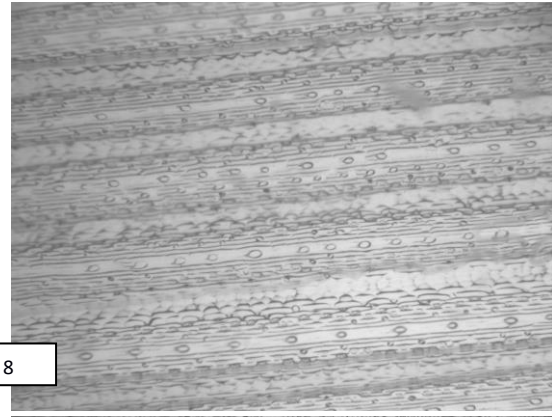
20X

Boin 512



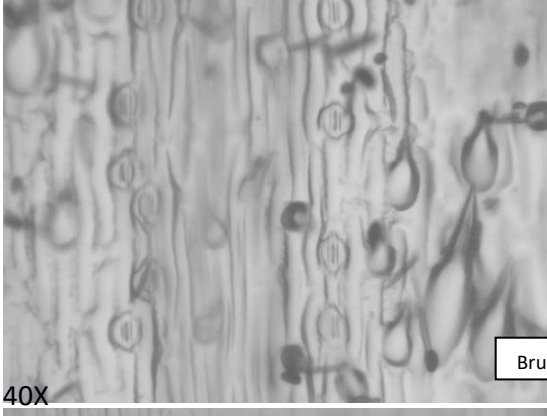
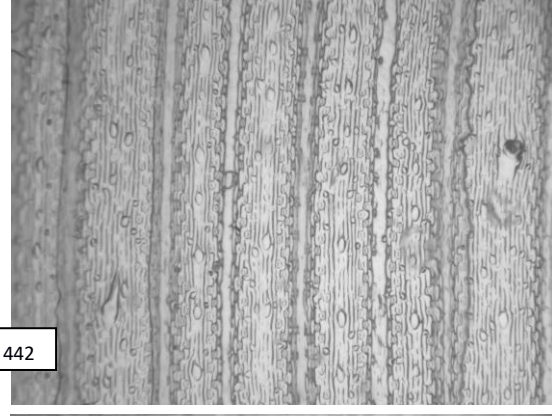
20X

Brup 8



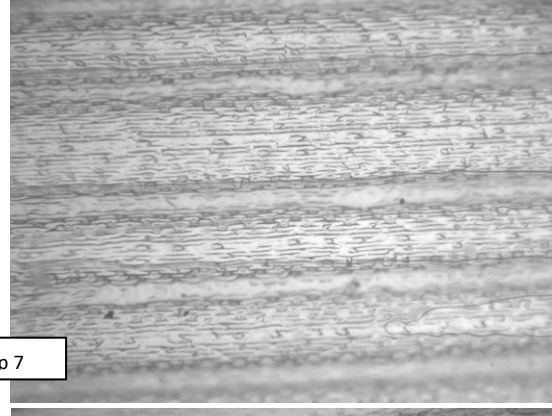
40X

Brup 442



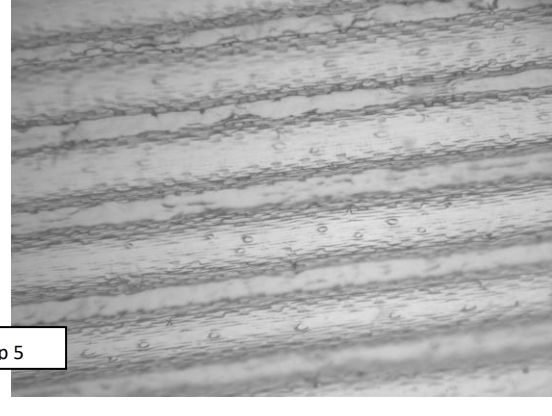
40X

Brup 7



20X

Brup 5



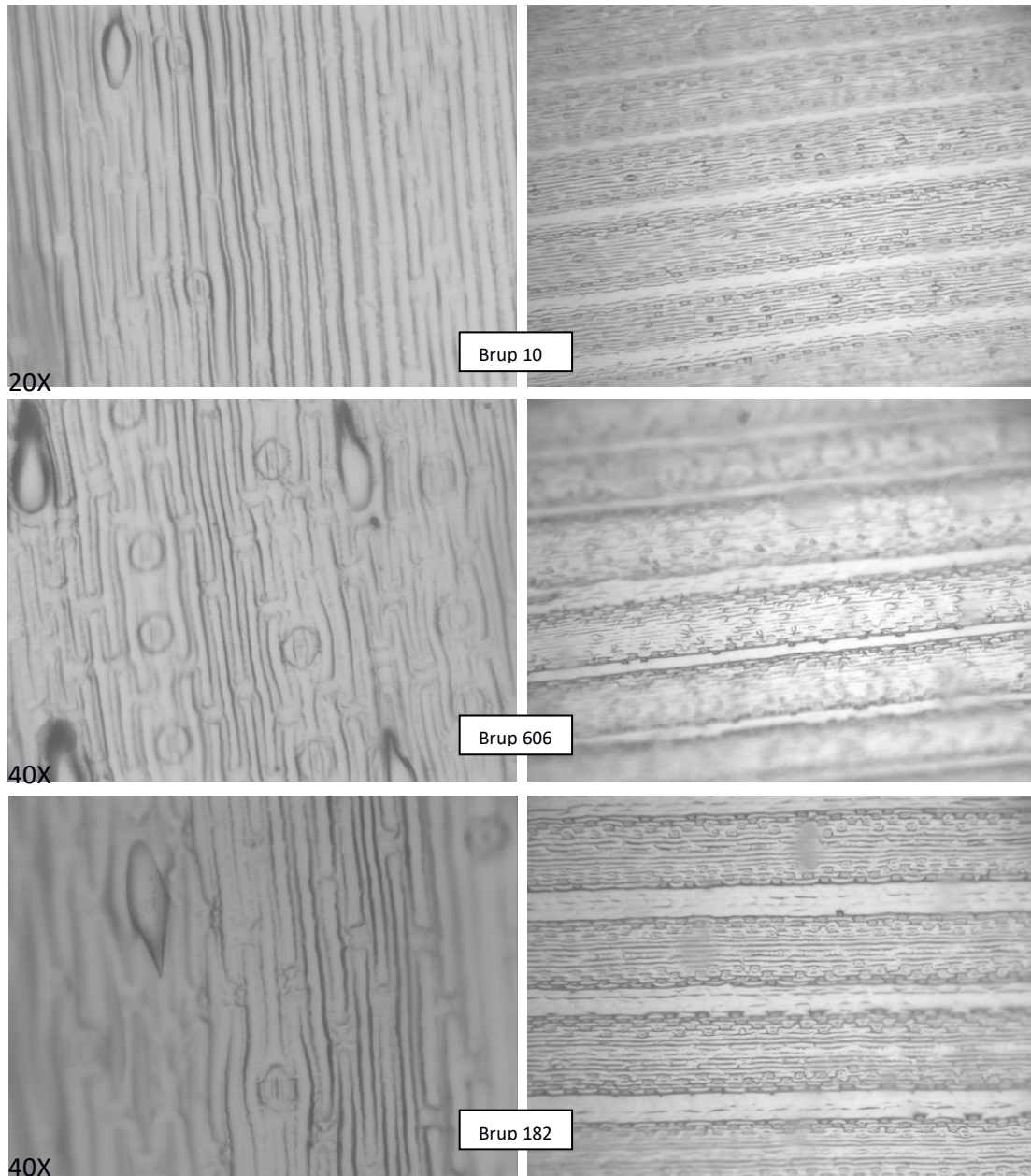


Imagen 22. Moldes foliares de *B. pinntaum* y *B. rupestre*. La parte izquierda corresponde al envés y la parte derecha al haz. Se indica el taxón y el aumento del objetivo empleado para tomar las imágenes en el caso del envés. Para el haz tiene el mismo aumento en todas de 10X. Fuente: elaboración propia.

Anexo IV: Datos citometría de flujo e histogramas.

Tabla 25. Datos citometría de flujo para *B. pinnatum*. Los datos en gris se descartan a la hora de realizar el promedio por presentar coeficientes de variación superiores a 3,12. SD=desviación estándar. Fuente: elaboración propia

Muestra/Patrón(ST)	Núcleos	Núcleos (ST)	Media	Media (ST)	CV	CV (ST)	pg/2C	pg/2C (ST)	Promedio	SD
Bpin515 (1)/L.sculentum	8197	1861	10044,36	23948,59	3,26	2,04	0,82	1,96		
Bpin515 (2)/L.sculentum	4785	1292	10069,95	23630,53	3,59	1,95	0,83	1,96		
Bpin515 (3)/L.sculentum	2577	6384	9159,41	21772,88	2,98	2,81	0,82	1,96		
Bpin515 (4)/L.sculentum	5435	5182	9548,88	22835,91	2,86	2,27	0,81	1,96		
Bpin515 (5)/L.sculentum	4554	2108	8411,71	20852,05	3,41	2,45	0,79	1,96	0,815	0,0046
Bpin515 (6)/L.sculentum	2081	4157	8921,29	21691,5	2,98	2,47	0,81	1,96		
Bpin515 (7)/L.sculentum	2095	5092	9662,05	23278,74	2,9	2,28	0,8135	1,96		
Bpin515 (8)/L.sculentum	3448	3009	10411,26	24967,74	3,12	1,95	0,8172	1,96		
Bpin502 (1)/L.sculentum	23125	10803	10781,28	20997,82	3,34	3,15	1	1,96		
Bpin502 (2)/L.sculentum	10267	8009	10614,68	21338,35	2,95	2,62	0,97	1,96		
Bpin502 (3)/L.sculentum	13143	9325	10431,59	21529,51	2,72	2,9	0,95	1,96	0,968	0,013
Bpin502 (4)/L.sculentum	5568	8024	10272,99	20965,93	2,23	2,26	0,96	1,96		
Bpin502 (5)/L.sculentum	6030	4305	10375,49	20620,82	2,92	2,32	0,98	1,96		
Bpin502 (6)/L.sculentum	8252	5465	11165,98	22328,77	2,49	2,69	0,98	1,96		
Bpin512 (1)/L.sculentum	10427	3679	9546,77	21948,24	2,78	2,22	0,85	1,96		
Bpin512 (2)/L.sculentum	7593	6068	9670,65	22268,64	2,78	2,32	0,85	1,96		
Bpin512 (3)/L.sculentum	3215	3144	9497,4	22518,87	2,51	1,96	0,82	1,96		
Bpin512 (4)/L.sculentum	4995	3019	9720,93	23105,07	2,57	1,9	0,82	1,96	0,840	0,015
Bpin512 (5)/L.sculentum	3557	6104	9951,76	22869,63	2,56	2,22	0,85	1,96		
Bpin512 (6)/L.sculentum	4059	7807	10491,38	24267,29	2,91	2,61	0,847	1,96		
Bpin513 (1)/Raphanus	4264	10336	18266,95	13713,92	1,99	2,33	1,46	1,1		
Bpin513 (2)/Raphanus	3662	2443	21725,41	15829,3	2,7	2,44	1,5	1,1		
Bpin513 (3)/Raphanus	3495	4843	18776,65	14350,57	2,41	2,97	1,43	1,1	1,453	0,026
Bpin513 (4)/Raphanus	4156	3901	19176,76	14504,6	2,71	2,52	1,45	1,1		
Bpin513 (5)/Raphanus	5352	2565	18270,54	14065,71	2,46	2,95	1,428	1,1		
Bpin513 (6)/Raphanus	7035	2155	19568,41	14831,82	2,66	2,77	1,451	1,1		
Bpin514 (1)/L.sculentum	3212	233	19677,34	24796,03	2,49	1,71	1,555	1,96		
Bpin514 (2)/L.sculentum	4518	2080	19649,11	24966,59	2,54	1,84	1,5425	1,96		
Bpin514 (3)/L.sculentum	6735	4796	16640,3	21463,33	2,78	2,19	1,5195	1,96	1,537	0,012
Bpin514 (4)/L.sculentum	4590	3175	16941,8	21658,43	2,17	2	1,5331	1,96		
Bpin514 (5)/L.sculentum	4313	3134	15856,96	20319,42	3,05	2,66	1,5295	1,96		
Bpin514 (6)/L.sculentum	3443	3207	15846,01	20171,28	2,65	2,39	1,5397	1,96		
Bpin505 (1)/L.sculentum	2956	3020	8418,76	20239,69	3,7	2,53	0,82	1,96		
Bpin505 (2)/L.sculentum	4319	4343	8208,49	19667,8	3,8	2,5	0,82	1,96		
Bpin505 (3)/L.sculentum	4141	2332	8401,4	20077,16	3	2,2	0,82	1,96	0,822	0,009
Bpin505 (4)/L.sculentum	5092	2869	8410,44	20240,58	3,08	3,44	0,81	1,96		
Bpin505 (5)/L.sculentum	4264	4537	8708,1	20595,73	3,16	2,6	0,83	1,96		
Bpin505 (6)/L.sculentum	4047	3205	8578,93	20093,53	3,6	2,48	0,84	1,96		

Bpin505 (7)/L.sculentum	5847	4502	8576,58	20303,87	3,1	2,54	0,83	1,96		
Bpin505 (8)/L.sculentum	3011	3507	8080,85	19493,57	3,2	2,7	0,81	1,96		
Bpin520 (1)/L.sculentum	3919	2236	14982,3	19684,84	2,8	2,28	1,49	1,96		
Bpin520 (2)/L.sculentum	3679	3552	16093,12	21104,24	3,32	2,9	1,49	1,96		
Bpin520 (3)/L.sculentum	5901	3748	14921,16	19649,85	3,08	2,3	1,49	1,96	1,499	0,014
Bpin520 (4)/L.sculentum	3841	6420	15365,66	20205,58	3,19	2,75	1,49	1,96		
Bpin520 (5)/L.sculentum	5484	5716	15819,82	20324,25	2,87	2,63	1,53	1,96		
Bpin520 (6)/L.sculentum	5071	5657	15516,81	20192,45	2,86	2,75	1,51	1,96		
Bpin525(1)/L.sculentum	6172	9840	10878,77	23400,59	2,54	2,13	0,911	1,96		
Bpin525(2)/L.sculentum	18510	14114	10796,53	23033,98	2,69	2,26	0,918	1,96		
Bpin525(3)/L.sculentum	3854	6048	11767,3	24489,36	2,42	1,39	0,941	1,96	0,9395	0,0206
Bpin525(4)/L.sculentum	19719	12534	12057,18	24607,3	2,31	1,4	0,9603	1,96		
Bpin525(5)/L.sculentum	6877	7862	9557,2	19727,54	2,92	2,81	0,9495	1,96		
Bpin525(6)/L.sculentum	8225	18973	8291,48	16972,92	2,36	2,4	0,957	1,96		
Bpin519(1)/L.sculentum	7531	6702	16192,94	22219,56	2,36	1,83	1,428	1,96		
Bpin519(2)/L.sculentum	10416	9354	16664,82	23142,74	2,49	2,19	1,411	1,96		
Bpin519(3)/L.sculentum	9131	11967	18985,77	24958,85	2,13	1,84	1,4909	1,96	1,4717	0,0441
Bpin519(4)/L.sculentum	11598	14081	19610,92	25151,13	1,76	1,86	1,528	1,96		
Bpin519(5)/L.sculentum	4351	8488	12876,94	16877,29	2,21	1,98	1,495	1,96		
Bpin519(6)/L.sculentum	17700	13409	12512,81	16603,79	2,43	2,51	1,477	1,96		
Bpin34(1)/L.sculentum	5500	3531	16779,46	22498,07	2,08	2,33	1,461	1,96		
Bpin34(2)/L.sculentum	5849	3801	17296,44	22909,37	1,86	2,17	1,479	1,96		
Bpin34(3)/L.sculentum	3478	7862	18472,13	25260,66	2,02	1,48	1,433	1,96	1,4498	0,0181
Bpin34(4)/L.sculentum	8452	14785	18897,8	25886,93	1,67	1,91	1,4308	1,96		
Bpin34(5)/L.sculentum	13914	14830	13340,57	18030,68	1,96	1,68	1,45	1,96		
Bpin34(6)/L.sculentum	7041	11042	13570,53	18394,71	1,58	2,36	1,445	1,96		
Bpin523(1)/L.sculentum	5835	4219	16583,25	22304,6	2,3	1,97	1,457	1,96		
Bpin523(2)/L.sculentum	4410	12391	17503,08	24225,2	1,94	1,96	1,4161	1,96		
Bpin523(3)/L.sculentum	6667	18539	17512,12	24212,72	1,95	1,96	1,4175	1,96	1,4353	0,0190
Bpin523(4)/L.sculentum	3596	7183	13319,79	17968,18	1,86	1,65	1,452	1,96		
Bpin523(5)/L.sculentum	5672	6262	12876,79	17590,34	2,44	2,24	1,434	1,96		

Tabla 26. Datos citometría de flujo para *B. rupestre*. Los datos en gris se descartan a la hora de realizar el promedio por presentar coeficientes de variación superiores a 3,17. El color azul corresponde a un taxón no estudiado en este trabajo pero usado como patrón. SD=desviación estándar. Fuente: elaboración propia

Muestra/Patrón(ST)	Núcleos	Núcleos (ST)	Media	Media (ST)	CV	CV (ST)	pg/2C	pg/2C (ST)	Promedio	SD
Brup442.2 (1)/L.sculentum	7844	5534	16207,52	20315,23	2,93	2,59	1,56	1,96		
Brup442.2 (2)/L.sculentum	3617	2828	17181,23	21389,76	2,98	2,57	1,57	1,96		
Brup442.2 (3)/L.sculentum	6067	5724	15286,52	18949,46	3,09	2,59	1,58	1,96		
Brup442.2 (4)/L.sculentum	9721	2595	16399,28	20121,65	3	2,18	1,60	1,96	1,560	0,030
Brup442.2 (5)/L.sculentum	4296	2056	16915,12	21517,63	2,6	2,14	1,54	1,96		
Brup442.2 (6)/L.sculentum	5779	5679	16983,78	22121,07	2,53	2,04	1,50	1,96		
Brup442.2 (7)/L.sculentum	4746	4788	17709,62	22327,65	2,88	2,5	1,55	1,96		
Brup7(1)/L.sculentum	4122	4848	17536,28	22092,67	2,52	2,21	1,55	1,96		
Brup7(2)/L.sculentum	5698	5571	18343,12	22980,41	3,04	2,56	1,56	1,96		
Brup7(3)/L.sculentum	3942	5095	176665,66	22314,44	2,73	2,84	1,55	1,96	1,562	0,016
Brup7(4)/L.sculentum	4028	6522	17651,52	22284,56	2,74	2,68	1,55	1,96		
Brup7(5)/L.sculentum	3535	6950	17501,52	21837,66	2,26	2,4	1,57	1,96		
Brup7(6)/L.sculentum	3680	7224	17874	22003,35	2,65	2,78	1,59	1,96		
Brup434(1)/L.sculentum	3834	3013	10801,35	22211,52	2,78	2,51	0,95	1,96		
Brup434(2)/L.sculentum	5223	5101	10437,18	21391,57	3,63	2,38	0,95	1,96		
Brup434(3)/L.sculentum	6152	7866	10683,48	21981,04	2,77	2,88	0,95	1,96		
Brup434(4)/L.sculentum	7379	2531	10669,37	21808,67	2,86	2,33	0,95	1,96	0,951	0,003
Brup434(5)/L.sculentum	4080	7190	9833,02	20270,8	2,46	2,98	0,95	1,96		
Brup434(6)/L.sculentum	6286	3073	10781,74	22094,65	2,88	2,06	0,95	1,96		
Brup434(7)/L.sculentum	6371	6759	10581,56	21537,18	3,33	2,85	0,96	1,96		
Brup8(1)/L.sculentum	7320	3974	10590,75	22492,79	2,87	2,25	0,92	1,96		
Brup8(2)/L.sculentum	6903	1948	10782,55	22804,65	2,95	2,25	0,92	1,96		
Brup8(3)/L.sculentum	5763	3602	10690,86	22302,59	2,81	2,43	0,93	1,96	0,913	0,015
Brup8(4)/L.sculentum	6196	2391	10667,24	23115	2,93	2,31	0,89	1,96		
Brup8(5)/L.sculentum	12303	9122	8934,95	19384,51	2,85	2,08	0,9	1,96		
Brup8(6)/L.sculentum	18608	8035	8831,4	18715,64	3,35	2,15	0,92	1,96		
Brup444(1)/L.sculentum	5729	4082	17327,47	23154,87	2,39	2,37	1,46	1,96		
Brup444(2)/L.sculentum	4914	3720	17453,83	23184,91	2,66	2,32	1,47	1,96		
Brup444(3)/L.sculentum	16052	11665	15702,57	20301,9	2,63	2,59	1,51	1,96	1,492	0,021
Brup444(4)/L.sculentum	8643	4302	16130,76	20962,62	2,9	2,53	1,5	1,96		
Brup444(5)/L.sculentum	6784	4122	148881,18	1932,35	2,56	1,9	1,5	1,96		
Brup444(6)/L.sculentum	10193	3967	15341,83	19789,51	2,35	2,21	1,51	1,96		
Brup443-1(1)/L.sculentum	5820	2999	14657,78	19234,95	2,3	2,08	1,49	1,96		
Brup443-1(2)/L.sculentum	7565	4550	14334,45	18610,6	2,49	2,23	1,5	1,96		
Brup443-1(3)/L.sculentum	7347	9741	15993,98	20697,27	2,51	2,55	1,51	1,96	1,498	0,012
Brup443-1(4)/L.sculentum	7705	4726	15990,18	20770,09	2,41	2,02	1,5	1,96		
Brup443-1(5)/L.sculentum	6720	1887	15383,75	20333,21	2,73	2,12	1,48	1,96		
Brup443-1(6)/L.sculentum	5843	6352	16145,19	20938,22	2,85	2,24	1,51	1,96		
Brup439-1(1)/L.sculentum	4815	3849	16186,6	20507,21	2,17	1,93	1,53	1,96	1,550	0,022
Brup439-1(1)/L.sculentum	8224	5124	16656,73	21023,26	2,41	2,01	1,55	1,96		

Brup439-1(3)/L.sculentum	13332	5797	17206,05	21479,21	2,51	2,23	1,57	1,96		
Brup439-1(4)/L.sculentum	18056	5220	17992,34	22533,27	2,47	1,99	1,56	1,96		
Brup439-1(5)/L.sculentum	15025	4633	18710,17	23493,57	2,48	2,08	1,56	1,96		
Brup439-1(6)/L.sculentum	6127	1351	18689,33	24222,67	2,21	2,21	1,51	1,96		
Brup439-1(7)/L.sculentum	15904	3441	19797,06	24705,72	2,46	2,17	1,57	1,96		
Brup441-5(1)/L.sculentum	5300	1553	15779,19	20704,8	2,9	2,14	1,49	1,96		
Brup441-5(2)/L.sculentum	4259	2411	16114,34	21069,04	2,52	2,22	1,49	1,96		
Brup441-5(3)/L.sculentum	9273	3486	17828,43	23335,6	2,36	2,01	1,49	1,96	1,483	0,008
Brup441-5(4)/L.sculentum	4115	3540	17837,74	23537,82	2,32	2,07	1,48	1,96		
Brup441-5(1)/L.sculentum	5807	2132	18604,69	24818,43	2,66	2,34	1,47	1,96		
Brup441-5(1)/L.sculentum	4692	2933	18645,83	24586,53	3,02	2,69	1,48	1,96		
Brup445(1)/L.sculentum	4604	5172	17360,38	23024,84	2,35	2,41	1,4778	1,96		
Brup445(2)/L.sculentum	6388	2370	17419,82	23184,46	2,21	2,37	1,4726	1,96		
Brup445(3)/L.sculentum	4105	3183	15944,79	20353,83	2,25	2,21	1,5354	1,96	1,519	0,039
Brup445(4)/L.sculentum	5622	3132	16759,43	20808,93	269	2,01	1,5785	1,96		
Brup445(5)/L.sculentum	3630	3435	16118,62	20678,64	2,57	2,17	1,5277	1,96		
Brup445(6)/L.sculentum	4480	4585	15139,28	19473,41	2,75	2,54	1,5237	1,96		
Brup605-1(1)/Brup435	5810	4500	57284,61	20673,19	2,16	2,67	2,27	0,82		
Brup605-1(2)/Brup435	6458	2535	55703,3	20212,43	2,13	2,67	2,25	0,82		
Brup605-1(3)/Brup435	6951	1420	41787,23	13888,16	2,82	4,21	2,46	0,82	2,265	0,013
Brup605-1(4)/Brup435	4989	1484	41500,56	15002,55	2,57	2,74	2,26	0,82		
Brup605-1(5)/Brup435	11350	2918	4357,49	15642,66	2,67	3,05	2,28	0,82		
Brup606-2(1)/Brup435	5950	2436	52151,11	18595,77	2,39	2,87	2,2996	0,82		
Brup606-2(2)/Brup436	15310	3079	53707,48	18559,37	2,47	2,49	2,3729	0,82		
Brup606-2(3)/Brup437	15749	2814	54050,06	19540,5	2,28	3,02	2,2681	0,82	2,330	0,043
Brup606-2(4)/Brup438	14841	942	46246,41	16181,55	2,81	2,89	2,3435	0,82		
Brup606-2(5)/Brup439	6022	1123	47669	16413,09	2,73	2,87	2,38	0,82		
Brup606-2(6)/Brup440	5392	3129	48055,58	16993,63	2,05	2,78	2,3188	0,82		
Brup600-3(1)/Brup435	4186	2200	48791,02	18026,38	2,94	3	2,2194	0,82		
Brup600-3(2)/Brup436	5847	2277	50247,2	18589,12	2,61	3,04	2,2164	0,82		
Brup600-3(3)/Brup437	7000	2204	44129,14	16335,82	2,48	3,17	2,2151	0,82	2,216	0,013
Brup600-3(4)/Brup438	8770	3585	46631,51	17439,88	2,67	2,96	2,1925	0,82		
Brup600-3(5)/Brup439	6631	2016	47491,01	17440,36	2,46	2,61	2,2329	0,82		
Brup600-3(6)/Brup440	12350	4467	50021,9	18461,3	2,19	2,75	2,2218	0,82		
Brup182(1)/Brup435	10899	1654	50699,49	18270,62	2,52	3,08	2,2754	0,82		
Brup182(2)/Brup436	11442	3571	51989,75	19014,58	2,52	3,08	2,242	0,82		
Brup182(3)/Brup437	6575	1015	52610,15	18839,32	2,52	2,55	2,2899	0,82	2,258	0,026
Brup182(4)/Brup438	10726	4360	52389,6	19341,1	2,48	2,19	2,2211	0,82		
Brup182(5)/Brup439	15867	6314	56382,04	20577,24	1,73	2	2,2468	0,82		
Brup182(6)/Brup440	6101	2132	55062,07	19868,46	1,84	2,44	2,2724	0,82		
Brup10 (1)/L.sculentum	3822	3485	17484,14	23791,1	1,97	1,9	1,4404	1,96		
Brup10 (2)/L.sculentum	4009	4295	17472,3	23747,85	2	1,86	1,4421	1,96	1,4324	0,0177
Brup10 (3)/L.sculentum	3575	5928	17474,63	23772,54	1,95	1,88	1,4407	1,96		

Brup10 (4)/L.sculentum	4272	2622	17474,17	23620,15	2	1,63	1,45	1,96		
Brup10 (5)/L.sculentum	3926	6763	17461,76	24161,78	1,98	1,81	1,4165	1,96		
Brup10 (6)/L.sculentum	5160	6237	17674,73	24664,55	2,16	2,06	1,4045	1,96		
Bpin512 (1)/L.sculentum	10427	3679	9546,77	21948,24	2,78	2,22	0,85	1,96		
Bpin512 (2)/L.sculentum	7593	6068	9670,65	22268,64	2,78	2,32	0,85	1,96		
Bpin512 (3)/L.sculentum	3215	3144	9497,4	22518,87	2,51	1,96	0,82	1,96	0,840	0,015
Bpin512 (4)/L.sculentum	4995	3019	9720,93	23105,07	2,57	1,9	0,82	1,96		
Bpin512 (5)/L.sculentum	3557	6104	9951,76	22869,63	2,56	2,22	0,85	1,96		

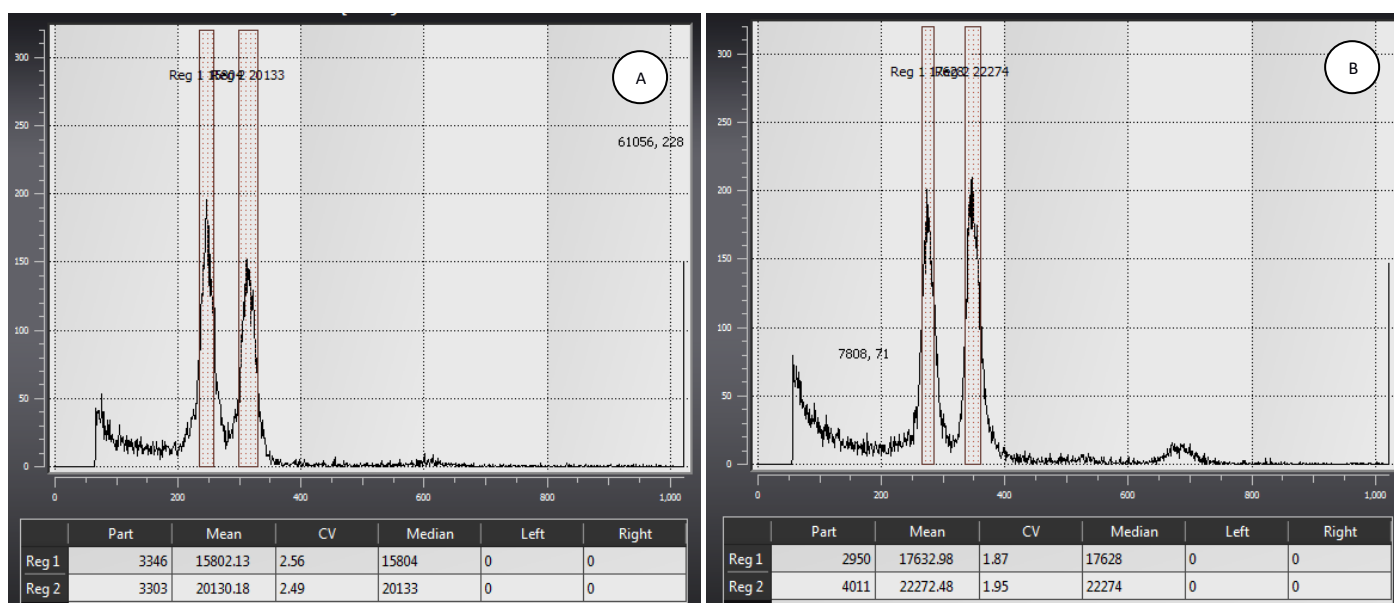


Imagen 23. Histogramas de Bpin 514 (A) y Brup7 (B). Fuente: elaboración propia.

Anexo V: Imágenes conteo cromosómico de *B. pinnatum*.

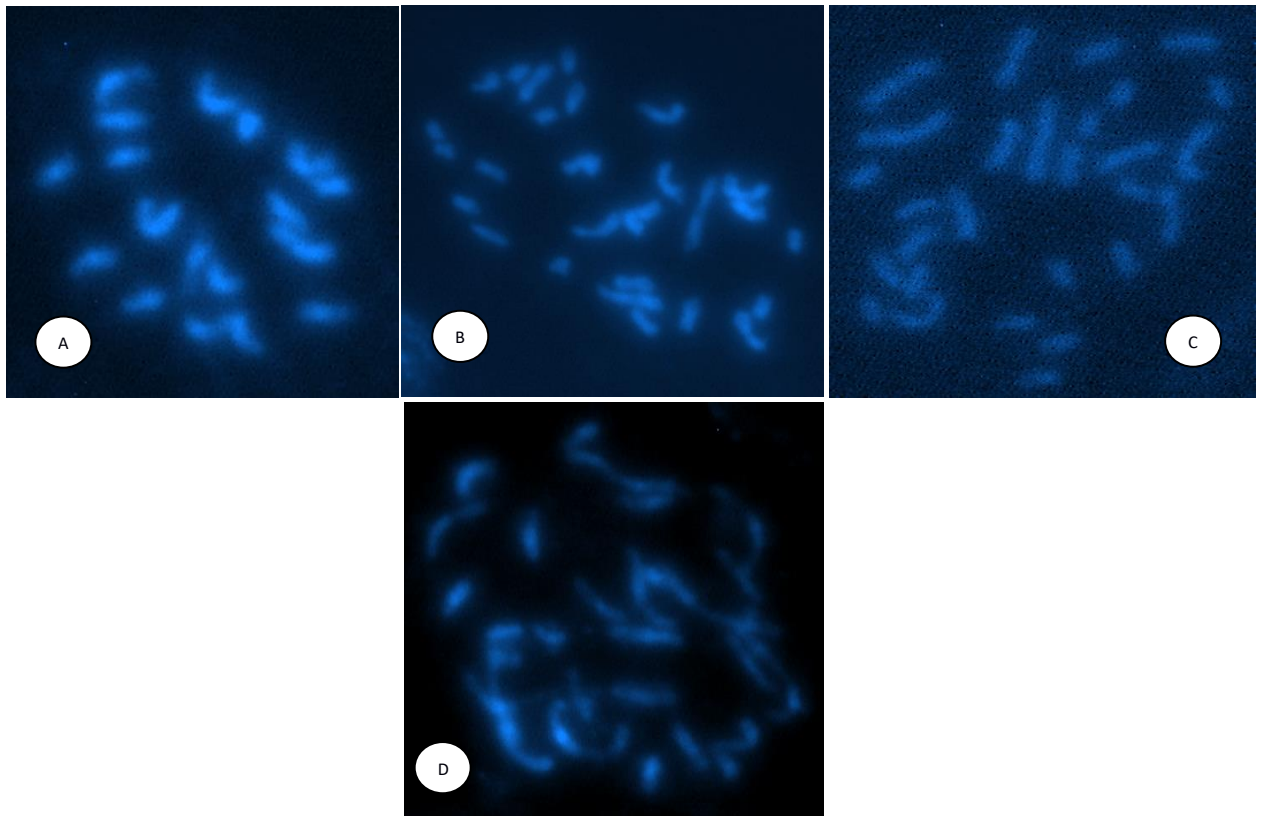


Imagen 24. Conteo *B. pinnatum*. Bpin 525 $2n=18$ (A), Bpin 523 $2n=28$ (B), Bpin 519 $2n=28$ (C), Bpin 34 $2n=28$ (D).

Fuente: elaboración propia.

Anexo VI: Imágenes conteo cromosómico de *B. rupestris*.

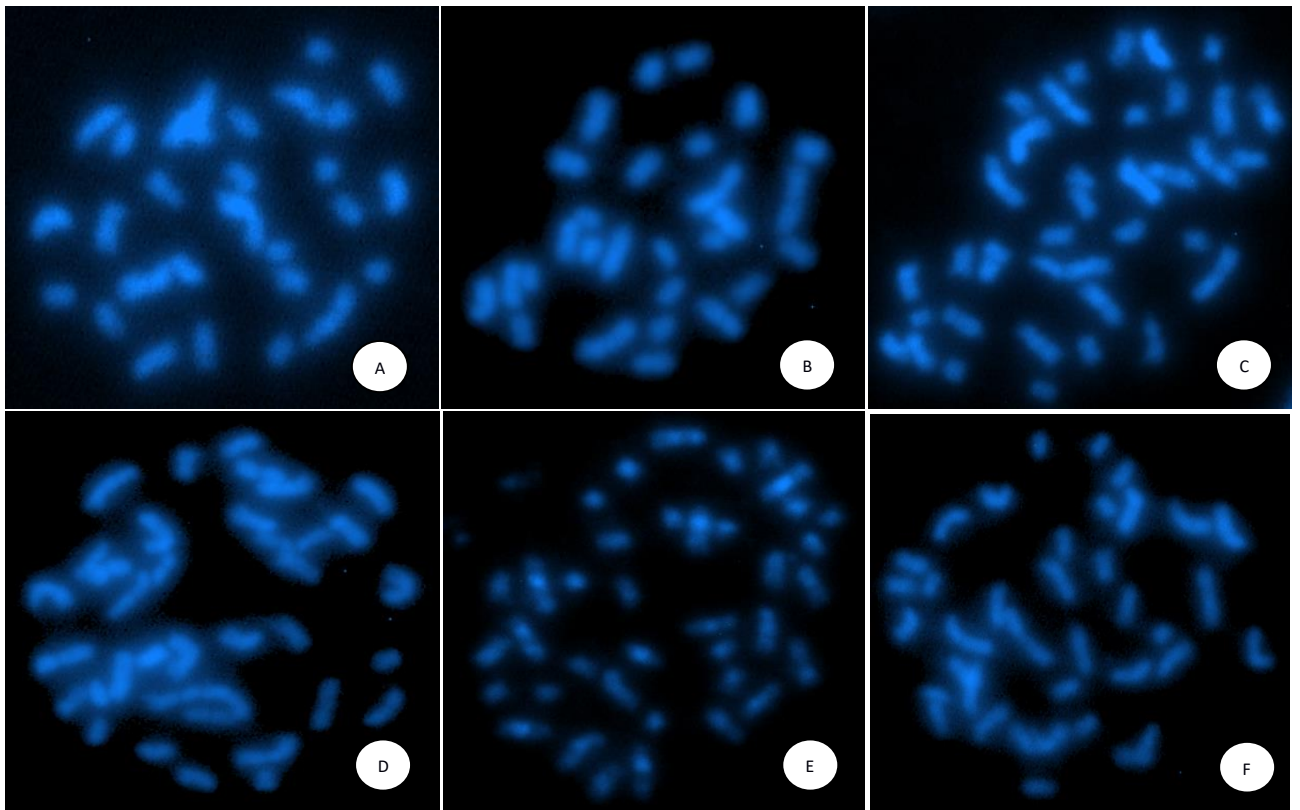


Imagen 24. Conteo *B. rupestris*. Brup 439 $2n=28$ (A), Brup 444 $2n=28$ (B), Brup 182 $2n=38$ (C), Brup 600 $2n=38$ (D), Brup 605 $2n=38$ (E), Brup 606 $2n=38$ (F). Fuente: elaboración propia.