

2014

APLICACIÓN DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS
Y MOLECULARES EN LA DETERMINACIÓN
DEL ORIGEN DE *ANTHOXANTHUM*
ODORATUM L. EN SUDAMÉRICA

MARIA CLAUDIA DOS SANTOS LUCIANO

TRABAJO DE FIN DE GRADO: BIOLOGÍA

A Coruña, 2014





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Aplicación de técnicas citogenéticas y moleculares en la determinación del origen de *Anthoxanthum odoratum* L. en Sudamérica

Aplicación de técnicas citoxenéticas e moleculares na determinación da orixe de *Anthoxanthum odoratum* L. en Sudamérica

Using cytogenetic and molecular methods in the determination of the origin of some South American *Anthoxanthum odoratum* L. populations

Trabajo de Fin de Grado

María Claudia dos Santos Luciano

2013-14

Manuel Pimentel Pereira

Elvira Sahuquillo Balbuena

TRABALLO FIN DE GRAO

Os doutores Elvira Sahuquillo Balbuena e Manuel Pimentel Pereira autorizan a presentación e defensa do Traballo de Fin de Grao **titulado: “APLICACIÓN DE TÉCNICAS CITOGÉNÉTICAS Y MOLECULARES EN LA DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DE LAS POBLACIONES DE *ANTHOXANTHUM ODORATUM* L. EN SUDAMÉRICA”** elaborado por MARIA CLAUDIA DOS SANTOS LUCIANO.

A Coruña, 29 de xullo de 2014

Manuel Pimentel Pereira

Elvira Sahuquillo Balbuena

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, me gustaría agradecer al “*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) da República Federativa do Brasil*” por me permitir vivir esa increíble experiencia de aprendizaje, en todo el amplio aspecto que esa palabra nos permite llegar, así como al grupo Universidad.es que fueron fundamentales en todo el proceso de llegada a la Universidade da Coruña. Luego, me gustaría agradecer a todo el profesorado y funcionarios de la presente Facultad que me permitieron sumar una cantidad de conocimiento y madurez incontables. En especial y con mucho cariño me gustaría agradecer inmensamente a los profesores Elvira Sahuquillo y Manuel Pimentel que hicieron mucho más que me acoger en su laboratorio y me dejar participar del trabajo; con mucha paciencia, disponibilidad y dedicación me dieran la oportunidad de conocer el increíble mundo de las gramíneas y poder estar aquí ahora. Muchas gracias a los doctorandos Irene Lema y David Seoane que siempre estuvieron disponibles, me enseñaron y sacaron incontables dudas, además de compartir agradables charlas. Gracias también a los compañeros de laboratorio Eloy Álvarez y André Flores que compartieran diversos buenos momentos mientras se desarrollaban las experimentaciones. Gracias también a la técnica Raquel Lorenzo que siempre está muy disponible para ayudarnos. A los compañeros de clase me gustaría agradecer a todo el tiempo, compañía y la gran ayuda con las dudas que surgieron a lo largo del año. Gracias a todos por la paciencia, confianza y apoyo, que directa y indirectamente me ayudaron a superar la "barrera" transponible que es el idioma.

"No es el más fuerte el que sobrevive, tampoco es el más inteligente.

El que sobrevive es aquel que es más adaptable al cambio."

Charles Darwin

ÍNDICE:

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 2. OBJETIVOS | 7 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 8 |
| <i>Estudio cariológico</i> | |
| 3.1. Obtención de ápices radicales | 8 |
| 3.2. Germinación, desinfección y mantenimiento de las carióspsides..... | 9 |
| 3.3. Optimización del protocolo para análisis cariológico | 10 |
| 3.4. Montaje y observación de las divisiones celulares | 10 |
| <i>Estudio molecular</i> | |
| 3.5. Material vegetal y extracción de ADN | 10 |
| 3.6. Cuantificación y análisis de la calidad de ADN | 11 |
| 3.7. Amplificación, secuenciación y análisis de los datos | 11 |
| 4. RESULTADOS | 14 |
| <i>Germinación de las carióspsides</i> | 14 |
| <i>Estudio citogenético</i> | 14 |
| <i>Filogenia molecular</i> | 17 |
| 5. DISCUSIÓN | 21 |
| <i>Estudio citogenético</i> | 21 |
| <i>Filogenia molecular</i> | 22 |
| 6. CONCLUSIONES | 23 |
| REFERENCIAS | 24 |
| ANEXO | 27 |

RESUMEN

La especie *Anthoxanthum odoratum* (Poaceae; Pooideae) es originaria de Eurasia, si bien su rango de distribución se ha ampliado considerablemente por la acción humana, y en la actualidad supone un problema ecológico en zonas templadas de Australia y América del Sur. El objetivo del presente trabajo es poner a punto técnicas citogenéticas y moleculares (filogenéticas) que permitan determinar el origen de las poblaciones de *Anthoxanthum odoratum* en Chile. Para ello se adaptaron los protocolos de germinación de semillas y de las técnicas cariológicas a las particularidades del género *Anthoxanthum*. Asimismo, para los trabajos de filogenia molecular se emplearon regiones nucleotídicas cloroplásticas (*trnLF* y *trnTL*) y nucleares multicopia (ETS y ITS). El estudio filogenético se llevó a cabo mediante Máxima Parsimonia e inferencia Bayesiana. Asimismo, se realizó un árbol basado en las distancias estimadas mediante el algoritmo *Neighbor-Joining*. Las tres metodologías apuntaron un claro agrupamiento de las poblaciones chilenas de *A. odoratum* con las poblaciones de Europa Occidental y, particularmente, la Península Ibérica. Por otro lado, los recuentos cromosómicos realizados indican que las poblaciones de *A. odoratum* analizadas, tanto chilenas como ibéricas, son tetraploides ($n=20$). La falta de delimitación celular y la tendencia al agrupamiento de los cromosomas dificultaron los recuentos cromosómicos. La combinación de técnicas moleculares y citogenéticas permitirá avanzar más en el estudio de las poblaciones invasoras de este taxón y su evolución reciente.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Anthoxanthum* L. *sensu stricto* forma parte de la familia Poaceae y está ampliamente distribuido en todo el globo (Tovar, 1993; Teillier, *et al.*, 2007; Pimentel & Sahuquillo, 2008). Incluye alrededor de 15 especies, 8 de las cuales han sido descritas en Europa y Macaronesia (Valdes, 1973; Tutin, 1980; Dahlgren *et al.*, 1985). Diferentes ordenaciones taxonómicas han sido propuestas para ese grupo debido a la gran variabilidad morfológica observada entre estas especies (Paunero, 1953; Valdés, 1973; López González, 1994; Pimentel & Sahuquillo, 2003). Se pueden diferenciar dos grandes grupos de especies europeas basándose en la duración de su ciclo vital; anuales como *Anthoxanthum aristatum* Boiss., *Anthoxanthum ovatum* Lag. y *Anthoxanthum gracile* Biv. y perennes como *Anthoxanthum amarum* Brot., *Anthoxanthum alpinum* Löve & Löve, *Anthoxanthum maderense* Teppner y *Anthoxanthum odoratum* L. (Schouten & Veldkamp, 1985), aunque esta diferenciación ha sido también fuente de controversias (Borrill, 1962; Hedberg, 1964).

Entre las especies perennes la que está más ampliamente distribuida es *A. odoratum* taxón que forma un complejo poliploide extremadamente polimórfico (Hedberg, 1990; Felgrova & Krahulec, 1999), presente en diversos hábitats en Eurasia y que ha sido introducido en América del Norte, del Sur, Australia y Nueva Zelanda, donde constituye un problema ecológico por su gran capacidad invasora (Tovar, 1993).

Anthoxanthum odoratum es una planta perenne, que puede alcanzar de 20 a 60 cm de altura. Sus hojas son planas, linear-lanceoladas de 15 a 20 cm de longitud y de 0,2 a 0,6 cm de ancho, glabras y olorosas. La inflorescencia es alargada, y sus espiguillas están formadas por dos flores estériles y una flor terminal hermafrodita; la glumilla de las flores estériles suele tener dos lóbulos apicales y llevan una arista en el dorso.

Tradicionalmente se han diferenciado dos citotipos dentro del complejo poliploide formado por *A. odoratum* (Teppner, 1970; Felber, 1993; Felgrova & Krahulec, 1999): *A. alpinum*, diploide ($2n=10$), distribuida por zonas montañosas del norte y centro de Europa y *A. odoratum*, tetraploide ($2n=20$) y abundante en latitudes medias de Eurasia (Hedberg, 1976). La separación morfológica entre estos citotipos es controvertida. Tradicionalmente, para su caracterización morfológica se utilizaban caracteres cualitativos y cuantitativos como la longitud de la planta, el color y forma de la inflorescencia y de las flores estériles, anchura de las hojas, pubescencia de la planta y forma de la lígula, pero los trabajos de Pimentel *et al.*, (2007) han demostrado que no son suficientes para diferenciar los citotipos. Estudios moleculares han confirmado esta difícil diferenciación y han permitido detectar distintos linajes en *A. odoratum* que difieren por su relación respecto a *A.*

alpinum (Pimentel *et al.*, 2007; 2013). Como ya se indicó previamente, aunque *Anthoxanthum odoratum* es de origen europeo fue introducida en América (Tovar, 1993, Tomé *et al.*, 2007) y Oceanía, lo que le confiere hoy una distribución global. El efecto que esta especie tiene sobre las comunidades vegetales naturales fue puesto de manifiesto por Mifsut & Jiménez (2007), siendo su principal impacto la competencia por el espacio que conlleva la eliminación de las especies autóctonas y por lo tanto, la pérdida de la biodiversidad. En Chile, esta especie es común en praderas del dominio húmedo, sobre suelos ligeramente ácidos y de fertilidad media (López *et al.*, 1997). Está ampliamente distribuida en áreas modificadas para su uso agrícola, ganadero o forestal (Tomé *et al.*, 2007).

Según la IUCN las especies invasoras son la segunda causa de la extinción de las especies a nivel mundial, después de la destrucción de los hábitats. Su efecto sobre los ecosistemas es incalculable afectando tanto a su estructura como a su funcionamiento y en muchos casos provocan daños irreversibles (Leung *et al.*, 2002). La propagación de las especies invasoras está favorecida por el comercio internacional, por ello se trata de un problema global que requiere cooperación internacional y en la actualidad, se considera una prioridad establecer programas que favorezcan la prevención, control y seguimiento de las especies invasoras (IUCN, declaración de Mèze 2005, UE Directiva 92/43/CEE, y España, Real Decreto 630/2013). El Real Decreto 630/2013 define como especie “invasora” aquella introducida accidental o intencionadamente fuera de su área de distribución natural, y con capacidad de establecerse y reproducirse amenazando la diversidad biológica.

Para desarrollar los proyectos de gestión, prevención y control de las especies invasoras es necesario conocer el origen de las introducciones y los factores biológicos y ambientales que determinan el éxito de la invasión. Dentro de esta línea se encuadra este trabajo con el que se pretende aplicar y poner a punto técnicas moleculares y citogenéticas para conocer el origen de las poblaciones de *A. odoratum* en Chile y su relación con las poblaciones europeas. Para la consecución del objetivo planteado será preciso combinar distintas técnicas de estudio de la biología de las poblaciones. La filogenia molecular basada en caracteres moleculares se ha utilizado a menudo para estudios de determinación de orígenes híbridos y para diferentes tests de delimitación de hipótesis taxonómicas. Por su parte, los estudios citogenéticos tienen un papel fundamental en la interpretación de los resultados filogenéticos, especialmente a niveles filogenéticos bajos en plantas, donde la evolución reticulada es común (Stuessy, 1990). Estudios de parámetros como el número y la morfología de los cromosomas mitóticos, así como el uso de descripciones acerca del comportamiento meiótico, son a menudo muy importantes para la

comprensión de las relaciones entre especies, géneros e incluso familias (Armstrong & Jones, 2003; Éder-Silva *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. GENERAL

- Poner a punto las técnicas moleculares y citogenéticas para el estudio del origen de las poblaciones de *Anthoxanthum odoratum* en Chile.

2.2. ESPECÍFICOS

- Determinar el nivel de ploidía de las poblaciones Chilenas de *Anthoxanthum*.
- Establecer las relaciones filogenéticas entre las poblaciones chilenas y europeas de la especie *Anthoxanthum odoratum* para detectar la existencia de una o más introducciones en América del Sur.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras analizadas en este estudio provienen de recolecciones realizadas por el personal del laboratorio de Botánica Terrestre en Galicia y América del sur. Los datos sobre el origen de las poblaciones y su distribución figuran en las figuras 1 y 2.

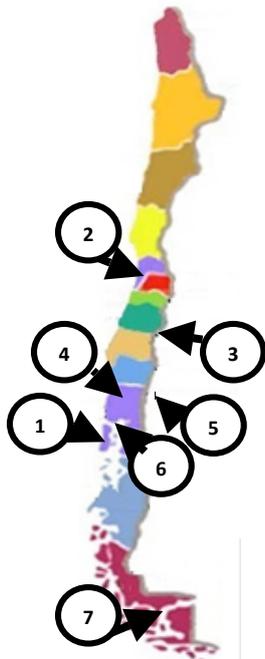


Figura 1: Distribución geográfica de las poblaciones chilenas utilizadas. 1, Iglesia del Carmen, Compu, Chiloé; 2, Escuadrón, Coronel, Concepción; 3, Manzanales, Cautín; 4 Caleta el Molinar, Niebla, Valdivia; 5, Lago Ranco, Valdivia; 6, Castro, Chiloé; 7, Herberton, Tierra de Fuego.

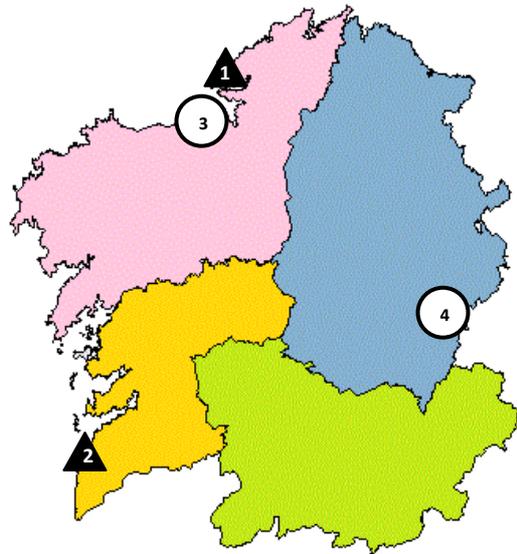


Figura 2: Distribución geográfica de las poblaciones gallegas utilizadas. ▲ *A. aristatum*, ○ *A. odoratum*. 1, San Cristovo, Ferrol, A Coruña; 2, Cabo Silleiro, Baiona, Pontevedra; 3, A Zapateira, A Coruña; 4, O Courel, Folgoso do Courel, Lugo.

ESTUDIO CARIOLÓGICO

Se utilizaron representantes de las cuatro poblaciones gallegas (Fig. 2) y 2 poblaciones procedentes de Chile (Fig. 1: Compu y Cautín) para poner a punto la técnica cariológica

3.1. OBTENCIÓN DE ÁPICES RADICALES

Para la observación de las metafases se utilizaron ápices radicales obtenidos a partir de cariósides germinadas o plantas recogidas en campo que se mantuvieron en macetas o en agua para obtener raíces con meristemos en buen estado (Fig. 3).

Las cariósides fueron colectadas en plantas previamente identificadas y almacenadas en sobres de papel en los que se indicaba su nombre, localidad y fecha de recolección.



Figura 3: Diferentes métodos de obtención de raíces utilizadas para los estudios citogenéticos.

3.2. GERMINACIÓN, DESINFECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS CARIÓPSIDES

Con el fin de optimizar las tasas de germinación de las cariósides, se analizó el efecto de la vernalización, así como el efecto del tratamiento de desinfección sobre la capacidad de germinación de las cariósides. Para ello se establecieron cuatro grupos diferentes. Un primer grupo de frutos no fue sometido a ningún tratamiento. Para los tres grupos restantes se evaluaron diferentes tiempos refrigeración antes del inicio del mantenimiento en placa: $t\emptyset$ (grupo control no sometido a refrigeración), $t48$ y $t72$ (muestras sometidas a refrigeración en nevera, 4-8 °C, durante 48 y 72h respectivamente).

En los grupos sometidos a desinfección, antes de ser puestas en placas de Petri las cariósides se lavaron en agitación en una dilución de lejía comercial al 10% durante 60 minutos, seguido de un lavado también en agitación en agua del grifo durante 60 minutos. Las cariósides fueron puestas en placas de Petri sobre papel de filtro humedecido con agua del grifo y mantenidas a temperatura de 37 °C y régimen controlado de luz (17 horas luz-7 de oscuridad) en la cámara de cultivo del Laboratorio de Fisiología Vexetal.

El control de la evolución de la germinación se realizó dos veces a la semana a lo largo de todo el período experimental (4 meses) a fin de evaluar la necesidad de hidratar las placas, la presencia de posibles contaminantes y observar el inicio de la germinación.

Las cariósides germinadas, una vez que desarrollaban el cotiledón y las raíces alcanzaban un tamaño superior a 2 cm se pasaban a macetas o se fijaban para observar las divisiones en los meristemos apicales.

3.3. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA ANÁLISIS CARIOLÓGICO

Para el estudio cariológico fue necesaria la optimización del protocolo de fijación y tinción de ápices radicales de uso habitual (método de Darlington & La Court, 1962) que consiste en el enfriamiento en agua con hielo a $T < 4^{\circ}\text{C}$ durante 24h para la condensación de los cromosomas y la acumulación de las divisiones celulares. A continuación se realiza la fijación de los ápices con *Carnoy* (Alcohol:Ác. acético, 3:1) en el que se mantienen las raíces hasta el momento de la tinción, permaneciendo un mínimo de 24h en el fijador. En el momento de la tinción se lavaban con agua, para quitar los residuos de fijador y luego eran teñidas en orceína acética a una concentración de 0,45% a 65°C en baño termostático durante 10 minutos. Antes de la tinción se realiza un baño en HCl al 3% en caliente.

Para poner a punto la técnica se probaron diferentes horas de fijación, con el objetivo de encontrar el momento en el que se produce el mayor número de divisiones celulares en ápice de la raíz. En general, para la mayoría de las especies primera hora de la mañana (Fraga, 1982). Debido a la sensibilidad de las raíces de estas especies a los agentes químicos se analizó el efecto del fijador de *Carnoy* (Alcohol - Ác. acético 3:1), la concentración de orceína y el tiempo de tinción.

3.4. MONTAJE Y OBSERVACIÓN DE LAS DIVISIONES CELULARES

Los ápices teñidos fueron seccionados bajo lupa (Olympus SZX9, Tokyo, Japón) y colocados individualmente entre portaobjetos y cubreobjetos levemente humedecidos con albumina glicerizada. El ápice fue ligeramente golpeado y sometido a presión fuerte a fin de provocar la separación de las células y poner los cromosomas en un plano. La observación de los cromosomas fue realizada bajo microscopio óptico con cámara acoplada (Olympus BX50, Tokyo Japón).

ESTUDIO MOLECULAR

3.5. MATERIAL VEGETAL Y EXTRACCIÓN DE ADN

Para el estudio molecular se recogieron hojas en buen estado de 5 individuos por cada una de las poblaciones chilenas seleccionadas. La selección se realizó con vistas a conseguir una buena representación de las áreas de Chile donde *A. odoratum* ha formado poblaciones significativas. Las hojas se guardaban en sobres de papel y los ejemplares por población se guardaban en bolsas de plástico con gel de sílice para su conservación a largo plazo. Este material fue recogido por personal del Laboratorio de Botánica Terrestre en Enero de 2014.

Las extracciones de ADN se realizaron a partir de 20 mg de hojas de cada individuo, que eran previamente molidas en un molino de bolas *Mini Beadbeater* (Biospec Products, Dover, FL, EUA). El procedimiento de extracción se llevó a cabo con el kit comercial DNeasy® Plant Mini kit 50 (Qiagen, Valencia, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante, con adaptaciones en algunas etapas a las particularidades del material vegetal utilizado. Estas modificaciones afectaron principalmente a los tiempos de incubación y de centrifugación y a los volúmenes de elución.

3.6. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL ADN

La determinación de la calidad del ADN obtenido se realizó mediante dos métodos; electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y espectrofotometría a través del Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DL, EUA). Para la electroforesis se cargaron 5 µL de ADN genómico y 3 µL de tampón de carga. Asimismo, se incluyó en el gel un marcador de peso molecular (NZY Ladder VI, NZYTech, Lisboa, Portugal). La visualización del resultado de la electroforesis se llevó a cabo bajo luz ultravioleta utilizando un Foto-Documentador Gel DOC XR System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

3.7. AMPLIFICACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para realizar este estudio se analizaron dos regiones nucleotídicas nucleares (ITS, *internal transcribed spacer* y ETS, *external transcribed spacer*) y dos regiones cloroplásticas (*trnTL* Y *trnLF*). Las regiones nucleares seleccionadas han sido comúnmente empleadas en estudios filogenéticos por su alta variabilidad (e.g. Clevinger & Panero, 1999). Se trata de regiones multicopia y con función conformacional, que se transcriben para dar lugar a RNAr y se eliminan en el proceso de maduración del ARN. Los fragmentos nucleotídicos cloroplásticos elegidos son también de uso común (e.g. Galley & Linder, 2007). Se trata secuencias espaciadoras o intrónicas, no codificantes, de alta variabilidad.

Para la amplificación de las distintas regiones se emplearon los primers diseñados por Gillespie *et al.*, (2009; ETS), Hsiao *et al.*, (1995; ITS) y Taberlet *et al.*, (1991; *trnLF* y *trnTL*).

Las reacciones utilizadas para amplificar estas regiones fueron las siguientes. Para la región cloroplástica *trnTL* se siguió el protocolo de Galley *et al.*, (2007). Se preparó un volumen total de 25 µL, siendo la composición de la mezcla: 2,5 µl 10 x PCR Buffer; 0,2 µl de la enzima Taq polimerasa (5 U/µl, NZYTech, Lisboa, Portugal), 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,63 µl dNTPs (10 mM; Roche, Basilea, Suíza), 1 µl BSA (1 %; Sigma-Aldrich, St Louis, MI, EUA), 4 µl de cada uno de los primers *forward* y *reverse* (10 µM), 1 µl ADN. El programa de PCR consistió en: un primer paso de desnaturalización del ADN a 94°C durante 3 min, seguido de 32 ciclos compuestos por una

desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una fase de anillamiento de 1 minuto a 54 °C en los dos primeros ciclos, y a 52°C en los siguientes 30 ciclos; y una extensión de 1 minuto a 72 °C. Finalmente se realizó una extensión adicional de 7 minutos a 72 °C.

Para la región *trnLF* se siguió el protocolo de Torrecilla *et al.*, (2003). La mezcla de los reactivos consistió en: 2,5 µl 10 x PCR Buffer; 0,5 µl de la enzima Taq polimerasa (5 U/µl, NZYTech, Lisboa, Portugal), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTPs (10 mM; Roche, Basilea, Suíza), 2,5 µl BSA (1 %; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), 0,5 µl de cada uno de los primers *forward* y *reverse* (10 µM), 3 µl ADN, reacción completada con dH₂O para un volumen final de 25,5 µL. El programa de la PCR consistió en: un paso de desnaturalización del ADN a 95 °C durante 10 min seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, anillamiento a 50 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por un minuto, con una extensión adicional a 72 °C por un minuto.

Dentro de las regiones nucleares, para el ITS se siguió el protocolo de Hsiao *et al.*, (1995). La mezcla de PCR incluyó: 1,5 µl 10 x PCR Buffer; 0,06 µl de la enzima Taq polimerasa (5 U/µl, NZYTech, Lisboa, Portugal), 0,9 µl MgCl₂ (25 mM), 0,3 µl dNTPs (10 mM; Roche, Basilea, Suíza), 0,38 µl de cada uno de los primers *forward* y *reverse* (10 µM) cada, 1,5 µl ADN, reacción completada con dH₂O para un volumen final de 15 µL. El programa de la PCR consistió en: un paso de desnaturalización del ADN a 95 °C durante un minuto seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 45 segundos, anillamiento a 58 °C por 45 segundos y extensión a 72 °C por 90 segundos, con una extensión adicional a 72 °C por 7 minutos. Finalmente, para el ETS, fueron utilizadas las mismas cantidades y concentraciones de los reactivos que para el ITS. El programa de la PCR fue también idéntico, excepto por la extensión adicional que para esa región fue de 72 °C por 5 minutos. El resultado de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

Los productos de PCR fueron purificados utilizando la mezcla enzimática Exosap® (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA). El procedimiento consistió en mezclar 2 µl de Exosap 1:10 por cada 5 µl volumen de muestra y a continuación se incubó la mezcla a 37 °C durante 45 minutos. Finalmente, la mezcla enzimática se desactivó mediante su incubación a 80 °C durante 15 minutos. Las muestras fueron secuenciadas en secuenciador 3130xl de Applied Biosystems (Foster City, California, USA) a través de una empresa especializada, *Macrogen Europe* (Amsterdam, Holanda). Una vez recibidas las secuencias (*forward* y *reverse*) fueron editadas y ensambladas utilizando el programa CodonCode Aligner v. 4 (CodonCode Corporation, Dedham, MA, EUA). A continuación, las secuencias de las distintas regiones se alinearon usando el programa MEGA v6.0 (Tamura *et al.*, 2013), y mediante el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004).

Se construyeron matrices individuales para las distintas regiones nucleotídicas a partir de los distintos alineamientos realizados. Todas las matrices fueron analizadas individualmente y sin tener en cuenta los gaps. Asimismo, se realizaron análisis combinados cloroplásticos (*trnLF* y *trnTL*), nucleares (ITS y ETS) y globales (nucleares + cloroplásticos) a través de la concatenación de las secuencias. Antes de realizar la concatenación se comprobó que las matrices cumplieran el criterio propuesto por Pirie *et al.*, (2009) (i.e. la no existencia de diferencias significativas entre las topologías individuales generadas a partir de las matrices a concatenar). Con el fin de aumentar la resolución de los árboles, en el análisis global solo fueron utilizadas muestras para las cuales se disponía de secuencias de todos los genes trabajados, para las regiones cloroplásticas y nucleares.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante métodos filogenéticos de máxima parsimonia e inferencia Bayesiana. Asimismo, se analizó el parecido entre las diversas muestras mediante la construcción de un árbol de distancias.

Para la máxima parsimonia se empleó el programa PAUP v. 4 (Swofford, 2002). Se realizó una búsqueda heurística con 1000 réplicas aleatorias de secuencia aditiva (*random addition sequence replicates*), utilizando la permutación de ramas tipo TBR (*Tree bisection reconnection*). El algoritmo *branch and bound* se utilizó para aumentar la eficacia del análisis. La significación estadística del árbol se analizó mediante la técnica del *bootstrap* con 1000 réplicas.

La inferencia bayesiana se realizó usando el software MrBayes 3.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2005). Los análisis bayesianos estiman la probabilidad *a posteriori* de los distintos árboles alternativos usando las cadenas de Markov y Monte Carlo (MCMC). Los análisis bayesianos requieren la realización hipótesis que resumen la información que se tiene sobre las secuencias (los *priors*). Establecimos el modelo de evolución para nuestro alineamiento mediante el software MrModelTest 2.3 (Nylander, 2004), que indicó que el modelo más probable es el GTR+I+G. A continuación se realizaron los análisis, cada uno de ellos con 4 cadenas de Markov y 20.000.000 de generaciones, guardando una topología de cada 10000 generaciones. La convergencia de los análisis realizados se comprobó mediante la estima ofrecida por el programa. Finalmente, se construyó un árbol consenso utilizando el mismo software MrBayes 3. Todos los tests se realizaron en el servidor *Cipres Science Gateway* de la Universidad de San Diego (<https://www.phylo.org/portal2/home.action> accedido el día 17-06-2014).

El análisis cluster basado en los alineamientos se llevó a cabo empleando el software MEGA v 6.0. El algoritmo usado fue el *Neighbor-Joining*. Los árboles resultantes de los distintos análisis hechos se visualizaron y modificaron empleando el programa FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

4. RESULTADOS

GERMINACIÓN DE LAS CARIÓPSIDES

Se seleccionaron dos poblaciones de *Anthoxanthum odoratum* procedentes de Chile para realizar las pruebas de germinación de cariósides, cubriendo el rango geográfico del muestreo para el que se consiguieron semillas, Manzanales (Cautín) al norte y Compu (Chiloé) al sur (Fig. 1). Para germinar las cariósides se plantearon varios tratamientos ya que se desconocía su capacidad de germinación. Los resultados ponen de manifiesto (Fig. 4) que cuando no se hace desinfección se pierden más cariósides (37%). Asimismo, el tratamiento de vernalización mejoró el rendimiento frente al grupo control (4% de semillas perdidas tras una vernalización de t=48h; <1% de semillas perdidas tras t=72h de vernalización vs 31% de semillas perdidas en el grupo control con desinfección).

En contra de lo previsto, la vernalización no mejoró el porcentaje de germinación, alcanzándose el mejor resultado en el grupo control sin desinfección ni vernalización

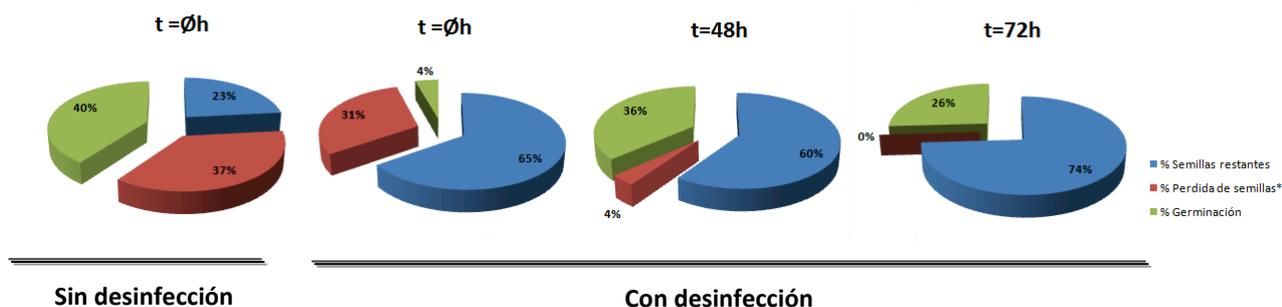


Figura 4: Porcentaje de germinación de las cariósides sometidas o no a tratamiento de desinfección y prueba de diferentes tiempos de vernalización a 4-8 °C. *Se considera pérdida de semillas, aquellas que presentaron contaminación fúngica.

ESTUDIO CITOGENÉTICO

Para realizar la optimización del protocolo se utilizaron las muestras procedentes de poblaciones de Galicia (Fig. 2) debido a la mayor disponibilidad de material (plántulas).

Como resultado de las pruebas realizadas se modificó el protocolo de uso habitual (Darlington & La Court, 1967) en cuatro aspectos fundamentales:

- Se eliminó la inclusión en agua con hielo durante 24 horas. El tratamiento con frío no producía el efecto esperado de concentración de divisiones celulares.
- Se eliminó la inclusión en fijador de Carnoy (Alcohol-Ác. Acético 3:1) previa a la tinción con Orceína-Acética (Fig. 5A), que producía la degradación del contenido celular.
- Se eliminó el tratamiento previo a la tinción con HCl al 3%, que resultaba muy agresivo para las células (Fig. 5B).

-Se disminuyó el tiempo de inmersión de los ápices en Orceína-Acética. Asimismo, también se disminuyó la temperatura y concentración del colorante (de 10 minutos a 3 minutos de inmersión; de T=65 °C a T=55 °C y de 0,45% de concentración a 0,35%; Fig. 5C).

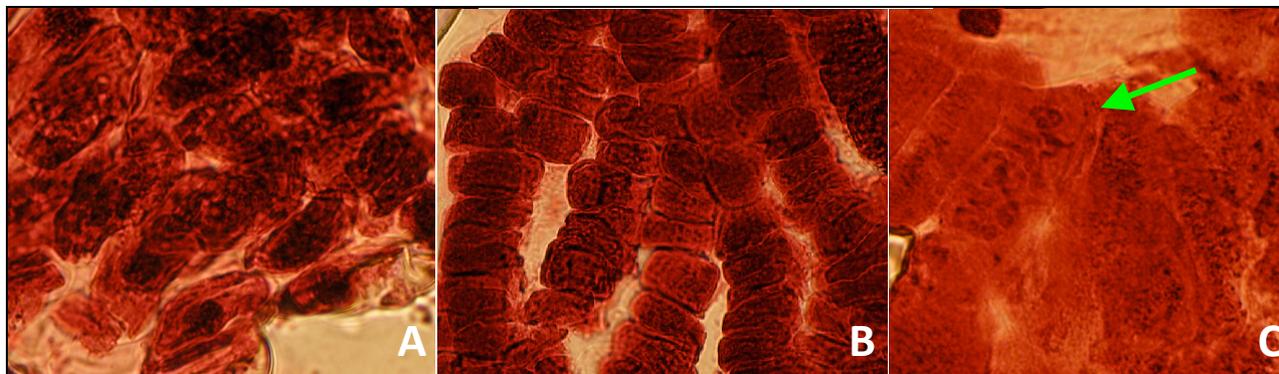


Figura 05: Optimización del protocolo de fijación y tinción para estudios cariológicos. (A) Protocolo original con fijación hecha a la primera hora de la mañana. (B) Protocolo sin Ácido Clorhídrico hecho a la primera hora de la mañana. (C) Protocolo final, porta teñido directamente a las 13h.

Además, se tiñeron ápices a diferentes horas de la mañana hasta encontrar el momento en que la concentración de divisiones celulares era mayor. El rango de pruebas fue desde las 9 de la mañana hasta las 16 h. Estableciéndose que el pico de divisiones celulares se encontraba a última hora de la mañana entre las 13h – 13:45h (Fig. 5C).

El resultado de estas pruebas iniciales permitió establecer un protocolo que implicaba realizar la tinción directa de los ápices radicales con Orceína-Acética al 0,35% durante 5 minutos en baño termostático a 65 °C. Estos ápices fueron obtenidos de plantas en condiciones controladas de luz y temperatura en cámara de cultivo y escindidos de las plantas a las 13 h, momento en que se observaban mayor número de metafases en las células en división (Fig. 6, flechas verdes).

En cada preparación se utilizaba un único ápice para conseguir que la presión ejercida sobre el cubreobjetos fuese homogénea en toda la superficie que ocupaba el ápice y que los cromosomas de las células en división se colocasen en el mismo plano.

Como se observa en la figura 6 (A y B) todavía existen daños celulares observables en la preparación y granulación celular (flecha de 1 a 4), así mismo otro de los problemas es que las células aparecen fragmentadas y sin límites claros, por lo que los recuentos cromosómicos por célula serán aproximados (Fig. 7). En la figura 6 (C) también podemos observar una metafase con los cromosomas muy pegados lo que hace difícil su recuento. Este fenómeno es común a todas las preparaciones realizadas, siendo muy complicado encontrar alguna célula donde de forma definitiva se pueda establecer su número cromosómico. A pesar de ello se muestra en la figura 7 (A y B) un

recuento en el que se pueden diferenciar 20 cromosomas, lo que coincide con lo esperado para *A. odoratum* ($2n=4x=20$) y 10 cromosomas (Fig. 7 C y D) para *A. aristatum* ($2n=2x=10$).

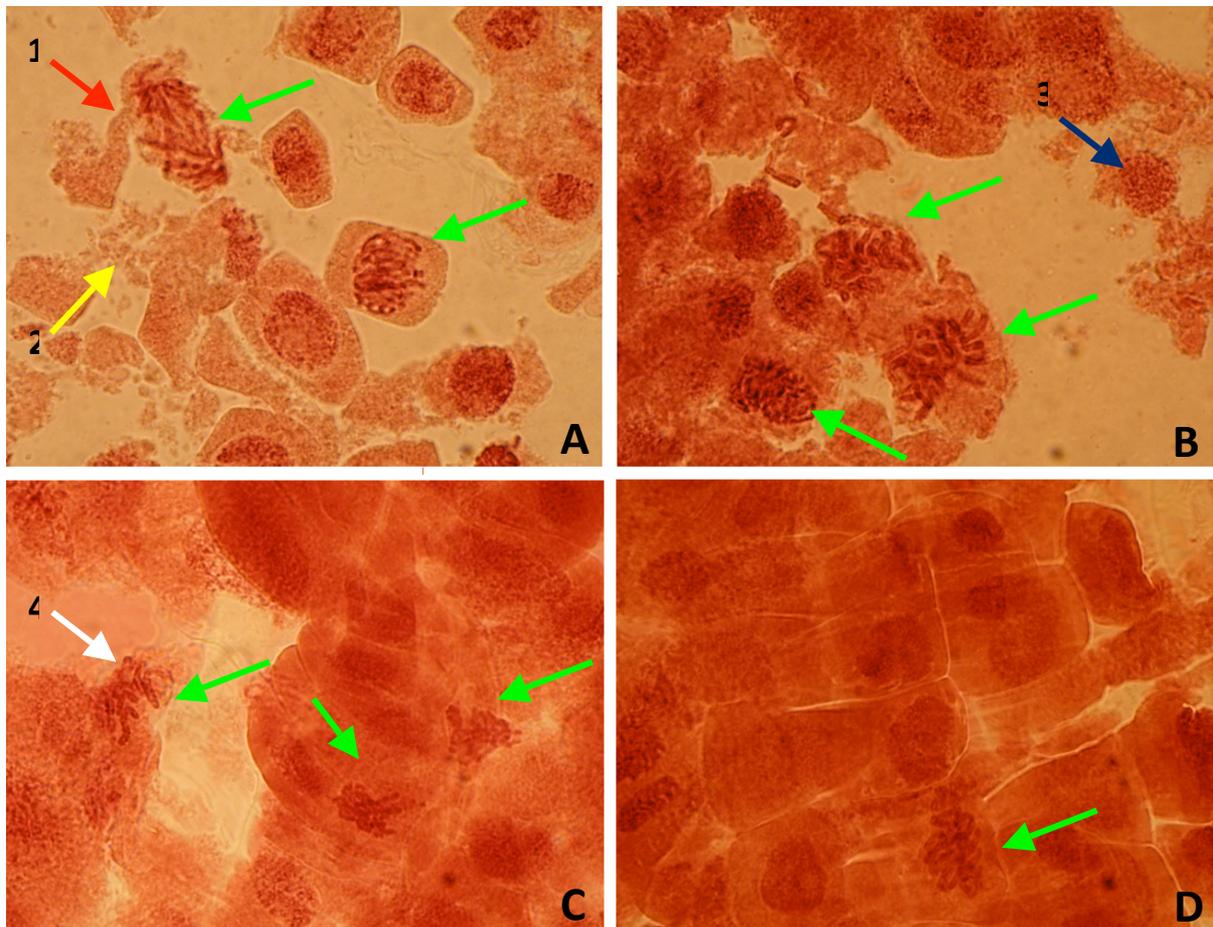


Figura 6: Diferentes preparaciones con células en división hechas con el protocolo final. Las divisiones están indicadas con flechas verdes. 1- Célula con límites difusos, 2- Fragmentación celular, 3- Granulación en el citoplasma y 4- Cromosomas libres en la preparación.). A, B, C y D representan diferentes ápices.

Una vez puesta a punto la técnica el siguiente paso sería realizar recuentos cromosómicos en todas las poblaciones de Chile y establecer el cariotipo de cada una de las especies, comparando los cromosomas por su morfología y su situación en metafase.

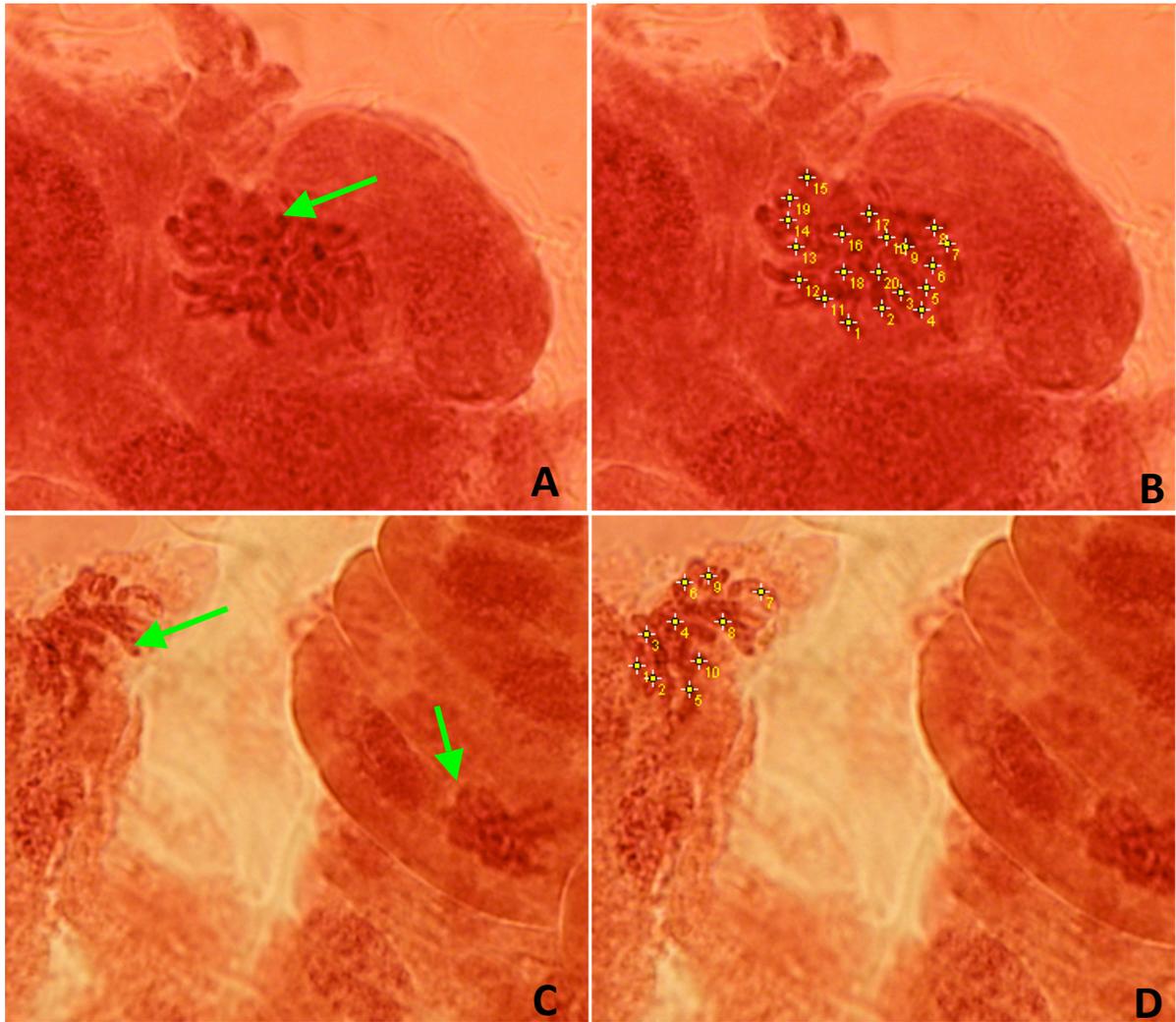


Figura 7: Protocolo final de tinción directa de ápices de *A. odoratum* y *A. aristatum*. (A) Células de *A. odoratum* en metafase, cromosomas condensados. (B) Número de cromosomas por célula, $2n=20$. (C) Células de *A. aristatum* en metafase, cromosomas condensados. (D) Número de cromosomas por célula, $2n=10$ aproximadamente.

FILOGENIA MOLECULAR

La filogenia presentada se ha basado en un total de 418 secuencias: 213 para el análisis de las regiones plastídicas (107 de *trnTL* y 106 de *trnLF*) y 205 para el análisis de las regiones nucleares (97 de ETS y 108 de ITS). De las secuencias empleadas, 120 se han obtenido para este estudio (30 de ETS, 30 de ITS, 30 de *trnLF* y 30 de *trnTL*). Las restantes 298 se recopilieron de la base de datos del Área de Botánica de la Universidad de A Coruña. La procedencia de cada una de las secuencias empleadas se indica en el Anexo. Los alineamientos finales generados tuvieron los siguientes tamaños: 1096 pares de bases para el *trnLF*; 808 pares de bases para la región *trnTL*; 741 pares de bases para la región ETS y 699 pares de bases para la región ITS.

Todos los resultados filogenéticos por región (datos no presentados) y por genoma (cloroplástico vs nuclear), tanto los basados en parsimonia (no presentados) como en inferencia bayesiana, fueron coherentes, lo que nos permitió la realización de los análisis globales (cloroplástico + nuclear). El análisis bayesiano presenta un mayor nivel de apoyo estadístico y, por lo tanto, será el que se presente a lo largo de este trabajo.

El árbol obtenido con las regiones cloroplásticas concatenadas (no presentado) no presentaba buena resolución, formando todos los taxa con la excepción del grupo externo *A. gracile* una gran politomía. Dentro de la politomía se observaron pequeñas agrupaciones, si bien éstas no superaron el 0.7 de probabilidad posterior (PP). La matriz de datos nuclear concatenada ofreció mejor resolución, ya que presentaba una serie de clados más informativos. Sin embargo, el nivel de apoyo estadístico fue bajo y la topología coherente con el árbol generado a partir de la matriz global, por lo que solo éste será presentado (Fig. 8).

La topología global mostró la clara separación entre el grupo externo (*A. gracile*) y las restantes especies de *Anthoxanthum*. Asimismo, se observó una clara diferenciación entre dos clados: Un primer grupo incluyó el taxon diploide *A. alpinum* y las poblaciones del C y N de Europa del tetraploide *A. odoratum*. Un segundo clado comprendió los táxones anuales *A. aristatum* y *A. ovatum* y los perennes *A. amarum* y *A. odoratum* (poblaciones del W y SW de Europa). Dentro de este último grupo, se observó una separación clara entre las poblaciones de *A. ovatum* (procedentes principalmente de localidades estrictamente mediterráneas del Centro, Oriente y Occidente de la Cuenca Mediterránea), y las poblaciones occidentales de *A. odoratum*, *A. amarum* y *A. aristatum*. En lo que se refiere a las poblaciones Sudamericanas (Chilenas) se observa claramente su agrupamiento con el clado de poblaciones procedentes del S y SW de Europa. Dentro de este clado, las poblaciones se distribuyen en varios subclados, sin una organización lógica aparente.

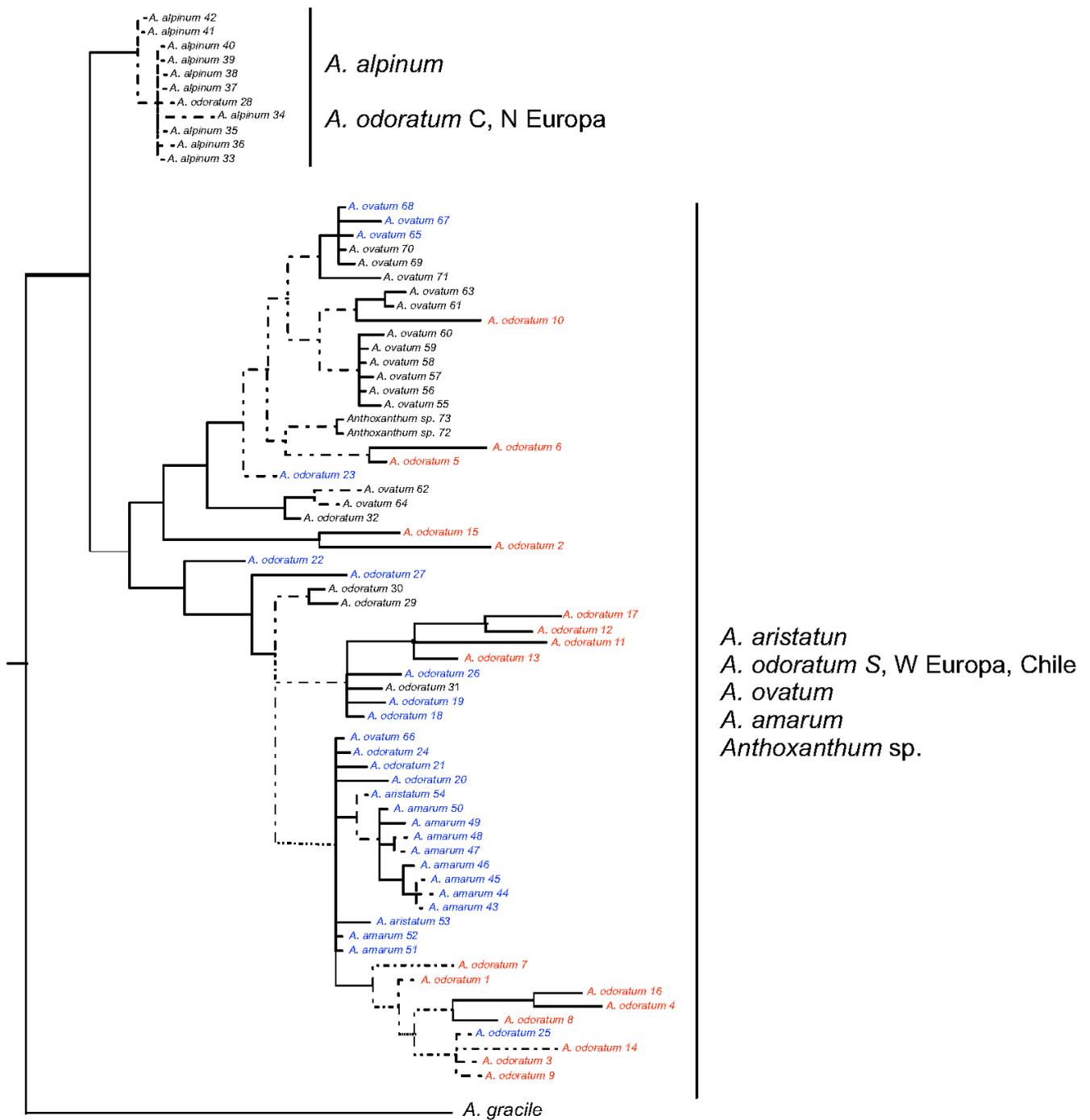


Figura 8: Árbol resultado del análisis filogenético por inferencia Bayesiana de 74 secuencias concatenadas (cloroplásticas y nucleares). Las líneas discontinuas representan probabilidad posterior (PP) < 0,8. Los números al lado de cada especie representan el orden numérico del anexo. En azul, poblaciones chilenas; en rojo, poblaciones ibéricas.

El árbol de distancias realizado (Fig. 9) a través del algoritmo *Neighbor-joining* ofrece resultados muy semejantes, con niveles de apoyo moderados en las ramas principales. Una vez más se observa:

- La clara diferenciación entre *A. gracile* y las restantes especies.

- La existencia de los dos clados principales comentados con anterioridad.
- La asociación entre las poblaciones chilenas y las europeas occidentales de *Anthoxanthum*. En este caso se aprecia una mayor afinidad entre las poblaciones australes y las de la Península Ibérica (Fig. 9).

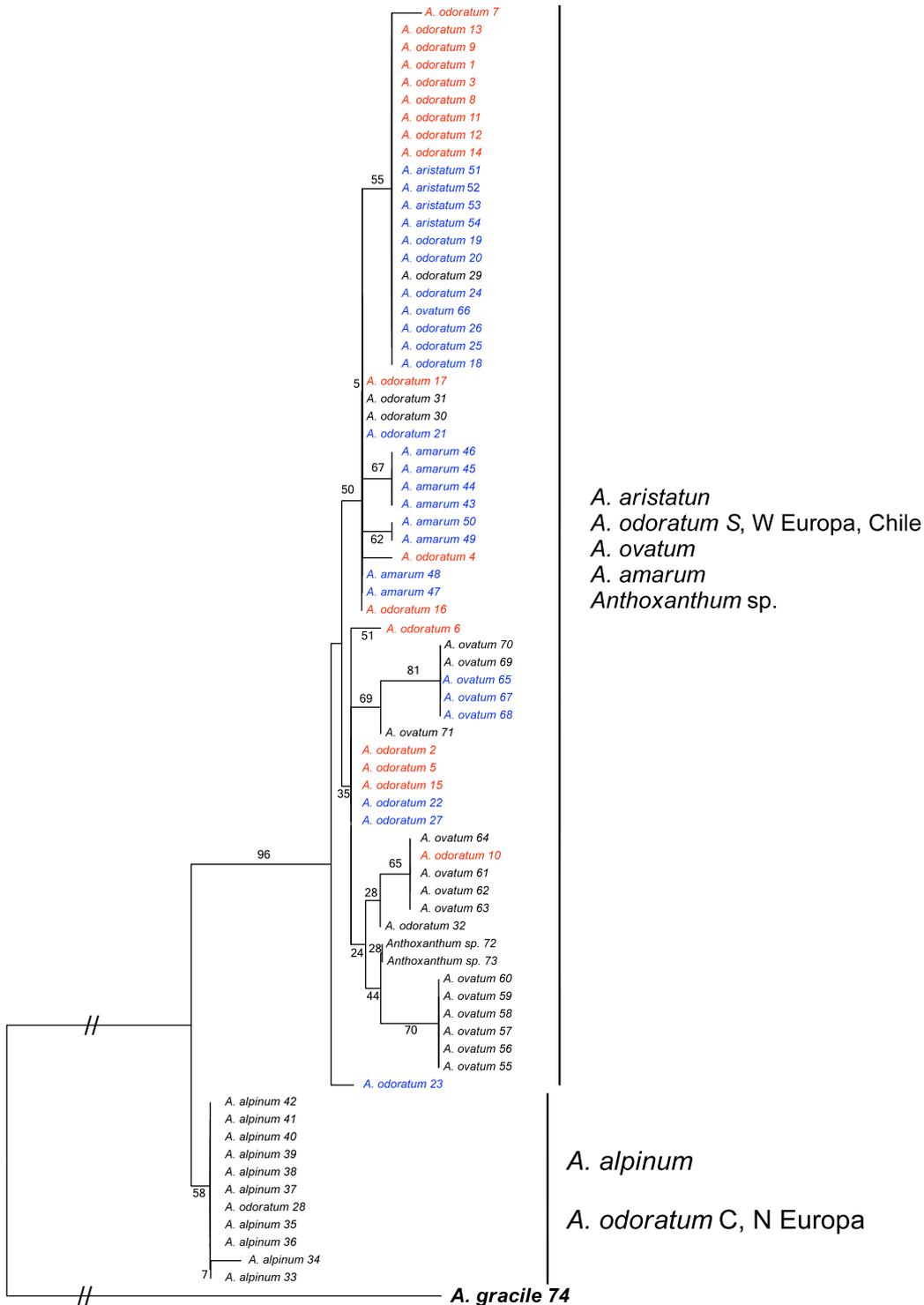


Figura 9: Árbol de distancias obtenido mediante *Neighbor joining*. //, ramas acortadas. Los valores de *bootstrap* se indican junto a las ramas. En rojo las poblaciones chilenas, en azul las de la Península Ibérica.

5. DISCUSIÓN

Estudio citogenético

En general, para facilitar o provocar la germinación de semillas es necesario el control de las condiciones ambientales si se quiere realizar este proceso fuera de su entorno natural (Penfield, 2005, Saucedo *et al.*, 2009) y, en particular, cubrir sus necesidades hídricas (Manz *et al.*, 2005; Bonvissuto & Busso, 2007). En este estudio las cariósides de *Anthoxanthum odoratum* necesarias para la obtención de ápices radicales en división celular germinaron mejor bajo condiciones de T controladas, con un fotoperíodo de 17 horas de luz y un suplemento hídrico cada tres días.

El tratamiento de desinfección con lejía y vernalización, fue eficaz a la hora de disminuir el número de cariósides perdidas, aunque no para aumentar el número de cariósides germinadas. Los mejores resultados se obtuvieron con aquellas poblaciones que no se sometieron a desinfección ni vernalización aunque el grado de contaminación fúngica fue elevado, provocando la pérdida de un alto número de cariósides. La contaminación fúngica es un problema común cuando se quiere germinar en placa cariósides procedentes de poblaciones naturales (Suárez *et al.*, 2009; Vargas-Castillo & Abdelnour-Esquivel, 2010). La hora en la que se realiza la tinción también resultó ser un dato importante a tener en cuenta, siendo a las 13h el mejor momento para conseguir mayor número de células en división. Los datos publicados para gramíneas y otras especies indicaban que primera hora de la mañana era el mejor momento (Fraga, 1982, Sahuquillo *et al.*, 2001).

Los marcadores cariológicos han sido señalados como muy útiles para la identificación cromosómica, así como para la detección de re-ordenamientos y fenómenos de introgresión de regiones cromosómicas (Cuadrado & Jouve, 1994). Para realizar este tipo de estudios es necesaria la obtención de un elevado número de células en división celular (metafase) con los cromosomas bien diferenciados. El problema de *A. odoratum*, al igual que otras especies del género, es que sus raíces son muy sensibles al tratamiento con agentes químicos, provocándose fácilmente la degradación de las células en división (Jones, 1964, Delgado *et al.* 2010). La adaptación del protocolo de uso tradicional (Darlington & La Court, 1962) para obtener células en metafase ha sido la prioridad de este trabajo. Como resultado, se consiguió un protocolo muy corto y de rápida realización. Cuanto menor tiempo se dejaban las células en contacto con el fijador o el colorante las preparaciones al microscopio presentaban células en mejor estado y los cromosomas con la tipología característica. Como ya los describió Jones (1964) los cromosomas de las especies del género *Anthoxanthum* suelen ser relativamente grandes pero tienden a agregarse en metafase siendo difícil observarlos en un único plano (Fig. 6C). A pesar de ello como se muestra en la figura 7B en algunos casos se han podido diferenciar de forma aproximada los 20 cromosomas descritos para *A.*

odoratum ($2n=4x=20$) y los 10 cromosomas ($2n=2x=10$) para *A. aristatum* (Fig. 7D). Como se trata de recuentos aproximados realizados en diferentes preparaciones obtenidas de planta o cariósides procedentes de diferentes localidades, es necesario continuar con las pruebas para completar la caracterización cromosómica de las especies (realizando recuentos definitivos, los cariotipos y aplicando otras técnicas complementarias como *FISH*) que, en paralelo con el estudio filogenético, serán fundamentales para su caracterización. El género *Anthoxanthum*, con sus variaciones en el nivel de ploidía y con la capacidad de hibridación de varios de sus linajes es un buen candidato para estos estudios. El establecimiento de las relaciones citogenéticas entre las poblaciones sudamericanas de *A. odoratum* y los restantes linajes euro-mediterráneos del género serán de gran importancia para detectar su procedencia y avanzar en el estudio acerca de su capacidad invasora.

Estudio molecular

La estructura filogenética mostrada en las topologías obtenidas (Fig. 8 y 9) es congruente con lo señalado en estudios previos realizados en el género *Anthoxanthum* (e.g. Pimentel *et al.*, 2013). El estudio realizado señala con claridad la monofilia de complejo poliploide europeo y la existencia de dos linajes principales que han sufrido diversos eventos de poliploidización (Hedberg, 1990). En lo que se refiere a la posición ocupada en la filogenia por las poblaciones sudamericanas, la afinidad entre éstas y el clado occidental de *Anthoxanthum* hace pensar en una introducción a partir de poblaciones de Europa Occidental. Particularmente, los resultados del árbol de distancias (Fig. 9) muestran una proximidad entre las poblaciones Americanas y las Ibéricas de *A. odoratum*, algo que sería coherente con los datos históricos de poblamiento de Hispanoamérica y, más concretamente de Chile (Torrejón *et al.*, 2004). La llegada de especies invasoras desde el Mediterráneo Occidental (especialmente la Península Ibérica) hasta América del Sur ha sido detectada para diversos táxones (Ramírez *et al.*, 2010).

La proximidad de las especies chilenas con más de una localidad europea nos da indicios de que la introducción de esta especie exótica se dio más de una vez a lo largo de la historia. Esto es común en el caso de especies como *Anthoxanthum*, en las que la introducción se lleva a cabo de forma principalmente accidental (Hedberg, 1976).

Los trabajos filogenéticos llevados a cabo han permitido determinar de forma aproximada el origen de las poblaciones invasoras de *A. odoratum* en Chile. Sin embargo, los análisis realizados no han sido adecuados para analizar la relación entre las poblaciones invasoras, ni para establecer una cronología para la introducción de la especie en Chile. Para la consecución de estos objetivos será necesario emplear técnicas de mayor resolución, como pueden ser los marcadores moleculares hipervariables (AFLPs, microsatélites) o las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS).

Para determinar la técnica a emplear será precisa la determinación de los números cromosómicos. La asociación de los datos filogenéticos con los datos citogenéticos posibilitarán una mejor caracterización de las especies (Poggio *et al.* 2010). Asimismo, la obtención de buenas preparaciones cromosómicas será esencial para la realización de técnicas citogenéticas como el *FISH* y el *GISH*, de gran utilidad en la detección de eventos de evolución reticulada comunes en la evolución reciente de las gramíneas (e.g. Catalán *et al.*, 2012). El trabajo realizado supone un paso preparatorio en esa dirección.

6. CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Para la realización de estudios citogenéticos en especies del género *Anthoxanthum* es necesario minimizar los efectos de los reactivos inherentes a los protocolos de fijación y tinción. La tinción directa con Orceína-Acética es suficiente para observar numerosas divisiones celulares si se establece la hora de mayor actividad en las raíces. Los recuentos realizados en las poblaciones analizadas de *A. odoratum* originarias de Chile permiten establecer que se trata de individuos tetraploides ($2n=2x=20$).
2. Dentro del género *Anthoxanthum* las especies europeas forman un grupo monofilético que presenta varios linajes en los que se produjeron diferentes eventos de poliploidización. Las poblaciones chilenas presentaron mayor afinidad con el linaje formado por las poblaciones de Europa occidental (Península Ibérica).
3. La relación de las poblaciones chilenas con poblaciones de diferentes localidades de Europa occidental parece indicar que la entrada en Chile de esta especie se produjo en diferentes ocasiones a lo largo de la Historia.
4. Las técnicas empleadas no fueron resolutivas a la hora de establecer las relaciones entre las poblaciones chilenas ni la cronología de su introducción, siendo necesario utilizar marcadores de mayor resolución, como los moleculares hipervariables (AFLPs, microsatélites) y las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), además de técnicas citogenéticas como *FISH* o *GISH* adecuadas para analizar los procesos de evolución reticulada, proceso considerado habitual en la evolución reciente de gramíneas.

REFERENCIAS

- ARMSTRONG, S. J. & JONES, G. H. (2003). Meiotic cytology and chromosome behaviour in wild-type *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, v. 54: 380-90.
- BONVISSUTO, G.L. & BUSSO, C. A. (2007) Germination of grasses and shrubs under various water stress and temperature conditions. *Experimental Botany* v. 76: 119-31.
- BORRILL, M. (1962). The experimental taxonomy of *Anthoxanthum* species. *Proceedings of the Linnean Society of London* 1960, 106–09.
- CATALAN, P., MULLER, J., HASTEROK, R., JENKINS, G., MUR, L. A. J., LANGSON, T., BETEKHTIN, A., SIWINSKA, D., PIMENTEL, M., LÓPEZ-ÁLVAREZ, D. (2012). Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. (Poaceae). *Annals of Botany* v. 109: 385-05.
- CLEVINGER, J. & PANERO, J. L. (1999). Phylogenetic analysis of Silphium and subtribe Engelmanniinae (Asteraceae: Heliantheae) based on ITS and ETS sequence data. *American Journal of Botany* v. 87: 867-72.
- CUADRADO, A. E. & JOUVE, N. (1994). Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6Xtricale. *Chrom. Res.* 2: 331-338.
- DAHLGREN, R. M. T., CLIFORD, H. T. & YEO, P. F. (1985). The families of the monocotyledons Structure, Evolution and Taxonomy. Springer Verlag. Berlín.
- DARLINGTON, C. D. S. & LA COURT, L. F. (1969). The handling of chromosomes. Allen Sunwin Ltd. London.
- DARWIN, C. (1859). On the Origin of Species by Means of Natural selection, or, the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. London.
- DELGADO, L. M., LASTRA, M. U., LEONOR, M., ANGEL, M. (2010). Standardization of Cytogenetic Techniques “SQUASH” for Counting of Mitotic Chromosomes in *Rubus glaucus* Benth. v. 46: 74-9.
- ÉDER-SILVA, E.; FELIX, L. P. & BRUNO, R. L. A. (2007). Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29:110-14.
- EDGAR, E., CONNOR, H.E. (2010). *Flora of New Zealand*, Vol. 5, 2nd edn. Lincoln: Manaaki Whenua Press.
- FELBER, F. (1993). Présence de trois taxons pérennes d'*Anthoxanthum odoratum* L. en Corse. *Candollea*, v. 48: 582–91.
- FELGROVÁ, M. & KRAHULEC, F. (1999). *Anthoxanthum odoratum* and *A. alpinum*: life history parameters at two different altitudes. *Folia Geobotanica*, v. 34: 19–31.
- FRAGA & VILA M. I. (1982). Aportación al estudio taxonómico de las especies de los generos Erica y Calluna presentes en Galicia. Tesis doctoral. Dpto. Biología Vegetal y Fisiología. Facultad Biología. Universidad Santiago.
- FUENTES-RAMÍREZ, A., PAUCHARD, A., MARTICORENA1, A., SÁNCHEZ, P. Relationship between the invasion of *Acacia dealbata* Link (Fabaceae: Mimosoideae) and plant species richness in South-Central Chile *Gayana Bot.* 67(2), 188-97.
- GALLEY, C. A., LINDER, H. P. (2007). The phylogeny of the Pentaschistis clade (Danthonioideae, Poaceae) based on chloroplast DNA, and the evolution and loss of complex characters. *Evolution* 61: 864–84.
- GILLESPIE, L. J., SORENG, R. J., JACOBS, S. W. L. (2009). Phylogenetic relationships of Australian Poa (Poaceae: Poinae), including molecular evidence for two new genera, Saxipoa and Sylvipoa. *Australian Journal of Botany* v. 22:413–36.

- HEDBERG, I. (1964). Pubescence – a spurious taxonomic character in *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. *Svensk Botanisk Tidskrift* v. 58: 237–41.
- HEDBERG, I. (1976). A cytotoxic taxonomic reconnaissance of tropical African *Anthoxanthum* L. (Graminae). *Botanisk Notiser* v. 129: 85-0.
- HEDBERG, I. (1990). Morphological, cytotoxic taxonomic and evolutionary studies in *Anthoxanthum odoratum* L. s.l.- a critical review. *Sommerfeltia* v. 11: 97–07.
- HSIAO, C., CHATTERTON, N. J., ASAY, K. H., JENSEN, K. B. (1995). Molecular phylogeny of the Pooideae (Poaceae) based on nuclear rDNA (ITS) sequences. *Theoretical and Applied Genetics* v. 90: 389–98.
- HUELSENBECK, J. P., RONQUIST, F., (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* v. 17, 754–55.
- JONES, K. (1964). Chromosomes and the origin of *Anthoxanthum odoratum* L. *Chromosoma* v. 15: 248–74.
- LEUNG, B., LODGE, D. M., FINNOFF, D., SHOGREN, J. F., LEWIS, M. A., & LAMBERTI, G. A. (2002). An ounce of prevention or a pound of cure: bioeconomic risk analysis of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 269, 2407–2413.
- LÓPEZ-GONZÁLEZ, G. (1994). Nota sobre el género *Anthoxanthum* L. (Gramineae). *An. Jard. Bot. Madrid*. v. 51.2: 309-12.
- MANZ, B., MÜLLER, K., KUCERA, B., VOLKE, F. & LEUBNER-METZGER, G. (2005). Water Uptake and Distribution in Germinating Tobacco Seeds Investigated in Vivo by Nuclear Magnetic Resonance Imaging. *Plant Physiology*. v. 138:1538–51.
- MIFSUT, I. J. M. Y JIMÉNEZ, M. M. (2007). Especies invasoras de alto impacto a la biodiversidad, prioridades en México. The nature conservancy.
- NYLANDER, J. A. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala: Uppsala University. <https://github.com/nylander/MrModeltest2>.
- PAUNERO, E. (1953). Las especies españolas del género *Anthoxanthum* L. *Anales del Instituto Botánico AJ Cavanilles* 12: 401–42.
- PENFIELD, S., EVE-MARIE J., KANNANGARA, R. GILDAY, A. D., HALLIDAY, K. J., GRAHAM, I. A. (2005). Cold and Light Control Seed Germination through the bHLH Transcription Factor spatula *Current Biology*, v. 15:1998–06.
- PIMENTEL, M. & SAHUQUILLO, E. (2003). An approach to the study of morphological relationships among the sweet vernal grasses (*Anthoxanthum* L. Poaceae, Pooideae) in the Iberian Peninsula. *Bocconeia* v. 16: 731–37.
- PIMENTEL, M. & SAHUQUILLO, E. (2008). Relationships between the close congeners *Anthoxanthum odoratum* and *A. alpinum* (Poaceae: Pooideae) assessed by morphological and molecular methods. *Botanical Journal of the Linnean Society* v. 156: 237–52.
- PIMENTEL, M. P (2005). Estudio taxonomico y biogeografico de las especies europeas del género *Anthoxanthum* L. (Poaceae: Pooideae: Avenae) Tesis doctoral. Dpto. Biología Vegetal y Fisiología. Facultad Biología. Universidad da Coruña.
- PIMENTEL, M., & SAHUQUILLO, E. (2007). Intraspecific variation and phylogeography of the high polyploid Iberian endemic *Anthoxanthum amarum* Brot. (Poaceae: Pooideae) assessed by random amplified polymorphic DNA markers (RAPDs) and morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society* v. 155:179–92.
- PIRIE, M. D., HUMPHREYS, A. M., BARKER, N. P., LINDER, H. P. (2009). Reticulation, data combination, and inferring evolutionary history: an example from Danthonioideae (Poaceae). *Systematic Biology* v. 58: 612–28.
- POGGIO, L., GONZÁLEZ, G., FERRARI, M. R., GARCÍA, A. M., WULFF A., GREIZERSTEIN, E., TÓMAS, P. SCHRAUF, G. (2010). Aportes de la citogenética al estudio de genomas vegetales. Volume 5, Capítulo 1. In: 8 Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argenbio, Buenos Aires.
- RAMBAUT, A. (2012). FigTree v.1.4.0. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

- RONQUIST, F., HUELSENBECK, J. P., VAN DER MARK, P. (2005). MrBayes 3.1 Manual. San Diego: University of California at San Diego. <http://mrbayes.sourceforge.net/wiki/index.php/Manual>.
- SAHUQUILLO, E., CAJADE, D. & FRAGA, M. (2001). Taxonomic revision of *Hedera* L. species from the NW Iberian Peninsula. *Bol. Soc. Brot.* v. 70: 89-00.
- SAUCEDO, S. M. C., MORENO, T. A., HUBER-SANNWALDA, E., RIVASA, J. F. (2009). Comparación en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas entre gramíneas nativas y exóticas del pastizal semiárido Seed germination and seedling growth in native and exotic grasses in the semiarid grasslands of Northern Mexico. *Nativas* v. 47(3):299-12.
- SCHOUTEN, Y. & VELDKAMP, J. F. (1985). A review of *Anthoxanthum* including *Hierchlöe* (Gramineae) in Malesia and Thailand. *Blumea*. v. 30: 319-51.
- STUESSY, F. O. D. F. (1990). Plant taxonomy: a sistematic evolution of comparative data. New York, Columbia University Press.
- SUÁREZ, M.A., ALVARADO-CAPÓ, Y., CRUZ-MARTÍN, M., LEIVA-MORA, M., SÁNCHEZ-GARCÍA, C., BERKIS R., QUIALA, E., CHÁVEZ, M., JIMÉNEZ-TERRY, F., MARIANA, L. A O., BARBÓN, R., COLLADO, R., RODRÍGUEZ, M., PÉREZ, M. (2009). Microbiota de plantas donadoras y hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* de cinco especies forestales *Artículo Científico Biotecnología Vegetal* v. 9(2):99-03.
- SWOFFORD, D. L. (2002). PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- TABERLET, P., GIELLY, G., PAUTOU, G., BOUVET, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* v. 17: 1105-09.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. v. 30(12): 2725-29.
- TEPPNER, H. (1970). Karyotypen europäischer, perennierender Sippen der Gramineen-Gattung *Anthoxanthum*. *Österreichische Botanische Zeitschrift*. v. 118: 280-92.
- TOMÉ, A., TEILLIER, S. & HOWARTH (2007). Contribución al conocimiento de la flora vascular de la Reserva Nacional Tamango, XI Región de Aisén, Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural de Santiago*. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural* v. 56:9-25.
- TORRECILLA, P., LÓPEZ-RODRÍGUEZ, J. A., STANCIK, D., CATALAN, P. (2003). Systematics of *Festuca* sects. *Eskia* Willk., *Pseudotropis* Kriv., *Amphigenes* (Janka) Tzvel., *Pseudoscariosa* Kriv. and *Scariosae* Hack. Based on analysis of morphological characters and DNA sequences. *Plant Systematics and Evolution* v. 239: 113-39.
- TORREJÓN, F., CISTERNAS, M., ARANEDA, A. (2004). Efectos ambientales de la colonización española desde el Río Maullín al archipiélago de Chiloé, sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* v.77: 661-77.
- TOVAR, O. (1993). Las gramíneas (Poaceae) del Perú. *Ruizia* v. 13:1-480.
- TUTIN, T. G. (1980). *Anthoxanthum* L. In: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A. eds. *Flora Europaea*, Vol. 5. Cambridge: Cambridge University Press, 229-30.
- VALDÉS, B. (1973). Revisión de las especies anuales del género *Anthoxanthum* (Graminae). *Lagascalía* v. 3: 99-41.
- VARGAS-CASTILLO, M. P. ESQUIVEL, A. A. (2010). Cultivo *in vitro* DE *Geophila macropoda* (Ruiz & Pav. DC) a partir de embriones cigóticos. *Agronomía mesoamericana* v. 21(1):73-3.
- VITOUSECK, P. M., D'ANTONIO, C. M., LOOPE, L., REJMANECK, M., WESTBROOKS, R. (1997). Introduced species: A significant component of human-caused global change. *NZ J Ecol* v. 21(1):1-16.

Anexo: Tabla de especies utilizadas para estudios filogenéticos y localización por país. *A. gracile* outgroup.

| Nº individuo | Especie | Localidad |
|----------------|---------------------|---|
| 1, 2, 3 | <i>A. odoratum</i> | Iglesia Compu. Pastizal junto Iglesia. Isla Chiloé |
| 4 | <i>A. odoratum</i> | Escuadrón. Coronel. Concepción |
| 5, 6, 7, 8 | <i>A. odoratum</i> | Hostería Rotonda del Cautín. Manzanales. Curacautín-Lonquimay |
| 9, 10 | <i>A. odoratum</i> | Antes de Caleta el Molinar. Niebla. Valdivia |
| 11, 12 | <i>A. odoratum</i> | Lago Ranco. Carretera a Rupameica. Valdivia |
| 13, 14, 15, 16 | <i>A. odoratum</i> | Los Liles. Castro carretera Chaihuin al bosque de alerce. Valdivia |
| 17 | <i>A. odoratum</i> | Herbario Herbeton |
| 18 | <i>A. odoratum</i> | Portugal: Guarda: Serra da Estrela: Antes de chegar a Famalição |
| 19, 20 | <i>A. odoratum</i> | Portugal: Bragança: Parque de Montesinho: Estrada de Rabal a Baçal |
| 21 | <i>A. odoratum</i> | España: Asturias: Pesoz: Área recreativa de Pesoz |
| 22 | <i>A. odoratum</i> | España: Comunidad Valenciana: Castellón: La Pobla de Benifassà: El Boixar |
| 23 | <i>A. odoratum</i> | España: Aragón: Huesca: Benasque: La Renclusa. vn |
| 24 | <i>A. odoratum</i> | España: Galicia: Lugo: Sarria |
| 25 | <i>A. odoratum</i> | España: Galicia: Folgoso do Courel: Taro Blanco |
| 26 | <i>A. odoratum</i> | España: Galicia: Ourense: Pena Trevinca |
| 27 | <i>A. odoratum</i> | España: Castilla-León: Salamanca, La Alberca |
| 28 | <i>A. odoratum</i> | Francia: Hautes Alpes: Col de Lautaret. vn |
| 29 | <i>A. odoratum</i> | Irlanda: Wicklow County: Carrigoona. vn |
| 30 | <i>A. odoratum</i> | Irlanda: Dublin County: Carrickgollogan. vn |
| 31, 32 | <i>A. odoratum</i> | Irlanda: Little Sugar Loaf |
| 33 | <i>A. alpinum</i> | Suecia: Norrbotten: 10 Km N Björkliden. Vn. |
| 34 | <i>A. alpinum</i> | Suecia: Dalarna: Nipfjället |
| 35 | <i>A. alpinum</i> | Francia: Hautes Alpes: Col de Galibier |
| 36 | <i>A. alpinum</i> | Francia: Hautes Alpes: Pico Brèvent |
| 37 | <i>A. alpinum</i> | República Checa: Hrubý Jeseník Mts., Vysoká Hole Mt |
| 38 | <i>A. alpinum</i> | República Checa: Rokytnice: Jehlanka chalet. Vn. |
| 39, 40, 41, 42 | <i>A. odoratum</i> | República Checa: Mocky Dül Valley, meadow 1040 msm |
| 43 | <i>A. amarum</i> | Portugal: Viseu: Oliveira de Frades: Souto de Lafões |
| 44 | <i>A. amarum</i> | Portugal: Guarda: Almeida: Castelo Bom |
| 45 | <i>A. amarum</i> | Portugal: Viseu: Caramulo: Cabeço da Neve |
| 46 | <i>A. amarum</i> | Portugal: Aveiro: Águeda: Redonda |
| 47 | <i>A. amarum</i> | España: Asturias: Grandas de Salime: La Coba |
| 48 | <i>A. amarum</i> | España: Asturias: Carretera de Taramundi a Teixoes |
| 49 | <i>A. amarum</i> | España: Galicia: A Coruña: Zas |
| 50 | <i>A. amarum</i> | España: Galicia: Ferrol: Monte Esperón |
| 51, 52 | <i>A. aristatum</i> | España: Galicia: Palas de Rei: Castelo de Pambre |
| 53, 54 | <i>A. aristatum</i> | España: Galicia: Baiona: Cabo Silleiro |
| 55, 56, 57 | <i>A. ovatum</i> | Italia: Cerdeña: Bunia |
| 58, 59, 60 | <i>A. ovatum</i> | Italia: Cerdeña: Iglesias: Fluminimaggiore |
| 61, 62, 63, 64 | <i>A. ovatum</i> | Grecia: Crete: Omalos Plain |
| 65 | <i>A. ovatum</i> | España: Andalucía: Cádiz: Jerez de la Frontera: Puerto de Gáliz |
| 66 | <i>A. ovatum</i> | España: Madrid: El Paular |
| 67, 68 | <i>A. ovatum</i> | España: Andalucía: Huelva: Doñana National Park: El Acebuche |

| | | |
|--------|-------------------------|---|
| 69, 70 | <i>A. ovatum</i> | Marruecos: Carretera Tanger-Rabat, Boukhalef Sovahel, a 15 Km de Tanger cerca del Clube Tánger TIR. |
| 71 | <i>A. ovatum</i> | Marruecos: Carretera Tiflet-Si AifaelBahraoui: Bosque de Mamora |
| 72, 73 | <i>Anthoxanthum sp.</i> | España: Islas Canarias: Santa Cruz de Tenerife: La Palma. vn |
| 74 | <i>A. gracile</i> | Italia: Cerdeña: Orune |
