



# Estudio citotaxonómico de *Helianthemum squamatum* y *H. syriacum* (*Cistaceae*)

Ana Valdés Florido

Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla



Trabajo de Fin de Grado

Grado en Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

Estudio citotaxonómico de *Helianthemum squamatum* y *H. syriacum* (Cistaceae)

Alumna: Ana Valdés Florido

Tutor: Abelardo Aparicio Martínez

Departamento de Biología Vegetal y Ecología

Trabajo experimental

Sevilla, 8 de junio de 2017

*En agradecimiento al departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Facultad de Farmacia (Universidad de Sevilla) y a los Servicios Generales de Investigación de la US (CITIUS) por la ayuda prestada.*

## Resumen

Los estudios citotaxonómicos de especies vegetales suponen una herramienta muy útil para analizar procesos evolutivos. Desde inicios del siglo XX el número, tamaño, morfología, el comportamiento de los cromosomas durante los procesos de mitosis y meiosis e incluso el tamaño del genoma han proporcionado abundante información en este sentido. Este proyecto se centra en el estudio citotaxonómico de *Helianthemum squamatum* y de *H. syriacum*, dos especies pertenecientes a la familia *Cistaceae*. Consiste en el análisis de las divisiones mitóticas y meióticas de ambas especies, en la elaboración y análisis del cariograma y la morfometría de los cromosomas, además de en la estimación del tamaño de sus genomas correspondientes mediante citometría de flujo.

Habitualmente se ha interpretado que las especies con bajo número de cromosomas corresponden a especies ancestrales, a partir de las cuales, mediante diferentes procesos de dispoloidía y/o poliploidía, ha ido aumentando el número cromosómico con la diversificación de nuevas especies. Por ello, trabajos previos sugieren que *H. squamatum* es una especie ancestral por su bajo número de cromosomas ( $2n=10$ ) y sitúan a *H. syriacum* como derivada, ya que tiene  $2n=20$ , número propio en el género *Helianthemum*. Sin embargo, recientes estudios filogenéticos sitúan ambas especies como especies hermanas derivadas.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es realizar el estudio citotaxonómico de ambas especies para confirmar la hipótesis de que *H. squamatum* es una especie derivada del género y para investigar el proceso de reducción del número de cromosomas recabando información detallada sobre la morfología y el comportamiento de los mismos durante la meiosis y la mitosis.

Los resultados obtenidos muestran que tienen un cariotipo similar, sin encontrar diferencias significativas en la morfología, tamaño de los cromosomas y en el tamaño del genoma. Por otra parte, en el estudio meiótico de *H. squamatum* se ha demostrado que tiene lugar una división asináptica, en la que se presentan univalentes en diacinesis, hecho infrecuente en las especies vegetales.

**Palabras clave:** citotaxonomía, cariotipo, tamaño del genoma, citometría de flujo

## Índice

1. Introducción .....	6
2. Material y métodos .....	11
2.1. Material vegetal necesario .....	11
2.2. Tratamiento previo: procedimiento antimitótico y fijación .....	11
2.2.1. Tratamiento previo para el estudio de las divisiones mitóticas .....	12
2.2.2. Tratamiento previo para el estudio de las divisiones meióticas.....	12
2.3. Tinción .....	12
2.4. Visualización al microscopio óptico .....	12
2.5. Elaboración del cariograma .....	13
2.6. Citometría de flujo .....	14
3. Resultados y discusión .....	15
3.1. <i>Helianthemum squamatum</i> .....	15
3.2. <i>Helianthemum syriacum</i> .....	19
3.3. Citometría de flujo .....	22
4. Conclusiones .....	24
5. Bibliografía .....	25

## 1. Introducción

Desde inicios del siglo XX la citotaxonomía constituye una herramienta esencial para el estudio de la evolución vegetal, ya que se basa en el análisis de cariotipos de diferentes especies para tratar de extraer las posibles relaciones existentes entre ellos e inferir los procesos evolutivos que hayan tenido lugar (Stebbins, 1950). El número, tamaño, morfología y el comportamiento de los cromosomas durante los procesos de división celular (mitosis y meiosis), así como en el propio contenido de ADN del núcleo celular (i. e. tamaño del genoma), son los parámetros citotaxonómicos más importantes cuyo análisis comparativo permite comprender la historia evolutiva de diferentes especies o linajes (Levin, 2002; Shan et al., 2003; Soltis et al., 2005; Clarindo et al., 2012; Amaral- Silva et al., 2016).

El análisis del tamaño y de la morfología de los cromosomas proporciona información muy útil para comprender e interpretar dichos procesos evolutivos. Así, los estudios cariológicos observan y comparan diferentes características de los cromosomas tales como la diferencia en el tamaño absoluto de los cromosomas, las diferencias en la posición del centrómero, en el tamaño relativo y en el número y posición de los satélites, entre otras. De igual forma, se estudia la simetría o asimetría del cariotipo. Este concepto fue desarrollado por Levitsky (Levitsky, 1931), que definió que un cariotipo simétrico es aquel en el que los cromosomas tienen todos un tamaño semejante y tienen centrómeros en la región mediana o submediana. Por otra parte, un cariotipo asimétrico será aquel que es heterogéneo en cuanto al tamaño de los cromosomas y la posición de los centrómeros. La asimetría irá aumentando conforme los centrómeros pasen de medianos a terminales o subterminales o con el acúmulo de diferencias en el tamaño relativo entre los cromosomas (Stebbins, 1971). A mediados del siglo XX se consideraba que existe una tendencia en las plantas con flores a incrementar su asimetría con la especialización, lo que ocurre en géneros como *Crepis*, *Aster* (Huziwara, 1959) y *Haplopappus* (Stebbins, 1971). Sin embargo, en la actualidad hay numerosas evidencias de que no siempre ocurre esto (Levin, 2002).

En particular, los procesos que suponen un aumento o disminución del número cromosómico han sido con mucha frecuencia objeto de estudio desde una perspectiva evolutiva. Por una parte, las primeras teorías citotaxonómicas contemplaron que el cambio del número cromosómico debería ser ascendente, correspondiendo el número cromosómico ancestral de un linaje con el número cromosómico más bajo del mismo y tendiendo a incrementar mediante procesos de disiploidía y/o poliploidía (Stebbins, 1950). Sin embargo, hoy día existen

numerosos casos documentados, como por ejemplo en *Podolepis*, *Brachyscome*, *Allium*, *Myosotis*, *Artemisia* o *Ranunculus*, en los que este cambio ha operado en sentido inverso, es decir, disminuyendo el número cromosómico, así como el tamaño del genoma, con la especiación (Diosdado y Pastor, 1996; Watanabe et al., 1999; Konishi et al., 2000; Levin, 2002; Soltis et al., 2005). En éstos y otros géneros (por ejemplo, *Crepis*, *Calotis* o *Haplopappus*) se ha constatado que el cambio del número de cromosomas está asociado a cambios ecológicos pero también biológicos, como, por ejemplo, la aparición de especies de corta vida (anuales) a partir de especies de larga vida (perennes) en ecosistemas áridos, estando esta modificación asociada a una reducción en el número de cromosomas (Babcock, 1947; Jackson, 1962; Smith, 1966; Stace, 1978, 1982; Levin, 2002).

Se conocen diversos mecanismos que explican el modo en que se produce el cambio de la estructura y número de cromosomas tales como inserciones, inversiones, deleciones o traslocaciones, además de fusiones y fisiones robertsonianas (Schubert y Lysak, 2011). En las fusiones se produce, en primer lugar, la rotura por el centrómero de dos cromosomas no homólogos acrocéntricos, a lo que sigue la fusión de los brazos largos y de los brazos cortos para originar un cromosoma metacéntrico largo y otro cromosoma metacéntrico corto. Aunque este proceso en sí mismo no varía el número de cromosomas, es frecuente, sin embargo, que se pierda el cromosoma generado por la fusión de los brazos cortos causando que, cuando haya fusión de gametos con la misma dotación génica, se originen homocigotos con número base menor que el original. Si este proceso de fusión ocurriera de forma progresiva, se podría dar una disminución constante del número de cromosomas. Por otra parte, en el caso de las fisiones se produce la rotura de los cromosomas por el centrómero y por cada fisión que se produzca se aumentará en uno el número de cromosomas base. Se ha visto que este tipo de modificaciones suele darse, sobre todo, en cromosomas metacéntricos de brazos largos (Levin, 2002).

El tamaño del genoma es también un parámetro muy relevante en biología evolutiva desde que puede medirse de una forma precisa tras el desarrollo de las técnicas de citometría de flujo (Loureiro et al., 2010). El tamaño del genoma es la cantidad de ADN que se encuentra en un juego cromosómico gamético no replicado y se representa como “valor-C” (Soltis et al., 2005). Se trata de la cantidad de ADN nuclear 2C dividido por el nivel de ploidía de la especie, lo que sería equivalente al valor-C en especies diploides (Bennet et al., 1998).

Es de destacar que los procesos que conducen al aumento o a la disminución del tamaño de genoma pueden incluir o no cambios en el número de cromosomas según han comprobado

diversos estudios citotaxómicos y cariológicos en diferentes especies. Algunos de ellos sugieren que la diferencia en el tamaño del genoma se debe a la presencia de transposones en las secuencias de ADN, ya que estas unidades son las responsables de la mayor parte de las mutaciones que se producen en ellas. Se propone que no son eventos específicos de ninguna familia, sino que se dan de forma repentina de una generación a la siguiente (Wendel, 2010). Por otra parte, la disminución del tamaño del genoma se debe principalmente a deleciones, las cuales varían mucho entre especies.

El género *Helianthemum* Miller es uno de los 8 géneros que incluye la familia *Cistaceae*. Integrado por los subgéneros *Helianthemum* y *Plectolobum* Willk., está compuesto por alrededor de 130 especies y subespecies que se distribuyen por las zonas subtropicales y templadas del Hemisferio Norte y, puntualmente, América del Sur (Arrington y Kubitzki, 2003). Desde un punto de vista taxonómico es un género muy complejo debido a que los principales caracteres diagnósticos suelen variar mucho en una misma población como consecuencia de, entre otras causas, fenómenos de hibridación e introgresión (López-González, 1992). Estudios filogenéticos recientes (Parejo-Farnés et al., 2013; Aparicio et al., 2017) han mostrado que se trata de un género monofilético integrado por tres clados principales apoyados estadísticamente en concordancia con la taxonomía del género, pero que las especies se encuentran formando politomías con muy bajo apoyo debido a fenómenos de especiación reciente sin diversificación genética. Entre los clados apoyados figura un linaje de carácter no ancestral integrado por dos especies hermanas *H. syriacum* (Jacq.) Dum. Cours. (Figura 1) y *H. squamatum* (L.) Dum. Cours. (Figura 2).

Este es un hecho relevante y digno de investigación, ya que diversos autores han sugerido que *H. squamatum*, con el número más bajo de cromosomas en el género ( $2n = 10$ ), debería corresponder a un grupo ancestral y no derivado (Azevedo y Lorenzo, 1948; López-González, 1992). Por su parte, *H. syriacum* presenta el número cromosómico propio de todo el subgénero *Helianthemum* con  $2n = 20$ . Cabría esperar que estas especies hermanas no ancestrales en el género tuviesen ambas el número cromosómico del género  $2n = 20$ , sin embargo, todos los estudios cariológicos realizados hasta el momento indican que ambas especies tienen números cromosómicos diferentes.

El proyecto realizado se centra en el estudio del genoma de *H. squamatum* y de *H. syriacum*. Mientras que *H. syriacum* es una especie de distribución circunmediterránea y ecología más o menos generalista y, como se ha mencionado anteriormente, presenta el número cromosómico propio del subgénero *Helianthemum* ( $2n=20$ ), *H. squamatum* crece



exclusivamente sobre suelos yesíferos de la Península Ibérica y del norte de África (Argelia) (López-González, 1993) y presenta el más bajo número de cromosomas conocido en el género con un número gamético  $n=5$  (Azevedo y Lorenzo, 1948; Valdés-Bermejo, 1980) ya que el resto de las especies tienen  $n=10, 11$  o  $12$  (c. f. Rice et al., 2015).

En concordancia con las primeras ideas citotaxonómicas, por su bajo número de cromosomas se ha considerado que *H. squamatum* debería representar una línea antigua de evolución en el género y que mediante cruzamientos, disploidía ascendente y poliploidía ha derivado el número cromosómico de las especies restantes del género (Azevedo y Lorenzo, 1948; López-González, 1992). Pero, como se ha mencionado, este hecho no encuentra apoyo en recientes estudios filogenéticos basados en el análisis de secuencias de ADN nuclear y plastidial (Parejo-Farnés et al., 2013; Aparicio et al., 2017) lo que abre la puerta para plantear la hipótesis de que no siendo *H. squamatum* una forma ancestral en el género, su número cromosómico sea consecuencia de una drástica reducción del mismo a partir de un número más elevado. Además, los estudios meióticos realizados hasta el momento han mostrado que mientras que en *H. syriacum* la meiosis es un proceso regular, en *H. squamatum* no lo es del todo. Se ha observado en *H. squamatum* que durante la división meiótica al menos se producen repartos irregulares de cromosomas (Azevedo y Lorenzo, 1948).

Como estudio complementario que pueda proporcionar mayor información sobre este hecho se ha analizado el tamaño del genoma de ambas especies mediante citometría de flujo. Desde que se comenzó a estudiar el tamaño del genoma de especies vegetales en la década de los 50 se ha sostenido que éste tiene una relación muy cercana con el número de cromosomas. Esto ha sido así ya que los primeros estudios realizados proponían que el número de cromosomas base de angiospermas era bajo, entre  $n=6$  y  $9$  (Ehrendorfer et al., 1968; Stebbins 1971; Walker, 1972; Raven, 1975) y que el tamaño de genoma original de angiospermas también lo era (Leitch et al., 2002; Soltis et al., 2003). Sin embargo, con los sucesivos estudios realizados se ha visto que el tamaño del genoma puede variar independientemente del número de cromosomas (Soltis et al., 2005).

Así, la hipótesis que se plantea en este proyecto es que el bajo número de cromosomas en *H. squamatum* ( $2n=10$ ) se debe a una reducción drástica del número a partir de ancestros con  $2n=20$ , y que esta reducción ha podido tener efectos en la morfología y comportamiento de los cromosomas así como en el propio tamaño del genoma. El objetivo de este proyecto es, en consecuencia, investigar este proceso recabando información detallada sobre la morfología y el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis y la mitosis, así como estimar el

tamaño del genoma de *H. squamatum* y *H. syriacum*, dos especies hermanas desde el punto de vista filogenético. En principio podría pensarse que el tamaño del genoma en *H. squamatum* ( $2n=10$ ) fuese la mitad que *H. syriacum* ( $2n=20$ ), aunque ello implicaría la pérdida de una importante cantidad de información genética.



Figura 1. *Helianthemum syriacum* (Jacq.) Dum. Cours

A



B



Figura 2. *Helianthemum squamatum* (L.) Dum. Cours. A, planta completa; B, detalle de la flor.

## 2. Material y métodos

En el presente apartado se describirá cómo y cuándo se obtuvieron las muestras, cuáles fueron los procesos antimitóticos y de fijación y, seguidamente, se detallarán los procedimientos utilizados para teñir el material y visualizarlo bajo microscopía óptica. Asimismo, se detallará cómo se trabajó el cariograma y los pasos que se siguieron en la citometría de flujo.

### 2.1. Material vegetal necesario

Para el estudio del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis se utilizaron botones florales, ya que en las anteras en desarrollo es donde se están produciendo las microsporas haploides (i. e. granos de polen uninucleados) mediante divisiones reduccionales (meiosis). Para el estudio del número y morfología de los cromosomas somáticos se utilizaron meristemas radicales, donde existe una alta tasa de divisiones somáticas o mitosis. Para ello se recolectaron de una población natural en el campo (1) botones florales de *H. squamatum* y *H. syriacum* en fase de desarrollo y (2) semillas maduras de ambas especies. La localidad de la población estudiada es: Granada, Escúzar, matorrales sobre yesos, 925 msm, 37.05583N, 3.76131W. Fueron recogidas por A. Valdés-Flrido, RG. Albaladejo, S. Martín-Hernanz y E. Rubio. Los botones florales fueron recogidos el 21 abril de 2016 y las semillas el 6 julio de 2016.

### 2.1. Tratamiento previo: procedimiento antimitótico y fijación

Para llevar a cabo el estudio cariológico es necesario tratar el material antes de su observación al microscopio óptico. El tratamiento previo fue realizado en dos fases: el procedimiento antimitótico y la fijación.

El procedimiento antimitótico consiste en tratar la muestra para evitar la formación del huso acromático, asegurando así una mayor cantidad de células en metafase y que se facilite la observación de los cromosomas (Sharma y Sharma, 1965).

La fijación tiene como objetivo mantener la disposición de los orgánulos que se encuentran en el interior de la célula conservando la estructura celular (Reig Armiñana y García Breijo, 2013). En el estudio de los cromosomas la fijación no solo favorece la visualización de los mismos, sino que también permite distinguir detalles de su morfología (Sharma y Sharma, 1965).

### 2.1.1. Tratamiento previo para el estudio de las divisiones mitóticas

Para estudiar las divisiones mitóticas, las semillas maduras de ambas especies se pusieron a germinar, habiéndolas escarificado previamente. La escarificación se llevó a cabo limándolas con papel de lija para así disminuir el tiempo de germinación al erosionar la testa y facilitar la entrada de agua en la semilla.

Obtenidas las plántulas se ensayaron las siguientes técnicas antimitóticas: (1) inmersión de los meristemas radicales en agua a 0°C durante 4 horas (Singh, 2002); (2) inmersión en hidroxiquinoleína 2 mM durante 4 horas (Tjio y Levan, 1950; Singh, 2002).

Tras el procedimiento antimitótico se procedió a la fijación con etanol (95%): ácido acético glacial (3:1) durante 3 horas (Sharma y Sharma, 1965; Singh, 2002).

Por último, se conservaron en alcohol 70% a -20°C hasta su estudio.

### 2.1.1. Tratamiento previo para el estudio de las divisiones meióticas

Para el estudio de la meiosis, los botones florales fueron fijados directamente en el campo en la solución Carnoy (etanol absoluto: cloroformo: ácido acético glacial, 5:1:1) (Sharma y Sharma, 1965; Singh, 2002).

## 2.2. Tinción

Todas las muestras fueron teñidas con carmín-alcohólico-clorhídrico (Snow, 1963) durante las 24 horas previas a su visualización al microscopio óptico.

## 2.3. Visualización al microscopio óptico

Para la visualización al microscopio óptico se recurrió a la técnica squashing (i.e. aplastamiento) (Singh, 2002). El estudio de la mitosis de algunas de las muestras se realizó introduciendo las mismas en una solución de HCl 1% (0'2 N) a 60°C durante 1 minuto, previo al procedimiento de la técnica squashing. Se observaron diferencias notables a la hora de llevar a cabo la técnica. Las muestras tratadas con dicha solución permitieron una mejor visualización y mayor facilidad para situar los cromosomas en un mismo plano.

Por último, se fotografiaron las placas mitóticas y meióticas ilustrativas. Se han observado 50 placas meióticas de *H. squamatum*, así como 110 de *H. syriacum*. En cuanto a las placas

mitóticas, se han examinado 65 placas de *H. squamatum* y 115 de *H. syriacum*. Por lo tanto, en total se han estudiado 340 placas, aproximadamente.

## 2.2. Elaboración del cariógrama

A partir de las fotografías obtenidas en la visualización mediante el microscopio óptico se emparejaron los cromosomas homólogos. El criterio utilizado para asociarlos fue el tamaño relativo de los cromosomas y la posición del centrómero.

Una vez emparejados se llevó a cabo la medida de los brazos (corto y largo) de cada cromosoma. Se calculó el cociente brazo largo/brazo corto ( $r$ ), se clasificaron según la posición del centrómero y se denominaron según el mismo parámetro.

$$r = \frac{l}{s}$$

r: ratio (cociente brazo largo/ brazo corto)  
l: longitud del brazo largo del cromosoma  
s: longitud del brazo corto del cromosoma

Las parejas de cromosomas se clasificaron morfológicamente según la equivalencia determinada por Levan et al. (1964) (Tabla 1).

Abreviatura	Localización del centrómero	Valor de r	Tipo de cromosoma
<b>M</b>	Punto medio	1,0	Metacéntrico
<b>m</b>	Región media	1,0 – 1,7	Metacéntrico
<b>sm</b>	Región submediana	1,7 – 3,0	Submetacéntrico
<b>st</b>	Región subterminal	3,0 – 7,0	Subtelocéntrico
<b>t</b>	Región terminal	7,0 - ∞	Acrocéntrico
<b>T</b>	Punto terminal	∞	Telocéntrico

Tabla 1. Equivalencia para la clasificación morfológica de los cromosomas (Levan et al., 1964).

La asimetría del cariotipo se evaluó usando el método propuesto por Romero-Zarco (1986), utilizando la fórmula:

$$A_2 = \frac{s}{x}$$

A<sub>2</sub>: índice de asimetría

s: desviación estándar

x: media del tamaño de los cromosomas

### 2.3. Citometría de flujo

La citometría de flujo es la técnica de elección actual para la estimación del tamaño del genoma en plantas por su rapidez, precisión y relativa facilidad de ejecución (Nath et al., 2014).

La realización de esta técnica se llevó a cabo con 10 plántulas de cada especie (aproximadamente 0,05 g) con cotiledones desarrollados, incluyendo *Solanum lycopersicum* cv. *Satupike* como marcador interno cuyo valor conocido de tamaño de genoma 2C es 1'96 pg ADN (Doležel et al., 1992). La suspensión de núcleos se realizó en 1 mL del buffer Galbraith-NM (Tabla 2), tal y como lo describen Nath et al. (2014).

Compuesto
45 mM MgCl <sub>2</sub>
50 mM Ácido cítrico
20 mM MOPS
0.15% v/v Triton X
pH = 8,5

Tabla 2. Composición del buffer Galbraith-NM (Nath et al., 2014) para la realización de la suspensión de núcleos para la citometría de flujo.

El material se troceó sobre una placa de Petri sobre hielo durante unos 45 segundos. La suspensión resultante se incubó durante 2 minutos y se filtró mediante un filtro con una luz de malla de 50 µm para eliminar fragmentos celulares y restos que pudieran interferir en la medida.

Tras el filtrado, se añadió 50 µg/mL de yoduro de propidio (PI) como fluorocromo, al igual que 50 µg/mL de ARN-asa para prevenir la tinción del ARN. Una vez hecho esto se incubó a 0°C en oscuridad durante 10 minutos, tras los que se procedió a su análisis en el Citómetro Analizador Flexible de Beckman Coulter, CYTOMICS FC 500-MPL (Servicios Generales de Investigación de la US, CITIUS).

Este proceso se llevó a cabo, en primer lugar, con *Solanum lycopersicum* cv. *Satupike* junto con *H. squamatum* para poder obtener la medida del tamaño del genoma de la muestra problema. A continuación, se realizó el mismo proceso con *H. squamatum* como estándar, con el dato obtenido anteriormente, y se analizó *H. syriacum*.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. *Helianthemum squamatum*

En todas las muestras estudiadas de *H. squamatum* se observan placas metafásicas con  $2n=10$  (Figura 3). En cuanto a su morfología, los cromosomas presentan aproximadamente el mismo tamaño, exceptuando una pareja que son visiblemente mayores, de 14,28 y 15, 71 µm (Figura 4, Tabla 3).

Teniendo en cuenta la diferencia de tamaño entre los brazos cortos y largos y la posición del centrómero se deduce que se trata de cromosomas cuyo centrómero está en la región mediana, es decir, son cromosomas metacéntricos. La única excepción es la pareja número 2, en la que el centrómero se encuentra en la región submediana, esto es, la longitud de sus brazos no es la misma, sino que un brazo es ligeramente mayor que el otro. Se trata de cromosomas submetacéntricos (Tabla 3).

En ellos no se encuentra ningún cromosoma SAT, descrito anteriormente por Azevedo y Lorenzo (1948).

El índice de asimetría de *H. squamatum* es de  $A_2 = 0,25$ , según la fórmula propuesta por Romero-Zarco (1986).



Figura 3. Placa metafásica de *Helianthemum squamatum*.  $2n = 10$



Figura 4. Cariograma de *Helianthemum squamatum*.  $2n=10$

Durante el estudio de la división meiótica de *H. squamatum* se observaron placas que corresponden a la diacinesis, la fase final de la profase I (Figura 5). En diacinesis, los cromosomas homólogos deben encontrarse íntimamente unidos mediante apareamiento de las hebras de ADN y quiasmas. No obstante, en *H. squamatum* se ha observado en todas las preparaciones que no existen bivalentes sino que los cromosomas homólogos están desapareados y se presentan como univalentes. Esto constituye una anomalía meiótica.



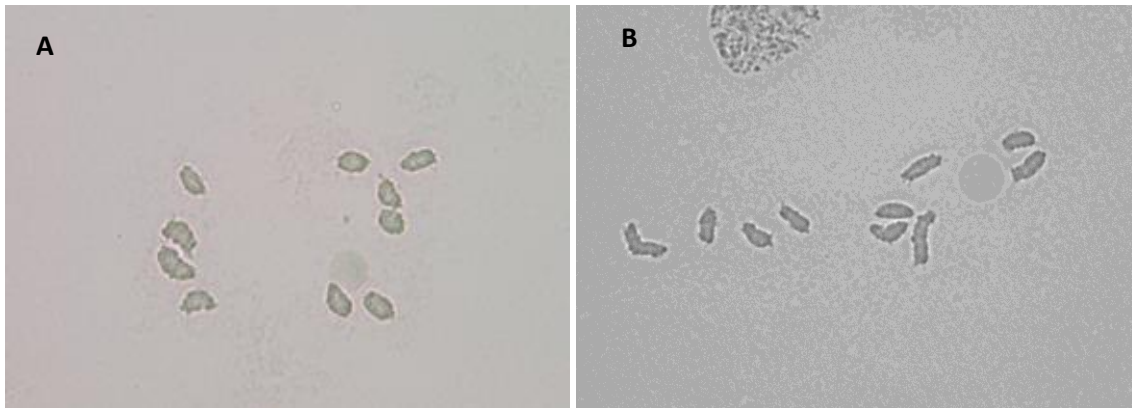


Figura 5. Placas meióticas de *Helianthemum squamatum* en la fase de diacinesis (A y B)

No obstante, en fases posteriores de la meiosis como la anafase I se ha observado un reparto casi equitativo de los cromosomas ya que la mayoría de las células estudiadas mostraron un reparto regular 5/5 de cromosomas. Con relativa frecuencia también se ha observado un reparto irregular 4/6 (Figuras 6 y 7) y es interesante destacar que no se ha observado ningún otro tipo de reparto de entre todos los posibles (0/10, 1/9, 2/8 o 3/7).



Figura 6. Placa meiótica de *Helianthemum squamatum* en Anafase I. Reparto regular a cada polo de la célula: 5 cromosomas a un polo y 5 a otro.

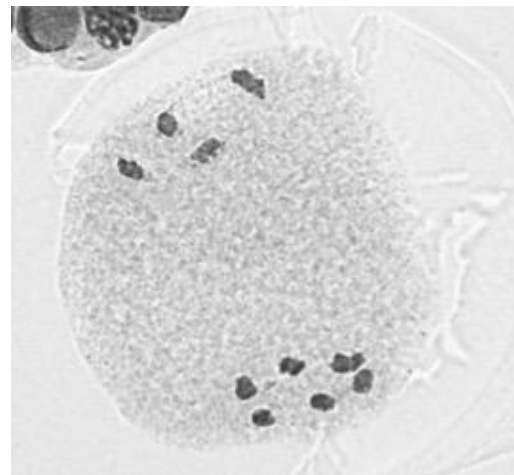


Figura 7. Placa meiótica de *Helianthemum squamatum* en Anafase I. Reparto irregular a cada polo de la célula: 6 cromosomas a un polo y 4 a otro.

Nº de Pareja	Cromosomas	Total (µm)	Brazos (µm) Corto - Largo	Ratio	Clase / Tipo de cromosoma	Tamaño medio (µm)
1	1	14,28	5,71 – 8,57	1,50	m /Metacéntrico	10,43
1	2	15,71	7,14 – 8,57	1,20	m /Metacéntrico	
2	3	10	2,85 – 7,14	2,50	sm / Submetacéntrico	
2	4	10	2,85 – 7,14	2,50	sm / Submetacéntrico	
3	5	10	4,28 – 5,71	1,33	m /Metacéntrico	
3	6	10	4,28 – 5,71	1,33	m /Metacéntrico	
4	7	10	4,28 – 5,71	1,33	m/ Metacéntrico	
4	8	10	4,28 – 5,71	1,33	m /Metacéntrico	
5	9	7,85	3,57 – 4,28	1,20	m /Metacéntrico	
5	10	7,85	3,57 – 4,28	1,20	m /Metacéntrico	

Tabla 3. Morfometría de los cromosomas metafásicos de *Helianthemum squamatum* (2n=10).

*m*: Centrómero situado en la región mediana del cromosoma

*sm*: Centrómero situado en la región submediana del cromosoma

### 3.2. Helianthemum syriacum

En los resultados obtenidos en el estudio mitótico de *H. syriacum* se puede observar que tiene  $2n=20$  (Figura 8). Al igual que en el caso de *H. squamatum*, la mayoría de los cromosomas metafásicos tienen el centrómero en la región mediana y submediana, por lo que son cromosomas metacéntricos y submetacéntricos (Figura 9, Tabla 4).

En cuanto a su tamaño medio, los cromosomas de *H. syriacum* son mayores, con  $18,14 \mu\text{m}$ , siendo los de *H. squamatum* de  $10,43 \mu\text{m}$  (Tabla 4). No obstante, esta diferencia podría deberse a cuestiones metodológicas relacionadas con el tratamiento antimitótico y es, en consecuencia, un resultado que hay que valorar con cautela. Por lo tanto, serían necesarios otros estudios a este respecto.

El índice de asimetría de *H. syriacum* es de  $A_2= 0,14$ . En comparación con el índice de asimetría de *H. squamatum*, el de *H. syriacum* es menor, por lo que su cariotipo es más simétrico ya que es más cercano a 0.



Figura 8. Placa metafásica de *Helianthemum syriacum*.  
 $2n= 20$

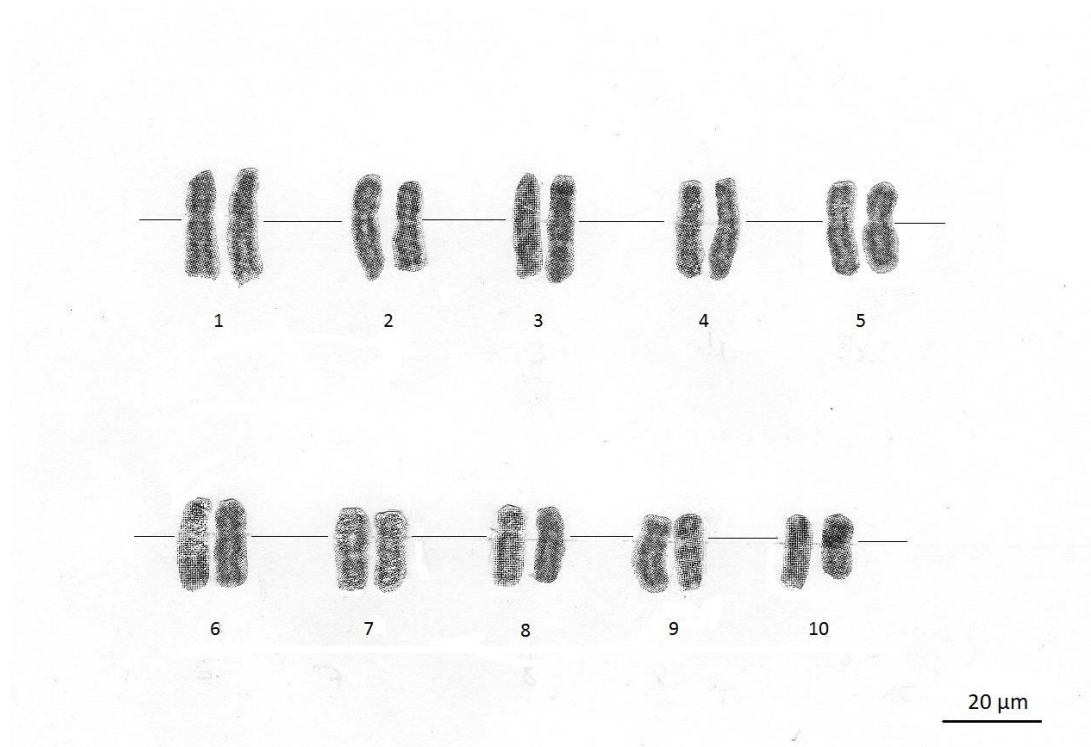


Figura 9. Cariograma *Helianthemum syriacum*.  $2n=20$

En el caso de la meiosis de *H. syriacum* se observa en todas las muestras estudiadas la formación regular de 10 bivalentes. De igual forma, se ha observado que existe un reparto regular 10/10 en la anafase I (Figura 10).

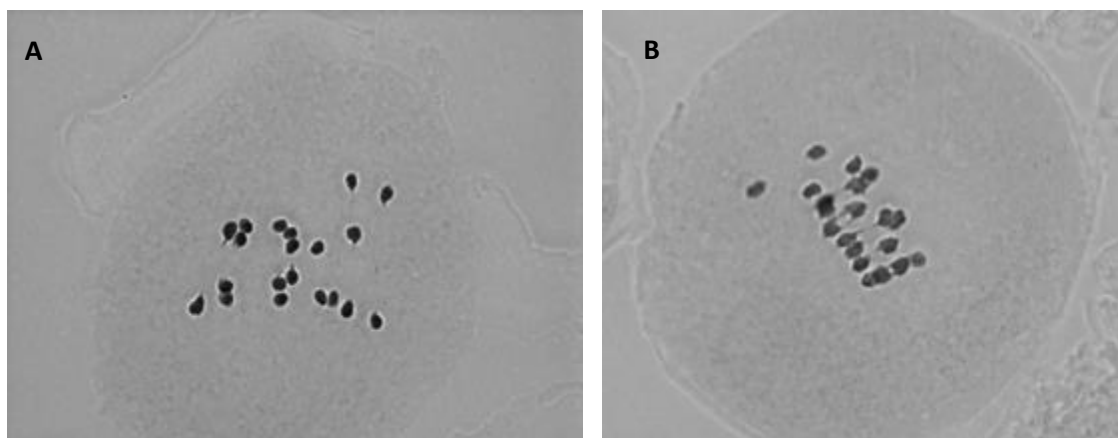


Figura 10. Placas meióticas de la anafase I de *Helianthemum syriacum* mostrando un reparto regular 10/10 (A y B).

Nº de Pareja	Cromosomas	Total (µm)	Brazos (µm) Corto - Largo	Ratio	Clase	Tamaño medio (µm)
1	1	22,85	10 – 12,85	1,28	m /Metacéntrico	18,14
1	2	22,85	10 – 12,85	1,28	m /Metacéntrico	
2	3	21,42	10 – 11,42	1,14	m /Metacéntrico	
2	4	21,42	8,57 – 12,85	1,49	m /Metacéntrico	
3	5	19,99	7,14 – 12,85	1,79	sm / Submetacéntrico	
3	6	18,38	6,56 – 11,82	1,80	sm /Submetacéntrico	
4	7	18,57	8,57 - 10	1,16	m /Metacéntrico	
4	8	18,57	8,57 - 10	1,16	m /Metacéntrico	
5	9	18,56	7,14 – 11,42	1,59	m /Metacéntrico	
5	10	18,57	8,57 - 10	1,16	m /Metacéntrico	
6	11	17,14	7,14 - 10	1,40	m /Metacéntrico	
6	12	17,14	7,14 - 10	1,40	m /Metacéntrico	
7	13	17,14	7,14 - 10	1,40	m /Metacéntrico	
7	14	17,14	7,14 - 10	1,40	m /Metacéntrico	
8	15	17,13	5,71 – 11,42	2,00	sm / Submetacéntrico	
8	16	17,13	5,71 – 11,42	2,00	sm / Submetacéntrico	
9	17	15,71	5,71 - 10	1,75	sm / Submetacéntrico	
9	18	15,71	5,71 - 10	1,75	sm / Submetacéntrico	
10	19	14,28	7,14 – 7,14	1,00	M/Metacéntrico	
10	20	12,85	5,71 – 7,14	1,25	m /Metacéntrico	

Tabla 4. Morfometría de los cromosomas metafásicos de *Helianthemum syriacum* (2n=20).

M: Centrómero situado en el punto medio del cromosoma

m: Centrómero situado en la región mediana del cromosoma

sm: Centrómero situado en la región submediana del cromosoma

### 3.3. Citometría de flujo

Una vez analizadas las muestras en el citómetro, se obtuvo un histograma en escala lineal (Figura 11), en el que se muestra en el eje de ordenadas el número de núcleos estudiados y, en el eje de abscisas, la intensidad de la luz fluorescente emitida por cada núcleo, que será proporcional al contenido de ADN del mismo.

En la figura 11 se observan los picos que corresponden con los núcleos en la fase celular  $G_0/G_1$  de *Solanum lycopersicum* cv. *Satupike* ( $2C= 1'96$  pg ADN) y a la de los núcleos de *H. squamatum*, picos E e I, respectivamente. A cada pico generado se le asigna un valor de canal medio de intensidad de fluorescencia en función de la señal detectada, a partir de los cuales se puede calcular, mediante una regla de tres, el tamaño del genoma de la muestra problema, en este caso, de *H. squamatum*. El canal medio del pico E, es decir, de *Solanum lycopersicum* cv. *Satupike* es de 60,3 y, el de *H. squamatum*, de 265. Por lo tanto:

$$\frac{1,96}{60,3} \times 265 = 8,61 \text{ pg ADN}$$

Así, el tamaño del genoma de *H. squamatum* será de  $2C = 8,61$  pg ADN.

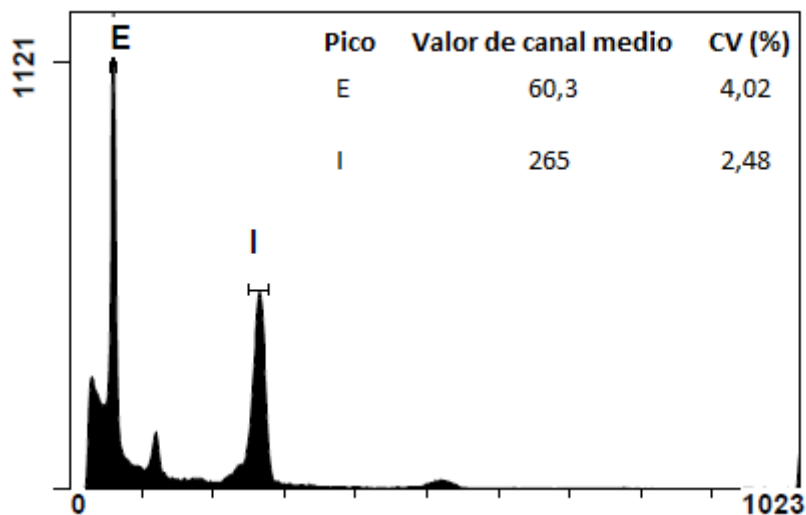


Figura 11. Histograma en escala lineal con picos  $G_0/G_1$  de *Solanum lycopersicum* cv. *Satupike* (E) y de *Helianthemum squamatum* (I).

Al analizar *H. syriacum* se obtuvo el segundo histograma (Figura 12), que corresponden a los picos de *H. squamatum* (pico C) y de *H. syriacum* (pico E). De igual forma que en el caso anterior se le asigna un valor del canal medio a cada pico, siendo para el pico C de 160 y para el pico E de 201.

Así, para el cálculo del tamaño de genoma de *H. syriacum* se procedería del mismo modo:

$$\frac{8,61}{160} \times 201 = 10,81 \text{ pg ADN}$$

El tamaño de genoma de *H. syriacum* resultó ser de  $2C = 10,81$  pg ADN.

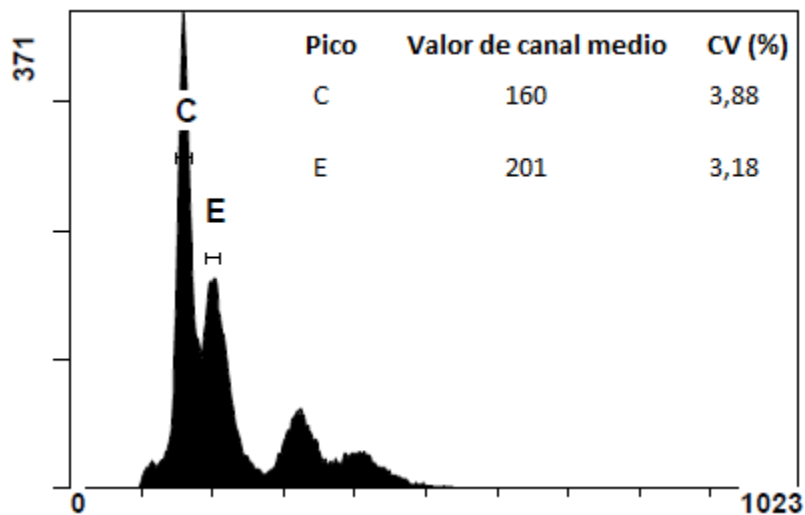


Figura 12. Histograma en escala lineal con picos  $G_0/G_1$  de *Helianthemum squamatum* (C) y de *Helianthemum syriacum* (E).

Si *H. squamatum* con  $2n=10$  cromosomas deriva de especies con  $2n=20$  cromosomas, los resultados obtenidos muestran que no ha habido una reducción a la mitad del tamaño del genoma de *H. squamatum* con respecto a *H. syriacum*, tal y como cabría esperar. Por lo tanto, la reorganización del material genético en esta especie ha debido de pasar por mecanismos de fusión cromosómica eliminando centrómeros y cantidades no significativas de ADN informativo.

#### 4. Conclusiones

Tras la realización del estudio cariológico de *H. squamatum* y de *H. syriacum* se confirma que el número de cromosomas de ambas especies es el mismo que han descrito diferentes autores anteriormente, siendo de  $2n=10$  para *H. squamatum* y de  $2n=20$  para *H. syriacum*. Los resultados obtenidos en el cariograma muestran ligeras diferencias con respecto a los realizados por otros autores (por ejemplo, Azevedo y Lorenzo, 1948).

A pesar de que haya habido una reducción del número de cromosomas de *H. squamatum* con respecto al de *H. syriacum*, no se ha observado ninguna diferencia significativa en la morfología o el tamaño de los cromosomas, ni en el tamaño del genoma. El mecanismo que podría haber tenido lugar para que se haya reducido el número de cromosomas es la fusión de los mismos. En ella se habrían eliminado 5 centrómeros sin que, por ello, se haya perdido información genética.

Un resultado muy relevante en este estudio es la constatación de la meiosis asinápica de *H. squamatum* caracterizada por la presencia de univalentes en diacinesis, aunque predominen los repartos regulares en anafase I. Este hecho tan infrecuente (Pradillo et al., 2007) podría proporcionar algún indicio sobre el mecanismo de reducción del número de cromosomas sin disminución del tamaño del genoma que en este trabajo se documenta. Para ir más allá en esta investigación sería necesario la utilización de otras técnicas cariológicas y citogenéticas más resolutivas como es FISH o hibridación fluorescente *in situ* que, mediante el marcaje de cromosomas y su visualización por fluorescencia, permitiría rastrear con más detalle el flujo de información genética durante la meiosis (Singh, 2002).



## 5. Bibliografía

- Aparicio A, Martín-Hernanz S, Parejo-Farnés C, Arroyo J, Lavergne S, Yeşilyurt EB, Zhang M, Rubio E, Albaladejo RG. Phylogenetic reconstruction of the genus *Helianthemum* (Cistaceae) using plastid and nuclear DNA-sequences: systematic and evolutionary inferences. *Taxon*. 2017; 66 (en prensa).
- Amaral-Silva PM, Clarindo WR, Carrijo TT, Carvalho CR, Praça-Fontes MM. The contribution of cytogenetics and flow cytometry for understanding the karyotype evolution in three *Dorstenia* (Linnaeus, 1753) species (*Moraceae*). *Comp. Cytogenet.* 2016; 10(1): 97–108.
- Arrington, JM, Kubitzki, K. Cistaceae. En: Kubitzki, K, editor. *The Families and Genera of Vascular Plants IV. Flowering Plants. Dicotyledons. Malvales, Capparales and Non-betain Caryophyllales*. Berlin: Springer; 2003. P 62–70.
- Azevedo Coutinho L, Lorenzo Andreu A. Contribución al estudio cariológico de la flora espontánea de la estepa de Aragón I. *Anales de la estación experimental de aula Dei*. 1948; 1: 3-32.
- Babcock, E.B. *The genus Crepis*, vols. I and II. University of California Publications on Botany, Berkeley; 1947.
- Bennet MD, Leitch IJ, Hanson L. DNA Amounts in Two Samples of Angiosperm Weeds. *Annals of Botany*. 1998; 82: 121-134.
- Clarindo WR, Carvalho CR, Mendonça MAC. Cytogenetic and flow cytometry data expand knowledge of genome evolution in three *Coffea* species. *Plant Syst Evol.* 2012; 298: 835–844.
- Diosdado JC, Pastor JE. Consideraciones citotaxonómicas del género *Ranunculus* L. (*Ranunculaceae*) en la Península Ibérica. *Anales Jard. Bot. Madrid*. 1996; 54: 166-178.

- Doležel J, Sgorbati S, Lucretti S. Comparison of three DNA flouochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Plant.* 1992; 85: 625-631.
- Ehrendorfer F, Krendl F, Habeler E, and Sauer W. Chromosome numbers and evolution in primitive angiosperms. *Taxon.* 1968; 17: 337-468.
- Huziwara Y. *Evolution.* Lancaster. 1959; 13, 188.
- Jackson RC. Interspecific Hybridization in *Haplopappus* and Its Bearing on Chromosome Evolution in the *Blepharodon* Section. *Am J Bot.* 1962; 49: 119- 132.
- Konishi N, Watanabe K, Kosuge K. Molecular Systematics of Australian *Podolepis* (*Asteraceae: Gnaphalieae*): Evidence from DNA Sequences of the Nuclear ITS Region and the Chloroplast matK Gene. *Austral. Syst. Bot.* 2000; 13: 709-727.
- Leitch IJ, Hanson L. DNA C-values in seven families fill phylogenetic gaps in the basal Angiosperms. *Bot. J. Linn. Soc.* 2002; 140: 175–179.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.* 1964; 52: 201-220.
- Levin, D A. *The role of chromosomal change in plant evolution.* New York: Oxford Series in Ecology and Evolution; 2002.
- Levitsky GA. The karyotype in systematics. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding.* 1931; 27: 220-240.
- López-González G. Apuntes para justificar el tratamiento del género *Helianthemum* Miller, s.l. (*Cistaceae*) en Flora Ibérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid.* 1992; 50: 35-63.
- López-González G. *Helianthemum*. En: S. Castroviejo S. et al. (Eds.). *Flora Ibérica.* Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC; 1993.
- Loureiro, J, Trávníček P, Rauchová J, Urfus T, Vít P, Stech M, Castro S, Suda J. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia.* 2010; 82: 3–21.

- Nath S, Mallick SK, Jha S. An Improved Method of Genome Size Estimation by Flow Cytometry in Five Mucilaginous Species of *Hyacinthaceae*. Wiley Online Library; 2014.
- Parejo-Farnés C., Albaladejo RG, Arroyo J, Aparicio, A. A phylogenetic hypothesis for *Helianthemum* (*Cistaceae*) in the Iberian Peninsula. Bot. Complut. 2013; 37: 83-92.
- Pradillo M, López E, Romero C, Sánchez-Morán E, Cuñado N, Santos JL. An Analysis of Univalent Segregation in Meiotic Mutants of *Arabidopsis thaliana*: a Possible Role for Synaptonemal Complex. Genetics. 2007; 175(2): 505-511.
- Raven PH. The Bases of Angiosperm Phylogeny: Cytology. Ann. Missouri Bot. Gard. 1975; 62 (3): 724- 764.
- Reig Armñana J, García Breijo F. Técnicas de Histología Vegetal. Laboratorio de Histología Vegetal “Julio Iranzo” Jardín Botánico de Valencia; 2013.
- Rice A, Glick L, Abadi S, Einhorn M, Kopelman NM, Salman-Minkov A, Mayzel J, Chay O, Mayrose I. The chromosome counts database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers. New Phytologist. 2015; 206: 19–26.
- Romero - Zarco C. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon. 1986; 35: 526–530.
- Schubert I, Lysak MA. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. Trends in Genetics 2011; 27(6): 207-16.
- Shan Fucheng, Yan Guijun, Plummer JA. Karyotype evolution in the genus *Boronia* (*Rutaceae*). Bot. J. Linn. Soc. 2003; 142: 309–320.
- Sharma AK & Sharma A. Chromosome techniques: theory and practice. 1º Ed. United Kingdom: Butterworths; 1965.
- Singh Ram J. Plant cytogenetics. 2º Ed. United States of America: CRC Press; 2002.

- Smith, E.B. Cytogenetics and phylogeny of *Haplopappus* section *Isopappus* (*Compositae*). *Can. J. Genet. Cytol.* 1966; 8: 14-36.
- Snow, R. Alcoholic hydrochloric acid-carmin as a stain for chromosomes in squash preparations. *Stain Tech.* 1963; 38: 9-13.
- Soltis DE, Soltis PS, Bennett D, Leitch IJ. Evolution of Genome Size in the Angiosperms. *Am J Bot.* 2003; 90(11): 1596–1603.
- Soltis DE, Soltis PS, Endress PK, Chase MW. Phylogeny and evolution in Angiosperms. 1º Ed. United States of America: Sinauer Associates; 2005.
- Stace HM. Cytoevolution in the *genus Calotis R. Br. (Compositae: Astereae)*. *Austral. J. Bot.* 1978; 26: 287-307.
- Stace HM. *Calotis (Compositae)*, a Pliocene arid zone genus? En: Barker WR and Greenslade PJM, eds. *Evolution of the Flora of Arid Australia*. Frewille (Australia): Peacock Publications; 1982. Págs 357-367.
- Stebbins GL. *Variation and Evolution in Plants*. 1º Ed. United States of America: Columbia University Press; 1950.
- Stebbins GL. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. 1º Ed. Great Britain: Edward Arnold (Publishers) Ltd; 1971.
- Tjio J-H & Levan A. The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *Anales Estacion Exper. Aula Dei (España)*. 1950; 2:21-64.
- Valdés- Bermejo E. Números cromosómicos de plantas occidentales. *Anales Jard. Bot. Madrid*. 1980; 1: 193-198.
- Walker JW. Chromosome Numbers, Phylogeny, Phytogeography of the *Annonaceae* and their bearing on the (original) Basic Chromosome Number of Angiosperms. *Taxon*. 1972; 21:57-65.

- Watanabe K, Yahara T, Denda T, Kosuge K. Chromosomal Evolution in the Genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): Statistical Tests Regarding Correlation Between Changes in Karyotype and Habit Using Phylogenetic Information. *J. Plant Res.* 1999; 112: 145-161.
- Wendel JF, Grover CE. Recent insights into mechanisms of genome size change in plants. *Journal of Botany.* 2010; 1–8.