

ASPECTOS EVOLUTIVOS DE LAS FESTUCAS DEL PIRINEO: UNA APROXIMACIÓN MOLECULAR

Pedro TORRECILLA LÓPEZ¹
Pilar CATALÁN RODRÍGUEZ²

RESUMEN.— Presentamos una primera aproximación a la reconstrucción de las relaciones de parentesco evolutivo de diez taxones de *Festuca* L. (Poaceae) que habitan en los Pirineos, incluyendo las especies endémicas de esta cadena montañosa, basándonos en análisis filogenéticos de secuencias de ADN del genoma nuclear (ITS) y cloroplástico (trnL-F). Los resultados indican la divergencia de dos linajes evolutivos, el de las «festucas de hojas anchas» (subgen. *Montanae*, sect. *Subbulbosae*, subgen. *Schedonorus*) y el de las «festucas de hojas finas» (sect. *Eskia*, sect. *Festuca*, sect. *Aulaxyper*). En este último grupo las especies de la sect. *Eskia* parecen ser más ancestrales que sus más recientemente evolucionados congéneres de las secciones *Festuca* y *Aulaxyper*.

ABSTRACT.— *A molecular approach to the evolutionary relationships among Pyrenean fescues.* We present a first approach to the reconstruction of the evolutionary relationships among ten taxa of *Festuca* L. (Poaceae) present in the Pyrenees, including endemic species to this mountain range, based on phylogenetic analysis of DNA sequences from the nuclear (ITS) and chloroplast (trnL-F) genomes. Our results indicate the divergence of two evolutionary

¹ Cátedra de Botánica Sistemática. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Av. El Limón, s/n. 456323 MARACAY, Venezuela. Torrecillap@agr.ucv.ve

² Departamento de Agricultura y Economía Agraria. Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza. Ctra. Cuarte, km 1. E-22071 HUESCA. pcatalan@unizar.es

lineages, that including «the broad-leaved fescues» (subgen. *Montanae*, sect. *Subbulbosae*, subgen. *Schedonorus*) and that including «the fine-leaved fescues» (sect. *Eskia*, sect. *Festuca*, sect. *Aulaxyper*). Within the last group, the representatives of sect. *Eskia* could be more ancestral than their more recently evolved congeners of sect. *Festuca* and sect. *Aulaxyper*.

KEY WORDS.— *Festuca*, endemics, Pyrenees, phylogenetic reconstruction, ADN sequences (ITS, trnL-F).

INTRODUCCIÓN

Festuca L. es un género de controvertida clasificación taxonómica. Los sistemas de clasificación clásicos, fundamentados en caracteres morfológicos y anatómicos (HACKEL, 1882; SAINT-YVES, 1927), postularon una división seccional, subseccional y específica que ha sido referencia y modelo de todos los trabajos taxonómicos posteriores, hasta la década de los años setenta, en que nuevas evidencias provenientes de campos diversos impulsaron una modificación sustancial de la clasificación hackeliana e incluso llevaron a proponer nuevas jerarquías o a restablecer el tratamiento de algunas secciones (HOLUB, 1984).

En el momento actual, desde hace unos pocos años, las técnicas de análisis moleculares sobre diferentes especies, géneros, tribus y subfamilias de gramíneas marcan una nueva etapa en la sistemática. La adscripción del género *Festuca* a la tribu Poeae se deduce de estudios sistemáticos moleculares de la subfam. Pooideae basados en análisis del genoma nuclear (HSIAO *et al.*, 1995; HSIAO *et al.*, 1999) y del genoma cloroplástico (SORENG *et al.*, 1990; CATALÁN *et al.*, 1997). Estos estudios demuestran que la tribu Poeae, en la que se encuentra *Festuca*, es una tribu recientemente evolucionada en el seno de la subfamilia de las pooideas, señalándose en uno de ellos el posible origen parafilético de *Festuca* (CATALÁN *et al.*, 1997). Estos análisis noveles se han extendido también a estudios a nivel específico de estas plantas y, además de aportar criterios sólidos para su clasificación sistemática, han permitido establecer los lazos de parentesco evolutivo entre los taxones, relaciones que resultaban difíciles de precisar con los caracteres morfoanatómicos clásicos debido probablemente a su elevada homoplasia (KELLOGG y WATSON, 1993). Hasta la fecha, se carecía de estudios moleculares que abarcasen a las especies de *Festuca* de ámbito pirenaico.

El empleo combinado de datos moleculares procedentes de distintas fuentes genómicas, el genoma nuclear y el genoma cloroplástico, supone una estrategia metodológica fiable al permitir obtener reconstrucciones filogenéticas más sustentadas, cuando los resultados de ambas fuentes son congruentes, que las obtenidas de una única fuente genómica (HILLIS *et al.*, 1996), solventando posibles errores que se pueden producir con la elección de una única molécula que puede resultar inadecuada (PAGE y HOLMES, 1998).

El genoma cloroplástico, ampliamente estudiado en plantas superiores, ofrece una serie de regiones diana más conservadas o más variables, aptas para los estudios filogenéticos de grupos taxonómicos de distinta índole, basados en sus secuencias génicas (OLMSTEAD y PALMER, 1994). Una de estas regiones es la correspondiente a los espaciadores intergénicos trnT-trnL y trnL-trnF (TABERLET *et al.*, 1991). En el genoma nuclear los espaciadores intergénicos con evolución concertada de la región codificadora del ARN ribosomal (ITS) han sido la fuente de secuencias nucleares más investigada en los estudios evolutivos de las angiospermas (BALDWIN *et al.*, 1995). Los datos de las secuencias de los intrones ITS1 e ITS2 han resultado ser informativos en la resolución de las filogenias tribales y específicas de la subfamilia Pooideae (HSIAO *et al.*, 1995; HSIAO *et al.*, 1999), que incluye a *Festuca*.

Dentro de la amplia representación del género *Festuca* en los sistemas montañosos del norte peninsular existen una serie de taxones específicos e infraespecíficos cuya distribución es exclusiva o mayoritaria en la cordillera pirenaica (MONTERRAT RECODER *et al.*, 1998); algunos de estos taxones endémicos tienen un indudable valor biológico como testigos relícticos de situaciones de aislamiento —áreas refugio— preglaciares o posglaciares, y pudieran ser los ancestros de taxones más recientemente evolucionados. Son destacables los casos de *Festuca borderei* (Hack.) Richter y *F. pyrenaica* Reuter, ambas endémicas de los Pirineos, así como también de *Festuca eskia* Ramond ex DC. endémica pirenaico-cantábrica.

Tomando en consideración todo lo anterior, decidimos enfocar nuestro estudio evolutivo investigando las secuencias nucleotídicas provenientes de la región ITS del genoma nuclear y de la región trnL-F del genoma cloroplástico, a fin de obtener marcadores genéticos para las distintas especies, y poder reconstruir la filogenia de los taxones con sendas moléculas, ensa-

yando la posibilidad de combinar ambas fuentes de datos para establecer una hipótesis contrastada sobre las posibles relaciones filogenéticas en el conjunto de las festucas pirenaicas y, en particular, resolver la ubicación de las especies endémicas.

En este trabajo hemos seguido el tratamiento taxonómico del género *Festuca* L. propuesto por CLAYTON y RENVOIZE (1986), modificado y ampliado a nivel seccional por KERGUÉLEN y PLONKA (1989) e incluyendo el tratamiento subseccional de SAINT-YVES (1922) para la sect. *Festuca*.

La finalidad del estudio persigue los siguientes objetivos:

1. Reconstruir la filogenia de las especies en estudio utilizando secuencias de las regiones ITS del genoma nuclear.
2. Reconstruir la filogenia de las especies en estudio utilizando secuencias de la región intrónica del gen *trnL* y del espaciador entre el gen *trnL* y el gen *trnF* (incluyendo al exón 3' del gen *trnL* entre ambas regiones).
3. Completar un análisis filogenético combinado basado en los datos de secuencias ITS y *trnL-trnF* con resolución de los clados internos y de los taxones terminales.
4. Determinar los grados de parentesco evolutivo de las festucas pirenaicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material estudiado incluye representantes del género *Festuca* L. del Pirineo, con especial interés en aquellos taxones endémicos (Tabla I). En total se analizaron diez especies de festucas pirenaicas, utilizándose como grupo externo para enraizar los árboles filogenéticos a un representante del género *Brachypodium* (*Brachypodium distachyon*), cuya secuencia fue obtenida por nosotros anteriormente (CATALÁN y OLMSTEAD, 2000) y está depositada en la base de datos GenBank. La selección de *Brachypodium distachyon* como grupo externo se basa en la información suministrada por trabajos anteriores donde se evidencia que las Brachypodieae son basales respecto a la tribu Poeae, en la que se incluye el género *Festuca* (CATALÁN *et al.*, 1997; HSIAO *et al.*, 1999). También incluimos un representante del

género *Lolium* (*Lolium perenne*) por su conocida relación con el subgénero *Schedonorus* de *Festuca*, demostrada anteriormente en otros trabajos filogenéticos (CHARMET *et al.*, 1997).

Tabla I. Lista de taxones incluidos en nuestro estudio, clasificados de acuerdo con el tratamiento propuesto por CLAYTON y RENVOIZE (1986), modificado y ampliado por KERGUÉLEN y PLONKA (1989), incluyendo la división subseccional de la sect. *Festuca* de SAINT-YVES (1922): distribución geográfica, localidad de muestreo, autapomorfias ribotípicas y haplotípicas.

Taxón	Distribución geográfica	Localidad de muestreo	Autapomorfias ribotípicas	Autapomorfias haplotípicas
Subgen. <i>Montanae</i> (Hackel) Nyman sect. <i>Montanae</i>				
<i>Festuca altissima</i> All.	Europa y Siberia	Francia: valle de Aspe	12	5 (2 sustituciones, 3 brechas)
Subgen. <i>Schedonorus</i> (P. Beauv.) Petersen sect. <i>Schedonorus</i>				
<i>Festuca pratensis</i> (Huds.) P. Beauv.	Europa y Siberia	Inglaterra: Wilshire: Calne	0	0
Subgen. <i>Schedonorus</i> (P. Beauv.) Petersen sect. <i>Plantynia</i> (Dumort.) Tzvelev				
<i>Festuca gigantea</i> (L.) Vill.	Europa	España: Navarra: Arce: río Urrobi	1	1
Subgen. <i>Festuca</i> L. sect. <i>Subbulbosae</i> Hackel				
<i>Festuca paniculata</i> (L.) Schinz. et Thell. subsp. <i>paniculata</i>	Península Ibérica y Francia	Francia: Mont Aigoual	3	0
Subgen. <i>Festuca</i> L. sect. <i>Eskia</i> Willk.				
<i>Festuca eskia</i> Ramond ex DC.	Cordilleras cantábrica y pirenaica	España: Huesca: Benasque: Hospital	0	0
<i>Festuca gautieri</i> Richter	Norte de la Península Ibérica, Pirineos, sierras de Levante y Andalucía	España: Gerona Ribes de Freser: Nuria	1 (brecha)	8 (7 sustituciones, 1 brecha)
<i>Festuca quadriflora</i> Honckeny	Pirineos y Alpes	Francia: collado de Barrosa	1	1

Tabla I. (Continuación)

Taxón	Distribución geográfica	Localidad de muestreo	Autapomorfias ribotípicas	Autapomorfias haplotípicas
Subgen. <i>Festuca</i> L. sect. <i>Festuca</i> L. («grupo ovina»)				
<i>Festuca alpina</i> Suter	Pirineos y Alpes	España: Huesca: Vallibierna	3	14 (11 sustituciones, 3 brechas)
<i>Festuca borderei</i> (Hack.) Richter	Pirineos	España: Huesca: Vallibierna	1	1 (brecha)
Subgen. <i>Festuca</i> L. sect. <i>Aulaxyper</i> Dumort. («grupo rubra»)				
<i>Festuca pyrenaica</i> Reuter	Pirineos	España: Huesca: Cotiella	4	7 (5 sustituciones, 2 brechas)
<i>Lolium perenne</i>	Europa y Siberia	Inglaterra: cultivar	—	—
<i>Brachypodium distachyon</i>	Región mediterránea	Eslovenia: Ljubljana	—	—

Existe otra serie de taxones presentes en la región pirenaica, incluyendo la especie endémica *Festuca glacialis*, que no han sido incluidos en este estudio.

El material correspondiente a la mayor parte de los taxones en estudio fue previamente colectado en el campo y desecado en gel de sílice. Se procedió a la extracción del ADN de todas las muestras en estudio a partir de este material desecado y, en ciertos casos, de especímenes de herbario bien preservados. Para ello se siguió el procedimiento habitual de precipitación con sales CTAB y etanol, modificado de DOYLE y DOYLE (1987).

Una vez extraído el ADN total de cada muestra, se llevaron a cabo las amplificaciones de las regiones genómicas del ADN ribosomal nuclear (región ITS) y del ADN cloroplástico (región trnL-trnF) utilizando los cebadores adecuados para cada región (cebadores nucleares ITS1 e ITS4, HSIAO *et al.*, 1995; cebadores cloroplásticos *c* y *f*, TABERLET *et al.*, 1991) y siguiendo un programa de amplificación de 39 ciclos (94 °C 1 min., 58 °C 1 min., 72 °C 2 min.) para la región ITS, y un programa de 34 ciclos (92 °C

1 min., 50 °C 1 min., 72 °C 2 min.) para la región trnL-F. Para la secuenciación de estas regiones amplificadas se utilizaron dideoxinucleótidos terminales marcados con fluorocromos; las secuencias fueron obtenidas y resueltas en un secuenciador automático Applied Biosystems 373 siguiendo el protocolo de los fabricantes.

Un problema recurrente en varios taxones estudiados fue la presencia de contaminaciones por hongos endófitos en los amplificadores de la región ITS, problema que se logró solventar mediante la purificación de bandas ITS de *Festuca* (ca. 640 pares de bases) en gel de agarosa con reactivos de QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN cat. n° 28704).

El análisis de los cromatogramas de las secuencias se realizó mediante el programa Chromas v. 1.51; el alineamiento de las mismas se completó con el programa Clustal W v. 1.7, corrigiéndose con posterioridad de forma manual. Las secuencias correspondientes al genoma nuclear (ITS) y al genoma cloroplástico (trnL-trnF) se analizaron separadamente, para luego conducir un análisis combinado de ambas bases de datos. La búsqueda de mutaciones y deleciones identificativas de especies en las regiones secuenciadas se llevó a cabo visualmente con el editor de secuencias del programa MacClade v. 3.0. Las mutaciones informativas halladas en uno u otro caso se utilizaron para la construcción de las filogenias del grupo en estudio empleando métodos cladísticos basados en parsimonia, y la estimación de la bondad de la reconstrucción se calculó mediante el análisis autodocinante² («Bootstrap») (programa PAUP ver. 4, versión beta, Swofford, 1998). Debido a su potencial valor informativo, las deleciones de uno o varios nucleótidos detectadas en las matrices de secuencias nucleares (ITS) y cloroplásticas (trnL-F) fueron incluidas en los análisis codificándolas como caracteres binarios por su presencia o ausencia. Algunas de ellas mostraron un potencial valor diagnóstico como marcadores de grupo o de especie.

² Según GARCÍA-VALDECASAS y SANCHIZ (1989), el término «bootstrap» ha sido traducido por L. Bou —*Investigación y Ciencia*, 82— como ‘autodocinante’, supuestamente siguiendo la iniciativa de E. Cansado, traductor del libro de H. CRAMER (1954), *Métodos matemáticos en Estadística*, Aguilar, que introdujo el término *docimasia* para traducir ‘testing’ y *dócima* para ‘test’. Aunque refiriéndonos a este último término inglés podríamos traducirlo como ‘prueba o ensayo’.

Se contrastaron las filogenias obtenidas a partir de secuencias nucleares ITS con las obtenidas a partir de secuencias cloroplásticas trnL-trnF. Se comprobó la capacidad de combinación de ambas bases de datos mediante la prueba de partición de la heterogeneidad (FARRIS *et al.*, 1995), incluida en el programa PAUP v. 4.0. Una vez verificada la homogeneidad de dichas matrices, se procedió a realizar un análisis filogenético con la base de datos combinada resultante para intentar obtener una reconstrucción evolutiva más resuelta del conjunto de los taxones.

RESULTADOS

Análisis de secuencias nucleares (ITS)

Fueron secuenciados representantes de diez especies de *Festuca* y una especie de *Lolium* (*Lolium perenne*), incluyendo como grupo externo a *Brachypodium distachyon* (Tabla I).

El alineamiento de estas 12 secuencias produjo una matriz de datos de 606 caracteres correspondientes a la región ITS1-5.8S-ITS2, requiriéndose la introducción de nueve deleciones, cinco de las cuales eran potencialmente informativas.

Diferentes sustituciones nucleotídicas de las especies en estudio en esas posiciones con respecto a la secuencia consenso, así como la presencia de deleciones, proporcionan potenciales marcadores genómicos específicos (ribotipos). No obstante, al tratarse de un estudio preliminar en el que únicamente se ha secuenciado un representante de cada taxón, la caracterización ribotípica de estos taxones debe tomarse como provisional. En la tabla I se indica el número de caracteres variables exclusivos para cada especie (autapomorfias) que constituyen potenciales marcadores genéticos específicos.

De los 615 caracteres totales (sustituciones más deleciones), 477 caracteres son constantes (76%), y 138 son caracteres variables (22%); de estos últimos, 52 son caracteres potencialmente informativos (8% del total de caracteres), y 86 caracteres no son informativos (14% del total de caracteres).

Análisis filogenético (ITS)

Aplicando el método de parsimonia en una búsqueda exacta por el método de «branch and bound» se encontraron dos árboles igualmente parsimoniosos de 195 cambios de longitud (apomorfias), uno de los cuales se muestra en la figura 1-A.

El árbol consenso estricto de los dos árboles más parsimoniosos se muestra en la figura 1-B. El árbol más parsimonioso mostrado en la figura 1-A presenta un índice de consistencia de 0,7126 (excluyendo los caracteres no informativos) y un índice de retención de 0,8162. La topología de este árbol es coincidente con la del árbol consenso estricto, mostrando resuelto el clado (*F. borderei*, *F. pyrenaica*), *F. alpina* (Fig. 1, A y B). Según la hipótesis evolutiva basada en el análisis de las secuencias ITS de este grupo de taxones, *Festuca paniculata* podría ser un linaje basal, seguido de la divergencia del grupo compuesto por las especies del subgénero *Schedonorus* (*Festuca gigantea* y *F. pratensis*) y *Lolium perenne*, que forman una politomía, separándose a continuación la especie *Festuca altissima*, a la que sigue la divergencia de un clado politómico que incluye *Festuca quadriflora* y *F. gautieri*, y un subclado de especies más recientemente evolucionadas de las que *Festuca eskia* es taxón hermano del grupo de representantes de las sects. *Festuca* (*Festuca alpina* y *F. borderei*) y *Aulaxyper* (*Festuca pyrenaica*).

En estos árboles los clados sustentados por un mayor número de cambios y apoyados por valores autodocinantes más elevados (100%) son los correspondientes al grupo *Schedonorus* + *Lolium*, al grupo sect. *Eskia* + sect. *Festuca* + sect. *Aulaxyper*, y al grupo *Festuca* gr. ovina + *Festuca* gr. rubra (sect. *Festuca* + sect. *Aulaxyper*) (Fig. 1).

ANÁLISIS DE SECUENCIAS CLOROPLÁSTICAS (trnL-F)

Al igual que en el análisis ITS, en el estudio de la región cloroplástica trnL-F, fueron secuenciados representantes de diez especies de *Festuca* y una especie de *Lolium* (*Lolium perenne*), incluyendo como grupo externo a *Brachypodium distachyon* (Tabla I).

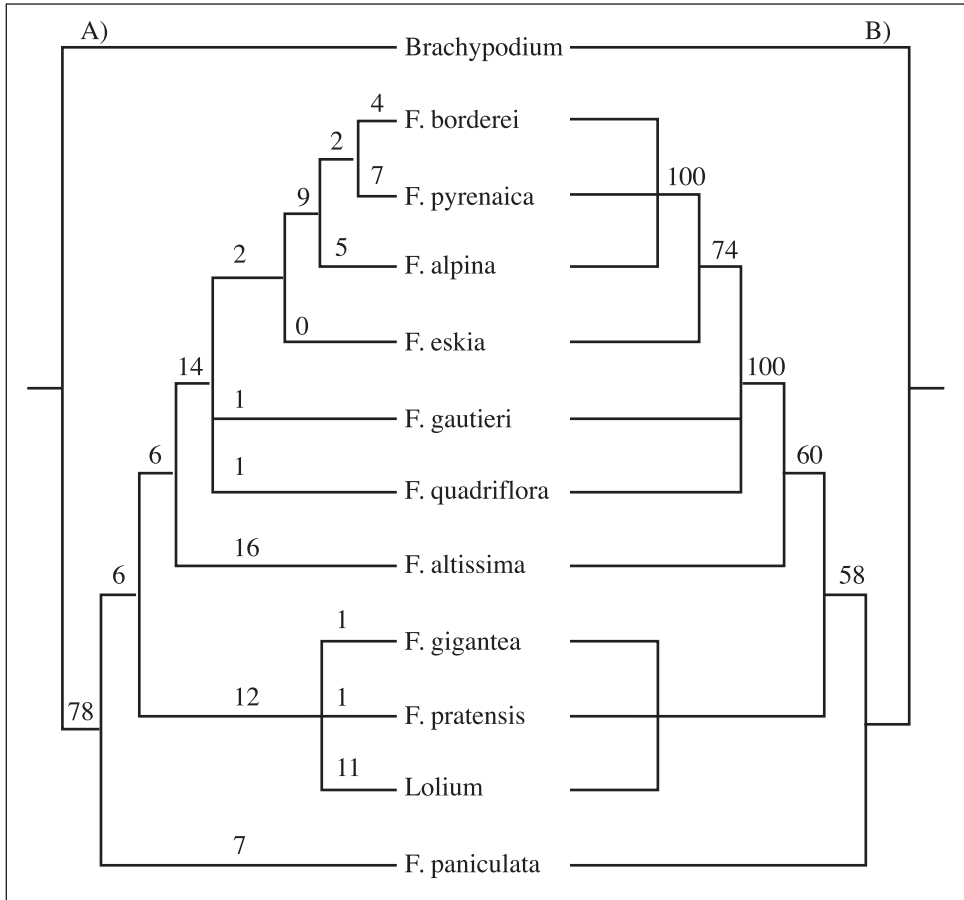


Fig. 1. ITS. A) Uno de los dos árboles más parsimoniosos producto del análisis de la matriz de datos ITS, los números sobre las ramas indican el número de cambios que las sustentan. B) Árbol consenso estricto de dos árboles más parsimoniosos de la matriz de datos ITS, los números sobre las ramas indican el índice autodocinante («bootstrap») que apoya el clado (%).

El alineamiento de estas 12 secuencias produjo una matriz de datos de 984 caracteres correspondientes a la región intrónica del gen *trnL* y a la región espaciadora intergénica *trnL-trnF* (incluyendo el exón 3' *trnL*). El alineamiento de las secuencias requirió la introducción de 35 deleciones, 23 de las cuales son informativas.

Del conjunto de 1.019 caracteres, sustituciones más deleciones, 884 son caracteres constantes (87%) y 135 son caracteres variables (13%); de estos últimos, 44 caracteres son potencialmente informativos (4% del total de caracteres), y 91 caracteres variables son parsimoniosamente no informativos (9% del total de caracteres).

Las proporciones de mutaciones variables e informativas halladas para el grupo de taxones en estudio indican que, pese a haber secuenciado un fragmento genómico cloroplástico de mayor tamaño que el nuclear ITS, la tasa de mutación de esta región cloroplástica en *Festuca* es menor que la de la región nuclear. Estos resultados coinciden con hallazgos anteriores en gramíneas y en otras angiospermas, confirmando el mayor grado de conservación del genoma plastídico. No obstante, las mutaciones halladas en la región trnL-F muestran un valor taxonómico y filogenético para este grupo de festucas.

Diferentes sustituciones nucleotídicas de las especies en estudio en esas posiciones, con respecto a la secuencia consenso, y la presencia de deleciones exclusivas proporcionan potenciales marcadores genómicos específicos (haplotipos cloroplásticos). Al igual que ocurría con los marcadores ribotípicos ITS, el valor diagnóstico de estos marcadores haplotípicos cloroplásticos trnL-F debe tomarse como provisional hasta que la representatividad de los taxones en estudio se amplíe a nuevas muestras de procedencia distinta a las aquí estudiadas. En la tabla I se indica el número de caracteres autapomórficos que constituyen marcadores genéticos específicos.

Análisis filogenético (trnL-F)

El método de parsimonia mediante una búsqueda exacta por «branch and bound» generó tres árboles igualmente parsimoniosos de 160 cambios de longitud (apomorfias), con un índice de consistencia de 0,7273 (excluyendo a los caracteres no informativos) y un índice de retención de 0,8548. En la figura 2-A se muestra uno de esos árboles más parsimoniosos y en la figura 2-B el árbol consenso estricto de los tres.

La topología del árbol más parsimonioso mostrado en la figura 2-A indica la presencia de dos clados hermanos, uno correspondiente al grupo de la sect. *Eskia* + sect. *Festuca* + sect. *Aulaxyper* sustentado por un alto número de cambios (13) y por un índice autodocinante de 100%; y el otro

que incluye a representantes del subgen. *Montanae* (*Festuca altissima*), de la sect. *Subbulbosae* (*Festuca paniculata*) y del grupo *Schedonorus* + *Lolium perenne*. Dentro de este último clado, el grupo que aparece apoyado por un número de cambios más alto (11) y por un porcentaje autodocinante de 100% es el que incluye a los representantes del subgen. *Schedonorus* y a *Lolium perenne*, divergiendo *Festuca gigantea* del clado formado por los taxones hermanos *Festuca pratensis* y *Lolium perenne*.

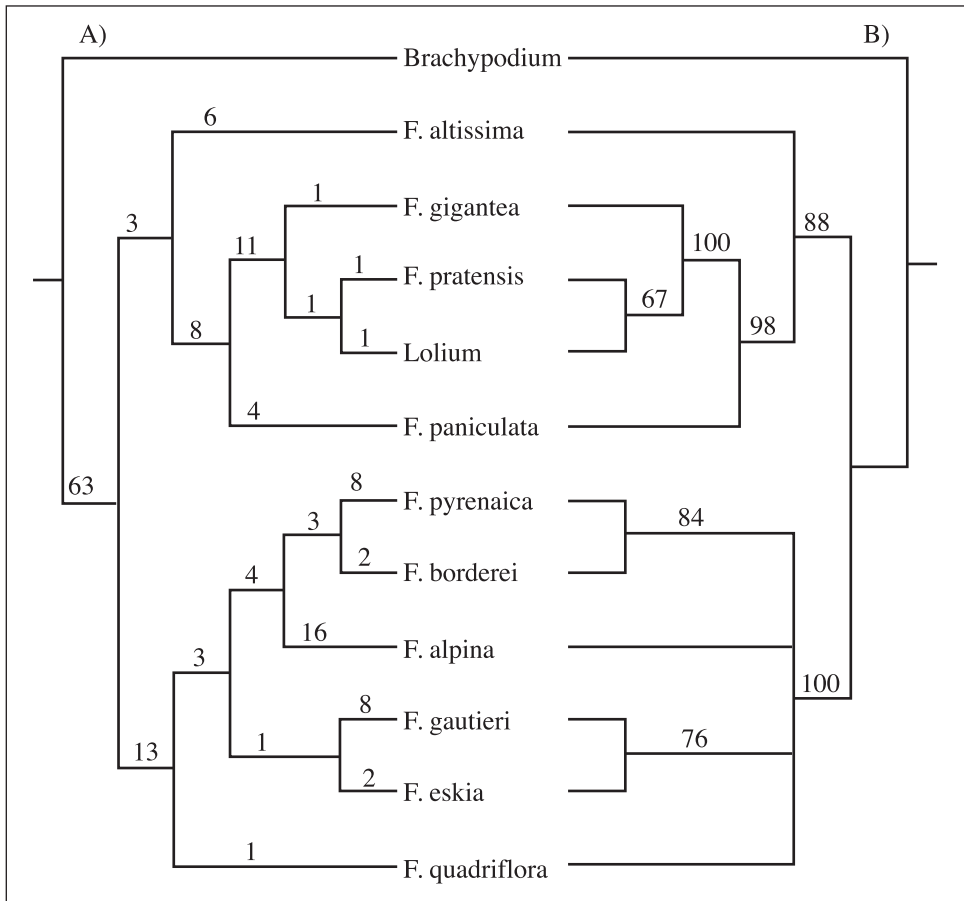


Fig. 2. trnL-F. A) Uno de los tres árboles más parsimoniosos producto del análisis de la matriz de datos trnL-F, los números sobre las ramas indican el número de cambios que las sustentan. B) Árbol consenso estricto de los tres árboles más parsimoniosos de la matriz de datos trnL-F, los números sobre las ramas indican el índice autodocinante («bootstrap») que apoya el clado (%).

Combinación de bases de datos ITS y trnL-F. Análisis filogenéticos

Pese a que las topologías obtenidas tras los análisis de las secuencias ribosómicas ITS y de las secuencias cloroplásticas trnL-F no son totalmente congruentes entre sí, se observa una notable coincidencia en la ubicación de los clados mejor sustentados en uno y otro caso. Para intentar obtener la mejor resolución posible de la filogenia del grupo de festucas en estudio, basada en las dos fuentes de datos analizadas, procedi-

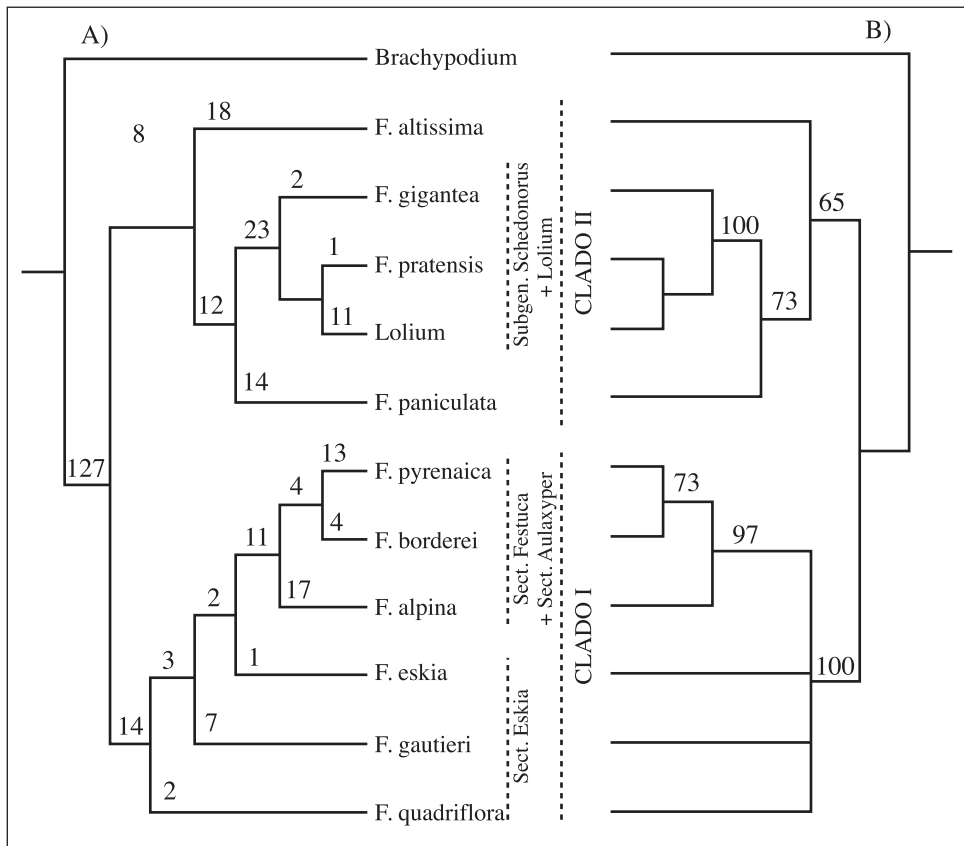


Fig. 3. ITS-trnL-F. A) Uno de los tres árboles más parsimoniosos producto del análisis de la matriz de datos combinada ITS-trnL-F, los números sobre las ramas indican el número de cambios que las sustentan. B) Árbol consenso estricto de los tres árboles más parsimoniosos de la matriz de datos combinada, los números sobre las ramas indican el índice autodocinante («bootstrap») que apoya el clado (%). Clado I: «festucas de hojas finas»; clado II: «festucas de hojas anchas».

mos a realizar una prueba de heterogeneidad con el fin de comprobar si las dos bases de datos podían ser combinadas. Al aplicar la Prueba de Heterogeneidad de FARRIS *et al.* (1995), obtuvimos un valor $p = 0,15$ tras una búsqueda «branch and bound» de mil replicados. Este resultado nos indica que, a pesar de que las dos matrices de datos muestran un relativo bajo índice de homogeneidad, las longitudes de los árboles construidos tras las particiones aleatorias no son significativamente diferentes de los construidos a partir de las particiones originales, y por ello es factible un análisis combinado de ambas. El análisis filogenético basado en esta matriz combinada mediante una búsqueda exacta «branch and bound» produjo tres árboles igualmente parsimoniosos de 347 cambios de longitud (apomorfias). Uno de estos árboles más parsimoniosos se muestra en la figura 3-A, este árbol presenta un índice de consistencia de 0,7143 (excluyendo a los caracteres no informativos) y un índice de retención de 0,8249. El árbol consenso estricto de los tres árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis de esta base de datos combinada se muestra en la figura 3-B.

En la topología mostrada en la figura 3-A se observa la separación de las festucas en estudio en dos clados hermanos, uno de ellos incluye los representantes de la sect. *Eskia*, la sect. *Festuca* y la sect. *Aulaxyper*, y el otro a los representantes del subgen. *Montanae*, de la sect. *Subbulbosae* y del grupo *Schedonorus* + *Lolium* (Fig. 3).

El primero de estos clados es compartido por los árboles más parsimoniosos ITS (Fig. 1-A) y trnL-F (Fig. 2-A), observándose la posición basal que ocupan los representantes de la sect. *Eskia* con respecto a los representantes más recientemente evolucionados de las sects. *Festuca* y *Aulaxyper*.

El segundo clado muestra un orden de divergencia similar al obtenido con la base de datos trnL-F. En este grupo *Festuca altissima* se resuelve en una posición basal, seguida por la divergencia de *Festuca paniculata* y por la del subclado formado por la relación hermana de *Festuca gigantea* y el clado *F. pratensis* / *Lolium perenne*, siendo congruente este subclado en las topologías de los árboles más parsimoniosos ITS (Fig. 1-A) y trnL-F (Fig. 2-A).

DISCUSIÓN

Tras los análisis filogenéticos del grupo de festucas en estudio, basados tanto en análisis independientes de las matrices de secuencias ITS y trnL-F como en el análisis combinado de ambas fuentes de datos, se observa la existencia de dos clados claramente definidos y sólidamente sustentados. Uno de ellos muestra la monofilia del grupo que incluye los representantes de la sect. *Eskia*, sect. *Festuca* y sect. *Aulaxyper*, el otro muestra el estrecho grado de parentesco entre los representantes del subgen. *Schedonorus* y *Lolium perenne*, corroborando resultados obtenidos anteriormente por otros autores (LEHVÄSLAIHO *et al.*, 1987; DARBYSHIRE y WARWICK, 1992; CHARMET *et al.*, 1997; y referencias incluidas en estos trabajos). Nuestra topología también apoya la parafilia del subgen. *Schedonorus* indicada por CHARMET *et al.* (1997).

El presente estudio apunta hacia un origen monofilético del grupo formado por los representantes de las secciones *Eskia*, *Festuca* y *Aulaxyper*, que comprenden especies cuyos individuos presentan hojas con plegadura y que tradicionalmente se conocen como «festucas de hojas finas». El análisis parece mostrar también un carácter más ancestral de los representantes de la sect. *Eskia* con respecto a los representantes en apariencia más recientemente evolucionados de las sects. *Festuca* y *Aulaxyper*.

Si bien los estudios taxonómicos habidos hasta la fecha han mantenido la jerarquía seccional del grupo *Eskia*, nuestros resultados indican que se trata de un grupo parafilético cuyo valor sistemático habría que revisar. Los representantes de la sect. *Eskia* incluidos en este trabajo muestran un estrecho grado de parentesco evolutivo al colapsar sus ramas en una politomía en el árbol consenso estricto basado en la matriz de datos combinada mostrada en la figura 3-B.

En lo referente a los representantes del grupo sect. *Festuca* + sect. *Aulaxyper* hemos constatado su carácter monofilético de acuerdo con los resultados del árbol consenso estricto basado en la matriz de datos combinada (Fig. 3-B). Este clado está apoyado por un número relativamente elevado de cambios (11; Fig. 3-A) y un índice autodocinante de 97%.

Los resultados del análisis efectuado muestran a *Festuca alpina* como el taxón hermano del grupo formado por *Festuca pyrenaica* y *F. borderei*.

Sin embargo, al ser muy limitado el número de representantes correspondientes a las sects. *Festuca* y *Aulaxyper* incluidas en nuestro estudio, no pueden extraerse conclusiones definitivas sobre las relaciones de parentesco entre estos taxones. Puesto que las secciones *Festuca* y *Aulaxyper* son las más amplias en cuanto a número de taxones dentro del género, deberán ser objeto de un estudio más exhaustivo.

Origen de las especies de Festuca pirenaicas

Basándonos en los resultados del árbol consenso estricto obtenido del análisis «branch and bound» de la matriz de datos combinados de secuencias ITS y trnL-F, distinguimos dos linajes evolutivos para los taxones de *Festuca* estudiados. Uno de ellos comprende a las «festucas de hojas finas» (clado I) y el otro a las «festucas de hojas anchas» (clado II). Dentro del segundo clado, *Festuca altissima*, taxón de las montañas del sur de Europa y representante del subgen. *Montanae*, sería una especie potencialmente ancestral, tratándose de una planta nemoral que habita preferentemente en hayedos y abetales, mientras que *Festuca paniculata* subsp. *paniculata*, taxón del sur europeo y representante de la sect. *Subbulbosae*, característico de pastos acidófilos subalpinos, parece haber divergido más recientemente. El grupo más recientemente evolucionado en este clado correspondería a los representantes del subgen. *Schedonorus* + *Lolium*, dentro de los cuales *Festuca gigantea*, planta silvática euro-siberiana y representante de la sect. *Plantynia*, diverge con anterioridad a la separación de los grupos hermanos *Festuca pratensis* y *Lolium perenne*. La especie *Festuca pratensis*, elemento euro-siberiano y representante de la sect. *Schedonorus*, típica de prados de siega en los Pirineos, muestra un estrecho parentesco con el representante del género *Lolium*, hecho reflejado por la existencia de híbridos intergenéricos espontáneos y ya evidenciado por estudios anteriores.

El grupo que mejor representa los orígenes evolutivos de los taxones pirenaico-cantábricos propiamente endémicos, y su posible relación con los eventos de especiación pre y posglaciales, es el constituido por los representantes del clado I pertenecientes a las sects. *Eskia*, *Festuca* y *Aulaxyper*. Según la topología del árbol ITS-trnL-F más parsimonioso mos-

trado en la figura 3-A, *Festuca quadriflora*, taxón alpino-pirenaico, distribuido en los pastos basófilos del piso alpino, podría constituir un linaje ancestral, seguido de las divergencias sucesivas de *Festuca gautieri*, taxón ibérico-pirenaico característico de pastos xéricos del piso subalpino, y de *Festuca eskia*, especie distribuida en las montañas pirenaicas y del norte peninsular característica de pastos acidófilos del piso subalpino.

La gran similitud genómica entre estos tres taxones y su proximidad evolutiva (Fig. 3-B), contribuye a explicar la existencia de híbridos interespecíficos espontáneos entre ellos que han sido detectados en los Pirineos y en los Picos de Europa.

Entre los representantes del grupo sect. *Festuca* + sect. *Aulaxyper* más recientemente evolucionados, *Festuca alpina*, elemento alpino-pirenaico típico de roquedos calcáreos y representante de la sect. *Festuca* subsect. *Festuca*, supone un linaje hermano respecto a los dos endemismos pirenaicos próximamente emparentados: *Festuca pyrenaica*, taxón clasificado en la sect. *Aulaxyper* y especie típica de gleras calcáreas del piso subalpino, y *Festuca borderei*, taxón clasificado en la sect. *Festuca* subsect. *Exaratae*, característico de roquedos silíceos del piso alpino.

AGRADECIMIENTOS

A las Dras. M. A. Rivas Ponce y C. Cebolla, por facilitarnos material de herbario de *Festuca paniculata* subsp. *paniculata*, y al Dr. C. A. Stace, por proveernos de material fresco de *Festuca pratensis* y *Lolium perenne*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; PORTER, J. M.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; CAMPBELL, C. S., y DONOGHUE, M. J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 82: 247-277.
- CATALÁN, P.; KELLOGG, E. A., y OLMSTEAD, R. G. (1997). Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequences. *Mol. Phylog. Evol.*, 8 (2): 150-166.
- CATALÁN, P., y OLMSTEAD, R. G. (2000). Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P. Beauv. (Poaceae) from combined sequences of chloroplast *ndhF* gene and nuclear ITS. *Pl. Syst. Evol.*, 220: 1-19.

- CHARMET, G; RAVEL, C., y BALFOURIER, F. (1997). Phylogenetic analysis in the Festuca-Lolium complex using molecular markers and ITS rDNA. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 1038-1046.
- CLAYTON, W. D., y RENVOIZE, S. A. (1986). Genera Graminum. Grasses of the world. *Kew Bull. Additional series*, XIII. 389 pp. [*Festuca*: 93-94]. Londres.
- DARBYSHIRE, S. J., y WARWICK, S. I. (1992). Phylogeny of North American Festuca (Poaceae) and related genera using chloroplast DNA restriction site variation. *Can. J. Bot.*, 70: 2415-2429.
- DOYLE, J. J., y DOYLE, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19: 11-15.
- FARRIS, J. S.; KÄLLERSJÖ, M.; KLUGE, A. G., y BULT, C. (1995). Testing significance of incongruence. *Forum. Cladistics.*, 10: 315-319.
- GARCÍA-VALDECASAS, A., y SANCHIZ, B. (1989). La inferencia filogenética. En AGUIRRE, E. (coord.). *Paleontología. Nuevas Tendencias*, 10: 47-59. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.
- HACKEL, E. (1882). *Monographia festucarum europaeum*. Verlag von Theodor Fischer. Berlín. 216 pp.
- HILLIS, D. M.; MABLE, B. K., y MORITZ, C. (1996). Applications of molecular systematics: the state of the field and a look to the future. En HILLIS, D. M., *et al.* (eds.). *Molecular Systematics*: 515-543. 2ª ed. Sinauer. Sunderland.
- HOLUB, J. (1984). New Genera in Phanerogamae [1-3]. *Folia Goebotánica et Phytotaxonomical* (Praga), 19 (1): 95-99.
- HSIAO, C.; CHATTERTON, N. J.; ASAY, K. H., y JENSEN, K. B. (1995). Molecular phylogeny of the Pooideae (Poaceae) based on nuclear rDNA (ITS) sequences. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 389-398.
- HSIAO, C.; JACOBS, S. W. L.; CHATTERTON, N. J., y ASAY, K. H. (1999). A Molecular Phylogeny of the Grass Family (Poaceae) Based on the Sequences of Nuclear Ribosomal DNA (ITS). *Australian Systematic Botany*, 11: 667-688.
- KELLOGG, E. A., y WATSON, L. (1993). Phylogenetic studies of a large data set. I. Bambusoideae, Andropogonodae, and Pooideae (Gramineae). *Botanical Review*, 59: 273-343.
- KERGUÉLEN, M., y PLONKA, F. (1989). Les Festuca de la Flore de France (Corse comprise). *Bull. Soc. Bot. Centre-Ouest N. S.*, n° esp., 10: 1-368.
- LEHVÄSLAIHO, H.; SAURA, A., y LOKKI, J. (1987). Chloroplast DNA variation in the grass tribe Festuceae. *Theor. Appl. Genet.*, 74: 298-302.
- MONTSERRAT RECODER, P.; RIVAS PONCE, M. A., y CEBOLLA, C. (1998). Las gramíneas en el ambiente pirenaico-cantábrico. *J. Bot. Soc. Bot. Fr.*, 5: 91-96.
- OLMSTEAD, R. G., y PALMER, J. D. (1994). Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *Amer. J. Bot.*, 81 (9): 1205-1224.

- PAGE, R. D. M., y HOMES, E. C. (1998). *Molecular Evolution. A phylogenetic Approach*. 1ª ed. Blackwell Science Ltd. Oxford-Londres. 346 pp.
- SAINT-YVES, A. (1922). Les *Festuca* (subg. Eu-Festuca) de l'Afrique du Nord et des Îles Atlantiques. *Candollea*, 1: 1-63.
- SAINT-YVES, A. (1927). Tentamen. Claves analyticae *Festucarum veteris orbis* (subgen. Eu-Festucarum) ad subspecies, multas varietates et nonnullas subvarietates usque ducentes. *Rev. Bretonne Bot. Pure Appl.*: 1-124.
- SORENG, R. J.; DAVIS, J. I., y DOYLE, J. J. (1990). A phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site variation in Poaceae subfam. Pooideae. *Pl. Syst. Evol.*, 172: 83-97.
- SWOFFORD, D. L. (1998). *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, ver. 4β test. Sinauer, MA. USA.
- TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTON, G., y BOUVET, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Pl. Mol. Biol.*, 17: 1105-1109.