

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA

Grado en Ciencias Ambientales



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



ESCUELA POLITECNICA
SUPERIOR DE GANDIA

**“Estudio de la descendencia del cruce entre
Centaurea aspera (2x) y *C. gentilii* (4x).
Nuevo híbrido Hort ex. *Centaurea* x (3x)”**

TRABAJO FINAL DE GRADO

Autor/a:

Ainoha Gamón Guillamón

Tutor/a:

Hugo Basilio Merle Farinós

GANDIA, 2020

Resumen

La familia *Asteraceae* es una de las familias vegetales con mayor diversidad biológica. Dentro de esta familia destaca la presencia del género *Centaurea*, el cuál es uno de los géneros más diversos. Esta gran diversidad se debe a los procesos de poliploidización e hibridación que dichos individuos pueden sufrir, siendo su capacidad de hibridación una de las más altas que se conocen.

En el presente trabajo se estudiará el híbrido triploide obtenido del cruce entre *Centaurea aspera* (2x) y *Centaurea gentilii* (4x). Para poder realizar dicho estudio se analizará por citometría de flujo la ploidía de 96 cipselas del híbrido. Además, se estudiará el porcentaje de germinación de las cipselas, se trasplantarán las cipselas germinadas para que se desarrollen las plántulas y se realizará una caracterización fenotípica de las plantas obtenidas. Finalmente, se estudiará la fertilidad masculina y femenina del nuevo híbrido.

Palabras clave

Poliploidía, hibridación, *Centaurea aspera*, *Centaurea gentilii*, caracterización fenotípica.

Resum

La família *Asteraceae* és una de les famílies vegetals amb major diversitat biològica. Dins d'aquesta família destaca la presència del gènere *Centaurea*, el qual és un dels gèneres més diversos. Aquesta gran diversitat es deu als processos de poliploidització i hibridació que aquests individus poden patir, sent la seua capacitat d'hibridació una de les més altes que es coneixen.

En el present treball s'estudiarà l'híbrid triploide obtingut de l'encreuament entre *Centaurea aspera* (2x) i *Centaurea gentilii* (4x). Per a poder realitzar aquest estudi s'analitzarà per citometria de flux la ploïdia de 96 cípselles de l'híbrid. A més, s'estudiarà el percentatge de germinació de les cípselles, es trasplantaran les cípselles germinades perquè es desenvolupen les plàntules i es realitzarà una caracterització fenotípica de les plantes obtingudes. Finalment, s'estudiarà la fertilitat masculina i femenina del nou híbrid.

Paraules clau

Poliploïdia, hibridació, *Centaurea aspera*, *Centaurea gentilii*, caracterització fenotípica.

Abstract

The *Asteraceae* family is one of the most biologically diverse plant families. Within this family the presence of the genus *Centaurea* stands out, which is one of the most diverse genera. This great diversity is due to the processes of polyploidization and hybridization that these individuals can undergo, being their capacity of hybridization one of the highest known.

In the present work we will study the triploid hybrid obtained from the cross between *Centaurea aspera* (2x) and *Centaurea gentili* (4x). In order to carry out this study, the ploidy of 96 cypselas of the hybrid will be analyzed by flow cytometry. In addition, the percentage of cypselas germination will be studied, the germinated cypselas will be transplanted so that the seedlings develop and a phenotypic characterization of the obtained plants will be made. Finally, male and female fertility of the new hybrid will be studied.

Key words

Polyploidy, hybridization, *Centaurea aspera*, *Centaurea gentili*, phenotypic characterization.

Agradecimientos

Me gustaría dedicar este trabajo a mis padres, sin cuyo amor, consejos y apoyo, no hubiera sido capaz de recorrer el camino que me ha llevado a este momento. Sois mi ejemplo a seguir.

A mi hermana Nereida, y a mi cuñado Rubén. Gracias por estar en los momentos en los que vuestra ayuda fue la única razón para seguir.

A Hugo. Gracias por brindarme esta oportunidad y por tu pasión hacia el mundo vegetal, sin la cual, este proyecto no hubiera sido lo mismo.

Gracias, porque este trabajo es más vuestro que mío.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Importancia de la poliploidía en el reino vegetal.....	1
1.2. Importancia de la hibridación en el reino vegetal	2
1.3. Influencia del parental materno sobre la descendencia.....	2
1.4. Descripción de <i>Centaurea aspera</i> L. y <i>Centaurea gentilii</i> L.....	3
1.4.1. Taxonomía.....	3
1.4.2. Morfología y distribución	4
1.5. Punto de partida del presente proyecto	6
2. Justificación	7
3. Objetivos.....	8
4. Materiales y métodos.....	8
4.1. Lavado e hidratación de las cipselas	8
4.2. Citometría de flujo.....	9
4.3. Germinación y trasplante para el crecimiento de las plántulas	11
4.4. Caracterización fenotípica de las plántulas híbridas y sus parentales	14
4.5. Estudio del polen del híbrido y comparación con el de sus parentales.....	16
4.6. Ensayo de cruces forzados.....	19
5. Resultados y discusión	23
5.1. Análisis de los porcentajes de cipselas viables	23
5.2. Estudio del nivel de ploidía de las cipselas enteras obtenidas en los cruces	25
5.3. Estudio de germinación y supervivencia	26
5.4. Análisis del fenotipo de las plántulas híbridas	29
5.5. Estudio del polen del híbrido y comparación con el polen de sus parentales	31
5.6. Estudio de la fertilidad de los híbridos.....	36
6. Conclusiones	37
7. Bibliografía.....	39

Índice de figuras

Figura 1. Taxonomía de la sección Seridia de la familia <i>Asteraceae</i>	4
Figura 2. <i>Centaurea aspera</i> (Fuente: FloraCatalana.net).....	4
Figura 3. Distribución de <i>C. aspera</i> en la Comunidad Valenciana (Fuente: Banco de Datos de Biodiversidad de la Comunidad Valenciana).....	5
Figura 4. <i>Centaurea gentilii</i> (Fuente: African Plants – A Photo Guide).....	5
Figura 5. Distribución de <i>C. gentilii</i> (Fuente: The Euro+Med PlantBase).....	6
Figura 6. Material utilizado en el protocolo de lavado.....	8
Figura 7. Cipselas tras el protocolo de lavado.....	9
Figura 8. Material necesario para realizar la citometría de flujo.....	9
Figura 9. Extracción del embrión y de los cotiledones (González, 2014).....	10
Figura 10. Muestra con los 5 ml de reactivo.....	10
Figura 11. Muestra preparada para introducirla en el citómetro.....	11
Figura 12. Embrión en correctas condiciones para su germinación.....	11
Figura 13. Embriones germinados, listos para su trasplante.....	12
Figura 14. Embrión germinado trasplantado.....	12
Figura 15. Repicado de las plántulas en el Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF).....	13
Figura 16. Plántulas de <i>C. aspera</i> , <i>C. gentilii</i> y de la especie híbrida obtenidas en el proceso de germinación.....	14
Figura 17. Material utilizado en la medición morfométrica de los individuos.....	15
Figura 18. Capítulo de <i>C. aspera</i>	16
Figura 19. Capítulo de <i>C. gentilii</i>	16
Figura 20. Capítulo del híbrido con parental materno procedente de <i>C. aspera</i>	17
Figura 21. Capítulo del híbrido con parental materno procedente de <i>C. gentilii</i>	17
Figura 22. Lupa binocular utilizado para realizar la apertura de la corola y la extracción del polen de las anteras.....	18
Figura 23. Microscopio utilizado para realizar el estudio de los capítulos.....	19
Figura 24. Material utilizado en el ensayo de cruces forzados.....	19
Figura 25. Embolsado de los capítulos de un individuo híbrido.....	20
Figura 26. Realización del frote entre capítulos.....	21
Figura 27. Embolsado posterior al frote entre capítulos y codificación de las bolsas de muselina.....	21
Figura 28. Material utilizado para realizar la extracción de cipselas de los capítulos.....	22
Figura 29. Proceso de apertura de los capítulos.....	22
Figura 30. Capitulo abierto en el que se puede apreciar la presencia de cipselas.....	22
Figura 31. Gráfico de mosaico del porcentaje de cipselas híbridas llenas y vacías. Según el origen de los óvulos y el polen. $\chi^2 p$ – valor = 0,0014.....	24
Figura 32. Histograma de intensidad de fluorescencia. Ploidía de la especie híbrida AxG (3x) (pico 2) con control <i>C. aspera</i> (2x) (pico 1).....	25
Figura 33. Representación gráfica del porcentaje de germinación (%).....	26
Figura 34. Gráfico de mosaico del porcentaje de germinación de los embriones híbridos. $\chi^2 p$ – valor = 0,0053.....	27
Figura 35. Presencia de hongos en el periodo de germinación de los embriones.....	27
Figura 36. Representación gráfica del porcentaje de supervivencia (%).....	28
Figura 37. Gráfico de mosaico del porcentaje de supervivencia de las plántulas híbridas. $\chi^2 p$ – valor = 0,7786.....	29
Figura 38. Análisis estadístico basado en el análisis de conglomerados, con el método del vecino más lejano, donde HA = Híbrido con parental materno <i>C. aspera</i> , HG = Híbrido con parental materno <i>C. gentilii</i> , G = <i>C. gentilii</i> y A = <i>C. aspera</i>	29

Figura 39. Análisis estadístico basado en el análisis de conglomerados, con el método de Ward, donde HA = Híbrido con parental materno <i>C. aspera</i> , HG = Híbrido con parental materno <i>C. gentilii</i> , G = <i>C. gentilii</i> y A = <i>C. aspera</i> .	30
Figura 40. Representación gráfica, de los taxones, en el que se agrupan los perfiles por su similitud.	30
Figura 41. Plántula híbrida con parental materno <i>C. gentilii</i> , en el que se puede observar como los capítulos están cerrados.	31
Figura 42. Antera de <i>C. aspera</i> con polen.	31
Figura 43. Antera de <i>C. gentilii</i> con polen.	32
Figura 44. Antera del híbrido con parental materno <i>C. aspera</i> , con polen (<i>C. aspera</i> x <i>C. gentilii</i>).	32
Figura 45. Antera del híbrido con parental materno <i>C. gentilii</i> , con polen (<i>C. gentilii</i> x <i>C. aspera</i>).	33
Figura 46. Polen de <i>C. aspera</i> , visto al microscopio.	34
Figura 47. Polen de <i>C. gentilii</i> , visto al microscopio.	34
Figura 48. Polen del híbrido con parental materno <i>C. gentilii</i> , visto en el microscopio (<i>C. gentilii</i> x <i>C. aspera</i>).	35
Figura 49. Polen del híbrido con parental materno <i>C. aspera</i> , visto en el microscopio (<i>C. aspera</i> x <i>C. gentilii</i>).	35
Figura 50. Restos del ovario de la flor sin fecundar.	36
Figura 51. Diagrama de caja de bigotes.	36

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación del clado Jacea, según biogeografía y secciones (Susanna and Garcia-Jacas, 2009).	3
Tabla 2. Características químicas y contenido en nutrientes del sustrato utilizado.	13
Tabla 3. Número de plántulas por especie sobre las que se ha realizado la caracterización fenotípica.	14
Tabla 4. Tabla de los principales tratamientos.	20
Tabla 5. Número y porcentaje de cipselas llenas y vacías por taxón.	23
Tabla 6. Número y porcentaje total de cipselas analizadas mediante el método de la citometría de flujo.	25
Tabla 7. Embriones germinados y porcentaje de germinación de cada una de las especies.	26
Tabla 8. Plántulas que han sobrevivido y porcentaje de supervivencia por taxón.	28
Tabla 9. Prueba de múltiples rangos, con el método Tukey HSD.	37
Tabla 10. Prueba de Kruskal – Wallis. Estadístico: 5,7632. P – Value: 0,450233.	37

1. Introducción

1.1. Importancia de la poliploidía en el reino vegetal

La poliploidía reside en la duplicación de un juego completo de cromosomas (Otto, 2007), pudiendo ser los organismos, triploides (3x), tetraploides (4x), pentaploides (5x), e incluso individuos con conjuntos cromosómicos de mayor número. Según el origen de la dotación cromosómica, existen dos tipos importantes de poliploidía: la autoploidía, en la que todos los juegos cromosómicos pertenecen a la misma especie y la alopoliploidía, en la que todos los juegos cromosómicos pertenecen a dos o más especies (Pierce, 2009).

En el reino vegetal, este fenómeno supone una notable fuerza impulsora en la evolución de las plantas (Soltis and Soltis, 2009), y los individuos que sufren este proceso, en comparación con sus ancestros diploides, pueden presentar mayor avance evolutivo (Fawcett et al., 2009).

La poliploidía puede producir importantes cambios fenotípicos, como son, el tamaño, el color de las flores, el uso del agua, el sistema reproductivo, la especialización de los polinizadores, la resistencia a los herbívoros y la fenología (Balao et al., 2011; Husband et al., 2008; Levin, 1983; Maherali et al., 2009; Masterson, 1994; Ramsey and Ramsey, 2014; Segraves and Thompson, 1999). Pero no solamente se observan mejoras fenotípicas, sino que, recientes estudios han demostrado la importancia de este proceso frente al cambio climático, ya que, la poliploidía aumenta el vigor, el rendimiento, la resistencia a enfermedades y la adaptación de los cultivos forrajeros al estrés (Moreno-González and Campo, 2016).

En las angiospermas, se estima que el 15% de los eventos de especiación están relacionados con este proceso, siendo un 35% de estas las que lo presentan (Wood et al., 2009), pudiéndose encontrar tanto en especies silvestres, como en las especies agrícolas.

En las especies silvestres, el 58,3% de los 978 géneros registrados de la familia *Asteraceae* presentan poliploidía. Este porcentaje engloba a 570 géneros de la familia, encontrándose un rango de niveles de ploidía desde 2x a 48x (Semple and Watanabe, 2009). Pero no solamente la familia *Asteraceae* presenta poliploidía, la gran mayoría de familias botánicas del reino Plantae presentan poliploidía. Por ejemplo, en la familia *Rosaceae*, en concreto en el género *Rubus*, existen varias especies tetraploides (4x) (Delgado et al., 2010).

En el caso de las especies agrícolas la poliploidía se utiliza de forma artificial para mejorar los cultivos (Sattler et al., 2016). Por ejemplo, en el caso de las manzanas triploides, la producción de fruta es más regular, de mayor tamaño y con mayor atractivo comercial (Sedov et al., 2014).

Dentro de este grupo predominan especies como el trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) el cual es hexaploide (AABBDD), el plátano (*Musa x paradisiaca*) que presenta triploidía del tipo AAB o ABB (De Wet et al., 1981) o especies del género *Citrus* de las que se tiene registrados niveles de tri, tetra, penta, hexa y octaploidía (Aleza et al., 2012).

1.2. Importancia de la hibridación en el reino vegetal

La hibridación se define como el cruce entre especies, razas genéticamente diferenciadas o poblaciones de la misma especie, y es la responsable de una gran cantidad de procesos de especiación en las plantas (Soltis and Soltis, 2009). La combinación de diferentes genomas puede presentar ventajas evolutivas y ecológicas que facilitan la innovación evolutiva y la radiación adaptativa de las especies (Anderson, n.d.; Arnold, 1997; Barton, 2001; Grant, 1981; Mallet, 2007; Paun et al., 2007; Rieseberg et al., 2003; Seehausen, 2004; Stebbins Jr, 1950).

Cuando dos especies conviven en un mismo lugar, se puede producir una hibridación natural en la que se genera un híbrido que presenta características morfológicas intermedias entre ambos progenitores. Un ejemplo reciente es el caso del híbrido originado a partir de las especies *Antirrhinum mollissimum* L. y *Antirrhinum tortuosum* L. que compartían invernadero en el Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF) de la Generalitat Valenciana (Gallego et al., 2016).

En el caso de las especies cultivadas, no resulta fácil conocer cuando la hibridación inducida se realizó por primera vez, ya que, muchas especies han hibridado de forma natural (Swingle, 1967), siendo los objetivos que se persiguen en este caso, la domesticación (Gentry, n.d.; Griffith, 2004; Ramamoorthy et al., 1993) y el incremento del rendimiento y de la diversidad genética del cultivo (Díaz Solís et al., 2015).

Por ejemplo, recientes estudios han mostrado la obtención de híbridos entre las especies *Citrus* y *Poncirus* (Forner et al., 2000), aunque en el género *Citrus* existen evidencias que indican que dicho género tiene tres especies básicas (zamboá, cidro y mandarino) que han sufrido hibridaciones naturales que han originado las especies que se conocen actualmente (Federici et al., 1998; Nicolosi et al., 2000).

1.3. Influencia del parental materno sobre la descendencia

La influencia del citoplasma materno sobre las características fenotípicas de los descendientes puede ocurrir a través de los tejidos que rodean el embrión y el endospermo que son todos de origen materno. Los tegumentos del óvulo y la pared del ovario forman el fruto, la capa de la semilla y sus estructuras accesorias, como son los pelos, las espigas o las púas, las cuales, influyen en los rasgos de latencia, dispersión y germinación de la semilla. Una variación en estos rasgos influye en el fenotipo maduro del individuo (Roach and Wulff, 1987).

Varios estudios realizados con plantas de lino de semillas pequeñas y con otras de semillas grandes han evidenciado diferencias recíprocas en el peso de las semillas, de modo que el citoplasma materno presenta influencias directas sobre el tamaño de la semilla (Smith and Fitzsimmons, 1965). Pero no solamente se ha observado este tipo de efectos, ya que, diferentes estudios genéticos han demostrado efectos sobre la composición mineral de las semillas (Roach and Wulff, 1987).

En el caso concreto de las angiospermas, durante su desarrollo, la fecundación múltiple suele originar un endospermo triploide, es decir, con dos núcleos de la madre y con un núcleo del padre. Pero, aunque el endospermo no siempre sea triploide, la carga materna siempre va a ser mayor que la dosis de los genes paternos, de modo que, la influencia del material materno es mayor (Westoby, 1981).

1.4. Descripción de *Centaurea aspera* L. y *Centaurea gentilii* L.

1.4.1. Taxonomía

La familia *Asteraceae* es una de las más diversas del grupo de las angiospermas (Bremer and Anderberg, 1994; Smith et al., 2004), y pertenece al orden *Asterales*, subclase *Asteridae*, clase *Magnoliopsida* (eucotiledóneas), división *Magnoliophyta* y reino *Plantae*, de las que se estiman entre 1.500 y 1.700 géneros y 30.000 especies (Anderberg and Bremer, 1994; Funk et al., 2009; Katinas et al., 2007).

Se han registrado 12 subfamilias y 38 tribus (Panero & Funk, 2008). En esta clasificación, la subfamilia más extensa (*Carduoideae*) tiene 82 géneros y un total de 2.700 especies (Susanna and Garcia-Jacas, 2009).

En la subfamilia *Carduoideae* Sweet, se encuentra la tribu *Cynareae* Lam. & DC. (sinónimo de *Cardueae* Cass.) (Bremer, 1996; Panero and Funk, 2008), en la que se han identificado 72 géneros y 2.600 especies (Susanna and Garcia-Jacas, 2009).

En esta tribu, se encuentra el género *Centaurea* con un total de 250 especies, cuya distribución se centra en Europa, la Región Mediterránea y el Suroeste de Asia (Susanna and Garcia-Jacas, 2007).

El género *Centaurea* se encuentran dentro de la sección *Seridia* y del clado (tipo polínico) *Jacea*. Dicha sección presenta 22 especies a nivel mundial, siete de las cuales se encuentran localizadas en la región mediterránea occidental (Tuntin et al., 1976).

Tabla 1. Clasificación del clado *Jacea*, según biogeografía y secciones (Susanna and Garcia-Jacas, 2009).

Clado (Tipo polínico)	Biogeografía	Secciones
<i>Jacea</i>	Circunmediterránea y eurosiberiana	<i>Acrolopus</i>
		<i>Ammocyanus</i>
		<i>Calcitrapa</i>
		<i>Cynaroides</i>
		<i>Jacea – Lepteranthus</i>
		<i>Phaeopappus</i>
		<i>Phalolepis</i>
		<i>Ptosimopappus</i>
		<i>Willkomia</i>
		Mediterránea oriental
	<i>Cheirolepis</i>	
	<i>Grossheimia</i>	
	<i>Microlophus</i>	
	Mediterránea occidental	<i>Pseudophaeopappoides</i>
<i>Rhizocalathium</i>		
<i>Hymenocentron</i>		
<i>Melanoloma</i>		
		<i>Mesocentron</i>
		<u><i>Seridia</i></u>

Dentro de la sección *Seridia* se encuentran las especies *Centaurea aspera* y *Centaurea gentilii*, siendo su taxonomía la que se muestra en la figura 1:

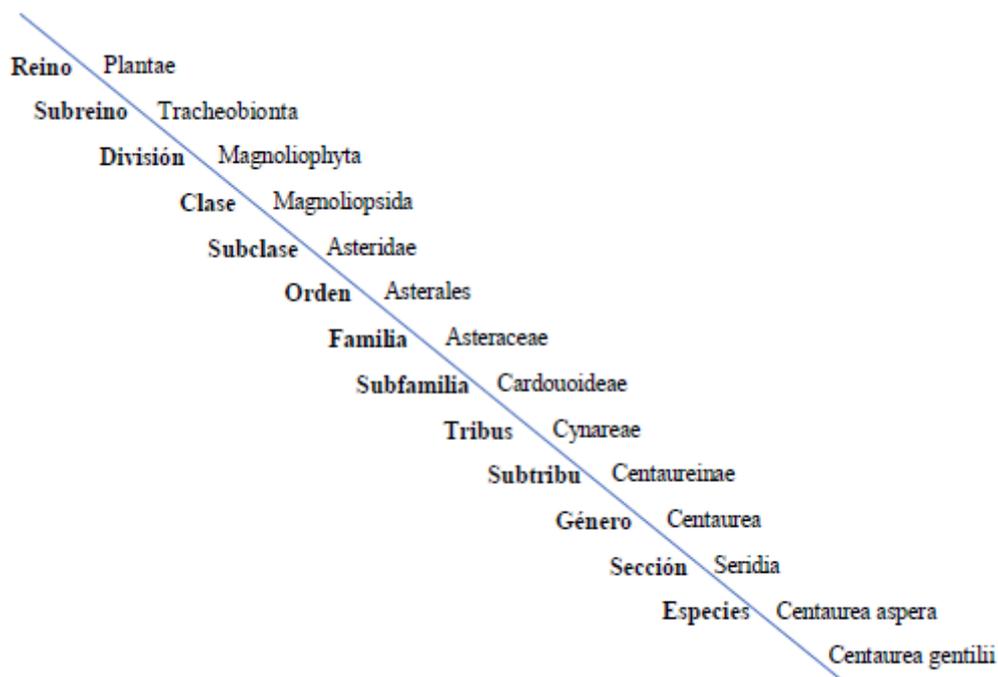


Figura 1. Taxonomía de la sección *Seridia* de la familia *Asteraceae*.

1.4.2. Morfología y distribución

Centaurea aspera L. es una especie herbácea de tallo muy duro y extensa ramificación. Sus hojas se caracterizan por ser lineales, de color grisáceo y con algunos dientes, mientras que los capítulos presentan brácteas, cada una de ellas con un número de espinas entre tres y cinco, siendo sus flores de color rosa con los estambres morados (Figura 2).



Figura 2. *Centaurea aspera* (Fuente: FloraCatalana.net).

Aunque su distribución geográfica se encuentra limitada a la zona mediterránea occidental, *C. aspera* se puede encontrar en América y Australia, donde ha sido introducida, y en varios países de Europa continental (Dengler et al., 2012).



Figura 3. Distribución de *C. aspera* en la Comunidad Valenciana (Fuente: Banco de Datos de Biodiversidad de la Comunidad Valenciana).

En el suroeste de Marruecos, el género *Centaurea* está representado por la especie *Centaurea gentilii* L., la cual, también se puede encontrar en la isla de Gran Canaria (Greuter and Von Raab-Straube, 2018).



Figura 4. *Centaurea gentilii* (Fuente: African Plants – A Photo Guide).

C. gentilii se localiza en suelos arenosos de la costa de Zaouiat el Kourati hasta la zona de Tiznit y en tenues acantilados de arena, donde se asocia con *Argania spinosa* y *Euphorbia beaumierana* Hook.f. & Coss. (Garmendia et al., 2015).

Dicha especie pertenece a las dunas fijas *Bubonio imbricati-Centaureetum gentilii* Peltir (Médail and Quézel, 1999).

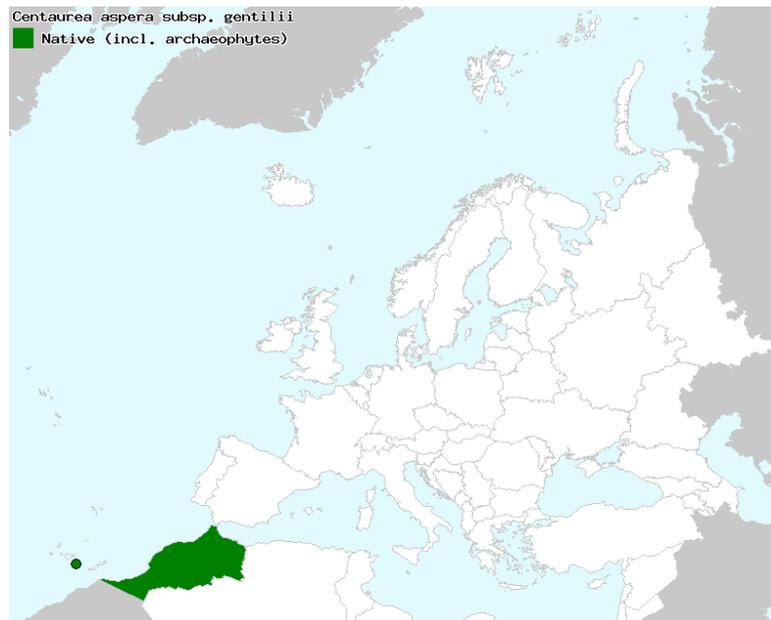


Figura 5. Distribución de *C. gentilii* (Fuente: The Euro+Med PlantBase).

Debido a su origen ancestral común, las diferencias entre ambas son muy sutiles o casi inexistentes, suponiendo una gran dificultad el establecimiento de límites que permita diferenciar los taxones (Garmendia et al., 2015).

1.5. Punto de partida del presente proyecto

El equipo del Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la Universidad Politécnica de Valencia ha centrado la mayor parte de sus estudios en las especies del género *Centaurea*, siendo los primeros de estos, de las especies que se pueden encontrar en la Península Ibérica, como son *Centaurea seridis* subsp. *marítima* (4x) o *Centaurea aspera* subsp. *stenophylla* (2x), ambas localizadas en la costa levantina (Farinós et al., 2010; Ferriol et al., 2012; Garmendia et al., 2018).

Pero los estudios no solamente se han centrado en especies de la Península Ibérica, ya que, actualmente se están llevando a cabo estudios de las especies marroquíes, siendo este el caso de *C. gentilii*, la cual se encuentra en las costas atlánticas centrales y meridionales de Marruecos.

Así mismo, los individuos que preceden el trabajo a realizar son especies de *C. aspera* (localizadas en el Saler y en Chulilla) y de *C. gentilii* (localizadas en Tamri y en Zaouiat el Kourati), de las que se tomaron muestras de las cipselas, y que se cultivaron en el invernadero del Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF).

El material vegetal de partida del presente trabajo procede de cruces forzados realizados en las instalaciones del Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF). Para la realización de dichos cruces el equipo de investigación muestreo en la primavera de 2017 cipselas de 4 poblaciones naturales de *Centaurea*, 2 poblaciones de *C. aspera* (localizadas en el Saler y Chulilla) y 2 poblaciones de *C. gentilii* (localizadas en Tamri y en Zaouiat el Kourati (Marruecos)). Las cipselas fueron germinadas y se hicieron crecer los individuos. En la primavera de 2018 y 2019 se realizaron los siguientes cruces:

- Alogamia entre los individuos de *C. aspera* de Chulilla.
- Alogamia entre los individuos de *C. aspera* del Saler.
- Alogamia entre los individuos de *C. gentilii* de Tamri.
- Alogamia entre los individuos de *C. gentilii* de Zaouiat el Kourati.
- Cruces entre *C. aspera* y *C. gentilii*, de las diferentes localizaciones.

De este modo, los cruces que se realizaron entre ambas especies, y que originaron el nuevo híbrido triploide que se va a estudiar en el presente trabajo, son:

- Madre *C. gentilii* (Zaouiat el Kourati) y padre *C. aspera* (Chulilla).
- Madre *C. aspera* (Chulilla) y padre *C. gentilii* (Zaouiat el Kourati).
- Madre *C. gentilii* (Zaouiat el Kourati) y padre *C. aspera* (El Saler).
- Madre *C. aspera* (El Saler) y padre *C. gentilii* (Zaouiat el Kourati).

En el caso de los individuos de *C. gentilii* de la zona de Tamri, solamente se hicieron tratamientos de alogamia.

2. Justificación

El presente estudio se centra en profundizar en los procesos de poliploidización y generación de diversidad que suceden en el reino *Plantae*.

La poliploidización supone una de las mayores fuerzas evolutivas de dicho reino y constituye uno de los procesos que más biodiversidad genera.

Dicho proceso se puede encontrar tanto en las poblaciones naturales de especies silvestres (por ejemplo, especies del género *Centaurea*), como en las especies cultivadas (por ejemplo, especies del género *Citrus*, *Triticum* y *Musa*), por lo que, conocer mejor como estos individuos interactúan es imprescindible en los procesos de mejora para la obtención de nuevas variedades y en el establecimiento de una correcta gestión de la conservación de determinadas especies.

Existen diversos estudios que establecen una relación entre la poliploidía y los ambientes cambiantes, presentando probablemente los poliploides una mayor capacidad de adaptación a dichos ambientes.

Por tanto, en un marco de cambio climático, donde las poblaciones naturales van a estar sometidas a cambios bruscos de sus hábitats, los poliploides podrían desempeñar un papel muy importante, debido a la capacidad de adaptación que dichos individuos presentan.

El complejo poliploide que se va a analizar en el presente estudio, formado por *C. aspera* y *C. gentilii*, es uno de los más completos, por lo que su estudio permite modelizar relaciones poliploides naturales.

Una vez completado el lavado, las cipselas se depositaron durante 24 horas en una placa petri, correctamente identificada, con un papel de filtro humedecido con agua destilada (Figura 7).



Figura 7. Cipselas tras el protocolo de lavado.

4.2. Citometría de flujo

Para conocer la ploidía de *C. aspera*, *C. gentilii* y del híbrido formado por el cruce de ambas especies, la técnica utilizada fue la citometría de flujo (Figura 8), la cual permite determinar el contenido del ADN nuclear de las células, midiendo su fluorescencia y sus características de dispersión de luz (Galbraith *et al.*, 1983). El análisis se realizó en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).



Figura 8. Material necesario para realizar la citometría de flujo.

Sobre las cipselas preparadas 24 horas antes, con un bisturí, se realizó un corte a 2/3 de la parte distal del embrión, de modo que se obtuvieron dos partes: la parte del embrión (2/3) y la parte final de los cotiledones (1/3).



Figura 9. Extracción del embrión y de los cotiledones (González, 2014).

La parte final de los cotiledones se destinó al análisis de ploidía mediante citometría de flujo. Para ello, se colocó en una placa petri, sobre la que se añadió un pequeño trozo de hoja de *C. aspera* (2x) o *C. gentilii* (4x) que actuó como control, ya que su ploidía era conocida.

Junto a la hoja control, sobre el material se añadieron dos gotas de tampón de extracción de núcleos (CyStain UV Precise P, Nuclei Extraction Buffer – 125 ml) con una pipeta pasteur, y se troceó, triturándolo, con una cuchilla.

Tras triturar el material vegetal, se añadió aproximadamente 1 ml del mismo tampón de extracción de núcleos, y una vez que el material estuvo correctamente mezclado con el reactivo, se pipeteo varias veces hasta que se hubo recogido toda la muestra con la pipeta pasteur.

Posteriormente, la mezcla se añadió a un tubo de ensayo, pero antes, sobre este tubo se colocó un filtro, de modo que, una vez filtrado, se añadieron 5 ml del reactivo (CyStain UV Precise P, Staining Buffer – 500 ml) y se agitó (Figura 10).

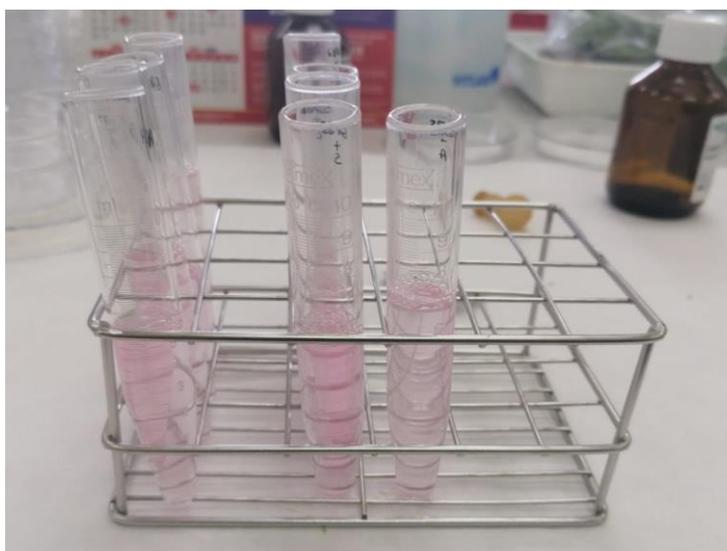


Figura 10. Muestra con los 5 ml de reactivo.

Por último, se vertió la muestra en pequeños tubos de ensayo (Figura 11) y se realizó el análisis de la ploidía mediante su introducción en el citómetro.

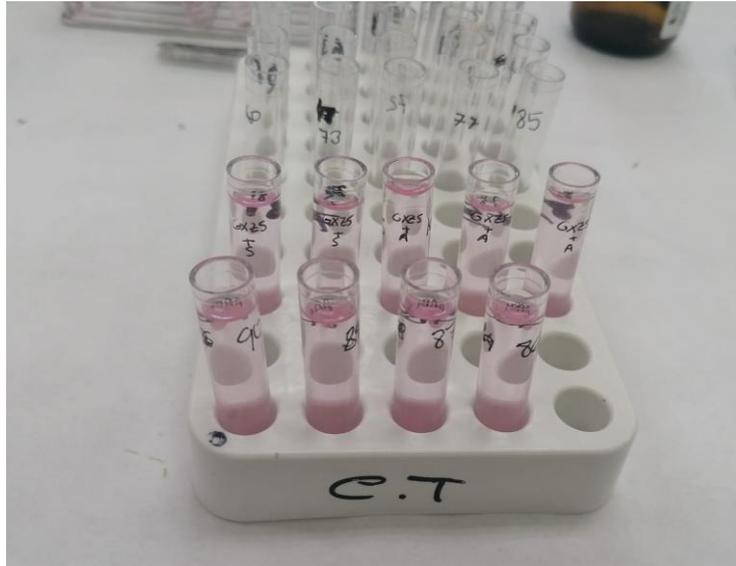


Figura 11. Muestra preparada para introducirla en el citómetro.

4.3. Germinación y trasplante para el crecimiento de las plántulas

Para poder realizar posteriores estudios del polen y morfometría del híbrido, fue necesario germinar el embrión de estas y el de las especies parentales.

Para ello, una vez realizado el corte anteriormente descrito, el embrión obtenido se colocó en una placa petri con papel de filtro en su base, hidratado con agua destilada (Figura 12).

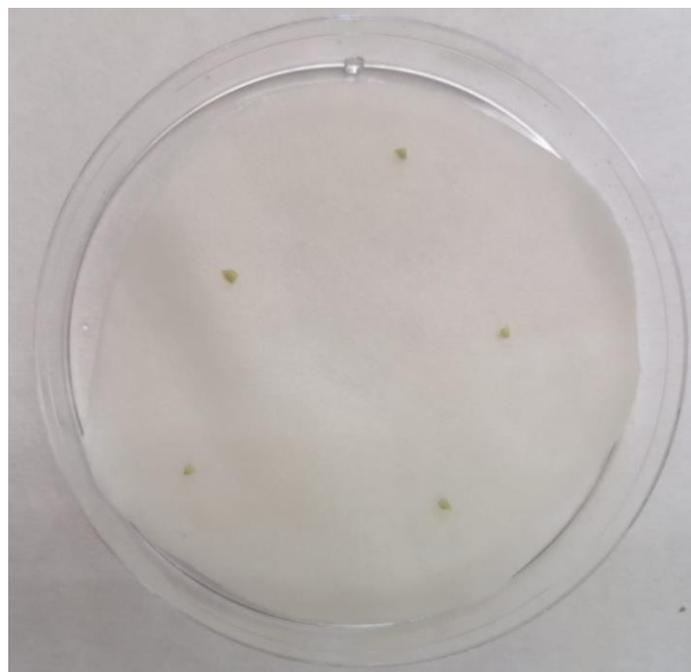


Figura 12. Embrión en correctas condiciones para su germinación.

Cuando el embrión desarrolló la raíz y tuvo una longitud de aproximadamente 1 cm (Figura 13), se procedió a realizar su trasplante a alveolos.



Figura 13. Embriones germinados, listos para su trasplante.

Para poder realizar el trasplante fue necesario rellenar con sustrato un alveolo, sobre el que se hizo un agujero en el centro, de modo que, con ayuda de unas pinzas, se cogió el embrión y se introdujo en el agujero, el cual se tapó enterrando la raíz (Figura 14).



Figura 14. Embrión germinado trasplantado.

El sustrato utilizado estaba compuesto por turba, perlita, cal, fertilizante NPK, fosfato de silicio y micronutrientes, siendo sus características las que aparecen en la tabla 2:

Tabla 2. Características químicas y contenido en nutrientes del sustrato utilizado.

Características químicas	Contenido en sal (KCl)	< 3,0 g/l
	pH (CaCl ₂)	5,0 – 6,5
Contenido en nutrientes	Nitrógeno (CaCl ₂)	180 – 450 mg/l de N
	Fosfato (CAL)	200 – 500 mg/l de P ₂ O ₅
	Óxido de potasio (CAL)	200 – 600 mg/l de K ₂ O

Este procedimiento se repitió con cada uno de los embriones germinados.

El posterior repicado de las plántulas (Figura 15) se realizó en el Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF).

Las plántulas, ya repicadas en macetas de 1,6 L de volumen, se colocaron en bandejas con agua en su base, que favorecieran la humectación por absorción.

Debido a la ternura del tallo, se decidió utilizar un sistema de riego por nebulización, ya que, otro sistema de riego, en el que el tamaño de gota fuera mayor, podría haber alterado la plántula.

En este caso, se utilizó un sustrato compuesto por turba rubia, fibra de coco y vermiculita.



Figura 15. Repicado de las plántulas en el Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF).

4.4. Caracterización fenotípica de las plántulas híbridas y sus parentales

Transcurrido un mes y medio desde que se realizara el repicado de las plántulas en el Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF), se realizó la caracterización fenotípica de las mismas.



Figura 16. Plántulas de *C. aspera*, *C. gentilii* y de la especie híbrida obtenidas en el proceso de germinación.

El número de plántulas que se analizó es el que se puede apreciar en la tabla 3:

Tabla 3. Número de plántulas por especie sobre las que se ha realizado la caracterización fenotípica.

Especie	Número de plántulas
<i>C. aspera</i>	7
<i>C. gentilii</i>	7
<i>C. aspera</i> x <i>C. gentilii</i>	7
<i>C. gentilii</i> x <i>C. aspera</i>	7
Total	28

A continuación, se pueden observar los indicadores utilizados para realizar el análisis morfométrico de las plántulas:

- Altura de la plántula, en mm (altura).
- Diámetro de la plántula, en mm (diámetro).
- Tipo de decurrencia (decu.tipo).
- Longitud de la decurrencia más larga de la plántula, en mm (decu.long).
- Anchura de la decurrencia más larga de la plántula, en mm (decu.anch).
- Longitud total de la hoja superior, en mm (hs.long.t).
- Longitud del peciolo de la hoja superior, en mm (hs.long.pec).
- Anchura máxima de la hoja superior, en mm (hs.anch).
- Número de lóbulos de la hoja superior (hs.nlob).
- Longitud de la decurrencia de la hoja superior, en mm (hs.decur).

- Longitud del internudo entre la hoja superior y la hoja inferior, en mm (hs.inter).
- Longitud total de la hoja media, en mm (hm.long.t).
- Longitud del peciolo de la hoja media, en mm (hm.long.pec).
- Anchura máxima de la hoja media, en mm (hm.anch).
- Número de lóbulos de la hoja media (hm.nlob).
- Longitud de la decurrencia de la hoja media, en mm (hm.decur).
- Longitud del internudo entre la hoja media y la inferior, en mm (hm.inter).
- Longitud total de la hoja basal, en mm (hb.long.t).
- Longitud del peciolo de la hoja basa, en mm (hb.long.pec).
- Anchura máxima de la hoja basal, en mm (hb.anch).
- Número de lóbulos de la hoja basal (hb.nlob).
- Longitud del capítulo fértil, en mm (cap.long).
- Longitud del involucre del capítulo fértil, en mm (inv.long).
- Anchura del involucre del capítulo fértil, en mm (inv.anch).
- Número máximo de espinas por bráctea (inv.esp.n).
- Longitud de la espina más larga en la bráctea seleccionada (inv.esp.long).

Para ello, con ayuda de un pie de rey y una regla de 30 cm (Figura 17), se midieron los indicadores anteriormente citados.



Figura 17. Material utilizado en la medición morfométrica de los individuos.

4.5. Estudio del polen del híbrido y comparación con el de sus parentales

Con los individuos disponibles del estudio realizado en el año 2019, y que estaban en los viveros del Centro para la Investigación y Experimentación Forestal, se realizó el estudio del de polen.



Figura 18. Capítulo de *C. aspera*.



Figura 19. Capítulo de *C. gentilii*.

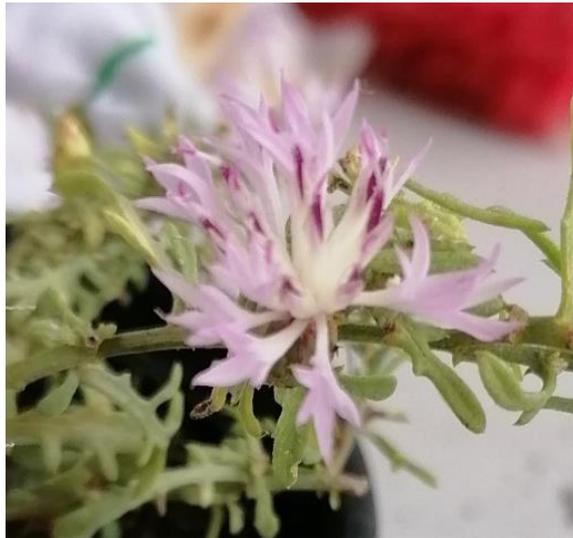


Figura 20. Capítulo del híbrido con parental materno procedente de *C. aspera*.



Figura 21. Capítulo del híbrido con parental materno procedente de *C. gentilii*.

Para extraer el polen de las anteras y tras lavar con alcohol un portaobjetos y un cubreobjetos, se procedió a abrir la corola. Para ello, sin que el proceso resultara demasiado intrusivo, con ayuda de unas pinzas se extrajeron las anteras sobre las que se hizo un corte transversal con una lanceta. Se extrajo así el polen y se colocó sobre el portaobjetos anteriormente preparado y sobre el que se había añadido una gota de alcohol, cubriendo posteriormente las muestras con el cubreobjetos.



Figura 22. Lupa binocular utilizado para realizar la apertura de la corola y la extracción del polen de las anteras.

De este modo, la muestra se colocó en el microscopio, y se realizó el estudio del polen del híbrido, realizando una comparativa con el polen de las especies *C. aspera* y *C. gentilii*.



Figura 23. Microscopio utilizado para realizar el estudio de los capítulos.

4.6. Ensayo de cruces forzados

Para poder realizar el análisis de la fertilidad del híbrido, fue necesario realizar cruces forzados entre los capítulos de los individuos adultos del año 2019.



Figura 24. Material utilizado en el ensayo de cruces forzados.

Considerando el híbrido con la nomenclatura “HA” (híbridos con parental materno *C. aspera*), “HG” (híbridos con parental materno *C. gentilii*), las especies de *C. aspera* “A”, y las especies de *C. gentilii* “G”, se diseñó un ensayo en el que se cruzarían 60 capítulos híbridos con 20 capítulos híbridos (de distintos individuos), 20 capítulos de *C. aspera*, y 20 capítulos de *C. gentilii*, siendo los cruces bidireccionales (cada capítulo actúa tanto como donante de polen, como donante de óvulos que pueden fecundarse con el polen del otro capítulo).

Tabla 4. Tabla de los principales tratamientos.

		Cruces	Capítulos tratados
Tratamiento A	HxAA	10	20
	HGxA	10	20
Tratamiento B	HxAH	10	20
	HGxH	10	20
Tratamiento C	HxAH	5	10
	HGxHG	5	10
	HxAHG	10	20
Total		60	120

Por lo tanto, antes de realizar la polinización forzada mediante frotación de los capítulos, fue necesario cortar con unas tijeras todos los capítulos abiertos, con el objetivo de que la planta no utilizase todas sus reservas en esos capítulos no controlados, y embolsar todos los capítulos cerrados para evitar la acción de los polinizadores sobre estos.



Figura 25. Embolsado de los capítulos de un individuo híbrido.

De este modo, cuando los capítulos desarrollaron las flores, y tras comprobar que los capítulos sobre los que se iba a realizar el frote estuvieran en el mismo estado fenológico, se realizó el primer frote (Figura 26).

Posteriormente, se embolsaron los capítulos cruzados, con las bolsas de muselina correctamente codificadas y atadas al tallo con un alambre (Figura 27), para realizar al día siguiente el segundo frote sobre estos, dejando en este caso los capítulos embolsados durante 30 días.



Figura 26. Realización del frote entre capítulos.



Figura 27. Embolsado posterior al frote entre capítulos y codificación de las bolsas de muselina.

Después de estos 30 días, con la finalidad de observar si la fecundación se había producido, se recogieron los capítulos tratados, y, se abrieron, contando el número de cipselas y sus características, las cuales, fueron introducidas en tubos eppendorfs, correctamente codificados y guardados en la nevera a una temperatura de 4°C (Figura 28 – 30).

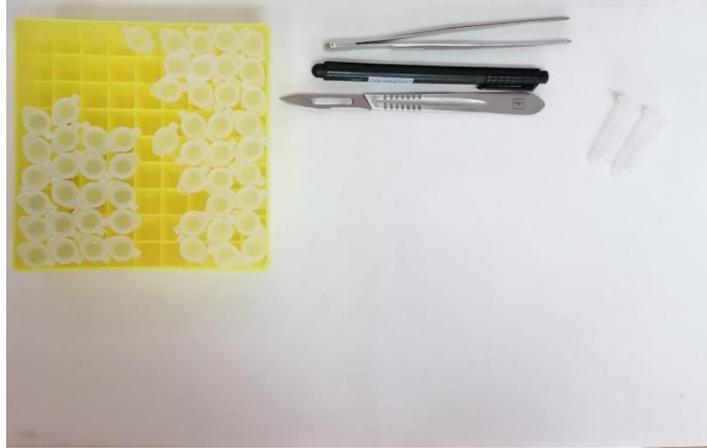


Figura 28. Material utilizado para realizar la extracción de cipselas de los capítulos.

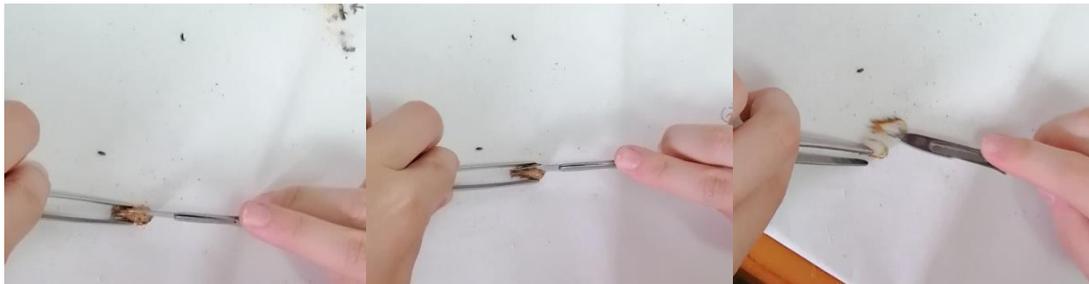


Figura 29. Proceso de apertura de los capítulos.



Figura 30. Capitulum abierto en el que se puede apreciar la presencia de cipselas.

De tal modo que, siguiendo el mismo procedimiento se realizó el ensayo con cada uno de los tratamientos citados en la tabla 4.

5. Resultados y discusión

Los resultados del presente estudio se ordenan cronológicamente en función de los análisis y experimentos realizados. En primer lugar, se hidrataron las cipselas obtenidas de los cruces realizados en 2019 por David Benavent y se retiró el pericarpio. En este momento se analizó la presencia de cipselas llenas y vacías (5.1). Los embriones de las cipselas llenas fueron analizados mediante citometría de flujo para determinar su nivel de ploidía (5.2) y fueron puestos a germinar (5.3). Posteriormente, con las plántulas crecidas a partir de estos embriones, se realizó un análisis morfométrico de las mismas (5.4), se estudiaron las características del polen (5.5), y finalmente se realizó un experimento de cruces forzados para comprobar su fertilidad (5.6).

5.1. Análisis de los porcentajes de cipselas viables

Después de hidratar las cipselas, se retiró el pericarpio, y un gran número de cipselas híbridas no presentaron embrión desarrollado. Del total de las 97 cipselas híbridas, un 67,95% estaban vacías (Tabla 5). Al analizar las diferencias entre las cipselas híbridas formadas sobre *C. aspera* AxG (óvulos de *C. aspera* x polen de *C. gentilii*) y sobre *C. gentilii* (óvulos de *C. gentilii* x polen de *C. aspera*) se encontraron diferencias significativas (Figura 31, $\chi^2 p$ – valor = 0,0014). Es decir, se encontró un mayor número de cipselas llenas sobre madre *C. gentilii* que sobre madre *C. aspera*, siendo esta diferencia significativa. Adicionalmente se analizó el porcentaje de cipselas llenas y vacías en las cipselas obtenidas por alogamia de los parentales (Tabla 5). En estos casos, cipselas no híbridas, los porcentajes de cipselas vacías fueron muy bajos, alrededor del 3%.

Tabla 5. Número y porcentaje de cipselas llenas y vacías por taxón.

Tratamiento	Especie		Cipselas llenas	Cipselas vacías	Total
Alogamia	<i>C. aspera</i>	N	34	1	35
		%	97,14	2,86	100
Cruce	<i>C. aspera</i> x <i>C. gentilii</i>	N	29	29	58
		%	50,00	50,00	100
Cruce	<i>C. gentilii</i> x <i>C. aspera</i>	N	32	7	39
		%	82,05	17,95	100
Alogamia	<i>C. gentilii</i>	N	29	1	30
		%	96,66	3,34	100

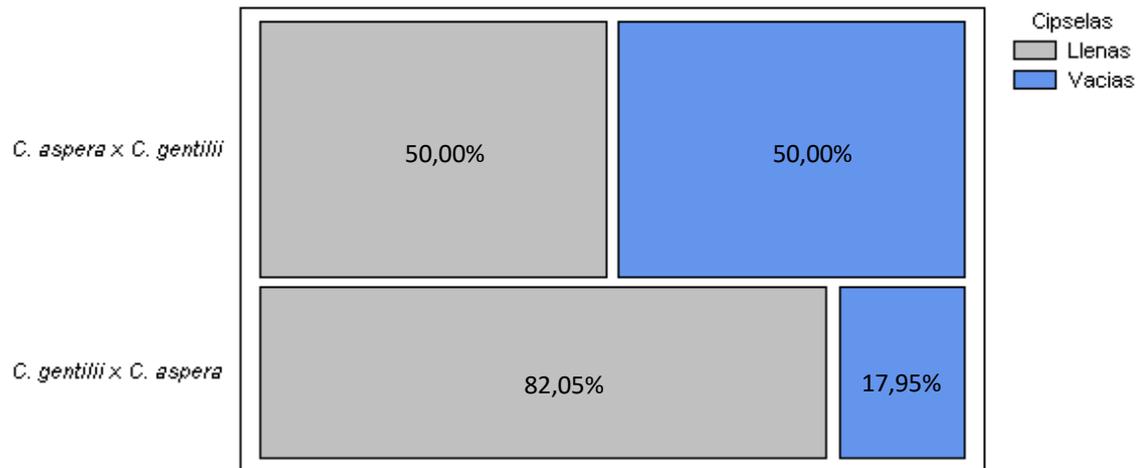


Figura 31. Gráfico de mosaico del porcentaje de cipselas híbridas llenas y vacías. Según el origen de los óvulos y el polen. $\chi^2 p$ – valor = 0,0014.

El elevado porcentaje de cipselas híbridas vacías, indica probablemente la presencia de barreras postcigóticas. Las barreras postcigóticas hacen referencia al proceso en el que los cigotos y los individuos adultos (si se desarrollan), presentan problemas reproductivos (Dobzhansky, 1970; Perfectti, 2002). Las cipselas provenientes de cruces alógamos (las que se producirían de forma natural en las poblaciones silvestres) tanto de *C. aspera* como de *C. gentilii* apenas presentaron cipselas vacías (porcentajes alrededor del 3%), indicando que la fecundación se produce adecuadamente y una vez se ha formado el cigoto éste se desarrolla hasta formar un embrión completo con sus cotiledones. Sin embargo, más de la mitad de las cipselas híbridas no presentaban embrión. Este hecho indica que seguramente el polen de una especie sobre la otra es capaz de desarrollarse, llegar hasta el óvulo y fecundar para formar el cigoto. Este proceso desencadenaría el desarrollo de la cipsela (con su pericarpio completo) pero incompatibilidades genéticas posteriores impedirían el desarrollo del cigoto hasta formar el embrión. Por ello las cipselas aparecen sin embrión desarrollado. La presencia de barreras postcigóticas ha sido descrita con anterioridad en especies de la familia Asteráceae (Nielsen et al., 2007).

5.2. Estudio del nivel de ploidía de las cipselas enteras obtenidas en los cruces

El objetivo propuesto consista en estudiar la ploidía de 97 cipselas híbridas y una muestra representativa de las cipselas obtenidas por alogamia de cada parental, pero debido a la alerta sanitaria ocasionada por el COVID – 19 que causo el cierre de las instituciones científicas, solamente se pudo comprobar la ploidía de 43 cipselas híbridas y de 40 cipselas parentales (Tabla 6).

Tabla 6. Número y porcentaje total de cipselas analizadas mediante el método de la citometría de flujo.

Tratamiento	Especie		Cipselas llenas	Cipselas vacías	Cipselas analizadas
Alogamia	<i>C. aspera</i>	N	19	1	19
		%	95,00	5,00	95,00
Cruce	<i>C. aspera</i> x <i>C. gentilii</i>	N	19	19	19
		%	50,00	50,00	50,00
Cruce	<i>C. gentilii</i> x <i>C. aspera</i>	N	5	0	5
		%	100,00	0,00	100,00
Alogamia	<i>C. gentilii</i>	N	19	1	19
		%	95,00	5,00	95,00

Las citometrías realizadas en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), y que se llevaron a cabo durante el mes de febrero de 2020, mostraron que los embriones de las cipselas híbridas son triploides (3x). Se analizaron 24 embriones híbridos y todos resultaron triploides. Este resultado coincide con lo esperado, puesto que el resultado del cruce entre una especie diploide y una tetraploide, si no se producen anomalías durante la meiosis, es un híbrido triploide (Figura 32).

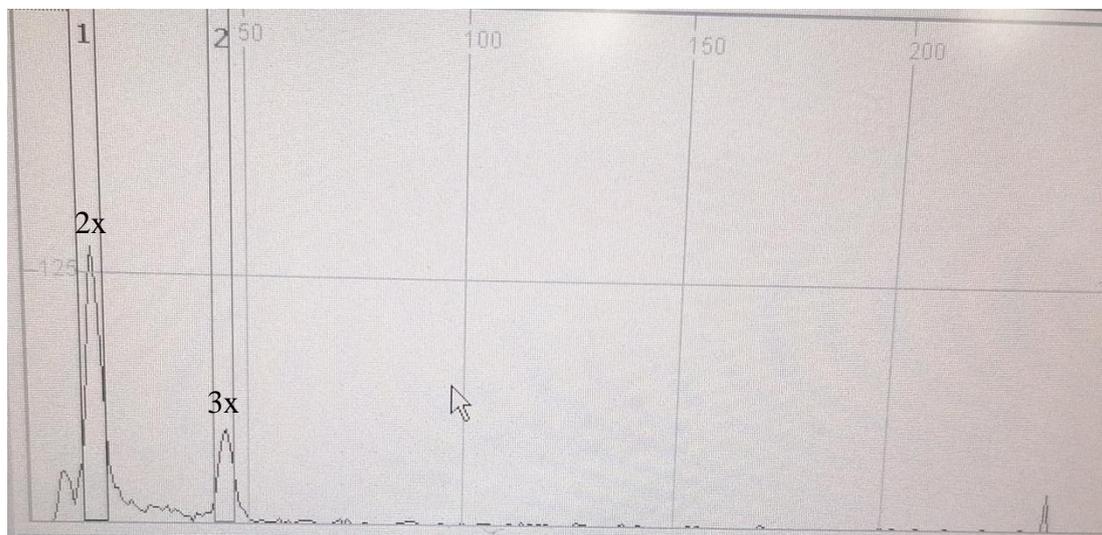


Figura 32. Histograma de intensidad de fluorescencia. Ploidía de la especie híbrida AxG (3x) (pico 2) con control *C. aspera* (2x) (pico 1).

Los embriones provenientes del tratamiento de alogamia en *C. aspera* resultaron ser diploides, mientras que los embriones provenientes de alogamia en *C. gentilii* fueron tetraploides.

En el anejo 2 se puede consultar el nivel de ploidía que se ha obtenido para cada uno de los embriones analizados.

5.3. Estudio de germinación y supervivencia

Los porcentajes de germinación de los diferentes taxones fueron elevados y variaron del 53,13% para el híbrido GxA al 93,10% para alogamia *C. gentilii* (Tabla 7, Figura 33).

Tabla 7. Embriones germinados y porcentaje de germinación de cada una de las especies.

Tratamiento	Especies		Germinación	No germinación	Total
Alogamia	<i>C. aspera</i>	N	31	3	34
		%	91,17	8,83	100,00
Cruce	<i>C. aspera</i> x <i>C. gentilii</i>	N	25	4	29
		%	86,21	13,79	100,00
Cruce	<i>C. gentilii</i> x <i>C. aspera</i>	N	17	15	32
		%	53,13	46,87	100,00
Alogamia	<i>C. gentilii</i>	N	27	2	29
		%	93,10	6,90	100,00

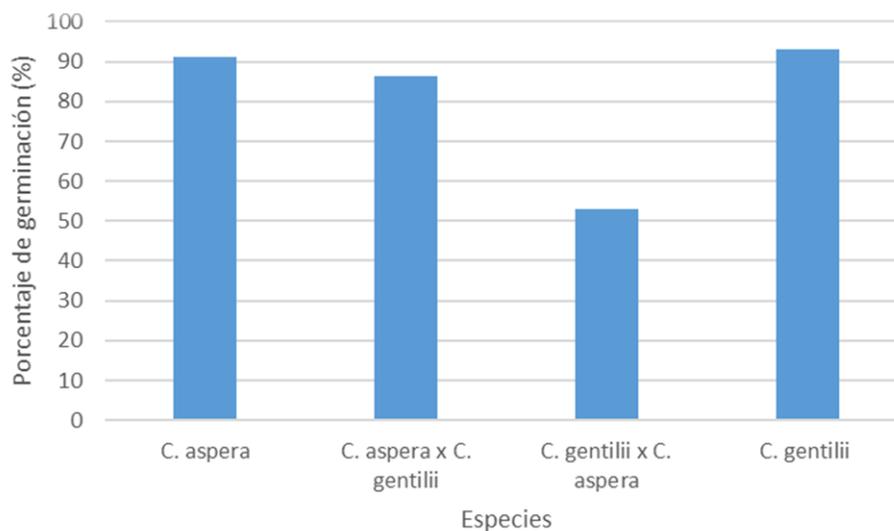


Figura 33. Representación gráfica del porcentaje de germinación (%).

En general, la germinación fue más alta en las cipselas provenientes de alogamia que en las cipselas híbridas. El 86,21% de los embriones provenientes del cruce AxG (*C. aspera* x *C. gentilii*) germinaron, mientras que sólo el 53,13% de los embriones proveniente del cruce GxA (*C. gentilii* x *C. aspera*) consiguieron germinar.

Se encontró una diferencia significativa en el porcentaje de germinación de los embriones híbridos dependiendo de su origen materno (Figura 34, χ^2 p – valor = 0,0053), puesto que la germinación de *C. aspera* x *C. gentilii* fue más alta.

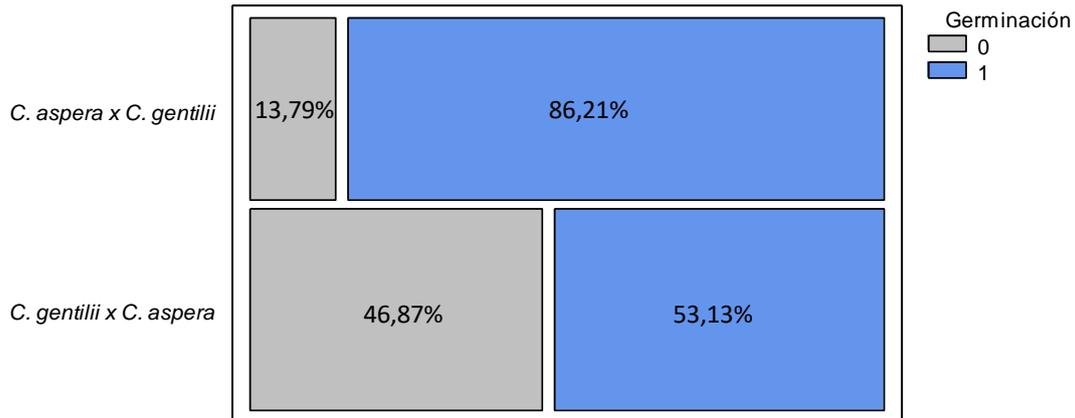


Figura 34. Gráfico de mosaico del porcentaje de germinación de los embriones híbridos. χ^2 p – valor = 0,0053.

Cabe destacar que, a causa del estado de alarma ocasionado por la alerta sanitaria del COVID – 19, el proceso de extracción y posterior germinación de los embriones no se pudo realizar en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), realizándose en su lugar, en el domicilio particular. Al no disponer de las condiciones asépticas de un laboratorio, el resultado puede haberse visto alterado, puesto que, a lo largo del periodo de germinación se observó una alta proliferación de hongos sobre los embriones (Figura 35).



Figura 35. Presencia de hongos en el periodo de germinación de los embriones.

Los resultados referentes a la supervivencia de las plántulas, se aprecian en la tabla 8 y en la figura 36.

Tabla 8. Plántulas que han sobrevivido y porcentaje de supervivencia por taxón.

Tratamiento	Especie	Supervivencia		No supervivencia	Total
		N	%		
Alogamia	<i>C. aspera</i>	N	31	0	31
		%	100,00	0,00	100,00
Cruce	<i>C. aspera</i> x <i>C. gentilii</i>	N	24	1	25
		%	96,00	4,00	100,00
Cruce	<i>C. gentilii</i> x <i>C. aspera</i>	N	16	1	17
		%	94,12	5,88	100,00
Alogamia	<i>C. gentilii</i>	N	27	0	27
		%	100,00	0,00	100,00

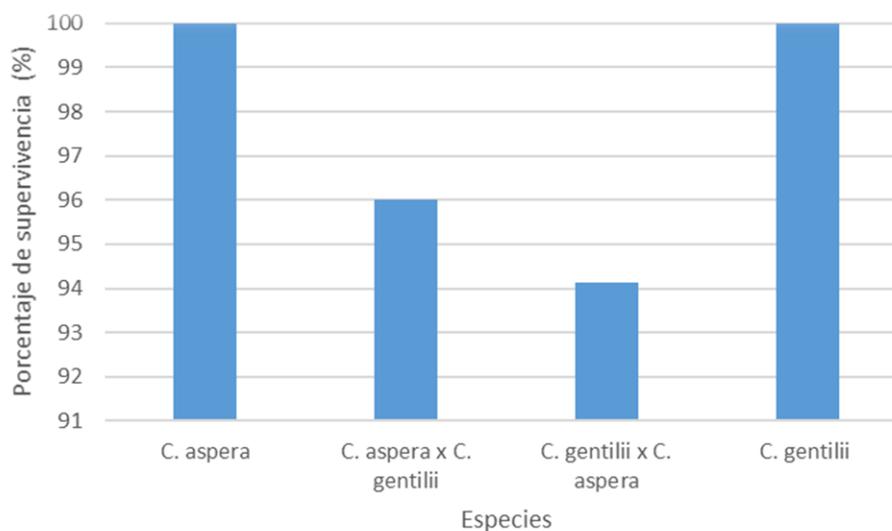


Figura 36. Representación gráfica del porcentaje de supervivencia (%).

C. aspera y *C. gentilii* presentaron una supervivencia del 100%, siendo la de los taxones híbridos de un 96% en los individuos con parental femenino *C. aspera*, y un 94,12% en los individuos con parental femenino *C. gentilii*.

Tras realizar el análisis estadístico, se ha comprobado que no existe una diferencia significativa entre la supervivencia de los taxones híbridos (Figura 37, χ^2 p – valor = 0,7786).

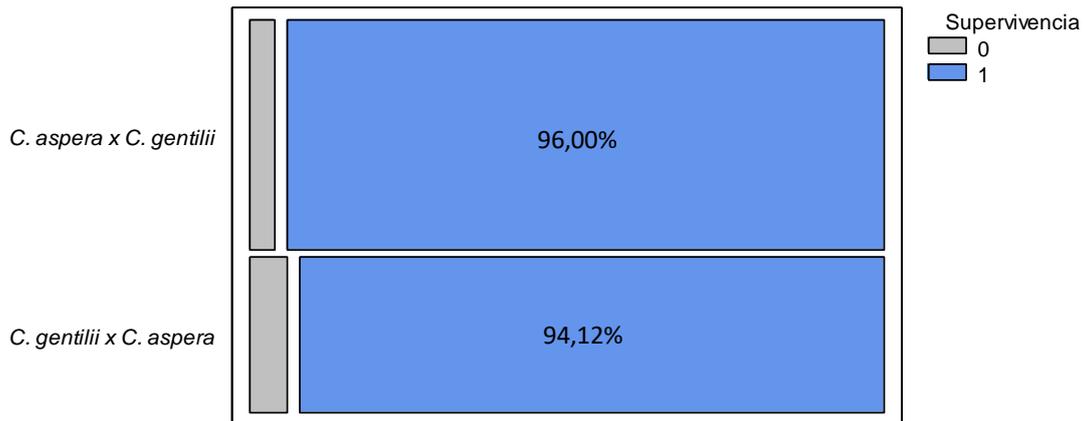


Figura 37. Gráfico de mosaico del porcentaje de supervivencia de las plántulas híbridas. χ^2 p – valor = 0,7786.

Los datos de germinación y de supervivencia se encuentran detallados en el anejo 3 y en el anejo 4.

5.4. Análisis del fenotipo de las plántulas híbridas

Para estudiar el fenotipo de las plántulas híbridas, los datos morfométricos fueron analizados mediante un análisis de conglomerados (análisis Clúster) y un análisis de Componentes Principales (ACP). Estos análisis nos aportan información sobre las diferencias y semejanzas entre individuos, los cuales son agrupados según el grado de homogeneidad que presentan.

De este modo, tras seleccionar el método del vecino más lejano (Figura 38) y el método Ward (Figura 39), se comprueba como individuos del taxón HA (*C. aspera* x *C. gentilii*) y HG (*C. gentilii* x *C. aspera*) no muestran diferencias morfométricas claras ya que no son separados en “clusters” independientes.

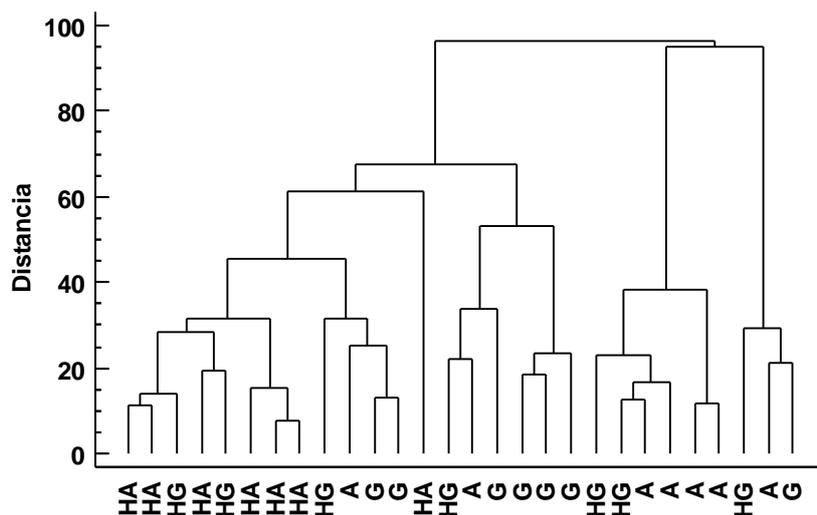


Figura 38. Análisis estadístico basado en el análisis de conglomerados, con el método del vecino más lejano, donde HA = Híbrido con parental materno *C. aspera*, HG = Híbrido con parental materno *C. gentilii*, G = *C. gentilii* y A = *C. aspera*.

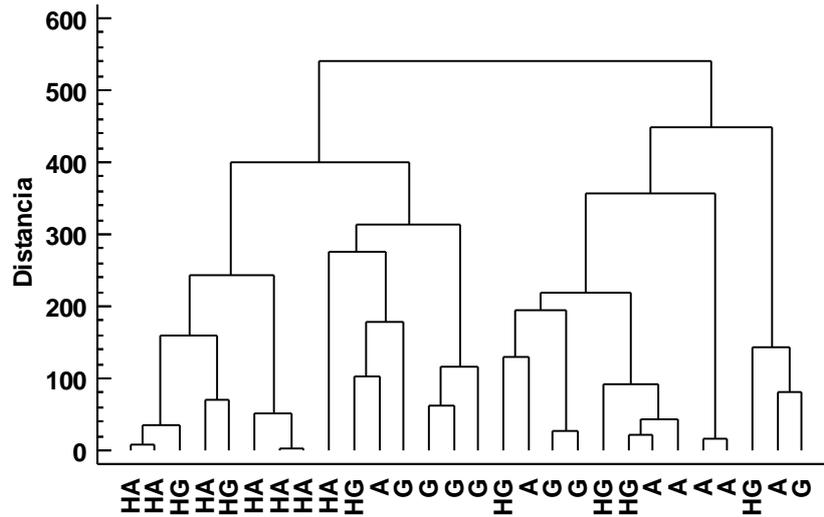


Figura 39. Análisis estadístico basado en el análisis de conglomerados, con el método de Ward, donde HA = Híbrido con parental materno *C. aspera*, HG = Híbrido con parental materno *C. gentilii*, G = *C. gentilii* y A = *C. aspera*.

El Análisis de Componentes Principales (figura 40), muestra de forma más detallada las semejanzas morfométricas que existen entre las especies. A la derecha del Componente 1, en rojo aparece un mayor número de individuos de *C. aspera*, mientras que, a la izquierda, en azul, aparecerían los individuos de *C. gentilii*. En una posición intermedia se encuentran los híbridos. Esta distribución lógica de los individuos analizados presenta grandes áreas de solape, lo que indica fenotipos muy similares de los diferentes taxones.

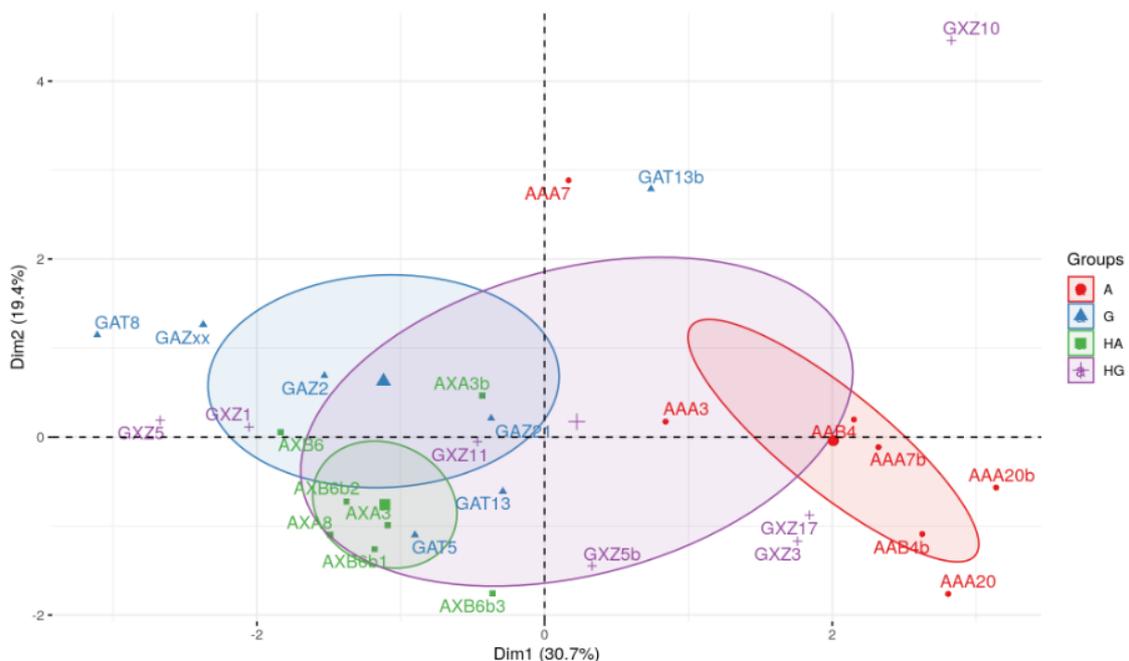


Figura 40. Representación gráfica, de los taxones, en el que se agrupan los perfiles por su similitud.

Es importante destacar que, a lo largo de la realización de la medición de los caracteres fenotípicos, tanto *C. gentilii* como el híbrido con parental materno *C. gentilii*, no habían desarrollado el crecimiento de los capítulos, por lo que en estos casos solo se pudo realizar la medición de las características del involucre (Figura 41).



Figura 41. Plántula híbrida con parental materno *C. gentilii*, en el que se puede observar como los capítulos están cerrados.

5.5. Estudio del polen del híbrido y comparación con el polen de sus parentales

Tras realizar la observación de las anteras, tanto de las especies parentales como de las especies híbridas, a nivel macroscópico, se ha podido observar como las especies híbridas presentan polen en sus anteras (Figura 42 – 45).



Figura 42. Antera de *C. aspera* con polen.



Figura 43. Antera de *C. gentilii* con polen.



Figura 44. Antera del híbrido con parental materno *C. aspera*, con polen (*C. aspera* x *C. gentilii*).



Figura 45. Antera del híbrido con parental materno *C. gentilii*, con polen (*C. gentilii* x *C. aspera*).

Tras comprobar la presencia de polen en los individuos híbridos, las observaciones microscópicas realizadas han mostrado que el polen con forma circular, muestra a primera vista, un aspecto de turgencia y de viabilidad similar al de los parentales, ya que este cuenta con la estructura básica: capa interna (intina), capa externa (exina) y apertura, zona por la que se produce la salida del tubo polínico (Figura 46 – 49).

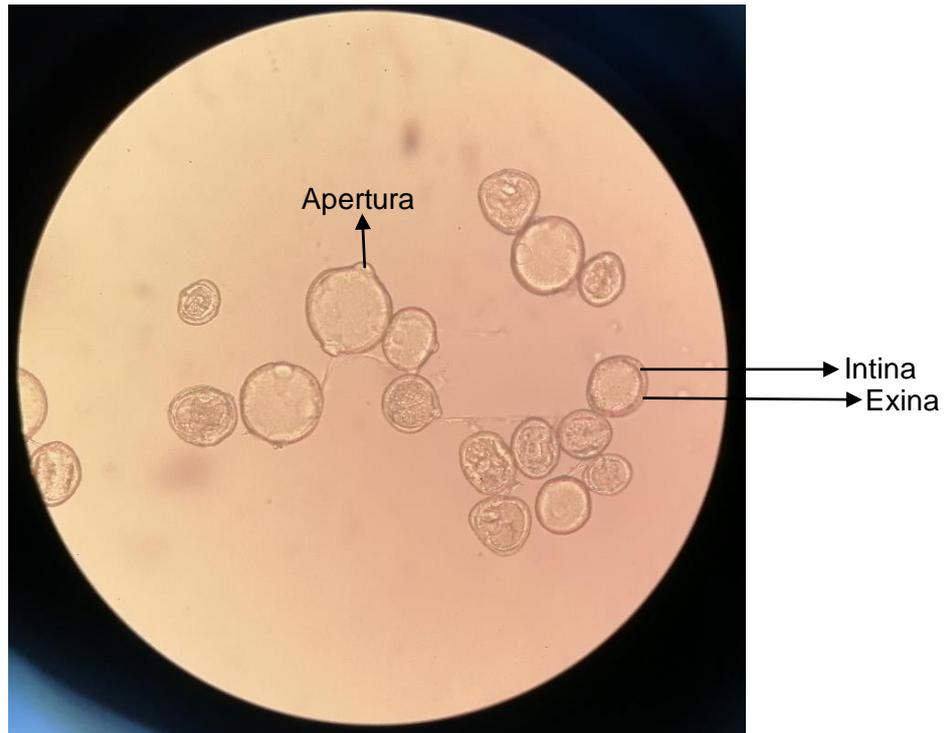


Figura 46. Polen de *C. aspera*, visto al microscopio.

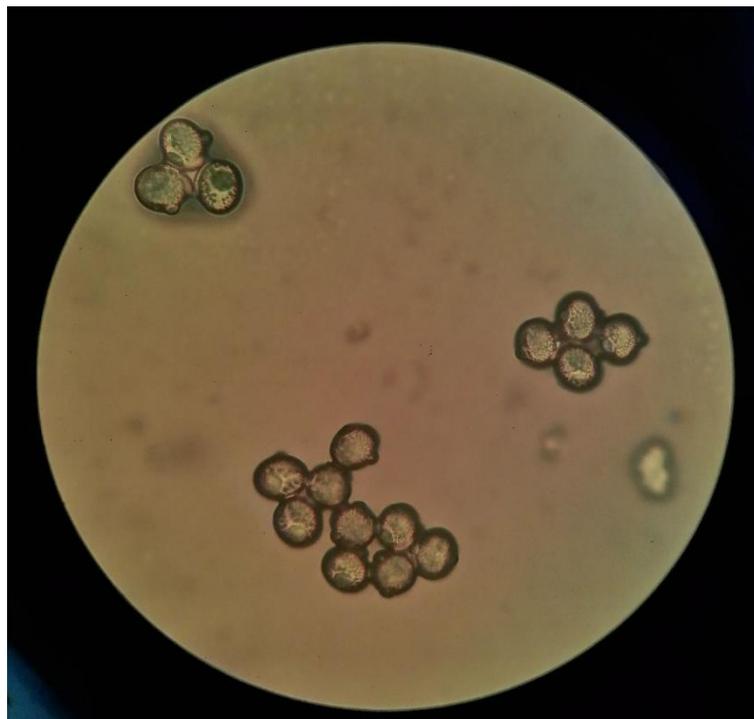


Figura 47. Polen de *C. gentilii*, visto al microscopio.



Figura 48. Polen del híbrido con parental materno *C. gentilii*, visto en el microscopio (*C. gentilii* x *C. aspera*).

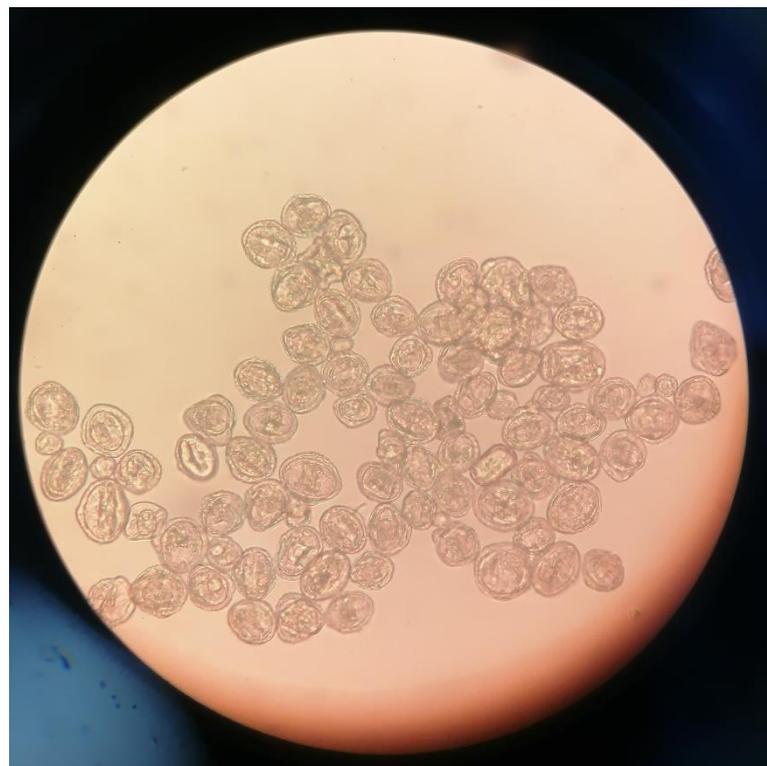


Figura 49. Polen del híbrido con parental materno *C. aspera*, visto en el microscopio (*C. aspera* x *C. gentilii*).

5.6. Estudio de la fertilidad de los híbridos

Después de la realización del experimento de cruces forzados, se contó el número de cipselas en cada uno de los capítulos tratados. Las cipselas observadas no eran completas, siendo estas, restos del ovario de la flor sin fecundar, por lo que no se consideran individuos fértiles (Figura 50).



Figura 50. Restos del ovario de la flor sin fecundar.

A pesar de no ser cipselas completas se realizó el recuento de “restos de ovarios” en cada uno de los capítulos tratados. Con estos datos los análisis estadísticos, mostraron que no existen diferencias significativas entre los taxones, ya que, existe una superposición entre los datos de los diferentes taxones (Figura 51).

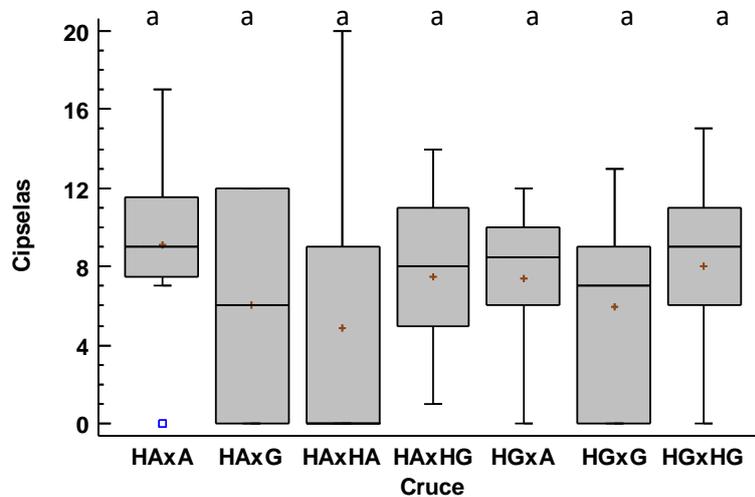


Figura 51. Diagrama de caja de bigotes.

Para comprobar la homogeneidad entre taxones, se utilizó el análisis de múltiples rangos con el método *Tukey HSD* (Tabla 9) y la prueba de *Kruskal – Wallis*, donde se aprecia que no existen diferencias significativas, siendo el valor – p mayor a 0,05 (Tabla 10).

Tabla 9. Prueba de múltiples rangos, con el método Tukey HSD.

Cruce	Casos	Media	Grupos Homogéneos
HxAHA	6	4,83333	X
HGxG	22	5,95455	X
HxAxG	2	6,0	X
HGxA	20	7,4	X
HxAxHG	10	7,5	X
HGxHG	14	8,0	X
HxAxA	8	9,125	X

Tabla 10. Prueba de Kruskal – Wallis. Estadístico: 5,7632. P – Value: 0,450233.

Cruce	Tamaño Muestra	Rango Promedio
HxAxA	8	50,5625
HxAxG	2	41,25
HxAxHA	6	28,25
HxAxHG	10	44,7
HGxA	20	42,975
HGxG	22	35,25
HGxHG	14	47,4643

Es importante destacar que el ensayo diseñado para ser realizado en primavera de 2020, se ha realizado en los meses de junio-julio. Este hecho puede haber afectado el resultado obtenido por lo que sería recomendable la repetición del mismo que permita confirmar el resultado.

6. Conclusiones

Las observaciones, mediciones y ensayos realizados han permitido caracterizar el híbrido *C. xmasfitensis* (*C. aspera* x *C. gentilii*).

Las cipselas híbridas presentaron un mayor porcentaje (68%) de cipselas vacías (sin embrión y cotiledones) que las cipselas obtenidas por cruces alógamos dentro de especie (sólo un 3%). Este alto porcentaje de cipselas vacías en el cruce híbrido probablemente ha sido causado por la presencia de barreras postcigóticas.

Los análisis de citometría confirmaron que todos los individuos de *C. xmasfitensis* obtenidos del cruce son triploides (3x). Su germinación fue inferior (53%) a la germinación obtenida en cipselas proveniente de alogamia (92%), aunque este resultado pudo estar parcialmente influido por el hecho de que gran parte de la germinación de las cipselas híbridas se realizó en el domicilio particular lo que aumentó la contaminación por hongos fitopatógenos. Una vez germinadas las cipselas, la tasa de supervivencia fue muy elevada, presentando una mortalidad inferior al 1%.

El fenotipo de *C. xmasfitensis* es intermedio entre los dos parentales (como ocurren en la mayoría de los híbridos), estando los 3 fenotipos (el de los dos parentales y el del híbrido), muy próximos entre sí, siendo difícil a simple vista diferenciar los tres taxones. La morfometría ha relevado que además no existen diferencias fenotípicas entre híbridos dependiendo de su origen materno. Es decir, que los individuos de *C. xmasfitensis* que se formaron sobre madre *C. aspera* (AxG) no se diferencian fenotípicamente de los individuos de *C. xmasfitensis* que se formaron sobre madre *C. gentilii* (GxA). Este resultado se contradice con las observaciones iniciales realizadas por David Benavent (resultados aún por publicar) que apuntaban a que las plantas provenientes de una u otra madre presentaban fenotipos diferenciados.

Finalmente *C. xmasfitensis* presenta polen en sus anteras y el aspecto del polen es normal y muy semejante al polen de sus parentales (*C. aspera* y *C. gentilii*) lo que podría indicar fertilidad del híbrido. Sin embargo, los experimentos de cruces forzados no han producido cipselas viables indicando una nula o baja fertilidad tanto de los óvulos como del polen.

Los estudios de fertilidad de *C. xmasfitensis* son preliminares y deberán ser complementados y confirmados en estudios posteriores. Para ello se estudiará la viabilidad del polen con técnicas de tinción y microscopía, y se repetirá el experimento de cruces forzados en una época más temprana e involucrando a un mayor número de individuos.

En las poblaciones naturales, la esterilidad o fertilidad de un híbrido resulta esencial ya que determina el papel que juega éste en las relaciones de competencia entre los parentales y el flujo de genes entre ambos.

7. Bibliografía

- Aleza, P., Juárez, J., Hernandez, M., Ollitrault, P., & Navarro, L.** (2012). Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on 4x x 2x sexual hybridisations. *Tree genetics & genomes*, 8(6), 1293-1306.
- Andersson E.** (1949). *Introgressive hybridization*. New York, NY, USA: Wiley.
- Arnold, Michael L.** (1997). *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press on Demand.
- Balao, F., Herrera, J., & Talavera, S.** (2011). Phenotypic consequences of polyploidy and genome size at the microevolutionary scale: a multivariate morphological approach. *New Phytologist*, 192(1), 256-265.
- Barton, N. H.** (2001). The role of hybridization in evolution. *Molecular ecology*, 10(3), 551-568.
- Bremer, K.** (1996). Major clades and grades of the Asteraceae. *Compositae: systematics*, 1, 1-7.
- Bremer, K., & Anderberg, A. A.** (1994). *Asteraceae: cladistics & classification*. Timber Press. Portland, USA.
- De Wet, J. M. J., Timothy, D. H., Hilu, K. W., & Fletcher, G. B.** (1981). Systematics of south american tripsacum (gramineae). *American Journal of Botany*, 68(2), 269-276.
- Delgado, L. M., Lastra, M. U., & Angel, M. L. M.** (2010). Estandarización de la técnica citogenética squash para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. *Scientia et Technica*, 3(46), 74-79.
- Dengler, J., Berendsohn, W., Bergmeier, E., Chytrý, M., Danihelka, J., Jansen, F., ... & Schaminée, J.** (2012). The need for and the requirements of EuroSL, an electronic taxonomic reference list of all european plants. *Biodiversity & Ecology*, 4, 15-24.
- Díaz Solís, S. H., Morejón Rivera, R., Onicka Chisholm, O., & Castro Álvarez, R.** (2015). Evaluación de nuevas líneas de arroz (*Oryza sativa* L.) obtenidas por hibridaciones dentro del Programa de Mejoramiento Genético del cultivo en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 36(3), 115-123.
- Dobzhansky, T., & Dobzhansky, T. G.** (1970). *Genetics of the evolutionary process* (Vol. 139). Columbia University Press.
- Farinós, M., Basilio, H., Garmendia Salvador, A., & Ferriol Molina, M.** (2010). Nuevo híbrido del género *Centaurea* L.(Compositae) sección *Seridia* (Juss.) Czerep. *Flora Montiberica*, 44, 66-71.
- Fawcett, J. A., Maere, S., & Van De Peer, Y.** (2009). Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5737-5742.
- Federici, C. T., Fang, D. Q., Scora, R. W., & Roose, M. L.** (1998). Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(6-7), 812-822.
- Ferriol, M., Garmendia, A., Ruiz, J. J., Merle, H., & Boira, H.** (2012). Morphological and molecular analysis of natural hybrids between the diploid *Centaurea aspera* L. and

the tetraploid *C. seridis* L.(Compositae). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146(sup1), 86-100.

Forner, J. B., Forner, M. A., Alcaide, A., Verdejo-Lucas, S., & Sorribas, F. J. (2000). New hybrid citrus rootstocks released in Spain. In *Proc. Int. Soc. Citricult. I* (pp. 58-61).

Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F., & Bayer, R. J. (2009). Systematics, evolution and biogeography of Compositae.

Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., & Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220(4601), 1049-1051.

Gallego, P. P. F., Gimeno, R. R., Lumbreras, E. L., & Güemes, J. (2016). Un nuevo híbrido en el género *Antirrhinum* L. (Plantaginaceae, Antirrhineae Chav.). *Acta botánica malacitana*, (41), 155-161.

Garmendia, A., Ferriol, M., Juarez, J., Zajac, A., Kaluzny, K., & Merle, H. (2015). A rare case of a natural contact zone in Morocco between an autopolyploid and an allopolyploid of *Centaurea aspera* with sterile tetraploid hybrids. *Plant Biology*, 17(3), 746-757.

Garmendia, A., Merle, H., Ruiz, P., & Ferriol, M. (2018). Distribution and ecological segregation on regional and microgeographic scales of the diploid *Centaurea aspera* L., the tetraploid *C. seridis* L., and their triploid hybrids (Compositae). *PeerJ*, 6, e5209.

Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press.

Grant V. (1981). *Plant speciation*, 2nd edn. New York, NY, USA: Columbia University Press.

Greuter, W., & Von Raab-Straube, E. (2018). Euro Med Notulae, 3. *Willdenowia*, 37(1), 139-189.

Griffith, M. P. (2004). The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany*, 91(11), 1915-1921.

González, A. 2014. Nivel de ploidía y viabilidad de la descendencia del tetraploide *Centaurea seridis* y el diploide *C. aspera* y los cruces entre ambos. Trabajo final de Grado. Grado en ingeniería forestal y del medio natural. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Valencia.

Husband, B. C., Ozimec, B., Martin, S. L., & Pollock, L. (2008). Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: current trends and insights from synthetic polyploids. *International Journal of Plant Sciences*, 169(1), 195-206.

Katinas, L., Gutiérrez, D. G., Grossi, M. A., & Crisci, J. V. (2007). Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42(1-2), 113-129.

Levin, D. A. (1983). Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist*, 122(1), 1-25.

Maherali, H., Walden, A. E., & Husband, B. C. (2009). Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. *New phytologist*, 184(3), 721-731.

Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature*, 446(7133), 279-283.

- Masterson, J.** (1994). Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 264(5157), 421-424.
- Médail, F., & Quézel, P.** (1999). The phytogeographical significance of SW Morocco compared to the Canary Islands. *Plant Ecology*, 140(2), 221-244.
- Moreno-González, J., & Campo, L.** (2016). Plant breeding as tool to challenge climatic changes in forage production. A review. *Pastos*, 46(2), 25-43.
- Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., & Tribulato, E.** (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8), 1155-1166.
- Nielsen, L. R., Siegismund, H. R., & Hansen, T.** (2007). Inbreeding depression in the partially self-incompatible endemic plant species *Scalesia affinis* (Asteraceae) from Galápagos islands. *Evolutionary Ecology*, 21(1), 1-12.
- Otto, S. P.** (2007). The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*, 131(3), 452-462.
- Panero, J. L., & Funk, V. A.** (2008). The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular phylogenetics and evolution*, 47(2), 757-782.
- Paun, O., Fay, M. F., Soltis, D. E., & Chase, M. W.** (2007). Genetic and epigenetic alterations after hybridization and genome doubling. *Taxon*, 56(3), 649-656.
- Perfectti, F.** (2002). Especiación: modos y mecanismos. *Soler M., Evolución: La base de la biología. Proyecto Sur. España.*
- Pierce, B. A.** (2009). *Genética: Un enfoque conceptual*. Ed. Médica Panamericana.
- Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A., Fa, J., Conzalez-Montagut, R.** (1993). *Biological diversity of Mexico: origins and distribution* (No. Sirsi) i9780195066746). T. P. Ramamoorthy (Ed.). New York: Oxford University Press.
- Ramsey, J., & Ramsey, T. S.** (2014). Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1648), 20130352.
- Rieseberg, L. H., Raymond, O., Rosenthal, D. M., Lai, Z., Livingstone, K., Nakazato, T., ... & Lexer, C.** (2003). Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*, 301(5637), 1211-1216.
- Roach, D. A., & Wulff, R. D.** (1987). Maternal effects in plants. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 209-235.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R.** (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243(2), 281-296.
- Sedov, E. N., Sedysheva, G. A., Serova, Z. M., Gorbacheva, N. G., & Melnik, S. A.** (2014). Breeding assessment of heteroploid crosses in the development of triploid apple varieties. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 4(1), 52-59.
- Seehausen, O.** (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in ecology & evolution*, 19(4), 198-207.

- Segraves, K. A., & Thompson, J. N.** (1999). Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution*, 53(4), 1114-1127.
- Semple, J. C., & Watanabe, K.** (2009). A review of chromosome numbers in Asteraceae with hypotheses on chromosomal base number evolution. *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*, 61-72.
- Smith, N., Mori, S. A., Henderson, A., Stevenson, D. W., & Heald, S. V.** (2004). *Flowering plants of the neotropics*. Princeton University Press
- Smith, W. E., & Fitzsimmons, J. E.** (1965). Maternal inheritance of seed weight in flax. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 7(4), 658-662.
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E.** (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annual review of plant biology*, 60, 561-588.
- Stebbins Jr, C. L.** (1950). Variation and evolution in plants. *Variation and evolution in plants*.
- Susanna, A., & Garcia-Jacas, N.** (2009). Cardueae (Carduoideae). *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*, 293-313.
- Susanna, A.; Garcia-Jacas, N** (2007). Tribe Cardueae. In: J.W. Kadereit & C. Jeffrey eds. *The families and genera of vascular plants* 8: 123-147. Springer-Verlag, Berlin.
- Swingle, W.T., Reece, P.C.** (1967). The botany of Citrus and its wild relatives. p. 190-430. En Reuther, W.; Batchelor, L.D.; Webber, H.J. (eds) *the Citrus Industry*. V1. University of California, Berkeley, U.S.A.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A.** (1976). *Flora europaea* Vol. 4, Cambridge University Press.
- Westoby, M.** (1981). How diversified seed germination behavior is selected. *The American Naturalist*, 118(6), 882-885.
- Wood, T. E., Takebayashi, N., Barker, M. S., Mayrose, I., Greenspoon, P. B., & Rieseberg, L. H.** (2009). The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the national Academy of sciences*, 106(33), 13875-13879.

Páginas web.

Banco de Datos de Biodiversidad de la Comunidad Valenciana (2017). Recuperado 13 de febrero de 2020, a partir de: <http://www.bdb.gva.es/es/buscador>

***Centaurea aspera* L. FloraCatalana.net** (2018). Recuperado 13 de febrero de 2020, a partir de: <http://www.floracatalana.net/centaurea-aspera-l>

***Centaurea aspera* subsp. *gentilii*. The Euro+Med Plant Base** (2018). Recuperado 13 de febrero de 2020, a partir de: <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/PTaxonDetail.asp?NameId=7705435&PTRefFk=700000>

***Centaurea aspera* subsp. *gentilii*. African Plants – A Photo Guide** (2014). Recuperado 13 de febrero de 2020, a partir de: http://www.africanplants.senckenberg.de/root/index.php?page_id=78&id=8347#