

RESUMEN

El género *Crocus* perteneciente a la familia de las Iridáceas, es conocido por su especie cultivada, el azafrán (*Crocus sativus* L.). El género incluye aproximadamente 100 especies, muchas de las cuales tienen interés como ornamentales o por sus productos de metabolismo secundario, y otras son exclusivamente silvestres. En su conjunto, constituyen una fuente de variabilidad genética de enorme interés.

La rápida desaparición del cultivo del azafrán en Europa debido a la importante cantidad de mano de obra que requiere, ha conducido a una importante erosión genética. Con el fin de frenar y mejorar esta situación, se han iniciado varios programas de ámbito nacional y europeo para la recolección, multiplicación, y caracterización de germoplasma de azafrán y especies afines. En ese contexto, se enmarca esta Tesis que tiene como objetivo completar las colecciones existentes y caracterizar el germoplasma disponible de especies silvestres españolas del género *Crocus*, del Banco de Germoplasma Vegetal del Centro de Investigación Agroforestal de Albaladejito (Cuenca).

En España pueden encontrarse 7 especies silvestres de este género, que son tanto de floración otoñal (*C. serotinus*, *C. clusii*, *C. nudiflorus* y *C. cambessedesii*) como primaveral (*C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus*), y en este trabajo se ha llevado a cabo una caracterización morfológica, fisiológica, bioquímica y molecular de las mismas.

Tras una revisión minuciosa de las citas sobre la localización de estas especies en España, se han conseguido entradas de distintas áreas, y que representan entre un 25% y un 70%, según la especie, de las zonas en las que se ha descrito su presencia. Asimismo, se ha ampliado la colecta a zonas no descritas con anterioridad. Se han elaborado mapas de localización, así como la descripción de los ecosistemas que habitan estas especies atendiendo a: tipo de suelo, altitud, clima, comunidad vegetal y los estreses abióticos o bióticos más frecuentes.

De este conjunto de entradas, un máximo de 60, que configuran una representación de la variabilidad observada, fueron caracterizadas morfológicamente. Los caracteres cuantitativos relacionados con el tamaño de los tépalos, la longitud del estilo, el desarrollo de hojas durante la floración, la anchura de la hoja y el tamaño de la semilla, han mostrado una importante variación genética y, fundamentalmente, entre especies. Sin embargo, la producción de flores, el desarrollo vegetativo y el tamaño del fruto presentan una mayor componente de variación ambiental. Se da una correlación tanto genética como ambiental entre los caracteres relacionados con el tamaño de la flor. También aparece una correlación entre el desarrollo vegetativo y la producción de flores, que es también de naturaleza tanto genética como ambiental.

El análisis de componentes y coordenadas principales nos señala que los caracteres con los que se ha trabajado permiten agrupar las entradas en las 7 especies diferentes

de *Crocus* españoles, y se han podido definir un número mínimo de caracteres cualitativos fáciles de medir que permite la separación de las especies. Hay que destacar una caracterización microscópica de la anatomía de las hojas y de la cubierta de las semillas que permite también identificar la mayoría de las especies.

Un total de 115 entradas, que representan las diferentes poblaciones recolectadas de cada especie, se han caracterizado fenológicamente. El momento de la brotación, la floración y la salida del fruto, que procede de un ovario subterráneo, presenta diferencias importantes entre especies y una menor variación intraespecífica. Sin embargo, la senescencia de la hoja y del fruto es más uniforme entre las especies y la principal fuente de variación es la existente entre entradas de una misma especie.

Se han caracterizado fisiológicamente 1-2 entradas de las especies de floración otoñal *C. serotinus* y *C. nudiflorus* (con histerantia), y de tres especies de floración primaveral *C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus* (esta última con floración más tardía). Se ha estudiado la influencia de la temperatura en el desarrollo de los meristemos florales, en la floración, en el desarrollo vegetativo, el cuajado y desarrollo del fruto y sobre la senescencia de las hojas. Estos estudios nos indican que:

La diferenciación floral de los meristemos de todas las especies silvestres de *Crocus* se induce durante la época estival, tras la seca de la hoja, con los cormos en aparente latencia, y coincide con lo descrito para azafrán (23°C). Así, las especies primaverales no requieren de un período frío para que se dé la inducción floral en la yema terminal. La emergencia de la flor, requiere una bajada de las temperaturas entre 10-17°C, que favorecen la elongación del brote floral. Las especies primaverales, de desarrollo más lento, no han alcanzado un desarrollo similar al de las especies otoñales cuando se produce esa bajada en sus ambientes naturales, deteniéndose por el frío intenso el desarrollo de la flor que no continuará hasta finales del invierno-principios de la primavera.

La salida de la hoja es siempre, en general, posterior al desarrollo de las raíces que aparecen tras el primer aporte de agua. Las hojas alcanzan su máximo crecimiento cuando las reservas del cormo madre se agotan, y es en este momento cuando los cormos hijos tienen su mayor tasa de crecimiento. Todas las especies presentan un mayor desarrollo vegetativo a la temperatura más baja ensayada, 10°C. La mayor temperatura de desarrollo (17°C) da lugar, en general, a un crecimiento inicial más acelerado de hojas y cormos, pero se detiene antes el crecimiento del cormo hijo y se inicia también antes la senescencia de las hojas. La fuerza de sumidero del cormo podría determinar la duración de la vida de la hoja, y un factor muy relevante en este proceso es la temperatura. La capacidad de sumidero del cormo se agota antes a temperaturas más elevadas.

Estos estudios fisiológicos también han permitido poner a punto métodos de rotura de latencia y germinación que permiten un porcentaje de germinación de semillas de las

especies españolas de *Crocus* entre un 81-95%. Únicamente la especie *C. vernus* ha sido una especie recalcitrante con una tasa de germinación que no supera el 30%. El tratamiento de almacenamiento en seco ha sido el más indicado para la rotura de la latencia.

La caracterización bioquímica de 15 entradas correspondientes a 5 de las especies analizadas, ha revelado el menor contenido en crocinas de los estilos de estas especies silvestres, como también su menor bioactividad, dándose la ausencia total de las mismas en *C. carpetanus* y *C. nevadensis*. Asimismo, no se ha detectado la presencia de la picrocrocina y de la crocina *trans*-3-Gg que se encuentran en la especie cultivada. Se han identificado tentativamente 6 crocinas y 4 kaempferoles en todas ellas, con la excepción de una crocina identificada únicamente en *C. vernus*. El análisis de la ausencia y presencia de los principales picos que corresponden a crocinas y a flavonoides, ha permitido separar entre sí las especies que presentan crocinas, pero no ha facilitado la separación entre *C. nevadensis* y *C. carpetanus*.

La caracterización molecular de 133 individuos que corresponden a 26 entradas diferentes mediante RAPD, indica que estos marcadores pueden ser una herramienta útil para la diferenciación de especies que comparten nicho ecológico, o con rasgos morfológicos vegetativos muy similares. Los marcadores microsatélites se han mostrado como una herramienta complementaria que permite la distinción de materiales que no es posible llevar a cabo mediante el empleo de marcadores tipo RAPD.

RESUM

El gènere *Crocus* pertanyent a la família de les *Iridaceae*, és conegut per la seua espècie conreada, el safrà (*Crocus sativus* L.). El gènere inclou aproximadament 100 espècies, moltes de les quals tenen interès com a ornamentals o pels seus productes de metabolisme secundari, i altres són exclusivament silvestres. El seu conjunt, constitueix una font de variabilitat genètica d'enorme interès.

La ràpida desaparició del cultiu del safrà a Europa, a causa de la important quantitat de mà d'obra que requereix, ha conduït a una important erosió genètica. Per tal de frenar i millorar aquesta situació, s'han iniciat diversos programes d'àmbit nacional i europeu per a la recol·lecció, multiplicació, i caracterització de germoplasma de safrà i espècies afins. En aquest context, s'emmarca aquesta Tesi que té com a objectiu completar les col·leccions existents i caracteritzar el germoplasma disponible d'espècies silvestres espanyoles del gènere *Crocus*, del Banco de Germoplasma Vegetal del Centro de Investigación Agroforestal de Albaladejito (Cuenca).

A Espanya es poden trobar 7 espècies silvestres d'aquest gènere, que són tant de floració tardoral (*C. serotinus*, *C. clusii*, *C. nudiflorus* i *C. cambessedesii*) com primaveral (*C. nevadensis*, *C. carpetanus* i *C. vernus*), i en aquest treball s'ha dut a terme una caracterització morfològica, fisiològica, bioquímica i molecular de les mateixes.

Després d'una revisió minuciosa de les cites sobre la localització d'aquestes espècies a Espanya, s'han aconseguit entrades de diferents àrees, i que representen entre un 25% i un 70%, segons l'espècie, de les zones en què s'ha descrit la seua presència. Així mateix, s'ha ampliat la col·lecta a zones no descrites amb anterioritat. S'han elaborat mapes de localització, així com la descripció dels ecosistemes que habiten aquestes espècies atenent: tipus de sòl, altitud, clima, comunitat vegetal i els estressos abiòtics o biòtics més freqüents.

D'aquest conjunt d'entrades, un màxim de 60, que configuren una representació de la variabilitat observada, van ser caracteritzades morfològicament. Els caràcters quantitius relacionats amb la mida dels tèpals, la longitud de l'estil, el desenvolupament de fulles durant la floració, l'amplada de la fulla i la mida de la llavor, han mostrat una important variació genètica i, fonamentalment, entre espècies. No obstant això, la producció de flors, el desenvolupament vegetatiu i la mida del fruit presenten una major component de variació ambiental. Es dona una correlació tant genètica com ambiental entre els caràcters relacionats amb la mida de la flor. També apareix una correlació entre el desenvolupament vegetatiu i la producció de flors, que és també de naturalesa tant genètica com ambiental.

L'anàlisi de components i coordenades principals ens assenyala que els caràcters amb els quals s'ha treballat permeten agrupar les entrades a les 7 espècies diferents de *Crocus* espanyols, i s'han pogut definir un nombre mínim de caràcters qualitius fàcils de mesurar que permet la separació de les espècies. Cal destacar una caracterització

microscòpica de l'anatomia de les fulles i de la coberta de les llavors que permet també identificar la majoria de les espècies.

Un total de 115 entrades, que representen les diferents poblacions recol·lectades de cada espècie, s'han caracteritzat fenològicament. El moment de la brotació, la floració i la sortida del fruit, que procedeix d'un ovari subterrani, presenta diferències importants entre espècies i una menor variació intraespecífica. No obstant això, la senescència del full i del fruit és més uniforme entre les espècies i la principal font de variació és l'existent entre entrades d'una mateixa espècie.

S'han caracteritzat fisiològicament 1-2 entrades de les espècies de floració de tardor *C. serotinus* i *C. nudiflorus* (amb histerantia), i de tres espècies de floració primaveral *C. nevadensis*, *C. carpetanus* i *C. vernus* (aquesta última amb floració més tardana). S'ha estudiat la influència de la temperatura en el desenvolupament dels meristemes florals, en la floració, en el desenvolupament vegetatiu, el quallat i desenvolupament del fruit i sobre la senescència de les fulles. Aquests estudis ens indiquen que:

La diferenciació floral dels meristemes de totes les espècies silvestres de *Crocus* s'indueix durant l'època estival, després del secant del full, amb els corms en aparent latència, i coincideix amb el descrit pel safrà (23°C). Així, les espècies primaverals no requereixen d'un període fred perquè es doni la inducció floral a la gemma terminal. L'emergència de la flor, requereix una baixada de les temperatures entre 10-17°C, que afavoreixen l'elongació del brot floral. Les espècies primaverals, de desenvolupament més lent, no han arribat a un desenvolupament similar al de les espècies de tardor quan es produeix aquesta baixada en els seus ambients naturals, detenint pel fred intens el desenvolupament de la flor que no continuarà fins a finals de l'hivern-principis de la primavera.

La sortida de la fulla és sempre, en general, posterior al desenvolupament de les arrels que apareixen després de la primera aportació d'aigua. Les fulles arriben al seu màxim creixement quan les reserves del corm mare s'esgoten, i és en aquest moment quan els corms fills tenen la seua major taxa de creixement. Totes les espècies presenten un major desenvolupament vegetatiu a la temperatura més baixa assajada, 10°C. La major temperatura de desenvolupament (17°C) dona lloc, en general, a un creixement inicial més accelerat de fulles i corms, però s'atura abans el creixement del corm fill i s'inicia també abans la senescència de les fulles. La força d'embornal del corm podria determinar la durada de la vida de la fulla, i un factor molt rellevant en aquest procés és la temperatura. La capacitat d'embornal del corm s'esgota abans a temperatures més elevades.

Aquests estudis fisiològics també han permès posar a punt mètodes de trencament de latència i germinació que permeten un percentatge de germinació de llavors de les espècies espanyoles de *Crocus* entre un 81-95%. Únicament l'espècie *C. vernus* ha estat una mica recalcitrant amb una taxa de germinació que no supera el 30%. El tractament

d'emmagatzematge en sec ha estat el més indicat per al trencament de la latència. La caracterització bioquímica de 15 entrades corresponents a 5 de les espècies analitzades, ha revelat el menor contingut en crocinas d'aquestes espècies silvestres, com també la seva menor bioactivitat, donant-se l'absència total de les mateixes en *C. carpetanus* i *C. nevadensis*. Així mateix, no s'ha detectat la presència de la picrocrocina i de la crocina *trans*-3-Gg que es troben en l'espècie conreada. S'han identificat temptativament 6 crocinas i 4 kaempferoles en totes elles, amb l'excepció d'una crocina identificada únicament en *C. vernus*. L'anàlisi de l'absència i presència dels principals pics que corresponen a crocinas i flavonoides, ha permès separar entre si les espècies que presenten crocinas, però no ha facilitat la separació entre *C. nevadensis* i *C. carpetanus*.

La caracterització molecular de 133 individus que corresponen a 26 entrades diferents mitjançant RAPD, indica que aquests marcadors poden ser una eina útil per a la diferenciació d'espècies que comparteixen nínxol ecològic, o amb trets morfològics vegetatius molt similars. Els marcadors microsatèl·lits s'han mostrat com una eina complementària que permet la distinció de materials que no és possible dur a terme mitjançant l'ús de marcadors tipus RAPD.

ABSTRACT

The genus *Crocus* belonging to the family *Iridaceae*, is known for its cultivated species, saffron (*Crocus sativus* L.). The genus includes about 100 species, many of which are of interest as ornamentals for their products or secondary metabolism, and others are exclusively wild. On the whole, they are a source of genetic variability of enormous interest.

The rapid disappearance of the culture of saffron in Europe due to the significant amount of manpower required, has led to significant genetic erosion. In order to slow down and improve this situation, several national and European programs for the collection, multiplication, and characterization of germplasm of saffron and related species were initiated. In this context, this Thesis aims to complete the existing collections and characterize the available germplasm of the Spanish wild species of the genus *Crocus*, conserved in the Plant Germplasm Bank of the Center for Research in Agroforestry in Albaladejito (Cuenca).

Seven wild species of this genus can be found in Spain, which are both autumn flowering species (*C. serotinus*, *C. clusii*, *C. nudiflorus* and *C. cambessedesii*) and spring flowering species (*C. nevadensis*, *C. carpetanus* and *C. vernus*), and in this work a morphological, physiological, biochemical and molecular characterization of them has been carried out.

After a thorough review of the locations of these species in Spain, we have collected accessions from different locations representing between 25% and 70% of the areas, depending on the species, in which their presence was described. Also, the collection has been expanded to areas not previously described. We have developed location maps, and the description of the ecosystems these species inhabit, attending to: soil type, altitude, climate, plant community and the most common abiotic or biotic stresses.

Of this set of accessions, a maximum of 60, which form a representation of the observed variability, were characterized morphologically. Quantitative characteristics related to the size of the tepals, style length, the development of leaves during flowering, leaf width and seed size have shown significant genetic variation mainly among species. However, flower production, vegetative growth and fruit size exhibit a greater environmental variation component. Both an environmental and genetic correlation between characters related to the size of the flower is given. A correlation between vegetative growth and flower production, which is of both genetic and environmental nature, also appears.

The principal components and coordinates analysis show that the selected characters can group the accessions in the 7 different wild species of Spanish *Crocus*. Also we have been able to define a minimum number of easy-to-measure qualitative

characteristics that allow the separation of the species. It should be noted that a microscopic characterization of the anatomy of the leaves and seed coat also identifies most species.

A total of 115 accessions, representing different populations of each species collected, have been characterized phenologically. Date of sprouting and flowering, and time of capsule emergence, which comes from an underground ovary, show significant differences between species and lower intraspecific variation. However, leaf senescence and fruit ripening is more uniform between species and the main source of variation is between accessions of the same species.

1-2 accessions of each autumn flowering species, *C. serotinus* and *C. nudiflorus* (with hystera), and the spring-flowering species, *C. nevadensis*, *C. carpetanus* and *C. vernus* (this last species has the latter flowering date), have been characterized physiologically. We have studied the influence of temperature on the development of floral meristems in flowering, in the vegetative development, set and development of fruit and leaf senescence. These studies indicate that:

The floral meristem differentiation of all wild species of *Crocus* is induced during the summer, after the leaf's senescence, with apparently latent corms, and coincides with that described for saffron (23°C). Thus, the spring species do not require a cold period for flower induction in the terminal bud. Flower emergence requires a temperature drop up to 10-17°C, favouring floral bud elongation. In natural environments, when that decline of temperature occurs, the spring species, having slower development, have not reached a similar development to that of the autumn species. The flower development of spring species stops because of the intense cold, and will not continue until late winter-early spring.

The leaf emergence generally follows the development of the roots that appear after the first water supply. The leaves reach their maximum growth when the reserves of the mother corm are exhausted, and at this moment, the replacement corms have their highest growth rate. All species have a higher vegetative growth at the lowest tested temperature of 10°C. The highest tested temperature (17°C) leads in general to a faster initial growth of leaves and corms, but at this temperature, the growth of the replacement corms stops earlier and also the senescence of leaves starts before. The sink demand of the replacement corm could determine the life span of the leaves, and temperature is a very important factor in this process. Sink capacity of the replacement corm is exhausted earlier at higher temperatures.

These physiological studies have also allowed developing methods to break dormancy and germination, which allow a percentage of germination of the Spanish species of *Crocus* of around 81-95%. Only the species *C. vernus* has been a recalcitrant species

with a germination rate not exceeding 30%. The dry storage has been the most suitable treatment for breaking off dormancy.

The biochemical characterization of 15 accessions belonging to 5 species of Spanish wild *Crocus* has revealed the lower content of crocins in its styles, as well as the lower bioactivity of its crocins. Two of these species, *C. carpetanus* and *C. nevadensis*, have no crocins in the style. Also, it has not been detected the presence of the picrocrocins and the *trans*-3-Gg crocin, both found in the cultivated species. We have tentatively identified 6 crocins and 4 kaempferols in the styles of these 5 species, with the exception of a crocin identified only in *C. vernus*. The analysis of the absence and presence of main peaks corresponding to crocins and flavonoids has enabled to separate each species which has crocins, but has provided no separation between *C. nevadensis* and *C. carpetanus*.

The molecular characterization of 133 individuals, corresponding to 26 different accessions of the 7 species, using RAPDs, indicates that these markers can be a useful tool for differentiating species that share ecological niche, or with very similar vegetative morphological features. Microsatellite markers have proved to be a complementary tool for the distinction of materials which cannot be distinguished by the use of RAPDs.

