

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERIA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO  
NATURAL DE VALENCIA**



**Caracterización fenológica, morfológica,  
fisiológica, fitoquímica, y molecular de las  
especies silvestres españolas del género  
*Crocus*.**

**TESIS DOCTORAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOTECNOLOGÍA**

Presentado por:

**María Teresa Pastor Ferriz**

Directores:

**Rosa Victoria Molina Romero**

**Marcelino De Los Mozos Pascual**

Tutor:

**María José Díez Niclós**

Valencia, 22 de diciembre de 2015



### ***Agradecimientos:***

*Mi más sincero agradecimiento, por hacer posible esta tesis doctoral, a la Prof. Rosa Victoria Molina Romero, directora de la presente tesis y profesora-investigadora del área de Fisiología Vegetal del Departamento de Producción Vegetal, de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN) de Valencia, y también al Dr. Marcelino De Los Mozos Pascual, investigador del Centro de Investigación Agroforestal (CIAF) de Albadalejito (Cuenca), codirector del presente trabajo. Gracias por todo lo aprendido, y también por vuestra dedicación, interés, esfuerzo y amabilidad.*

*Al Prof. José Luís Guardiola (†) y la Prof. María Desamparados García por su decisiva colaboración en la génesis del proyecto CROCUSBANK y, en cierto modo, de los sucesivos proyectos relacionados y de la presente tesis.*

*A la Prof. María José Díez Niclós, tutora del presente trabajo y profesora del Programa de Doctorado de Biotecnología y del Máster de Mejora Genética Vegetal del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana de la Universidad Politécnica de Valencia, por tu valiosa colaboración y amabilidad.*

*Al Dr. Omar Santana, a la Dra. María Fernanda Rodríguez y al Dr. Raúl Sánchez, del CIAF de Albaladejito, y también al Prof. Enrique Sanchís, al Prof. Sergio González y la Dra. Begoña Renau, del ETSIAMN de Valencia, por su importantísima aportación, en campo y laboratorio, por sus conocimientos e interés durante los trabajos previos a esta tesis, y también durante la misma, sin los que hubiera sido imposible llegar hasta aquí.*

*A la Prof. Ana María Pérez y a Alberto Alcázar, por su inestimable aportación a la presente tesis, y también por su amabilidad y simpatía.*

*A la Prof. María Tsimidou profesora del Departamento de Química y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Aristotélica de Tesalónica (Grecia), así como a su equipo, por su dedicación, conocimientos y amabilidad, en especial a la Prof. Stella Ordoudi y a la Dra. Anastasia Kyriakoudi.*

*Al equipo del Departamento de Biotecnología del Instituto de Desarrollo Regional de Albacete, de la Universidad de Castilla La-Mancha, en especial al Prof. José Antonio Fernández y la Dra. Marcela Santaella, por darme la posibilidad de aprender en su laboratorio, por su paciencia y amabilidad.*

*Mi más sincero reconocimiento al Prof. Gonzalo L. Alonso, de la Cátedra de Química Agrícola, del Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética, y a la Escuela Técnica Superior de Agrónomos de Albacete, por su tiempo, interés, amabilidad y conocimientos.*

*Gracias al personal auxiliar del CIAF de Albaladejito y del área de Fisiología Vegetal del ETSIAMN, por su inestimable colaboración, apoyo y simpatía. En especial a Miguel Ángel Escolano, compañero de colectas y gran apoyo en el trabajo experimental, y también a los técnicos de laboratorio José Vicente Reina, Manolo Sánchez y Ana García, por su amabilidad y colaboración.*

*En la recolección y localización de material vegetal de las diferentes especies del género *Crocus* en España fue imprescindible la participación de diferentes instituciones y personal que se citan a continuación: Jardín Zoobotánico de Jerez (Cádiz), Parque Natural de las Marismas de Odiel (Huelva), Hayedo de Montejo (Madrid), Instituto Pirenaico de Jaca (Huesca), Parque Nacional de Sierra Nevada (Granada), Parque Natural de Sierra de Cazorla (Jaén), Parque Nacional de Aigüestortes (Lérida), Dpto. Biología de la Universidad de las islas Baleares y Dpto. de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universidad de Huesca.*

*Las dudas de índole administrativo relacionadas con mi beca y con el desarrollo de esta tesis fueron amablemente resueltas por el personal del Servicio de Seguimiento y Control de la Promoción Científica del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), a quien agradezco su atención y orientación.*

*Los distintas actividades incluidas en este trabajo han sido posibles gracias a la financiación recibida de distintas entidades, especialmente del **Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)** que dotó la beca predoctoral (Bec-2008-0146) adscrita al CIAF de Albaladejito y financió los proyectos RF2008-00012-C03, RF2011-00005-C03, RFP2011-00006; la **Junta de Comunidades de Castilla – la Mancha**, que cofinanció parte de las actividades a través de los proyectos SIA 2011RFP3, CEC-PBI09-0025-1537 y CEC-PAI09-0021-0413. Y por último a la Dirección General de Agricultura de la Comisión Europea, que a través del proyecto 018 - Agri Gen Res 870/2004 ha permitido dar relevancia internacional al contenido de esta tesis.*

*Gracias a los que siempre han estado conmigo por su apoyo incondicional, su eterna paciencia y su gran cariño y comprensión, en especial a mis padres Piedad y Joaquín, a mis hermanos, Laura y Joaquín, a Alberto, a sus padres, Sonia y Antonio, a José y a Amadora y su familia. Mi eterna gratitud y cariño a todos aquellos que han hecho que este camino haya sido más fácil, y por ello, gracias por acompañarme siempre.*

## 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 assenyalen 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 hysteraemia), 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.



ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> Y CLASIFICACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS .....	1
2. ORÍGEN DEL AZAFRÁN ( <i>C. SATIVUS</i> L.), LA ESPECIE CULTIVADA DE MAYOR IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	7
3. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y USOS DEL AZAFRÁN Y DE OTRAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> .....	9
4. MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> .....	15
5. LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> .....	26
6. CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> .....	30
7. ESTUDIOS DE VARIABILIDAD EN EL GÉNERO <i>CROCUS</i> .....	32
7.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y AGRONÓMICA.....	32
7.2 CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y FENOLÓGICA.....	37
7.3 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA.....	44
7.3.1 ....Metabolitos secundarios en estilos y tépalos de azafrán y otras especies de <i>Crocus</i> .....	44
7.3.2 ...Técnicas aplicadas en la determinación de carotenoides y flavonoides en los estilos de azafrán y otras especies de <i>Crocus</i> .....	50
7.4 ESTUDIOS DE MARCADORES MOLECULARES EN EL GÉNERO <i>CROCUS</i> .....	56
8. ESTADO ACTUAL DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA COLECCIÓN DE AZAFRÁN Y ESPECIES DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> DEL BANCO DE GERMOPLASMA VEGETAL DE CUENCA .....	58
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
<b>1. LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE FORESTAL DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO <i>CROCUS</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO <i>CROCUS</i>.....</b>	<b>65</b>
2.1. MATERIAL VEGETAL .....	65
2.2. CARACTERES EVALUADOS.....	66
2.3. ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS CON LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA .....	69
2.3.1 Análisis de los caracteres cuantitativos.....	69
2.3.2 Análisis de los caracteres cualitativos .....	72
2.3.3 Análisis conjunto de los caracteres cuantitativos y cualitativos .....	73
2.4. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LA MORFOLOGÍA DE LAS SEMILLAS Y DE LAS HOJAS.....	73
<b>3. FENOLOGÍA DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> SILVESTRES.....</b>	<b>76</b>
3.1. COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO EN UN AMBIENTE PROTEGIDO .....	76

3.2 COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO EN UN AMBIENTE CONTROLADO.....	78
3.3 COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO EN SU AMBIENTE NATURAL.....	78
3.4 INFLUENCIA DEL TAMAÑO DEL CORMO EN LA FENOLOGÍA.....	79
3.5 INFLUENCIA DEL PESO EN LA DIFERENCIACIÓN FLORAL.....	79
3.6 ANÁLISIS DE DATOS DE LOS ENSAYOS DE FENOLOGÍA.....	80
<b>4. FISIOLOGÍA DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS SILVESTRES</i>.....</b>	<b>81</b>
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	81
4.2 METODOLOGÍA DE LOS ENSAYOS DE FISOLOGÍA.....	82
4.2.1 Influencia de la temperatura en la inducción floral.....	82
4.2.2 Influencia de la temperatura en la floración y en el tamaño de la flor.....	83
4.2.3 Influencia de un periodo frío en el crecimiento de la yema floral de especies primaverales.....	86
4.2.4 . Influencia de la temperatura en el desarrollo vegetativo, en la formación del fruto y en la senescencia de las hojas.....	87
4.2.5 Definición de las condiciones idóneas de germinación de las semillas.....	90
<b>5. VARIABILIDAD DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> PARA EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES EN SUS ESTIGMAS.....</b>	<b>92</b>
5.1 MATERIAL VEGETAL.....	92
5.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	92
5.3 ESPECTROSCOPIA DEL UV-VIS.....	94
5.3.1 Evaluación del factor E1%1cm según la ISO 3632-2.....	94
5.4 CROMATOGRAFIA DE HPLC-DAD.....	94
5.5 IDENTIFICACIÓN.....	95
5.5.1 Análisis de los datos obtenidos en la identificación.....	95
5.6 CUANTIFICACIÓN.....	95
5.6.1 Análisis estadístico de los datos obtenidos en la cuantificación.....	97
<b>6. ESTUDIO PRELIMINAR DEL USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> EN ESTADO VEGETATIVO.....</b>	<b>98</b>
6.1 ANÁLISIS MEDIANTE MARCADORES RAPD.....	98
6.2 ANÁLISIS MEDIANTE MARCADORES DE TIPO EPIC.....	101
6.3 ANÁLISIS MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MICROSATÉLITES.....	102
6.3.1 Material vegetal.....	102
6.3.2 PCR.....	103
6.3.3 Electroforesis.....	103
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>104</b>
<b>1. LOCALIZACIÓN DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE <i>CROCUS</i> SPP. EN LA PENÍNSULA IBÉRICA.....</b>	<b>104</b>

1. LOCALIZACIÓN DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE <i>CROCUS</i> EN LA PENÍNSULA IBÉRICA .	104
1.1 <i>C. NEVADENSIS</i> .....	104
1.2 <i>C. CARPETANUS</i> .....	104
1.3 <i>C. VERNUS</i> .....	105
1.4 <i>C. SEROTINUS</i> Y <i>C. CLUSII</i> .....	106
1.5 <i>C. NUDIFLORUS</i> .....	107
1.6 <i>C. CAMBESSEDESII</i> .....	108
2. ENTRADAS DE <i>CROCUS</i> SILVESTRES ESPAÑOLES COLECTADAS Y MANTENIDAS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA VEGETAL DE CUENCA.....	109
3. CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE FORESTAL DE LAS DIVERSAS ESPECIES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> .....	113
3.1 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO <i>C. NEVADENSIS</i> .....	113
3.2 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO <i>C. CARPETANUS</i> .....	117
3.3 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO <i>C. VERNUS</i> .....	118
3.4 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO <i>C. SEROTINUS</i> Y <i>C. CLUSII</i>	120
3.5 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO <i>C. NUDIFLORUS</i> .....	126
3.6 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO <i>C. CAMBESSEDESII</i> .....	129
<b>2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> SPP.</b> .....	<b>131</b>
2. VARIABILIDAD PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS CUANTITATIVOS .....	131
1.1 ESTRUCTURA DE LA VARIACIÓN ENTRE LAS ESPECIES SILVESTRES DE <i>CROCUS</i> PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS CUANTITATIVOS .....	131
1.1.1 Caracteres relacionados con la morfología y producción de flores .....	131
1.1.2 Caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo .....	131
1.1.3 Caracteres relacionados con el fruto y la semilla .....	132
1.2 VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS EN LAS DISTINTAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> .....	132
1.2.1 <i>C. nevadensis</i> .....	132
1.2.2 <i>C. carpetanus</i> .....	137
1.2.3 <i>C. vernus</i> .....	139
1.2.4 <i>C. serotinus</i> .....	141
1.2.5 <i>C. clusii</i> .....	145
1.2.6 <i>C. nudiflorus</i> .....	147
1.2.7 <i>C. cambessedesii</i> .....	150
1.3 VARIACIÓN ENTRE ESPECIES DE <i>CROCUS</i> .....	152
1.3.1 Caracteres relacionados con la morfología y producción de flores.....	152
1.3.2 Caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo .....	153

1.3.3 Caracteres de fruto y de semilla .....	154
1.4 CORRELACIONES.....	155
1.4.1 Correlaciones entre caracteres a nivel de especie .....	155
1.4.2 Correlaciones entre caracteres a nivel de entrada de las especies de <i>Crocus</i> silvestres .....	157
1.4.3 Correlaciones a nivel de planta de los caracteres evaluados en las especies de <i>Crocus</i> silvestres españolas. ....	164
2. VARIABILIDAD PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS CUALITATIVOS.....	171
2.1 CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA FLORAL .....	172
2.1.1 Forma del tépalo externo e interno .....	172
2.1.2 Ápice del tépalo .....	173
2.1.3 Patrón de fondo de los tépalos .....	175
2.1.4 Color general del tépalo .....	175
2.1.5 Patrón de venación.....	177
2.1.6 Tipo de venación.....	180
2.1.7 Patrón de color de venación.....	181
2.1.8 Color de la venación .....	181
2.1.9 Continuación de las venas hacia el tubo floral.....	184
2.1.10 Localización de las manchas del tépalo.....	184
2.1.11 Color de las manchas del tépalo.....	186
2.1.12 Color del inicio del tubo floral .....	187
2.1.13 Color de la garganta floral .....	189
2.1.14 Pubescencia de la garganta floral.....	190
2.1.15 Coloración del filamento del estambre .....	191
2.1.16 Grado de ramificación del estigma.....	192
2.1.17 Coloración del estigma .....	193
2.1.18 Fragancia de la flor .....	193
2.1.19 Hojas en el periodo floral .....	194
2.1.20 Guía de identificación de las especies de <i>Crocus</i> en base a las características relacionadas con la morfología floral .....	194
2.2. CARACTERES RELACIONADOS CON LA BRÁCTEA Y LA BRACTÉOLA .....	195
2.2.1 Textura de la bráctea.....	195
2.2.2 Color de la bráctea .....	195
2.2.3 Visibilidad de la bractéola.....	197
2.2.4 Textura de la bractéola.....	197
2.2.5 Color de la bractéola .....	198

2.2.6	Tamaño de la bractéola respecto la bráctea.....	199
2.3	CARACTERES CUALITATIVOS RELACIONADOS CON EL FRUTO.....	200
2.3.1	Forma de la cápsula.....	200
2.3.2	Color de la cápsula .....	201
2.4	CARACTERES CUALITATIVOS RELACIONADOS CON LA SEMILLA.....	202
2.4.1	Forma de la semilla .....	202
2.4.2	Superficie de la semilla.....	203
2.4.3	Color de la superficie.....	204
2.4.4	Desarrollo de la carúncula.....	205
2.4.5	Desarrollo del rafe.....	206
2.4.6	Forma de las excrescencias y la presencia de cera.....	207
2.4.7	Caracterización microscópica de la superficie de las semillas españolas de <i>Crocus</i> .209	
2.4.8	Guía de identificación de las especies de <i>Crocus</i> en base a la morfología de la semilla .....	215
2.5	CARACTERES CUALITATIVOS RELACIONADOS CON LA HOJA.....	217
2.5.1	Forma de la hoja.....	217
2.5.2	Caracterización microscópica de la anatomía de la hoja de las diferentes especies de <i>Crocus</i> . .....	219
2.5.3	Guía de identificación de las especies de <i>Crocus</i> en base a la morfología de la hoja	225
2.6	CARACTERES RELACIONADOS CON LA TÚNICA.....	225
2.6.1	Aspecto de la túnica .....	225
2.6.2	Color de la túnica.....	227
2.6.3	Persistencia de la túnica.....	227
2.6.4	Presencia de estolones.....	228
2.6.5	Guía de identificación de las especies de <i>Crocus</i> en base a la morfología de la túnica y del cormo.....	230
3.	AGRUPACIÓN DE LAS ENTRADAS EN FUNCIÓN DE LOS CARACTERES MORFOLÓGICOS ANALIZADOS Y PRINCIPALES CARACTERES IMPLICADOS EN DICHA AGRUPACIÓN .....	231
3.1	ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS.. .....	231
3.1.1	Representación de los caracteres cuantitativos frente a las componentes principales .....	232
3.1.2	Representación de las diferentes entradas frente a las componentes principales....	234
3.2	ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES DE LOS CARACTERES CUALITATIVOS .....	237
3.2.1	Representación de las diferentes entradas frente a las coordenadas principales .....	239
3.2.1.1	Análisis clúster con los caracteres cualitativos.....	244
3.3	ANÁLISIS CONJUNTO DE CARACTERES CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS .....	243
3.3.1	Representación de las diferentes entradas frente a las componentes principales .	243

3.4 SELECCIÓN DE UN NÚMERO MÍNIMO DE CARACTERES CUALITATIVOS PARA IDENTIFICAR LAS ESPECIES .....	244
<b>3. FENOLOGÍA DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> .....</b>	<b>247</b>
1. COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO EN CULTIVO PROTEGIDO .....	247
1.1 ESTRUCTURA DE LA VARIACIÓN ENTRE LAS ESPECIES SILVESTRES DE <i>CROCUS</i> PARA CARACTERES RELACIONADOS CON LA FENOLOGÍA OBSERVADA EN CULTIVO PROTEGIDO ...	247
1.2 VARIABILIDAD ENTRE LAS ESPECIES SILVESTRES DE <i>CROCUS</i> PARA CARACTERES RELACIONADOS CON LA FENOLOGÍA OBSERVADA EN CULTIVO PROTEGIDO .....	247
2. COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO EN CULTIVO CONTROLADO .....	253
3. COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO EN SU AMBIENTE NATURAL .....	256
4. INFLUENCIA DEL PESO DEL CORMO EN LA FENOLOGÍA .....	257
5. INFLUENCIA DEL PESO DEL CORMO EN LA DIFERENCIACIÓN FLORAL .....	258
<b>4. FISIOLOGÍA DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> SPP.....</b>	<b>260</b>
1. FISIOLOGÍA DE LA FLORACIÓN DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> .....	260
1.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA DIFERENCIACIÓN FLORAL .....	260
1.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA FLORACIÓN Y EN EL TAMAÑO DE LA FLOR EN LAS ESPECIES DE FLORACIÓN PRIMAVERAL .....	265
1.3 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA FLORACIÓN Y EN LA LONGITUD DE LAS FLORES DE LAS ESPECIES DE FLORACIÓN OTOÑAL .....	272
1.4 INFLUENCIA DE UN PERÍODO FRÍO EN EL CRECIMIENTO DE LA YEMA FLORAL DE ESPECIES PRIMAVERALES .....	276
2. FISIOLOGÍA DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> .....	282
2.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO VEGETATIVO DE ESPECIES DE FLORACIÓN PRIMAVERAL .....	282
2.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO VEGETATIVO DE ESPECIES DE FLORACIÓN OTOÑAL.....	294
2.3 DESARROLLO VEGETATIVO COMPARADO DE CUATRO ESPECIES DE <i>CROCUS</i> .....	306
2.4 FISIOLOGÍA DE LOS CORMOS PROCEDENTES DE SEMILLA .....	306
2.5 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO DE CORMOS ESTOLONÍFEROS ....	308
3. FISIOLOGÍA DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE LAS ESPECIES SILVESTRES DE <i>CROCUS</i> ESPAÑOLES.....	309
3.1 INFLUENCIA DE TRATAMIENTOS DE ROTURA DE LATENCIA.....	309
3.1.1 Germinación de las semillas de especies otoñales.....	309
3.1.2 Germinación de especies primaverales.....	312
3.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE GERMINACIÓN.....	315
3.3 EVOLUCIÓN DE LA TASA DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CINCO ESPECIES DE <i>CROCUS</i> BAJO LAS MISMAS CONDICIONES.....	318

4. FRUCTIFICACIÓN.....	319
5. SENESCENCIA DE LA HOJA EN LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> . EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO.....	324
<b>5. VARIABILIDAD DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> PARA EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES EN SUS ESTIGMAS.....</b>	<b>325</b>
1. VARIABILIDAD DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> PARA EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES EN SUS ESTIGMAS .....	325
1.1 VARIABILIDAD EN EL ESPECTRO UV-VIS.....	325
1.1.1 DATOS PROCEDENTES DE LA SEGUNDA DERIVADA DEL ESPECTRO UV-VIS.....	327
1.1.2 CÁLCULO DEL FACTOR $E^{1\%}_{1cm}$ .....	328
1.2 VARIABILIDAD EN EL PERFIL DE HPLC-DAD .....	329
1.2.1 VARIABILIDAD EN EL PERFIL DE HPLC-DAD A 310 NM .....	330
1.2.2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD EN EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES DETERMINADO MEDIANTE HPLC-DAD A 440 Y 260 NM .....	332
1.2.2.1 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ENTRE ESPECIES .....	335
1.2.2.2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DENTRO DE ESPECIES.....	338
1.2.2.3 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD EN EL PERFIL DE FLAVONOIDES DENTRO DE ESPECIES.....	343
2. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS CAROTENOIDES MÁS ABUNDANTES MEDIANTE HPLC.....	349
2.1 COMPARACIÓN DE LAS CROCINAS PROCEDENTES DE ESPECIES SILVESTRES CON AQUELLAS CONTENIDAS EN LOS ESTILOS DEL AZAFRÁN.....	351
3. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FLAVONOIDES MÁS ABUNDANTES MEDIANTE HPLC. ....	352
3.1 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO DE ADICIÓN DEL ANALITO PURO .....	354
4. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL EN CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES MEDIANTE HPLC-DAD.....	357
4.1 CUANTIFICACIÓN DE LAS CROCINAS TOTALES.....	357
4.2. CONTENIDO EN CROCINAS CIS Y TRANS.....	358
4.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES TOTALES .....	359
5. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL PERFIL FITOQUÍMICO DE LAS ESPECIES SILVESTRES DE <i>CROCUS</i> MEDIANTE ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES .....	359
5.1 ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES TENIENDO EN CUENTA LA AUSENCIA O PRESENCIA DE LOS PICOS MÁS IMPORTANTES.....	359
5.1.1 Representación de los caracteres cuantitativos frente a las coordenadas principales.....	361
5.1.2 Representación de las diferentes entradas frente a las coordenadas principales. .	362
5.2 ANÁLISIS CLÚSTER CON LOS CARACTERES CUALITATIVOS DE AUSENCIA O PRESENCIA DE LOS PICOS CROMATOGRÁFICOS MÁS IMPORTANTES .....	365

<b>6. ESTUDIO PRELIMINAR DEL USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> EN ESTADO VEGETATIVO .</b>	367
1. ESTUDIO PRELIMINAR DEL USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> EN ESTADO VEGETATIVO	367
1.1 EMPLEO DE MARCADORES DE TIPO RAPD	367
1.1.1 Tipado de poblaciones (FINGERPRINTING).	367
1.1.2 Amplificación	368
1.1.3 Análisis clúster	369
1.2 EMPLEO DE MARCADORES DE TIPO EPIC Y SSR	371
<b>V. DISCUSIÓN</b>	377
1. LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE FORESTAL DE LAS DIVERSAS ESPECIES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO <i>CROCUS</i> .	374
2. VARIABILIDAD PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS DE LAS ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO <i>CROCUS</i>	377
2.1 VARIABILIDAD OBSERVADA EN CARACTERES CUANTITATIVOS	377
2.2 VARIABILIDAD OBSERVADA EN CARACTERES CUALITATIVOS	384
3. FENOLOGÍA DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO <i>CROCUS</i>	392
4. FISIOLÓGÍA DE LAS ESPECIES SILVESTRES DE <i>CROCUS</i>	397
4.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA INDUCCIÓN FLORAL	397
4.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA FLORACIÓN	400
4.2.1 Efecto de un período de frío invernal previo a la floración	400
4.2.2 Influencia de la Temperaturas de floración	402
4.3 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO VEGETATIVO	402
4.4 DESARROLLO DE CORMOS PROCEDENTES DE SEMILLA Y FORMACIÓN DE CORMOS ESTOLONÍFEROS	407
4.5 FISIOLÓGÍA DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE LAS ESPECIES SILVESTRES DE <i>CROCUS</i> ESPAÑOLES	408
4.6 FRUCTIFICACIÓN	412
5. VARIABILIDAD DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> PARA EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES EN SUS ESTILOS	414
5.1 UTILIDAD DE LOS MÉTODOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-vis y de HPLC PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i>	414
5.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS CAROTENOIDES y FLAVONOIDES MÁS ABUNDANTES MEDIANTE HPLC	416
5.3 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL EN CAROTENOIDES y FLAVONOIDES MEDIANTE HPLC-DAD	417

5.4. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL PERFIL FITOQUÍMICO DE LAS ESPECIES SILVESTRES DE <i>CROCUS</i> MEDIANTE ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES .....	418
6. ESTUDIO PRELIMINAR DEL USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE <i>CROCUS</i> EN ESTADO VEGETATIVO .....	420
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	422
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	427
<b>VIII. ANEJOS</b> .....	446
<i>ANEJO 1. Lista de entradas conservadas en el BGV del CIAF utilizadas en el ensayo de caracterización morfológica</i> .....	446
<i>ANEJO 2. Lista de descriptores para las especies españolas del género <i>Crocus</i> spp.</i> .....	451
<i>ANEJO 3. Correlación de los caracteres cualitativos con cada una de las coordenadas principales (valores de los vectores)</i> .....	460
<i>ANEJO 4. Lista de entradas ensayadas en el estudio de fenología</i> .....	462
<i>ANEJO 5. Nombre y características de los cebadores descritos por Moraga et al., (2009). Todos los cebadores forward incorporan en su secuencia una cola M13</i> .....	465
<i>ANEJO 6. Nombre y características de los cebadores descritos por Nemati et al., (2012).</i> .....	466
<i>ANEJO 7. Tampones utilizados en la electroforesis de los geles de agarosa</i> .....	467
<i>ANEJO 8. Gráficas de evolución del peso seco del corno madre.</i> .....	468

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla.1. Clasificación del género Crocus de Mathew (1982) actualizada por diferentes autores. Se indica en negrita el autor cuando son especies nuevas, y con asterisco, cuando su clasificación se ha modificado, siendo (*) Petersen et al., 2008, (**) de Mathew et al., 2009, (3*) de Peruzzi y Carta (2011); (4*) de Peruzzi y Altinordu (2014) y (5*) de Harpke et al., (2015).....</i>	<i>2</i>
<i>Tabla. 2. Especies silvestres españolas del género Crocus y su información citológica (Mathew, 1982; Pérez y Pastor, 2004; Castro y Roselló, 2006; Guillén, 2014). .....</i>	<i>7</i>
<i>Tabla. 3. Análisis provincial de superficies, rendimiento y producción (estigmas tostados) del cultivo de azafrán en España (MAGRAMA, 2012).....</i>	<i>11</i>
<i>Tabla. 4. Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie C. serotinus. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla. 5. Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie C. clusii. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica. ....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla. 6. Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie C. nudiflorus. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla. 7. Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie C. cambessedesii. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica. ....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla. 8. Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie C. vernus. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica. ....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla. 9. Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie C. nevadensis. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla. 10 Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie C. carpetanus. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla. 11 Número de entradas y descriptores evaluados de azafrán y otras especies de Crocus conservadas en el Banco de Germoplasma Vegetal del CIAF de Albaladejito (Cuenca).....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla. 12. Entradas de las especies silvestres españolas del género Crocus evaluadas en el análisis de componentes y coordinadas principales a partir de los caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos. Se indica el nombre de la muestra utilizado en el análisis y la provincia de origen. Siendo: Cam: C. cambessedesii; Carp: C. carpetanus; Nev: C. nevadensis; Nu: C. nudiflorus; S: C. serotinus; Clu: C. clusii; V: C. vernus. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1. (Continua).....</i>	<i>70</i>
<i>Tabla. 13. Entradas de especies silvestres del género Crocus evaluadas en la caracterización de la morfología de la cubierta de la semilla. Se indica la provincia de origen. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1. ....</i>	<i>74</i>
<i>Tabla. 14. Entradas de especies silvestres del género Crocus evaluadas en la caracterización de la anatomía de las hojas. Se indica la provincia de origen. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1. ....</i>	<i>75</i>
<i>Tabla. 15. Entradas de Crocus silvestres españoles evaluadas en el estudio de fenología. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1. ....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla. 16. Muestras utilizadas en la caracterización fitoquímica. Se indica el número de entrada del BGV de Cuenca de procedencia de los estilos, la especie, el origen de la colecta del material vegetal y el lugar de la colecta de las flores. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1. ....</i>	<i>92</i>

<i>Tabla. 17. Proceso de extracción realizado con cada muestra. * Overnight: Los estigmas se dejaron en maceración en una mezcla de agua y metanol (50:50) durante 24 horas, con agitación ocasional. ....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla. 18. Muestras utilizadas en el análisis de RAPD. Se relaciona con su número de entrada del BGVCU, la especie, provincia de procedencia y el número de muestras. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1. ....</i>	<i>99</i>
<i>Tabla. 19. Nombre y características de los cebadores descritos por Moraga et al., (2009) .....</i>	<i>100</i>
<i>Tabla. 20. Condiciones de PCR y número de ciclos por cada paso .....</i>	<i>100</i>
<i>Tabla. 21. Condiciones de PCR y número de ciclos para cada paso (Castillo et al., 2005, con modificaciones de Alcázar, 2013).....</i>	<i>102</i>
<i>Tabla. 22. Condiciones de PCR y número de ciclos por cada paso .....</i>	<i>103</i>
<i>Tabla 23 Entradas conservadas en el BGV de Cuenca de especies españolas del género Crocus de floración primaveral. Correspondencia entre las poblaciones de referencia bibliográfica y el número de entrada del BGV de Cuenca. Cuando no se indica el número de población de referencia es porque su localización no se ha descrito con anterioridad. ....</i>	<i>111</i>
<i>Tabla 24 Entradas conservadas en el BGV de Cuenca de especies españolas del género Crocus de floración otoñal: Correspondencia entre las poblaciones de referencia bibliográfica y el número de entrada del Banco de Germoplasma de Cuenca. Cuando no se indica el número de población de referencia es porque su localización no se ha descrito con anterioridad.....</i>	<i>112</i>
<i>Tabla 25 Componentes de la varianza para los caracteres relacionados con la morfología floral.</i>	<i>131</i>
<i>Tabla 26 Componentes de la varianza para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo.....</i>	<i>132</i>
<i>Tabla 27 Componentes de la varianza para los caracteres relacionados con el fruto y la semilla.</i>	<i>132</i>
<i>Tabla 28 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de C. nevadensis. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>133</i>
<i>Tabla 29 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de C. nevadensis. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>). (Continua) .....</i>	<i>134</i>
<i>Tabla 30 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de C. nevadensis Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>136</i>
<i>Tabla 31 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de C. carpetanus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>) .....</i>	<i>137</i>
<i>Tabla 32 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de C. carpetanus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>) .....</i>	<i>138</i>
<i>Tabla 33 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de C. carpetanus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>139</i>
<i>Tabla 33. Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de C. carpetanus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>139</i>

<i>Tabla 34 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de C.vernus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>139</i>
<i>Tabla 35 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de C.vernus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>). Valores indicados con * indican plantas que sufrieron un problema de cultivo al final del ciclo y no se ha tenido en cuenta en el análisis de medias.....</i>	<i>140</i>
<i>Tabla 36. Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de C.vernus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>). Continua.....</i>	<i>140</i>
<i>Tabla 37 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de C. serotinus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>). Continua.....</i>	<i>141</i>
<i>Tabla 38 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de C. serotinus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>143</i>
<i>Tabla 39 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de C. serotinus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>144</i>
<i>Tabla 40 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de C. clusii. Con asterisco se han señalado los valores de las entradas en las que sólo se ha podido evaluar una flor. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>145</i>
<i>Tabla 41 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de C. clusii. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>146</i>
<i>Tabla 42 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de C. clusii. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>147</i>
<i>Tabla 43 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de C. nudiflorus. Con asterisco se han señalado los valores de las entradas en las que sólo se ha podido evaluar una flor. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>148</i>
<i>Tabla 44 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de C. nudiflorus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>149</i>
<i>Tabla 45 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de C. nudiflorus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>150</i>
<i>Tabla 46 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de C. cambessedesii. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>150</i>
<i>Tabla 47 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de C. cambessedesii. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>151</i>

<i>Tabla 48 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de C. cambessedesii. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (p&lt; 0,05).</i> .....	151
<i>Tabla 49 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de las diferentes especies de Crocus silvestres españoles. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (p&lt; 0,05).</i> .....	152
<i>Tabla 50 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de las diferentes especies de Crocus silvestres españoles. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (p&lt; 0,05).</i> .....	153
<i>Tabla 51 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de las diferentes especies de Crocus silvestres españoles. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas (p&lt; 0.05).</i> .....	154
<i>Tabla 52 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con la morfología floral a nivel de especie. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa</i> .....	155
<i>Tabla 53 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados el crecimiento vegetativo a nivel de especie. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa</i> .....	155
<i>Tabla 54 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo y los caracteres relacionados con la morfología floral a nivel de especie. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.</i> .....	156
<i>Tabla 55 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de las semillas a nivel de especie. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa</i> .....	156
<i>Tabla 56 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla y los caracteres relacionados con la morfología floral y el crecimiento vegetativo durante la floración a nivel de especie. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.</i> .....	157
<i>Tabla 57 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo y los relacionados con la morfología floral a nivel de especie * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.</i> .....	157
<i>Tabla 58 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con la morfología floral a nivel de entradas de la especie C. nevadensis. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.</i> .....	158
<i>Tabla 59 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo a nivel de entradas de la especie C. nevadensis. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.</i> .....	158
<i>Tabla 60 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla a nivel de entradas de la especie C. nevadensis. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.</i> .....	159
<i>Tabla 61 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo y los relacionados con la morfología floral a nivel de entradas de la especie C. nevadensis. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.</i>	159

Tabla 62 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla y los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo a nivel de entradas de la especie <i>C. nevadensis</i> . * Significación al nivel del 5%.....	160
Tabla 63 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con la morfología floral a nivel de entradas de la especie <i>C. carpetanus</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.....	160
Tabla 64 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con la morfología floral a nivel de entradas de la especie <i>C. serotinus</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.....	161
Tabla 65 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla a nivel de entradas de la especie <i>C. serotinus</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.....	162
Tabla 66 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla y los relacionados con la morfología floral a nivel de entradas de la especie <i>C. serotinus</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.....	163
Tabla 67 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla y los relacionados con el crecimiento vegetativo a nivel de entradas de la especie <i>C. serotinus</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.	163
Tabla 68 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla a nivel de entradas de la especie <i>C. clusii</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.....	164
Tabla 69 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de <i>C. nevadensis</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa .....	165
Tabla 70 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados al final del ciclo vegetativo de <i>C. nevadensis</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.....	165
Tabla 71 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de <i>C. carpetanus</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa .....	166
Tabla 72 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados al final del ciclo vegetativo de <i>C. nevadensis</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.....	166
Tabla 73 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto de <i>C. carpetanus</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.....	166
Tabla 74 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de <i>C. vernus</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa .....	167
Tabla 75 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de <i>C. serotinus</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa .....	168
Tabla 76 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados al final del ciclo vegetativo de <i>C. serotinus</i> . * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.....	168

<i>Tabla 77 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto de C. serotinus. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.....</i>	<i>168</i>
<i>Tabla 78 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de C. clusii. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.....</i>	<i>169</i>
<i>Tabla 79 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto de C. clusii. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.....</i>	<i>169</i>
<i>Tabla 80 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de C. nudiflorus. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1%. ns: no significativa .....</i>	<i>170</i>
<i>Tabla 81 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de C. cambessedesii. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.....</i>	<i>170</i>
<i>Tabla 82 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto de C. cambessedesii. * Significación al nivel del 5%. ** Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.....</i>	<i>171</i>
<i>Tabla 83. Ecuación de cada una de las tres componentes principales, en función de los caracteres considerados para el presente análisis y porcentaje de la varianza total explicada por cada una de ellas.....</i>	<i>231</i>
<i>Tabla 84. Valores X i2 para todos los caracteres cualitativos.....</i>	<i>237</i>
<i>Tabla 85 Componentes de la varianza para cada uno de los caracteres relacionados con la fenología. Días contados desde la plantación del cormo en el terreno (1 de agosto del 2011). ...</i>	<i>247</i>
<i>Tabla 86 Período transcurrido desde el 1 de agosto hasta la brotación, la salida de la hoja, la floración, la salida del fruto, la seca de los frutos y la seca de las hojas en las distintas especies silvestres españolas de Crocus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones (p&lt; 0,05). DHB, DHH, DHF y DSH, son días hasta que el 50% de las plantas se encuentran en ese estado fisiológico. DHC y DSC: cuando se inicia la seca en al menos 20-30% de las plantas.....</i>	<i>248</i>
<i>Tabla 87 Período transcurrido desde el 1 de agosto hasta la brotación, la salida de la hoja, la floración y el secado de las hojas, en las distintas especies silvestres españolas de Crocus cultivadas en un ambiente controlado. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones (p&lt; 0,05). DHB, DHH, DHF y DSH son días hasta que el 50% de las plantas se encuentran en ese estado fisiológico.....</i>	<i>253</i>
<i>Tabla 88 Periodo de floración de las especies en su ambiente natural, información procedente de las colectas. ....</i>	<i>256</i>
<i>Tabla 89 Comparación del periodo de floración entre los distintos ambientes de cultivo estudiados.</i>	<i>257</i>
<i>Tabla 90 Influencia del peso del cormo sobre el tiempo requerido para alcanzar el 50% de la brotación. Letras diferentes indican diferencias significativas (p&lt; 0,05). ....</i>	<i>258</i>
<i>Tabla 91 Influencia de la temperatura de conservación de los cormos durante la época estival, en la diferenciación de meristemos florales. Se muestra el porcentaje de cormos muestreados que presentan meristemos florales en buenas condiciones. * Presentan desarrollo de meristemos florales anómalos pero en baja proporción .....</i>	<i>260</i>

<i>Tabla 92 Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de C. nevadensis en el periodo de floración, en el período transcurrido desde el 1 de agosto hasta que el 50% de las plantas florecen y en el número de flores por cormo. Se muestran los valores medios. Datos conjuntos de los años 2009 y 2010. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>265</i>
<i>Tabla 93 Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de C. nevadensis en la vida media y la longitud máxima de las flores producidas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). Datos del año 2010. ....</i>	<i>266</i>
<i>Tabla 94 Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de C. vernus en el periodo de floración, en el período transcurrido desde el 1 de agosto hasta que el 50% de las plantas florecen y en el número de flores por cormo. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). Datos conjuntos de los años 2010 y 2011. ....</i>	<i>269</i>
<i>Tabla 95 Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de C. vernus en la vida media y la longitud máxima de las flores producidas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). Datos del año 2010. ....</i>	<i>270</i>
<i>Tabla 96 Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de la entrada silvestre de C. serotinus en el periodo de floración, en el período transcurrido desde el 1 de agosto hasta que el 50% de las plantas florecen y en el número de flores por cormo. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). ....</i>	<i>272</i>
<i>Tabla 97 Influencia del tratamiento térmico al que se someten la entrada comercial de C. serotinus en el periodo de floración, en el período transcurrido desde el 1 de agosto hasta que el 50% de las plantas florecen y en el número de flores por cormo. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). ....</i>	<i>273</i>
<i>Tabla 98 Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de la entrada de C. serotinus suministrada por un vivero en la vida media y longitud máxima de las flores producidas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). ....</i>	<i>274</i>
<i>Tabla 99 Efecto de distintos períodos de almacenamiento en seco a 23°C (0, 15, 30, 45, 60, 80 y 125 días) sobre la germinación de las semillas de C. serotinus a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). ....</i>	<i>310</i>
<i>Tabla 100 Efecto de distintos períodos de almacenamiento en seco a 23°C (0, 45 y 60 días) sobre la germinación de las semillas de C. nudiflorus a 10°C. Siendo: DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). ....</i>	<i>311</i>
<i>Tabla 101 Efecto de distintos períodos de estratificación en frío (0, 30 y 60 días) tras 60 días de almacenamiento en seco a 23°C, sobre la germinación de las semillas de C. nudiflorus a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>311</i>
<i>Tabla 102 Efecto de un almacenamiento en seco de 60 días previo sobre la germinación de las semillas de C. nevadensis a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). Estas semillas se mantuvieron dos meses en condiciones de conservación en nevera (5°C y baja humedad). ....</i>	<i>312</i>

<i>Tabla 103 Efecto de distintos períodos de almacenamiento en seco (60 y 80 días) previos, sobre la germinación de las semillas de C. nevadensis a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (p&lt; 0,05). Estas semillas se mantuvieron cinco meses y medio en condiciones de conservación en nevera (5°C y baja humedad).....</i>	<i>312</i>
<i>Tabla 104 Efecto de distintos períodos de almacenamiento en seco (0, 45, 60 y 80 días) previos a diferentes periodos de estratificación fría (0, 45 y 30), sobre la germinación de las semillas de C. nevadensis a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (p&lt; 0,05). Estas semillas se mantuvieron dos meses en condiciones de conservación en nevera (5°C y baja humedad).....</i>	<i>313</i>
<i>Tabla 105 Efecto de distintos períodos de almacenamiento en seco (0, 60 y 80 días) previos a diferentes tiempos de estratificación fría (0 y 30 días), sobre la germinación de las semillas de C. carpetanus a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (p&lt; 0,05). .....</i>	<i>314</i>
<i>Tabla 106 Efecto de distintos períodos de estratificación fría a 5°C (0, 30 y 60 días) tras diferentes periodos de almacenamiento en seco (0 y 60 días) sobre la germinación de las semillas de C. vernus a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (p&lt; 0,05). .....</i>	<i>315</i>
<i>Tabla 107 Influencia de la temperatura y del tratamiento de rotura de latencia (sin tratamiento previo; 23°C (45 días) siendo almacenamiento en seco de 45 días) en la germinación de semillas de C. serotinus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (p&lt; 0,05). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas de germinación y letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos de rotura de latencia. .</i>	<i>315</i>
<i>Tabla 108 Influencia de la temperatura y del tratamiento de rotura de latencia (sin tratamiento previo; 23°C (45 días) siendo almacenamiento en seco de 45 días) en la germinación de semillas de C. nudiflorus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (p&lt; 0,05). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas de germinación y letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos de rotura de latencia. .</i>	<i>316</i>
<i>Tabla 109 Influencia de la temperatura y del tratamiento de rotura de latencia (sin tratamiento previo; 23°C (60 días) /5°C (30 días) siendo almacenamiento en seco de 60 días seguido de estratificación fría de 30 días) en la germinación de semillas de C. carpetanus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (p&lt; 0,05). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas de germinación y letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos de rotura de latencia.....</i>	<i>317</i>
<i>Tabla 110 Influencia de la temperatura y del tratamiento de rotura de latencia (sin tratamiento previo; 23°C (60 días) /5°C (30 días) siendo almacenamiento en seco 60 días seguido de estratificación fría 30 días) en la germinación de semillas de C. nevadensis. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (p&lt; 0,05). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas de germinación y letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos de rotura de latencia.....</i>	<i>317</i>
<i>Tabla 111 Influencia de la temperatura de floración en el cuajado de los frutos en una especie otoñal y dos especies primaverales. % de frutos con semillas viables observado en el tratamiento óptimo de cuajado. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones (p&lt; 0,05). .....</i>	<i>319</i>

- Tabla 112 Influencia de la temperatura de desarrollo de la flor y cuajado del fruto sobre el desarrollo de la cápsula en especies que difieren en su época de floración (*C. serotinus* de floración otoñal y *C. nevadensis* de floración primaveral). Se da el período transcurrido desde el 1 de agosto hasta que el 50% de las plantas desarrollan las cápsulas y hasta que el 50% de las cápsulas maduran. Se muestran los valores medios. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). ..... 320
- Tabla 113 Influencia de la temperatura durante el desarrollo de la hoja en la duración de la vida de la misma en las distintas especies españolas de *Crocus*. Se aplica un periodo de frío invernal previo en todas ellas excepto en *C. serotinus*. Se da el valor medio de los días transcurridos desde la siembra de los cormos iniciales (1 de agosto) hasta que se observan el 50% de las plantas con las hojas totalmente secas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre las temperaturas ensayadas para una misma especie ( $p < 0,05$ ). ..... 324
- Tabla 114 . Longitud de onda de los máximos de absorbancia presentes entre los 200-500 nm de las especies que presentan pigmentos carotenoides en sus estilos. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones ( $p\text{-value} < 0,05$ ). \* indican plantas que sufrieron un problema de cultivo y no se ha tenido en cuenta en el análisis de medias. 328
- Tabla 115 . Valor E1% del extracto acuoso de los estigmas secos de *C. sativus*. Extracción realizada con el mismo protocolo que la extracción realizada con el material de las especies silvestres. .... 328
- Tabla 116 . Valor E1% de los extractos acuosos de los estilos secos de las diferentes especies silvestres de *Crocus* que han sido analizadas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones ( $p\text{-value} < 0,05$ ). ..... 328
- Tabla 117 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides de las especies *C. serotinus*, *C. nudiflorus* y *C. vernus*, según el rango de TR en el que eluyen y su espectro de absorción. Se indica el número de pico que se muestra en los cromatogramas. X1 pico importante en una única entrada, encontrándose en las restantes en menor cantidad. X2 Pico identificado sólo en una de las entradas. .... 333
- Tabla 118 Comparación compuesto 3 y 6 presentes en *C. vernus* y compuesto 4 y 5 presentes en *C. serotinus*. ..... 335
- Tabla 119 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a flavonoides de las especies *C. nevadensis*, *C. carpetanus*, *C. serotinus*, *C. nudiflorus* y *C. vernus*, según el rango de TR en el que eluyen. Se indica el número de pico que se indicará en los cromatogramas. X1 indica pico importante en una única entrada, encontrándose en las restantes en menor cantidad. X2 una única entrada analizada. .... 335
- Tabla 120 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides de las entradas de la especie *C. serotinus*, y el rango de TR en el que eluyen. 337
- Tabla 121 . Espectro UV-Vis de los principales picos del perfil cromatográfico a 460 y 461 nm de *C. serotinus* procedente de Jaén y Albacete. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos. .... 338
- Tabla 122 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides de las entradas de la especie *C. nudiflorus*, y el rango de TR en el que eluyen. 338
- Tabla 123 . Espectros del UV-Vis que corresponden a cada pico cromatográfico principal del perfil a 458 y 462 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos (Continúa en la siguiente página). ..... 339
- Tabla 124 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides de la especie *C. vernus*, y el rango de TR en el que eluyen. .... 340

<i>Tabla 125 . Espectros del UV-Vis que corresponden a cada pico cromatográfico principal del perfil a 462 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos. ....</i>	<i>341</i>
<i>Tabla 126 Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides de las entradas de la especie C. nevadensis, y el rango de TR en el que eluyen. ..</i>	<i>342</i>
<i>Tabla 127 .1. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 247 y 248 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos (continua en página siguiente).....</i>	<i>342</i>
<i>Tabla 128 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides de las entradas de la especie C. serotinus, y el rango de TR en el que eluyen..</i>	<i>343</i>
<i>Tabla 129 1.. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 260 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR minutos (continua en página siguiente).....</i>	<i>344</i>
<i>Tabla 129 .2. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 260 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR minutos.....</i>	<i>345</i>
<i>Tabla 130 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides de las entradas de la especie C. nudiflorus, y el rango de TR en el que eluyen.</i>	<i>346</i>
<i>Tabla 131 .1. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 462 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos (continua en página siguiente).....</i>	<i>346</i>
<i>Tabla 132 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides de las entradas de la especie C.vernus, y el rango de TR en el que eluyen. ....</i>	<i>347</i>
<i>Tabla 133 1.. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 260 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos (Continua en página siguiente).....</i>	<i>348</i>
<i>Tabla 133.2. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 260 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos .....</i>	<i>349</i>
<i>Tabla 134 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides que se han identificado en las especies C. serotinus, C. nudiflorus y C.vernus, según el rango de TR en el que eluyen y su espectro de absorción. Se indica el número de pico que se muestra en los cromatogramas.....</i>	<i>350</i>
<i>Tabla 135 . Espectro UV-Vis de los principales picos del perfil cromatográfico a 460 y 462 nm. Los espectros de los picos 1, 2, 3, 5 y 7 proceden del cromatograma de C. serotinus (BCU001657) y los picos 4 y 6 proceden del cromatograma de C.vernus (BCU003198). Entre paréntesis se indica el TR en minutos. Se indica el nombre del compuesto y sus <math>\lambda_{max}</math> (nm) .....</i>	<i>351</i>
<i>Tabla 136 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides presentes en las especies C. nevadensis, C. carpetanus, C. serotinus, C. nudiflorus y C.vernus, según el rango de TR en el que eluyen. Se indica el número de pico que se indicará en los cromatogramas.....</i>	<i>352</i>
<i>Tabla 137 .1 Espectro UV-Vis de los principales picos del perfil cromatográfico a 260 nm. Los espectros de los proceden del cromatograma de C.vernus (BCU003198). Entre paréntesis se indica el TR en minutos. Se indica el nombre del compuesto y sus <math>\lambda_{max}</math> (nm) .....</i>	<i>353</i>
<i>Tabla 138 . Espectros, TR y <math>\lambda_{max}</math> (nm) de los flavonoides identificados en C.vernus y C. nudiflorus... ..</i>	<i>354</i>

<i>Tabla 139 . Contenido total de crocinas en relación al peso de los estilos de las especies silvestres españolas de Crocus. Calculado tomando como patrón el pigmento carotenoide Crocina 1. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones (p-value &lt;0,05). * indican plantas que por problemas de cultivo al final del ciclo no se ha tenido en cuenta en el análisis de medias. ....</i>	<i>358</i>
<i>Tabla 140 Porcentaje de los isómeros trans y cis y de crocina trans 4-GG respecto de la masa total de crocinas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones (p-value&lt; 0,05). ....</i>	<i>359</i>
<i>Tabla 141 . Contenido total de flavonoides en los estilos de las especies silvestres españolas de Crocus. Se ha calculado tomando como patrón el flavonoide Quercetina. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones (p-value &lt; 0,05). * indican plantas que por problemas de cultivo al final del ciclo no se han tenido en cuenta en el análisis de medias. ....</i>	<i>359</i>
<i>Tabla 142 . Picos cromatográficos correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides que se han seleccionado para realizar el análisis de coordenadas principales. El número de pico corresponde con el número que se muestra en los cromatogramas. Se indica el rango de TR en el que eluyen. ....</i>	<i>360</i>
<i>Tabla 143 . Picos cromatográficos correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides que se han seleccionado para realizar el análisis de coordenadas principales. El número de pico corresponde con el número que se muestra en los cromatogramas. Se indica el rango de TR en el que eluyen. ....</i>	<i>360</i>
<i>Tabla 144 . Ecuación de cada una de las tres coordenadas principales, en función de los caracteres considerados para el presente análisis y porcentaje de la varianza total explicada por cada una de ellas. Se indica si el pico corresponde a una crocina (c) o a un flavonoide (f). ....</i>	<i>360</i>
<i>Tabla 145 Material utilizado en cada uno de los análisis mediante marcadores moleculares.....</i>	<i>367</i>
<i>Tabla 146 Número de bandas polimórficas y monomórficas obtenida en el test de cebadores realizado con las siete especies analizadas.....</i>	<i>368</i>
<i>Tabla 147 Número de bandas de cada especie obtenidas mediante los cebadores OPL-11 y OPL-16 .....</i>	<i>368</i>
<i>Tabla 148 Separación de las posibles parejas de especies mediante cada cebador analizado. Rosa: OPL-16; Gris: OPL-11. Mezcla de rosa y gris: separación mediante los dos cebadores. ....</i>	<i>369</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución del género <i>Crocus</i> (Rukšāns, 2010).	1
Figura 2 . Especies españolas del género <i>Crocus</i> . (1) <i>C. sativus</i> . Se distingue el estilo ramificado en tres ramas de color rojizo sobre los tépalos y las hojas estrechas y lineares; (2). <i>C. nudiflorus</i> ; (3). <i>C. serotinus</i> ; (4). <i>C.clusii</i> ; (5). <i>C. nevadensis</i> y (6). <i>C. carpetanus</i> .	4
Figura 3 . Especies españolas del género <i>Crocus</i> . (1). <i>C. cambessedesii</i> ; (2). <i>C. vernus</i> ; (3). <i>C. nudiflorus</i> y (4). <i>C. nevadensis</i> .	5
Figura 4 Dendograma UPGMA, que refleja las relaciones de similitud existente entre varias especies de <i>Crocus</i> , incluido <i>C. sativus</i> (Grilli Caiola et al., 2004).	8
Figura 5 Fresco del Palacio de Akrotiri en Thera, que representa la cosecha de las flores del azafrán (Grilli-Caiola y Canini, 2010). (2) Flores de la especie <i>Crocus sativus</i> .	9
Figura 6 Hebras de Azafrán	10
Figura 7 La producción de Azafrán por países (expresada en toneladas) (FAO, 2014; Banco Mundial, 2015)	10
Figura 8 Evolución de la superficie del cultivo en hectáreas (ha) y de la producción (kg) de azafrán (estigmas tostados) de España (Fuente: MAGRAMA, 2012).	12
Figura 9 Estructura molecular de los compuestos más importantes del azafrán (Fuente: Fernández, 2004).	13
Figura 10 Esquema de una planta del género <i>Crocus</i> (Adaptado de Bowles, 1952, extraído de Rukšāns, 2010). Foto 1: 1. Tépalos internos, 2. Tépalos externos, 3. Filamentos del estambre, 4. Antera, 5. Estigma, 6. Estilo, 7. Garganta floral, 8. Tubo periántico, 9. Bráctea, 10. Bractéola, 11. Hojas, 12. Prófilo o espata basal, 13, 14 y 15. Catafilos, 16. Ovario, 17. Escapo, 18. Base de las hojas, 19. Cormo hijo, 20. Túnica, 21. Cormo madre, 22. Túnicas de la base, 23. Raíces.	16
Figura 11 Cormo de azafrán con túnicas protectoras; (2) Cormo de azafrán sin túnicas pudiéndose observar la yema apical y las yemas laterales.	16
Figura 12 Ejemplos de variabilidad en la túnica de los cormos de <i>Crocus</i> spp.	17
Figura 13 Raíces de cormos de azafrán. (2) Cormos de azafrán con raíz contráctil. (3) Estructuras estoloníferas	18
Figura 14 Hojas de <i>C. vernus</i> , delgadas, lineares de color verde oscuro, se observa la franja blanca central.	19
Figura 15 Secciones de la hoja de diferentes especies de <i>Crocus</i> spp. (Mathew, 1982).	19
Figura 16 Cormos de azafrán con brotes florales (Fuente: www.srgc.org.uk, 2010). (2). Flor de <i>C. carpetanus</i> con bráctea visible. 3. Flor de <i>C. cambessedesii</i> , se observa estambres, estigmas y garganta floral.	20
Figura 17 Variabilidad presente en la coloración de los tépalos de <i>Crocus</i> spp. 1. Tépalos de coloración uniforme. 2. Coloración degradada. 3. Venación continua y uniforme. 4. Venación discontinua. 5. Venación plumosa con mancha en la base. 6. Venación plumosa con mancha uniforme. 7. Moteado. 6. Manchas en la base de los tépalos internos.	21
Figura 18 Flores de azafrán. Se distingue el estilo ramificado en tres ramas de color rojizo sobre los tépalos y las hojas estrechas y lineares.	22
Figura 19 Variabilidad de la ramificación del estilo (Mathew, 1982).	22

<i>Figura 20 Variabilidad en el grado de ramificación del estilo. 1. Tres ramificaciones con mazas a su vez divididas. 2. Tres ramificaciones con mazas no divididas. 3. Muchas ramificaciones. 4. Cuatro ramificaciones de diferente longitud.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 21 Estilos y estambres de Crocus spp.(2). Flores de C.vernus. Se puede observar la posición del ovario (ov) y el lugar de la inserción con el cormo (cor).....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 22 Variabilidad presente en la morfología de la cápsula. 1. Oblonga. 2. Elipsoide. 3. Fusiforme.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 23 Semilla de C. ancyrensis. Se observa el rafe (r), y la carúncula (c).....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 24 Variabilidad observada en la morfología de la semilla en especies del género Crocus. 1. Globosa (C. flavus). 2. Subglobosa (C. ancyrensis).3. Elipsoide (C. serotinus). 4. Superficie rugosa (C. fleischeri).....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 25 Ciclo biológico del azafrán. Se refleja el desarrollo de la planta y de las yemas florales (Fuente: Kafji, 2006).....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 26 Estadios de desarrollo del cormo de azafrán: C1: Yemas latentes en la superficie del cormo madre. C2: desarrollo de la yema principal. C3: Cormo hijo en desarrollo, sujeto a la superficie del cormo madre. C4: Cormo hijo desarrollado, comienzo del periodo de latencia. (Fuente: Fernández, 2004).....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 27 Las flores de las especies C. nevadensis (1), C. carpetanus (2) y C.vernus (3).....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 28 . Flores de C. serotinus (1) y C. clusii(2).....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 29 Las flores de las especies C. nudiflorus (1) y C. cambessedesii (2).....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 30 Colecciones de Crocus del Banco Germoplasma Vegetal del CIAF de Albaladejito. Colección vegetativa de reserva (A) y Colección vegetativa de intercambio (B).....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 31 Diagrama de la sección de la hoja típica del género Crocus. Tipos de vasos vasculares (Erol y Kuçuker, 2007).....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 32 Sección anatómica de la hoja de 1. C.vernus, 2. C. serotinus, 3. C. nudiflorus y 4. C. carpetanus (Adaptada de Barra, 1982).....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 33 Sección anatómica de la hoja de 1. C. nevadensis, 2. C. carpetanus y 3. C. sativus (Adaptada de G. Maw, 1886).....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 34 Tipos de estilos de Crocus spp. que crecen en Balikesir (Turquía). 1. Crocus gargaricus, 2. C. chrysanthus, 3. C. biflorus subsp. nubigena, 4. C. flavus subsp. dissectus 5. C. olivieri subsp. istanbulensis 6. C. c idus 7. C. pallasii subsp. pallasii, 8. C. cancellatus subsp. mazziaricus 9. C. pulchellus (Barra de escala: 2 mm) (Selvi y Satil, 2013).....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 35 Fotografías de la superficie de la semilla de Crocus spp. (Micrografías electrónicas de barrido): 1. Crocus albiflorus y 2. Crocus vernus subsp. vernus (Adaptado de Ryszard y Rafifiski, 1978).....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 36 Cultivo forzado bajo condiciones microclimáticas controladas (Foto ITAP, Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete; Fuente: Libro Blanco del azafrán en Europa, 2007). 2. Floración de azafran (C.sativus) en cultivo forzado (extraída de Valero et al., 2004b).....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 37 Estructura molecular de los compuestos más importantes del azafrán (Adaptado de Carmona et al., 2006b).....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 38 Esquema de la formación química o enzimática del safranal a partir de la picrocrocina (Himeno y Sano, 1987).....</i>	<i>46</i>

<i>Figura 39 Hipótesis para la formación de compuestos volátiles presentes en el aroma del azafrán a partir de los ésteres de crocetina (Carmona et al., 2006a).</i>	47
<i>Figura 40 Hipótesis de la formación de HTCC y safranal antes de (A) y durante la antesis de C. sativus (B) según Carmona et al. (2006a).</i>	47
<i>Figura 41 Espectro el UV-visible de los isómeros cis- y trans-crocina-4 (Tarantilis et al., 1995).</i>	51
<i>Figura 42 Espectro UV-vis de la picrocrocina y safranal (Tarantilis et al. 1995).</i>	51
<i>Figura 43 Espectro de absorbancia en el UV del compuesto flavonoide kaempferol-3,7,40-triglucoside. (Carmona et al. 2007).</i>	52
<i>Figura 44 Perfil cromatográfico de C. sativus a 440 nm obtenido mediante HPLC (Tarantilis et al. 1994).</i>	53
<i>Figura 45 Perfil de HPLC de un extracto de estilos de azafrán a 250, 310 y 440 nm (Lozano et al. 1999).</i>	53
<i>Figura 46 Colección de Reserva de Crocus spp. del Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Colección depositada en macetas, ubicada bajo umbráculo y con riego por goteo automatizado.</i>	63
<i>Figura 47 Colección Vegetativa de Multiplicación de Crocus spp en el Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca.</i>	64
<i>Figura 48 Medida de la longitud del tépalo externo de C. serotinus.</i>	66
<i>Figura 49 Portada del “Descriptors for Crocus (Crocus spp.)” editado por Bioversity International.</i>	67
<i>Figura 50 Umbráculo donde se ubica la colección sobre la que se realizó el estudio de fenología. 2. Jardineras de la misma colección durante la brotación.</i>	76
<i>Figura 51 Macetas del ensayo de fenología en ambiente controlado. Floración de la especie C. serotinus. (2) Macetas ensayo de C. nevadensis, tras la floración.</i>	78
<i>Figura 52 Influencia del tamaño del cormo en la fenología: 1. Cormos con peso &gt; 1,5 g; 2. Cormos con peso 1-1,5 g; 3. Cormos con peso 0,1 – 1 g; 4. Cormos con peso &lt; 0,06 g.</i>	79
<i>Figura 53 Material vegetal empleado en los ensayos de fisiología cedido por el Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Cormos de la especie C. nevadensis colectado en Olmeda del Rey (BCU002695).</i>	81
<i>Figura 54 Cámara MEDILOW con iluminación. Macetas en cultivo de los ensayos de fisiología. ...</i>	82
<i>Figura 55 Influencia de la temperatura en el desarrollo de los brotes. Distintas fases del proceso de observación del meristemo en desarrollo de los cormos incubados. 1. Cormos de C. serotinus BCU002775, 2. Yema de C. vernus BCU002998, 3 y 4. Yemas de C. nevadensis BCU002695, 5. Yema floral de C. nudiflorus BCU002944, 6. Flor de C. vernus BCU002998</i>	83
<i>Figura 56 Tratamiento térmico de los ensayos de floración realizados con cormos de C. nevadensis.</i>	84
<i>Figura 57 Tratamiento térmico de los ensayos de floración realizados con cormos de C. vernus.</i>	85
<i>Figura 58 Tratamiento térmico de los ensayos de floración realizados con cormos de C. serotinus.</i>	85
<i>Figura 59 Influencia de la temperatura en la floración de cormos de C. serotinus (BCU002775) (1) 10°C y (2). 17°C.</i>	86
<i>Figura 60 Tratamiento térmico de los ensayos previos a la floración realizados con cormos de C. nevadensis.</i>	86

Figura 61 Tratamiento térmico de los ensayos previos a la floración realizados con cormos de <i>C. vernus</i> .....	87
Figura 62 Tratamientos térmicos aplicados a la especie <i>C. nevadensis</i> para estudiar su desarrollo vegetativo.....	88
Figura 63 Tratamientos térmicos aplicados a la especie <i>C. vernus</i> para estudiar su desarrollo vegetativo.....	88
Figura 64 Diferentes tratamientos térmicos aplicados en <i>C. serotinus</i> para estudiar su desarrollo vegetativo (superior) sin periodo de frío invernal y (inferior) bajo la influencia de un periodo de frío invernal.....	89
Figura 65 Tratamientos térmicos aplicados a la especie <i>C. nudiflorus</i> para estudiar su desarrollo vegetativo.....	90
Figura 66 Cormos de <i>C. carpetanus</i> durante el ensayo de desarrollo vegetativo.....	90
Figura 67 Semillas de (1) <i>C. serotinus</i> y (2) <i>C. nudiflorus</i> tras la germinación .....	91
Figura 68 Distribución de la especie <i>C. nevadensis</i> , de floración primaveral, en la Península Ibérica.....	105
Figura 69 Distribución de la especie <i>C. carpetanus</i> , de floración primaveral, en la Península Ibérica.....	105
Figura 70 Distribución de la especie <i>Crocus vernus</i> , de floración primaveral, en la Península Ibérica.....	106
Figura 71 Distribución de las especies <i>C. serotinus</i> y <i>C. clusii</i> , de floración otoñal, en la Península Ibérica. ....	107
Figura 72 Distribución de la especie <i>C. nudiflorus</i> , de floración otoñal, en la Península Ibérica.....	108
Figura 73 Distribución de la especie <i>C. cambessedesii</i> , de floración otoñal, en la Península Ibérica.....	109
Figura 74 Aspecto de las flores de las diversas especies silvestres españolas del género <i>Crocus</i> . 1) <i>C. nevadensis</i> ; 2) <i>C. carpetanus</i> ; 3) <i>C. vernus</i> ; 4) <i>C. serotinus</i> ; 5) <i>C. nudiflorus</i> ; 6) <i>C. cambessedesii</i> .....	110
Figura 75 Mapa de distribución de las especies de <i>C. nevadensis</i> , de floración primaveral, en la Península Ibérica y localidades colectadas. ....	114
Figura 76 Ambiente forestal en el que se han colectado las especies <i>C. nevadensis</i> y <i>C. carpetanus</i> . 1) <i>C. nevadensis</i> en Basaurri (Huesca, BCU002992); 2) <i>C. nevadensis</i> en la Sª de Altomira (Cuenca, BCU002694); 3) <i>C. nevadensis</i> en Sª Nevada (Granada, BCU002977); 4) <i>C. nevadensis</i> en Sª de Cazorla (Jaén, BCU002982); 5) <i>C. carpetanus</i> en Robregordo (Madrid, BCU002972); 6) <i>C. carpetanus</i> en Montejo de la Sierra (Madrid, BCU002971); 7) <i>C. carpetanus</i> en Montejo de la Sierra (Madrid, BCU002971); 8) <i>C. carpetanus</i> en Navarredonda de Gredos (Ávila, BCU003192). ....	116
Figura 77 Distribución de las especies de <i>Crocus carpetanus</i> , de floración primaveral, en la Península Ibérica y localidades colectadas. ....	118
Figura 78 Distribución de <i>Crocus vernus</i> , de floración primaveral, en la Península Ibérica y localidades colectadas. ....	119
Figura 79 Ambiente forestal en el que se han colectado las especies <i>C. vernus</i> . 1) <i>C. vernus</i> en Llanos de Lizarra en Jaca (Huesca, BCU002935); 2) <i>C. vernus</i> en Llanos de Lizarra en Jaca (Huesca, BCU002935); 3) <i>C. vernus</i> en Refugio de Boyeros en Jaca (Huesca, BCU003198); 4) <i>C. vernus</i> en Refugio de Boyeros en Jaca (Huesca, BCU003198). ....	120

Figura 80 Distribución de las especies <i>C. serotinus</i> y <i>C. clusii</i> , de floración otoñal en la Península Ibérica y localidades colectadas.....	121
Figura 81 Ambiente forestal en el que se han colectado las especies <i>C. serotinus</i> y <i>C. clusii</i> . 1) <i>C. serotinus</i> en Barrios de Luna (León, BCU003173); 2 y3) <i>C. serotinus</i> en Sª de Aracena (Huelva, BCU002959); 4) <i>C. serotinus</i> en Villamanín (León, BCU003172); 5) <i>C. clusii</i> en Hinojos (Cádiz, BCU002963); 6) <i>C. clusii</i> en Laguna de la Paja (Cádiz, BCU002966); 7 y 8) <i>C. clusii</i> en el Coto de Doñana (Huelva, BCU002960) .....	124
Figura 82 Distribución de <i>C. nudiflorus</i> , de floración otoñal, en la Península Ibérica y localidades colectadas. ....	127
Figura 83 Ambiente forestal en el que se han colectado las especies <i>C. nudiflorus</i> y <i>C. cambessedesii</i> . 1) <i>C. nudiflorus</i> en Benasque (Huesca, BCU002557); 2) <i>C. nudiflorus</i> en Sª de Guara (Huesca, BCU003000); 3) <i>C. nudiflorus</i> en Benasque (Huesca, BCU002944); 4) <i>C. nudiflorus</i> en Villoslada de Cameros (La Rioja, BCU003123); 5) <i>C. cambessedesii</i> en Formentor (Mallorca, BCU001683); 6) <i>C. cambessedesii</i> en Es Replà (Mallorca, BCU001680); 7) <i>C. cambessedesii</i> en Can Mameta (Mallorca, BCU001685) .....	128
Figura 84 Distribución de la especie <i>C. cambessedesii</i> , de floración otoñal, en la Península Ibérica y lugares colectados. ....	130
Figura 85 Forma del tépalo interno en las diferentes especies españolas de <i>Crocus</i> . Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. ....	172
Figura 86 Variabilidad observada en la forma del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de <i>Crocus</i> . 1. Lineal: <i>C. nevadensis</i> (BCU002994); 2. Elíptica: <i>C. nudiflorus</i> (BCU003176); 3. Elíptica amplia: <i>C. carpetanus</i> (BCU002837); 4. Oblanceolada: <i>C. serotinus</i> (BCU001657); 5. Obovada: <i>C. vernus</i> (BCU002998).....	173
Figura 87 Variabilidad observada en el ápice del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de <i>Crocus</i> . 1. Agudo: <i>C. nevadensis</i> (BCU002994); 2. Acuminado: <i>C. nudiflorus</i> (BCU003176); 3. Obtuso: <i>C. carpetanus</i> (BCU002837); 4. Redondeado: <i>C. carpetanus</i> (BCU002971); 5. Emarginado: <i>C. cambessedesii</i> (BCU001685). ....	173
Figura 88 Ápice del tépalo externo e interno en las diferentes especies españolas de <i>Crocus</i> . Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. ....	174
Figura 89 Patrón de fondo de los tépalos en las diferentes especies españolas de <i>Crocus</i> . Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. ....	175
Figura 90 Color general del tépalo externo e interno en las diferentes especies españolas de <i>Crocus</i> . Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. ....	176
Figura 91 Variabilidad observada en el color general del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de <i>Crocus</i> . 1 y 2. Blanco: 1. <i>C. cambessedesii</i> (BCU001685), 2. <i>C. nevadensis</i> (BCU002694); 3. Crema: <i>C. nevadensis</i> (BCU002697); 4 y 5. Amarillo: 4. <i>C. cambessedesii</i> (BCU001685), 5. <i>C. nevadensis</i> (BCU002694); 6 y 7. Violeta claro: <i>C. serotinus</i> (BCU002618 y BCU002775); 8. Violeta: <i>C. serotinus</i> (BCU001657); 9. Violeta oscuro: <i>C. nudiflorus</i> (BCU003176); 10. Púrpura: <i>C. serotinus</i> (BCU001657); 11-13. Ápice violeta y base blanca: 11 y 12. <i>C. carpetanus</i> (BCU002837); 13. <i>C. clusii</i> (BCU002965). ....	177
Figura 92 Patrón de venación de los tépalos en las diferentes especies españolas de <i>Crocus</i> . Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. ....	178
Figura 93 Variabilidad observada en el patrón de venación del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de <i>Crocus</i> . 1-4. Sin venas: 1. <i>C. carpetanus</i> (BCU002837); 2. <i>C. nevadensis</i> (BCU002697); 3. <i>C. nudiflorus</i> (BCU003176); 4. <i>C. serotinus</i> (BCU003174); 5- 8. Uniforme y continua: 5. <i>C. carpetanus</i> (BCU002837); 6. <i>C. nevadensis</i> (BCU002689); 7. <i>C. serotinus</i> (BCU002775); 9-11. Sólo	

las venas de la base: 8. *C. cambessedesii* (BCU001685); 9. *C. carpetanus* (BCU002837); 10. *C. serotinus* (BCU002980); 12-13. Sólo las venas principales: 11. *C. carpetanus* (BCU002837); 12. *C. serotinus* (BCU002775); 14-15. Venación discontinua: 13. *C. nevadensis* (BCU002694); 14. *C. vernus* (BCU002998). ..... 179

Figura 94 Variabilidad observada en el tipo de venación del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Mal definida: *C. carpetanus* (BCU002837); 2 y 3. Bien definida: 2. *C. nudiflorus* (BCU003176); 3. *C. carpetanus* (BCU002837); 4 y 5. Plumosa: 4. *C. carpetanus* (BCU002835); 5. *C. serotinus* (BCU002367); 6 y 7. Plumosa con mancha: 6. *C. cambessedesii* (BCU001685); 7. *C. serotinus* (BCU001657). ..... 179

Figura 95 Tipo de venación del tépalo en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 180

Figura 96 Patrón del color de la venación del tépalo en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 181

Figura 97 Color de venación del tépalo en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 182

Figura 98 Variabilidad observada en el color de la venación del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-4. Violeta: 1, 2 y 3 *C. serotinus* (BCU002619, BCU002550 y BCU002775); 4. *C. vernus* (BCU001822); 5 y 6. Púrpura: 5. *C. serotinus* (BCU001657); 6. *C. nevadensis* (BCU002689); 7. Azul: *C. nevadensis* (BCU002982); 8. Negra: *C. cambessedesii* (BCU001685); 9. Ápice violeta y base púrpura: *C. carpetanus* (BCU002973); 10. Ápice violeta y base azul: *C. carpetanus* (BCU002838); 11 y 12. Ápice púrpura y base azul: *C. clusii* (BCU002963, BCU002965); 13. Ápice violeta y base azul: *C. carpetanus* (BCU002837). ..... 183

Figura 99 Variabilidad observada en la continuación de las venas hacia el tubo floral en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-4 Presente: 1. *C. cambessedesii* (BCU001685), 2. *C. nevadensis* (BCU002695); 3. *C. clusii* (BCU002963); 4. *C. vernus* (BCU002998); 5 y 6. Ausente: 5. *C. nudiflorus* (BCU002557); 6. *C. carpetanus* (BCU002696). ..... 183

Figura 100 Continuación de las venas hacia el tubo floral en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. Localización de las manchas del tépalo..... 184

Figura 101 Localización de la mancha del tépalo en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 185

Figura 102 Variabilidad observada en la localización de la mancha del tépalo en las especies estudiadas de *Crocus*. 1. Ausente: *C. cambessedesii* (BCU001685); 2. En la base: *C. carpetanus* (BCU002973); 3. En la base y en la garganta: *C. serotinus* (BCU002618). ..... 186

Figura 103 Variabilidad observada en el color de la mancha de la base del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-2. Ausente: 1. *C. cambessedesii* (BCU001685); 2. *C. nudiflorus* (BCU003176); 3. Blanco: *C. serotinus* (BCU002978); 4 y 5. Crema: 4. *C. carpetanus* (BCU002837); 5. *C. nevadensis* (BCU002979); 6 y 7. Amarilla: 6. *C. serotinus* (BCU002618); 7. *C. nevadensis* (BCU002380); 8. Violeta: *C. serotinus* (BCU001657); 9. Violeta oscuro: *C. serotinus* (BCU002741); 10. Púrpura: *C. serotinus* (BCU001657). ..... 186

Figura 104 Color de la mancha del tépalo externo e interno. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter..... 187

Figura 105 Color del inicio del tubo floral en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 188

Figura 106 Variabilidad observada el color del inicio del tubo floral en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-2. Blanco-crema: 1. *C. vernus* (BCU002998); 2. *C. nevadensis* (BCU002982);

3-5. Amarillo: 3. *C. nevadensis* (BCU002979); 4. *C. carpetanus* (BCU002836); 5. *C. serotinus* (BCU002618); 6-9. Violeta-púpura: 6. *C. serotinus* (BCU002619); 7. *C. carpetanus* (BCU002837); 8. *C. vernus* (BCU001822); 9. *C. nudiflorus* (BCU003176); 10. Azul-verde: *C. carpetanus* (BCU002835).188

Figura 107 Color de la garganta floral en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 189

Figura 108 Variabilidad observada en el color de la garganta floral en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1 y 2. Blanca: 1. *C. cambessedesii* (BCU001685); 2. *C. vernus* (BCU002998); 3 y 4. Amarilla: 3. *C. nevadensis* (BCU002698); 4. *C. serotinus* (BCU002550). .... 189

Figura 109 Pubescencia de la garganta floral en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 190

Figura 110 Variabilidad observada en la presencia de pubescencia en la garganta floral en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Pilosa: *C. nevadensis* (BCU002380); 2. Papilosa: *C. serotinus* (BCU002550). .... 190

Figura 111 Variabilidad observada en el color del filamento del estambre en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Blanco: *C. nevadensis* (BCU002982); 2. Amarillo claro: *C. serotinus* (BCU002775); 3. Amarillo-naranja: *C. serotinus* (BCU002618). .... 191

Figura 112 Color del filamento del estambre en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 191

Figura 113 Ramificación del estigma en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 192

Figura 114 Variabilidad observada en el grado de ramificación del estigma en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-3. Tres ramificaciones: 1. *C. carpetanus* (BCU002835); 2. *C. vernus* (BCU001822); 3. *C. cambessedesii* (BCU001685); 4 y 5. Muchas ramificaciones: 4. *C. nudiflorus* (BCU003176); 5. *C. serotinus* (BCU001657). .... 192

Figura 115 Color del estigma en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 193

Figura 116 Variabilidad observada en la coloración del estigma en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Blanco-crema: *C. nevadensis* (BCU002359); 2. Amarillo: *C. serotinus* (BCU002978); 3. Naranja: *C. vernus* (BCU002998). .... 193

Figura 117 Diferenciación entre especies españolas de *Crocus* en base a la morfología floral..... 194

Figura 118 Textura de la bráctea en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 195

Figura 119 Color de la bráctea en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 196

Figura 120 Variabilidad observada en el color de la bráctea floral el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1 y 2. Blanca: 1. *C. nudiflorus* (BCU002776); 2. *C. nevadensis* (BCU002990); 3. Verde: *C. serotinus* (BCU002619); 4. Marrón: *C. nevadensis* (BCU002694). .... 196

Figura 121 Variabilidad observada en la presencia de la bractéola en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1 y 2. Presente: 1. *C. carpetanus* (BCU002836), 2. *C. nevadensis* (BCU002976); 3 y 4. Ausente: 3. *C. vernus* (BCU002998), 4. *C. serotinus* (BCU003181). .... 196

Figura 122 Visibilidad de la bractéola en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 197

Figura 123 Textura de la bractéola en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 198

- Figura 124 Color de la bractéola en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 198
- Figura 125 Tamaño de la bractéola respecto la bráctea en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 199
- Figura 126 Variabilidad observada en el tamaño de la bractéola en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Iguales: *C. carpetanus* (BCU002987); 2 y 3. Casi iguales: *C. nevadensis* (BCU002694, BCU002976); 4. Más pequeña que la bráctea: *C. carpetanus* (BCU002987). .... 199
- Figura 127 Forma de las cápsulas en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 200
- Figura 128 Variabilidad observada en la forma de la cápsula en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1 y 2. Oblonga: 1. *C. carpetanus* (BCU002987), 2. *C. serotinus* (BCU003177); 3 y 4. Elipsoide: 3. *C. nudiflorus* (BCU002944), 4. *C. serotinus* (BCU002775); 5 y 6. Fusiforme: 5. *C. carpetanus* (BCU002987), 6. *C. serotinus* (BCU003174). .... 201
- Figura 129 Variabilidad observada en el color de la cápsula en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Verde uniformemente coloreado: *C. carpetanus* (BCU002987); 2. Verde con rayas moradas: *C. nevadensis* (BCU002871); 3. Amarillas con rayas verdes: *C. vernus* (BCU002998); 4. Morada con rayas moradas oscuras: *C. carpetanus* (BCU002987); 5. Amarilla: *C. nudiflorus* (BCU003123); 6. Verde claro con rayas verde: 6. *C. serotinus* (BCU002775). .... 201
- Figura 130 Color de la cápsula en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. Clave: 1. Verde uniformemente coloreado; 2. Verde con rayas moradas; 3. Amarillas con rayas verdes; 4. Morada clara con rayas moradas oscuras; 5. Amarilla; 6. Verde claro con rayas verde oscuro. .... 202
- Figura 131 Variabilidad observada en la forma de la semilla en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Subglobosa: *C. carpetanus* (BCU002987); 2. Globosa: *C. vernus* (BCU003198); 3. Elipsoide: *C. serotinus* (BCU002872). .... 203
- Figura 132 Forma de la semilla en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 203
- Figura 133 Variabilidad observada en la superficie de las semillas en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Muy rugosa: *C. serotinus* (BCU002775); 2. Algo rugosa: *C. cambessedesii* (BCU001685); 3. Lisa: *C. carpetanus* (BCU002971). .... 203
- Figura 134 Superficie de la semilla en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 204
- Figura 135 Color de la superficie de la semilla en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 204
- Figura 136 Variabilidad observada en el color de la semilla en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Marrón rojizo claro: *C. nudiflorus* (BCU002944); 2. Marrón rojizo oscuro: *C. carpetanus* (BCU002987); 3. Marrón pálido: *C. serotinus* (BCU002775); 4. Marrón oscuro: *C. nevadensis* (BCU002871). .... 205
- Figura 137 Variabilidad observada en el desarrollo de la carúncula de las semillas en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Poco desarrollada: *C. vernus* (BCU003198); 2. Prominente: *C. nudiflorus* (BCU002944); 3. Muy prominente: *C. carpetanus* (BCU002987). .... 205
- Figura 138 Desarrollo de la carúncula de la semilla en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. .... 206

<i>Figura 139 Variabilidad observada en el desarrollo del rafe en el conjunto de especies estudiadas de Crocus. 1. No desarrollado: C. vernus (BCU003198); 2 y 3. Desarrollado: 2. C. carpetanus (BCU002971); 3. C. cambessedesii (BCU001685).</i> .....	206
<i>Figura 140 Desarrollo del rafe de la semilla en las diferentes especies españolas de Crocus. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.</i> .....	207
<i>Figura 141 Forma de las excrescencias en las diferentes especies españolas de Crocus. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.</i> .....	208
<i>Figura 142 Variabilidad observada en la forma de las excrescencias en el conjunto de especies estudiadas de Crocus. 1. Ausencia de estructuras: C. carpetanus (BCU002987); 2. Papilas: C. cambessedesii (BCU001685); 3. Escamas triangulares: C. vernus (BCU003198); 4. Escamas con ápice distal cilíndrico: C. nudiflorus (BCU003176).</i> .....	208
<i>Figura 143 Variabilidad observada en la presencia de ceras en el conjunto de especies estudiadas de Crocus. 1. No aparentes: C. carpetanus (BCU002987); 2. Muy aparentes: C. nevadensis (BCU002981).</i> .....	209
<i>Figura 144 Semillas de C. nevadensis. 1. Morfología observada a lupa (BCU002969). 2 y 3. Aspecto exterior y sección transversal de la cubierta observado a microscopio de barrido (BCU002969). 4 y 5. Entramado de fibras céreas en dos diferentes entradas (BCU002969, BCU002981). 6. Entramado de fibras céreas con baja densidad en otra zona de la cubierta (BCU002981). 7. Aspecto en la zona del funículo (BCU002981).</i> .....	210
<i>Figura 145 Semillas de C. carpetanus. 1. Morfología observada a lupa. 2, 3 y 4. Aspecto exterior y sección transversal de la cubierta observada a microscopio de barrido. 5. Cubierta en la zona del rafe. 6. Cubierta en la zona de la carúncula. Fig. 1-6 de entrada BCU002971.</i> .....	211
<i>Figura 146 Semillas de C. vernus. 1. Morfología observada a lupa. 2 y 3. Aspecto exterior y sección transversal de la cubierta observado a microscopio de barrido. 4. Papilas en la cubierta. 5. Cubierta en la zona del rafe. Fig. 1-5 de la entrada BCU003198.</i> .....	212
<i>Figura 147 Semillas de C. serotinus y C. clusii. 1-3. Morfología observada a lupa: 1. C. serotinus (BCU002550); 2 y 3. C. clusii (BCU002966, BCU002963). 4-6. Papilas en cubierta: 4. C. serotinus (BCU002970); 5 y 6. C. clusii (BCU002966, BCU002963). 7. Aspecto exterior de la zona de la carúncula: C. serotinus (BCU002970); 8. Papilas en la zona de la carúncula: C. clusii (BCU002966); 9. Sección transversal de la cubierta: C. serotinus (BCU001657).</i> .....	213
<i>Figura 148 Semillas de C. nudiflorus. 1 Morfología observada a lupa. 2. Aspecto de la cubierta observado a microscopía electrónica de barrido y (3) detalle de la zona de la carúncula y (4) del rafe. 5. Sección transversal de la cubierta. 6 y 7. Papilas en cubierta de dos entradas diferentes de esta especie. Fig. 1-6 de entrada BCU002944 y Fig. 7 de entrada BCU003176.</i> .....	214
<i>Figura 149 Semillas de C. cambessedesii. 1. Morfología observada a lupa. 2. Aspecto de la cubierta observado a microscopía electrónica de barrido. 3. Detalle de la zona sin papilas. 4. Detalle de una papila. Fig. 1-4 de entrada BCU001653.</i> .....	215
<i>Figura 150 Diferenciación entre especies españolas de Crocus en base a la morfología de la semilla y la superficie de su cubierta.</i> .....	216
<i>Figura 151 Forma de la sección transversal de la hoja en las diferentes especies españolas de Crocus. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.</i> .....	217
<i>Figura 152 Variabilidad observada en la sección transversal de la hoja en el conjunto de especies estudiadas de Crocus. 1-3. Forma de T: 1. C. nudiflorus (BCU003176), 2. C. vernus (BCU003198), 3. C. nevadensis (BCU002359); 4. Forma redondeada: C. carpetanus (BCU002835); 5-9. Forma de doble T: 5. C. cambessedesii (BCU001680), 6 y 7. C. serotinus (BCU002775 y BCU001657); 8-9. C. clusii (BCU002960 y BCU002963).</i> .....	218

<i>Figura 153 Anatomía de la hoja de C. nevadensis (BCU002359).</i> .....	219
<i>Figura 154 Anatomía de la hoja de C. carpetanus (BCU002835).</i> .....	220
<i>Figura 155 Anatomía de la hoja de C. vernus (BCU002935).</i> .....	221
<i>Figura 156 Anatomía de la hoja de C. serotinus (BCU002775).</i> .....	222
<i>Figura 157 Anatomía de la hoja de C. nudiflorus (BCU003176).</i> .....	223
<i>Figura 158 Anatomía de la hoja de C. cambessedesii (BCU001685).</i> .....	224
<i>Figura 159 Diferenciación entre especies españolas de Crocus en base a la morfología de la hoja. S.T. es sección transversal</i> .....	225
<i>Figura 160 Aspecto de la túnica de los cormos en las diferentes especies españolas de Crocus. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.</i> .....	226
<i>Figura 161 Variabilidad observada en el aspecto de la túnica de los cormos en el conjunto de especies estudiadas de Crocus. 1. Membranosas, con fibras paralelas en la base: C. nudiflorus (BCU003001); 2. Reticulada fina: C. carpetanus (BCU002696); 3. Reticulada gruesa: C. clusii(BCU002960); 4.Fibrosa, con fibras paralelas en la base y reticuladas en el ápice: C. nevadensis (BCU002994).</i> .....	226
<i>Figura 162 Variabilidad observada en el color de la túnica de los cormos en el conjunto de especies estudiadas de Crocus. 1. Crema: C. carpetanus (BCU002971); 2. Bronce: C. serotinus (BCU002778); 3. Marrón claro: C. nevadensis (BCU002976); 4. Marrón oscuro: C. nevadensis (BCU002993).</i> .....	226
<i>Figura 163 Color de la túnica de los cormos en las diferentes especies españolas de Crocus. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.</i> .....	227
<i>Figura 164 Persistencia de la túnica del cormo en las diferentes especies españolas de Crocus. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.</i> .....	228
<i>Figura 165 Variabilidad observada en la persistencia de la túnica de los cormos en el conjunto de especies estudiadas de Crocus. 1-3. Persistente: 1. C. nevadensis (BCU002693), 2 y 3. C. carpetanus (BCU002974); 4. No persistente: C. serotinus (BCU001657).</i> .....	228
<i>Figura 166 Presencia de estolones en las diferentes especies españolas de Crocus. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.</i> .....	229
<i>Figura 167 Variabilidad observada en la presencia de estolones en el conjunto de especies estudiadas de Crocus. 1. Ausentes: C. serotinus (BCU002775); 2 y 3. Presentes: 2 y 3. C. nudiflorus (BCU002944).</i> .....	229
<i>Figura 168 Diferenciación entre especies españolas de Crocus en base a la morfología de la túnica</i> .....	230
<i>Figura 169 Representación de los coeficientes de los caracteres en los vectores propios que definen las dos primeras componentes principales 1, 2 y 3. En violeta se representan los caracteres relacionados con el tamaño de la flor, en verde los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo y en naranja los relacionados con el tamaño de la semilla. Los caracteres representados son: LONG.TEP. = longitud del tépalo externo, ANC.TEP.= anchura del tépalo externo, LONG.FILAM.= longitud del filamento; LONG. ANTER.= longitud de la antera, LONG.ESTILO = longitud del estilo, ALT.FLOR= altura de la flor desde el suelo, LON.MAX.HO= longitud máxima de la hoja, ANC.HO= anchura de la hoja, NU.HO.BR.PR.= número de hojas en el brote principal, SEM.LONG.= longitud media de la semilla, SEM.PESO= peso medio de la semilla.</i> .....	232
<i>Figura 170 Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 1 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: C. nevadensis; Amarillo: C. carpetanus;</i>	

<i>Blanco: C.vernus; Violeta: C. serotinus; Azul: C. clusii; Rojo: C. cambessedesii, Naranja: C. nudiflorus. ....</i>	<i>234</i>
<i>Figura 171 Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: C. nevadensis; Amarillo: C. carpetanus; Blanco: C.vernus; Violeta: C. serotinus; Azul: C. clusii; Rojo: C. cambessedesii; Naranja: C. nudiflorus. ....</i>	<i>236</i>
<i>Figura 172 Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: C. nevadensis; Amarillo: C. carpetanus; Blanco: C.vernus; Violeta: C. serotinus; Azul: C. clusii; Rojo: C. cambessedesii. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 12 en el apartado de Material y Métodos.....</i>	<i>240</i>
<i>Figura 173 Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: C. nevadensis; Amarillo: C. carpetanus; Blanco: C.vernus; Violeta: C. serotinus; Azul: C. clusii; Rojo: C. cambessedesii. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 12 en el apartado de Material y Métodos.....</i>	<i>241</i>
<i>Figura 174 Dendrograma consenso que representa las entradas según el análisis clúster realizado con los caracteres cualitativos, basado en índice de similitud Simple Matching y el método de análisis UPGMA. Se muestra al lado de cada nodo el número de veces que ese nodo se ha representado en 100 árboles calculados con el programa Phylip. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: C. nevadensis; Amarillo: C. carpetanus; Blanco: C.vernus; Violeta: C. serotinus; Azul: C. clusii; Rojo: C. cambessedesii. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 12 en el apartado de Material y Métodos.....</i>	<i>242</i>
<i>Figura 175 Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: C. nevadensis; Amarillo: C. carpetanus; Blanco: C.vernus; Violeta: C. serotinus; Azul: C. clusii; Rojo: C. cambessedesii. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 12 en el apartado de Material y Métodos.....</i>	<i>244</i>
<i>Figura 176 Diferenciación entre especies españolas de Crocus en base a los caracteres cualitativos. ....</i>	<i>245</i>
<i>Figura 177 Dendrograma consenso que representa las entradas según el análisis clúster realizado con el mínimo número de caracteres cualitativos, basado en índice de similitud Simple Matching y el método de análisis UPGMA. Se muestra al lado de cada nodo el número d veces que ese nodo se ha representado en 100 árboles calculados con el programa Phylips. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: C. nevadensis; Amarillo: C. carpetanus; Blanco: C.vernus; Violeta: C. serotinus; Azul: C. clusii; Rojo: C. cambessedesii. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 12 en el apartado de Material y Métodos.....</i>	<i>246</i>
<i>Figura 178 Colección de entradas de Crocus silvestres españoles sobre la que se ha realizado el estudio de fenología en cultivo protegido: 1) Cormos brotando; 2) Salida de la hoja; 3) Flor de C. serotinus BCU002965; 4) Flor de C. nevadensis BCU002359; 5) Fruto de C. serotinus BCU003173; 6) Fruto de C. cambessedesii BCU001685. ....</i>	<i>249</i>
<i>Figura 179 Fenología de las especies españolas de Crocus de floración otoñal en condiciones de cultivo protegido. Brotación, Salida de la hoja, Floración, Salida del fruto y Secado de la hoja y del fruto.(Continua).....</i>	<i>250</i>

<i>Figura 180 .Fenología de las especies españolas de Crocus de floración primaveral en condiciones de cultivo protegido. Siendo; Brotación, Salida de la hoja, Floración, Salida del fruto y Secado de la hoja y del fruto.....</i>	<i>252</i>
<i>Figura 181 Fenología de las especies españolas de Crocus de floración otoñal en condiciones de cámara. Siendo: Brotación, Salida de la hoja, Floración y Secado de la hoja y del fruto.....</i>	<i>254</i>
<i>Figura 182 Fenología de las especies españolas de Crocus de floración primaveral en condiciones controladas. Siendo: Brotación, Salida de la hoja, Floración y Secado de la hoja y del fruto. ...</i>	<i>255</i>
<i>Figura 183 Influencia del peso del los cormos de C. serotinus en la brotación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tamaños para alcanzar un 50% de la brotación (<math>p &lt; 0,05</math>).</i>	<i>257</i>
<i>Figura 184 Influencia del peso del cormo en la capacidad de florecer de cormos de las especies C. nevadensis y C.vernus. Se indica el % de cormos con flor respecto el total de cormos del mismo lote.....</i>	<i>258</i>
<i>Figura 185 Influencia de la temperatura de conservación de los cormos en la inducción floral de C. nevadensis .....</i>	<i>261</i>
<i>Figura 186 Influencia de la temperatura de conservación de los cormos en la inducción floral de C.vernus.....</i>	<i>262</i>
<i>Figura 187 Influencia de la temperatura de conservación de los cormos en la inducción floral de C. serotinus .....</i>	<i>263</i>
<i>Figura 188 Influencia de la temperatura de conservación de los cormos en la inducción floral de C. nudiflorus.....</i>	<i>264</i>
<i>Figura 189 Tratamiento térmico de los ensayos de floración realizados con cormos de C. nevadensis.....</i>	<i>265</i>
<i>Figura 190 Influencia de la temperatura en la floración de C. nevadensis. <math>\square</math>10°C desde mediados de noviembre; <math>\square</math> 5-2°C desde mediados de noviembre hasta finales de enero en que se sube la temperatura a 17°C. <math>\square</math> 5-2°C desde noviembre hasta finales de enero en que se sube la temperatura a 10°C. ES: error estándar.....</i>	<i>266</i>
<i>Figura 191 Floración de C. nevadensis tras dos meses de frío (5 y 2°C) desde finales de noviembre hasta finales de enero y sin tratamiento previo de frío invernal (10°C ctes). .....</i>	<i>267</i>
<i>Figura 192 Tratamientos térmicos de los ensayos de floración realizados con cormos de C.vernus en 2010.....</i>	<i>268</i>
<i>Figura 193 Influencia de la temperatura en la floración de C.vernus. <math>\square</math> 10°C desde mediados de noviembre; <math>\square</math> 5-2°C desde mediados de noviembre hasta primeros de marzo en que se sube la temperatura a 17°C. <math>\square</math> 5-2°C desde noviembre hasta primeros de marzo en que se sube la temperatura a 10°C. ES: error estándar. Datos del año 2010.....</i>	<i>269</i>
<i>Figura 194 Influencia de la temperatura en la floración de C.vernus . <math>\square</math>10°C desde mediados de noviembre; <math>\square</math> 5-2°C desde mediados de noviembre hasta finales de febrero en que se sube la temperatura a 17°C. <math>\square</math> 5-2°C desde noviembre hasta finales de febrero en que se sube la temperatura a 10°C. ES: error estándar. Datos del año 2011.....</i>	<i>269</i>
<i>Figura 195 Influencia del tratamiento térmico en la variabilidad observada en el estado de desarrollo de la flor. A) Tratamiento térmico de 10°C constantes desde principios de noviembre y B) 5-2°C desde finales de noviembre hasta finales de febrero en que se sube la temperatura a 10°C.....</i>	<i>270</i>
<i>Figura 196 Floración de la especie C.vernus tras tres meses de frío invernal (&lt;5°C) desde noviembre hasta finales de febrero y sin tratamiento previo de frío invernal (10°C constantes). .....</i>	<i>271</i>

<i>Figura 197 Tratamientos térmicos de los ensayos de floración realizados con cormos de la entrada silvestre de C. serotinus.</i> .....	272
<i>Figura 198 Influencia de la temperatura en la floración de la entrada silvestre de C. serotinus a 10°C desde principios de noviembre y a 17°C desde principios de noviembre. ES: error estándar.</i> .....	273
<i>Figura 199 Tratamiento térmico de los ensayos de floración realizados con cormos de la entrada de C. serotinus suministrada por un vivero. La bajada de las temperaturas se retrasa 15 días.</i> ....	273
<i>Figura 200 Influencia de la temperatura en la floración de la entrada de C. serotinus suministrada por un vivero. La temperatura de floración se retrasa quince días respecto del momento de floración de la especie silvestre. ES: error estándar.</i> .....	274
<i>Figura 201 Floración de la especie C. serotinus a 10°C y a 17°C constantes sin tratamiento previo de frío (5 y 2°C).</i> .....	275
<i>Figura 202 Tratamiento térmico de los ensayos previos a la floración realizados con cormos de C. nevadensis.</i> .....	276
<i>Figura 203 Influencia del frío en el desarrollo de la yema floral en la especie C. nevadensis. Con flechas se indica el momento de la floración en cada tratamiento. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	277
<i>Figura 204 Tratamiento térmico de los ensayos previos a la floración realizados con cormos de C. vernus.</i> .....	278
<i>Figura 205 Influencia del frío en el desarrollo de la flor antes de florecer en la especie C. vernus. Con flechas se indica el momento de la floración en cada tratamiento. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	278
<i>Figura 206 Comparación del desarrollo entre especies primaverales y otoñales. Se ha considerado una especie primaveral que florece más precozmente (C. nevadensis) y una más tardía (C. vernus). Las fotos con margen rojo indican el momento de inicio de la floración.</i> .....	280
<i>Figura 207 Comparación del desarrollo entre dos especies otoñales: C. serotinus y C. nudiflorus. Las fotos con margen rojo indican el momento de inicio de la floración.</i> .....	281
<i>Figura 208 Tratamientos térmicos aplicados a la especie C. nevadensis para estudiar su desarrollo vegetativo.</i> .....	283
<i>Figura 209 Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de C. nevadensis durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	283
<i>Figura 210 Influencia de la temperatura en el peso seco de las hojas de C. nevadensis durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	283
<i>Figura 211 Influencia de la temperatura en el peso seco del cormo hijo en desarrollo de C. nevadensis durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	284
<i>Figura 212 Influencia de la temperatura en el peso seco de las raíces de C. nevadensis durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	285
<i>Figura 213 Influencia de la temperatura en la longitud y en la vida media de las hojas de C. nevadensis durante su desarrollo vegetativo hasta que la hoja alcanza el valor máximo de su longitud. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los</i>	

<i>tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>286</i>
<i>Figura 214 Tratamientos térmicos aplicados a la especie C. carpetanus para estudiar su desarrollo vegetativo.....</i>	<i>287</i>
<i>Figura 215 Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de C. carpetanus durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). .....</i>	<i>287</i>
<i>Figura 216 Influencia de la temperatura en el peso seco de las hojas de C. carpetanus durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). .....</i>	<i>288</i>
<i>Figura 217 Influencia de la temperatura en el peso seco del cormo hijo en desarrollo de C. carpetanus durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). .....</i>	<i>288</i>
<i>Figura 218 Influencia de la temperatura en el peso seco de las raíces de C. carpetanus durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). .....</i>	<i>289</i>
<i>Figura 219 Tratamientos térmicos aplicados a la especie C. vernus para estudiar su desarrollo vegetativo.....</i>	<i>289</i>
<i>Figura 220 Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de C. vernus durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). .....</i>	<i>290</i>
<i>Figura 221 Influencia de la temperatura en el peso seco de las hojas de C. vernus durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). .....</i>	<i>290</i>
<i>Figura 222 Influencia de la temperatura en el peso seco del cormo hijo en desarrollo de C. vernus. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). .....</i>	<i>291</i>
<i>Figura 223 Influencia de la temperatura en el peso seco de las raíces de C. vernus durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). .....</i>	<i>292</i>
<i>Figura 224 Tratamientos térmicos aplicados a la especie C. vernus para estudiar la longitud de la hoja desde la floración. ....</i>	<i>292</i>
<i>Figura 225 Influencia de la temperatura en la longitud y en la vida media de las hojas de C. vernus durante su desarrollo vegetativo hasta que la hoja alcanza el valor máximo de su longitud. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>). .....</i>	<i>293</i>
<i>Figura 226 Tratamientos térmicos aplicados a la especie C. serotinus suministrada por un vivero para estudiar su desarrollo vegetativo.....</i>	<i>294</i>
<i>Figura 227 Tratamientos térmicos aplicados a la especie C. serotinus recogida inicialmente en su ambiente natural para estudiar su desarrollo vegetativo.....</i>	<i>294</i>
<i>Figura 228 Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de la especie C. serotinus suministrada por un vivero durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento</i>	

<i>de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	295
<i>Figura 229 Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de la especie C. serotinus recogida inicialmente en su ambiente natural durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	295
<i>Figura 230 Influencia de la temperatura en el peso seco de las hojas de C. serotinus suministrada por un vivero durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	296
<i>Figura 231 Influencia de la temperatura en el peso de las hojas de la especie C. serotinus recogida inicialmente en su ambiente natural durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	296
<i>Figura 232 Influencia de la temperatura en el peso seco del cormo hijo de la especie C. serotinus suministrada por un vivero durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	297
<i>Figura 233 Influencia de la temperatura en el peso de las raíces de la especie C. serotinus suministrada por un vivero durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	297
<i>Figura 234 Influencia de la temperatura en el peso de las raíces de la especie C. serotinus recogida inicialmente en su ambiente natural durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	298
<i>Figura 235 Tratamientos térmicos aplicados en la entrada procedente de vivero de la especie C. serotinus para estudiar su desarrollo vegetativo bajo la influencia de un periodo de frío invernal.</i>	298
<i>Figura 236 Influencia de un tratamiento de frío invernal previo al desarrollo a 10°C en la longitud de las hojas de en la entrada procedente de vivero de la especie C. serotinus durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	299
<i>Figura 237 Influencia de un tratamiento de frío invernal previo al desarrollo a 17°C en la longitud de las hojas en la entrada procedente de vivero de la especie C. serotinus durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	299
<i>Figura 238 Influencia de un tratamiento de frío invernal previo al desarrollo a 10°C en el peso seco de las hojas en la entrada procedente de vivero de la especie C. serotinus durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	300
<i>Figura 239 Influencia de un tratamiento de frío invernal previo al desarrollo a 17°C en el peso seco de las hojas en la entrada procedente de vivero de la especie C. serotinus durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos (<math>p &lt; 0,05</math>).</i> .....	300
<i>Figura 240 Influencia de un tratamiento de frío invernal previo al desarrollo a 10°C en el peso seco del cormo hijo en la entrada procedente de vivero de la especie C. serotinus durante su desarrollo</i>	

vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ )..... 301

Figura 241 Influencia de un tratamiento de frio invernal previo al desarrollo a 17°C en el peso seco del cormo hijo en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* durante su desarrollo vegetativo. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). ..... 301

Figura 242 Influencia de un tratamiento de frio invernal previo al desarrollo a 10°C en el peso seco de las raíces en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ )..... 302

Figura 243 Influencia de un tratamiento de frio invernal previo al desarrollo a 17°C en el peso seco de las raíces en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ )..... 302

Figura 244 Tratamientos térmicos aplicados a la especie *C. nudiflorus* para estudiar su desarrollo vegetativo..... 303

Figura 245 Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de *C. nudiflorus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). ..... 303

Figura 246 Influencia de la temperatura en el peso seco de las hojas de *C. nudiflorus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). ..... 304

Figura 247 Influencia de la temperatura en el peso seco del cormo hijo en desarrollo de *C. nudiflorus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). ..... 304

Figura 248 Influencia de la temperatura en el peso seco de las raíces de *C. nudiflorus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ )..... 305

Figura 249 Influencia de la temperatura en la longitud y en la vida media de las hojas de *C. nudiflorus* durante su desarrollo vegetativo hasta que la hoja alcanza el valor máximo de su longitud. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). ..... 305

Figura 250 Efecto de una temperatura constante de 10°C en el desarrollo de la hoja de las especies *C. serotinus*, *C. nudiflorus*, *C. nevadensis* y *C. vernus* hasta que la hoja alcanza el valor máximo de su longitud..... 306

Figura 251 Evolución del peso de los cormos procedentes de semillas a lo largo de dos o tres generaciones para las especies *C. nevadensis*, *C. carpetanus*, *C. nudiflorus* y *C. serotinus*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre especies dentro del mismo año ( $p < 0,05$ ). ..... 307

Figura 252 Recta de correlación entre el peso de los cormitos obtenidos a partir de semillas germinadas en diferentes tratamientos de germinación con los días hasta el 50% de la germinación de las mismas. Recta de correlación exponencial. .... 307

Figura 253 Estolones producidos por cormos de la especie *C. nudiflorus* (BCU002944)..... 308

<i>Figura 254 Influencia de la temperatura de incubación en la formación de estolones en cormos de C. nudiflorus. Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias significativas (<math>p &lt; 0,05</math>).</i>	308
<i>Figura 255 Evolución de la tasa de germinación de semillas de C. serotinus en condiciones óptimas (30, 45 o 60 días de almacenamiento en seco (23°C) y germinación a 10°C). Siembra realizada a finales de junio. ES: error estándar.</i>	310
<i>Figura 256 Evolución de la tasa germinación de semillas de C. nudiflorus en condiciones óptimas (45 y 60 días de almacenamiento en seco (23°C) y germinación a 10°C). Siembra realizada a finales de junio. ES: error estándar.</i>	311
<i>Figura 257 Evolución de la tasa de germinación de semillas de C. nevadensis en condiciones óptimas (60 días de almacenamiento en seco (23°C) seguidos de 45 días de estratificación fría (5°C), y germinación a 10°C). Siembra realizada a finales de junio. ES: error estándar.</i>	313
<i>Figura 258 Evolución de la tasa de germinación de semillas de C. carpetanus en condiciones óptimas (60 días de almacenamiento en seco (23°C) y germinación a 10°C). Siembra realizada a finales de junio. ES: error estándar.</i>	314
<i>Figura 259 Efecto de un mismo tratamiento de rotura de latencia (60 días de almacenamiento en seco y posterior germinación a 10°C) en la germinación de semillas de cinco especies diferentes de Crocus. ES: error estándar.</i>	318
<i>Figura 260 Evolución de la longitud del fruto más el pedúnculo de la especie C. serotinus a 10°C y a 17°C. Se presenta en cada punto el error estándar. Los asteriscos señalan diferencias significativas.</i>	320
<i>Figura 261 Evolución de la longitud del fruto más el pedúnculo de la especie C. nevadensis a 10°C y a 17°C. Se presenta en cada punto el error estándar. Los asteriscos señalan diferencias significativas.</i>	321
<i>Figura 262 Desarrollo del fruto de C. serotinus a 10°C y a 17°C constantes sin tratamiento previo de frío (5 y 2°C).</i>	322
<i>Figura 263 Desarrollo del fruto de C. nevadensis a 10°C y a 17°C tras dos meses de frío (95 y 2°C) desde finales de noviembre hasta finales de enero.</i>	323
<i>Figura 264 . Perfil UV-Vis. Espectro de orden cero para las especies C. carpetanus y C. nevadensis. En la tabla se relaciona el color de la gráfica con la entrada, indicando su lugar de procedencia.</i>	325
<i>Figura 265 . Perfil UV-Vis. Espectro de orden cero de dos entradas de la especie C. vernus. En la tabla se relaciona el color de la gráfica con la entrada, indicando su lugar de procedencia.</i>	325
<i>Figura 266 . Perfil UV-Vis. Espectro de orden cero de siete entradas de la especie C. serotinus. En la tabla se relaciona el color de la gráfica con la entrada, indicando su lugar de procedencia.</i>	326
<i>Figura 267 . Perfil UV-Vis. Espectro de orden cero de dos entradas de la especie C. nudiflorus. En la tabla se relaciona el color de la gráfica con la entrada, indicando su lugar de procedencia.</i>	326
<i>Figura 268 . Extracto en agua y metanol de los estilos secos de C. carpetanus y C. serotinus.</i>	326
<i>Figura 269 . Espectro UV-Vis de segundo orden: (1) de las especies que contienen carotenoides (C. serotinus, C. nudiflorus y C. vernus) y (2) de las especies que no contiene dichos pigmentos (C. nevadensis y C. carpetanus).</i>	327
<i>Figura 270 . Cromatograma de C. nevadensis (BCU003189) a 310nm y 350nm.</i>	330
<i>Figura 271 . Cromatograma a 310 nm de las especies C. carpetanus procedente de Ávila, y la especie C. nevadensis de Jaén y Cuenca. El cromatograma de menor tamaño corresponde al del solvente a 310 nm.</i>	330

<i>Figura 272 . Perfil de HPLC a 310nm de los extractos de los estilos en metanol y agua de las diferentes entradas analizadas de C. serotinus. Las tablas muestran la entrada correspondiente con su origen. ....</i>	<i>331</i>
<i>Figura 273 . Perfil de HPLC a 310nm de los extractos de los estilos en metanol y agua de las diferentes entradas analizadas de C. nudiflorus. La tabla muestra la entrada con su origen. ....</i>	<i>332</i>
<i>Figura 274 . Perfil de HPLC a 310nm de los extractos de los estilos en metanol y agua de las diferentes entradas de C. vernus. Las tablas muestran la entrada correspondiente, con su origen y la procedencia de la muestra. ....</i>	<i>332</i>
<i>Figura 275 . Cromatogramas a 461-462nm de C. vernus (BCU003198), C. nudiflorus (BCU003176) y C. serotinus (BCU002550). Se indica el número de pico en cada cromatograma. Se han despreciado los picos de absorbancia menor de 50 mUA. ....</i>	<i>334</i>
<i>Figura 276 . Cromatogramas a 248-260 nm de C. nevadensis (BCU003189), C. vernus (BCU003198), C. nudiflorus (BCU003176) y C. serotinus (BCU002550). Se indica el número de pico en cada cromatograma. Se han despreciado los picos de absorbancia menor de 50 mUA. ....</i>	<i>336</i>
<i>Figura 277 . Perfil de HPLC-DAD a 460-462 nm del extracto de los estilos de las diferentes entradas de C. serotinus que sean analizado. ....</i>	<i>337</i>
<i>Figura 278 . Perfil de HPLC-DAD a 458-462 nm del extracto de los estilos de las dos entradas de C. nudiflorus analizadas. ....</i>	<i>339</i>
<i>Figura 279 . Perfil de HPLC-DAD a 462 nm del extracto de los estilos de las dos entradas de C. vernus</i>	<i>340</i>
<i>Figura 280 . Perfil de HPLC-DAD a 247 y 248 nm del extracto de los estilos de C. nevadensis .....</i>	<i>342</i>
<i>Figura 281 . Perfil de HPLC-DAD a 260-262 nm del extracto de los estilos de seis entradas de C. serotinus. ....</i>	<i>344</i>
<i>Figura 282 . Perfil de HPLC-DAD a 260 nm del extracto de los estilos de las dos entradas de C. nudiflorus.....</i>	<i>346</i>
<i>Figura 283 . Perfil de HPLC-DAD a 260 nm del extracto de los estilos de dos entradas de C. vernus. ..</i>	<i>348</i>
<i>Figura 284 . Cromatograma de C. sativus a 440 nm y de C. serotinus a 461 nm.....</i>	<i>352</i>
<i>Figura 285 Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de C. vernus (BCU003198) y el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O-glucósido). ....</i>	<i>355</i>
<i>Figura 286 Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de C. nudiflorus (BCU003001) y el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O-rutinósido). ....</i>	<i>355</i>
<i>Figura 287 Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de C. vernus (BCU003198) y la mezcla de este extracto con el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O-glucósido). ....</i>	<i>356</i>
<i>Figura 288 Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de C. nudiflorus (BCU003001) y la mezcla de este extracto con el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O-rutinósido). ....</i>	<i>356</i>
<i>Figura 289 . Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de C. vernus (BCU003198) y la mezcla de este extracto con el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O-glucósido). ....</i>	<i>357</i>

Figura 290 . Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de <i>C. nudiflorus</i> (BCU003001) y la mezcla de este extracto con el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O-rutinósido). .....	357
Figura 291 . Representación de los coeficientes de los caracteres en los vectores propios que definen las dos primeras componentes principales 1 y 2. ....	361
Figura 292 . Representación de los coeficientes de los caracteres en los vectores propios que definen las dos primeras componentes principales 1 y 3. ....	362
Figura 293 Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: <i>C. nevadensis</i> ; Amarillo: <i>C. carpetanus</i> ; Gris: <i>C. vernus</i> ; Violeta: <i>C. serotinus</i> ; Naranja: <i>C. nudiflorus</i> . ....	363
Figura 294 . Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: <i>C. nevadensis</i> ; Amarillo: <i>C. carpetanus</i> ; Blanco: <i>C. vernus</i> ; Violeta: <i>C. serotinus</i> ; Naranja: <i>C. nudiflorus</i> . ....	364
Figura 295 . Dendograma consenso que representa las entradas según el análisis clúster realizado con los caracteres cualitativos, basado en índice de similitud Simple Matching y el método de análisis UPGMA. Se muestra al lado de cada nodo el número de veces que ese nodo se ha representado en 100 árboles calculados con el programa Phylip. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 16. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: <i>C. nevadensis</i> ; Amarillo: <i>C. carpetanus</i> ; Blanco: <i>C. vernus</i> ; Violeta: <i>C. serotinus</i> ; Naranja: <i>C. nudiflorus</i> . ....	366
Figura 296 . Patrones RAPD obtenidos a partir de la amplificación del ADN de <i>C. nevadensis</i> , utilizando el oligonucleótido OPL-11. Siendo: C+: <i>C. sativus</i> ; C-: control negativo. ....	368
Figura 297 Patrones RAPD obtenidos a partir de la amplificación del ADN de <i>C. nevadensis</i> , utilizando el oligonucleótido OPL-16. Siendo: C+: <i>C. sativus</i> ; C-: control negativo. ....	369
Figura 298 Dendrograma de las relaciones entre individuos de diferentes especies españolas de <i>Crocus</i> basado en la distancia genética de Dice usando marcadores RAPD derivados del oligonucleótido OPL-16 y OPL-11. El método de agrupamiento utilizado es el Neighbor-joining. Se indica el valor de la robustez de cada nudo. Los colores y la letra indican la especie en la que se agrupan: Verde- N: <i>C. nevadensis</i> ; Amarillo-C: <i>C. carpetanus</i> ; Gris-V: <i>C. vernus</i> ; Violeta-S: <i>C. serotinus</i> ; Azul-CL: <i>C. clusii</i> ; Rojo-CAM: <i>C. cambessedesii</i> ; Naranja-NU: <i>C. nudiflorus</i> . ....	370
Figura 299 Patrones de marcadores EPIC obtenidos a partir de la amplificación de la región 5' del intrón I hasta el final 3' del intrón II del gen BCH utilizando el cebador descrito Castillo et al., (2005) de las distintas especies españolas de <i>Crocus</i> : N: <i>C. nevadensis</i> , C: <i>C. carpetanus</i> , V: <i>C. vernus</i> , S: <i>C. serotinus</i> , Nu: <i>C. nudiflorus</i> , CL: <i>C. clusii</i> , C+: <i>C. sativus</i> y C-: control negativo. ....	372
Figura 300 Patrones SSR obtenidos utilizando el oligonucleótido 62 M (izquierda) y Cs11 (derecha) a partir de la amplificación del ADN de distintas especies españolas de <i>Crocus</i> : N: <i>C. nevadensis</i> , C: <i>C. carpetanus</i> , V: <i>C. vernus</i> , S: <i>C. serotinus</i> , Nu: <i>C. nudiflorus</i> , CL: <i>C. clusii</i> , C+: <i>C. sativus</i> y C-: control negativo. ....	373



# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *CROCUS* Y CLASIFICACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS

El género *Crocus* L. pertenece al orden *Asparagales* y a la amplia familia *Iridaceae*. Esta familia contiene 80 géneros y más de 1500 especies y, en particular, el género *Crocus* comprende aproximadamente 100 especies distribuidas por el suroeste de Europa, también desde Europa central hasta Turquía, en zonas del suroeste de Asia y hasta el oeste de China, tal y como se puede observar en la figura 1 (Mathew, 1982; Fernández, 2004; Petersen *et al.*, 2008). El centro de biodiversidad del género *Crocus* se encuentra en Asia Menor y en la península de los Balcanes (Mathew, 1982; Fernández, *et al.*, 2011; Harpke *et al.*, 2013). El azafrán y sus especies antecesoras han sido cultivados desde la antigüedad en diversos países mediterráneos (Gola *et al.*, 1965; Chichiricco, 1984).



Figura 1 Distribución del género *Crocus* (Rukšāns, 2010).

La taxonomía de este género es muy compleja debido a la ausencia de rasgos distintivos claros, al amplio rango de hábitats que ocupa y también a la falta de acuerdos en la información disponible sobre los caracteres morfológicos y citológicos (Nørbæk *et al.*, 2002; Beiki *et al.*, 2010; Moraga *et al.*, 2010; Uslu *et al.*, 2012).

La primera clasificación fue presentada por Haworth (1809). Esta clasificación dividió el género en las secciones *Pilgrim* y *Depilati*, dependiendo de la presencia o ausencia de pelos en la garganta floral. Sin embargo, esta clasificación dejó de ser válida cuando se vio que se trataba de una característica variable dentro de la misma especie (Mathew, 1982; Harpke *et al.*, 2013). También Sabine (1829) presentó una clasificación del género en base a las características de la túnica del cormo y la ausencia o presencia de prófalo o espata basal. Años más tarde fue mejorada por Herbert (1847) y Maw (1886), quienes descubrieron más especies de cada grupo. Segregaron el género en las divisiones *Involucrati* y *Nudiflori* teniendo en cuenta la época de floración. La clasificación más utilizada en la actualidad es la realizada por Mathew (1982), que está principalmente basada en la clasificación de Maw. Considera la morfología de los cormos, túnicas, brácteas, bractéolas, hojas, flores y semillas, el período de floración y características citológicas y ecológicas (Tabla 1).

# I. INTRODUCCIÓN

---

**Tabla. 1. Clasificación del género *Crocus* de Mathew (1982) actualizada por diferentes autores. Se indica en negrita el autor cuando son especies nuevas, y con asterisco, cuando su clasificación se ha modificado, siendo (\*) Petersen et al. (2008), (\*\*) de Mathew et al. (2009), (3\*) de Peruzzi y Carta (2011); (4\*) de Peruzzi y Altinordu (2014) y (5\*) de Harpke et al. (2015).**

---

## Subgénero *Crocus*

### A. Sección *Crocus*

#### Serie *Verni*:

*C. etruscus* Parl; *C. ilvensis* L. **Peruzzi y A. Carta (Peruzzi y Carta, 2011)** ; *C. kosaninii* Pulevic; *C. longiflorus* Raf. (anteriormente en serie *Longiflori*)\*\*; *C. tommasinianus* Herb.; *C. vernus* (L.) Hill; *C. neapolitanus* (Ker. Gawl.) Loisel <sup>4\*</sup> *C. siculus* Tineo y Guss. <sup>3\*</sup>; *C. heuffelianus* Herb. (anteriormente en el subgénero obsoleto *Crociris*) <sup>5\*</sup>; *C. neglectus* Peruzzi y Carta <sup>5\*</sup>

#### Serie *Baytopi* (nueva serie):

*C. baytopiorum* Mathew (anteriormente en la serie *Verni*)\*\*

#### Serie *Scardici*:

*C. pelistericus* Pulevic; *C. scardicus* Kos.

#### Serie *Versicolores*:

*C. cambessedesii* J. Gay; *C. versicolor* Ker Gawl.; *C. corsicus* Vanucchi ex Maw; *C. imperati* Ten.; *C. minimus* DC.

#### Serie *Longiflori*:

*C. goulimy* Turrill ; *C. ligusticus* M.G. Mariotti; *C. niveus* Bowles; *C. nudiflorus* Smith.; *C. serotinus* Salisb.

#### Serie *Kotschyani*: a

*C. autranii* Albov.; *C. gilanicus* B. Mathew ; *C. karduchorum* Kotschy ex Maw; *C. kotschyanus* K. Koch.; *C. ochroleucus* Boiss. y Gaill.; *C. scharojanii* Ruprecht.; *C. vallicola* Herb.

#### Serie *Crocus*:

*C. asumaniae* B. Mathew y T. Baytop; *C. cartwrightianus* Herb.; *C. sativus* L.; *C. hadriaticus* Herb.; *C. moabiticus* Bornm. y Dinsmore ex Bornm.; *C. mathewii* H. Kerndorff y E. Pasche (**Kerndorff y Pasche, 1994**); *C. naqabensis* Al-Eisawi (**Al-Eisawi, 2001**); *C. oreoreticus* B.L. Burt; *C. pallasii* Goldb.; *C. thomasi* Ten.

#### Posición dudosa:

*C. malyi* Vis. (anteriormente en la serie *Versicolores*)\*

### B. Sección *Nudiscapus*:

#### Serie *Reticulati*:

*C. abantensis* T. Baytop y B. Mathew; *C. ancyransis* (Herb.) Maw.; *C. angustifolius* Weston; *C. cancellatus* Herb.; *C. cvijicii* Kos.; *C. dalmaticus* Vis.; *C. gargaricus* Herb.; *C. herbertii* B. Mathew ; *C. hermoneus* Kotschy ex Maw; *C. jablanicensis* N. Randj. y V. Randj.; *C. reticulatus* Steven ex Adams; *C. robertianus* C.D. Brickell; *C. rujanensis* Randjel. y D.A. Hill (**Randjel y Hill, 1990**); *C. sieberi* J. Gay; *C. sieheanus* Barr ex B.L. Burt; *C. veluchensis* Herb.

#### Serie *Biflori*:

*C. aeri* Herb.; *C. almehensis* C.D. Brickell y B. Mathew; *C. biflorus* Mill.; *C. chrysanthus* Herb.; *C. cyprius* Boiss. y Kotschy; *C. danfordiae* Maw; *C. hartmannianus* Holmboe; *C. kerndorffiorum* Pasche (Güner et al., 2000); *C. leichtlinii* (Dewar) Bowles; *C. nerimaniae* Yüzbasıoğlu y Varol (**Yüzbasıoğlu y Varol, 2004**); *C. pestalozzae* Boiss.; *C. wattiorum* (Mathew) Mathew (**Mathew, 1995 y 2000**); *C. demirzianus* O. Erol y L. Can (**Erol y Can, 2012**); *C. yakarianus* H. Yıldırım y O. Erol (**Yıldırım y Erol, 2013**)

#### Serie *Speciosi*:

*C. pulchellus* Herb.; *C. speciosus* M. Bieb.

#### Serie *Orientales*:

*C. alatavicus* Semenova y Reg.; *C. caspius* Fischer y Meyer (anteriormente en la serie *Biflori*)\*; *C. korolkowii* Regel ex Maw; *C. michelsonii* B. Fedtsch.

#### Serie *Flavi*:

*C. adanensis* T. Baytop y B. Mathew (anteriormente en la serie *Biflori*)\*; *C. antalyensis* Mathew; *C. candidus* E.D. Clarke; *C. flavus* Weston; *C. graveolens* Boiss. y Reut.; *C. hyemalis* Boiss.; *C. olivieri* Gray; *C. paschei* H. Kerndorff (**Kerndorff, 1993**); *C. vitellinus* Wahl.

#### Serie *Aleppici*:

*C. aleppicus* Baker; *C. boulosii* Greuter; *C. veneris* Tappein ex Poech

#### Serie *Carpetani*:

*C. carpetanus* Boiss. y Reut.; *C. nevadensis* Amo y Campo

#### Serie *Intertexti*:

*C. fleischeri* J. Gay.

#### Serie *Laevigatae*:

*C. boryi* J. Gay; *C. laevigatus* Bory y Chaub.; *C. tournefortii* J. Gay.

Subgénero *Crociris*: *C. banaticus*

---

Basándose en estos caracteres morfológicos, Mathew dividió el género en dos subgéneros *Crociris* y *Crocus*. El subgénero *Crociris* comprende sólo la especie *C. banaticus*, mientras que el subgénero *Crocus* abarca el resto de las especies del género. Dentro del subgénero *Crocus* diferenció dos secciones, *Crocus* y *Nudiscapus*, que incluyen 6 y 9 series respectivamente. Además, introdujo como novedad el concepto de subespecie. Su clasificación abarca 80 especies pero, desde entonces, se han descrito muchas más especies. Estudios morfológicos, moleculares y cariológicos (Kerndorff *et al.* 2011, 2012; Uslu *et al.*, 2012; Harpke *et al.* 2013; Schneider *et al.* 2013) indican que el número de especies podría estar alrededor de 160. Trabajos en marcha reconocen nuevos taxones (Kerndorff, 1993; Pasche, 1993; Kerndorff y Pasche 1994, 1997, 2003, 2004a, b, 2006, 2011; Pasche y Kerndorff 1999; Yüzbaşıoğlu y Varol 2004; Kerndorff *et al.* 2011, 2012, 2013a, b, c; Randelović *et al.* 2012).

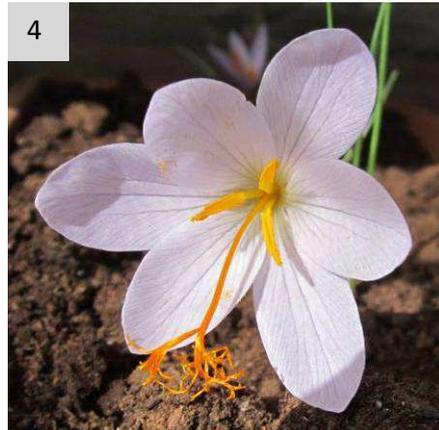
La revisión de esta clasificación propuesta por Mathew (1982) comprende distintos trabajos. Petersen *et al.* (2008) realizaron un análisis filogenético sobre el género *Crocus* basado en el análisis de ADN plastidial. Sus resultados entraron en conflicto con la clasificación primaria de Mathew (1982), sobretudo en referencia a los subgéneros y secciones, pero hay mayor acuerdo en las series. Asimismo, encontraron proximidad filogenética entre *C. caspius* y las especies de *Crocus* de Asia Central, aunque la morfología de sus cormos es muy diferente y en la clasificación de Mathew estaban separadas. Otro estudio que utilizó secuencias del ADN plastidial y nuclear reconoce la relación monofilética de tres series de la sección *Crocus* (*Crocus*, *Kotschyani* y *Scardici*) y cinco de la sección *Nudiscapus* (*Aleppici*, *Carpetani*, *Laevigati*, *Orientalis* y *Speciosi*) (Harpke *et al.*, 2013). La relación monofilética de siete de estas series es también apoyada por el estudio realizado por Petersen *et al.* (2008).

Centrados en la serie *Verni* Mathew, un estudio cariológico realizado por Peruzzi y Altinordu (2014) apoya la inclusión de las especies *C. neapolitanus* (antes *C. vernus* subsp. *neapolitanus*), *C. siculus* (de nueva designación por Peruzzi y Carta (2011)) y *C. vernus* dentro de la misma serie. Otro estudio de la misma naturaleza, mediante el cálculo de parámetros cuantitativos disponibles en la literatura, ADN plastidial y nuclear, sugiere que la serie *Verni* debería comprender las cinco especies *C. heuffelianus* (antes *C. banaticus*, que formaba parte del subgénero *Crociris*), *C. neapolitanus*, *C. neglectus* (de nueva designación), *C. siculus* y *C. vernus* (Harpke *et al.* 2015). Este mismo equipo y Mathew *et al.* (2009) proponen incluir en la serie *Verni* la especie de floración otoñal *C. longiflorus* (pertenece a la serie *Longiflori*) y excluir *C. baytopiorum*.

En España se pueden encontrar 8 especies del género *Crocus*: la especie cultivada azafrán (*C. sativus*), cuatro especies de floración otoñal (*C. cambessedesii*, *C. serotinus*, *C. clusii* y *C. nudiflorus*) y tres de floración primaveral (*C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus*) (Luceño, 1999; Guillén, 2014) (Figura 2 y 3).

## I. INTRODUCCIÓN

---



**Figura 2 . Especies españolas del género *Crocus*. (1) *C. sativus*. Se distingue el estilo ramificado en tres ramas de color rojizo sobre los tépalos y las hojas estrechas y lineares; (2). *C. nudiflorus*; (3). *C. serotinus*; (4).*C. clusii*; (5). *C. nevadensis* y (6). *C. carpetanus*.**



**Figura 3 . Especies españolas del género *Crocus*. (1). *C. cambessedesii*; (2). *C. vernus*; (3). *C. nudiflorus* y (4). *C. nevadensis*.**

La especie *C. clusii* es de reciente consideración dentro del género *Crocus* (Guillén, 2014). Al inicio de este trabajo, la bibliografía citaba seis especies silvestres: *C. cambessedesii*, *C. serotinus*, *C. nudiflorus*, *C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus*. La especie *C. serotinus* incluía tres subespecies: *C. serotinus* subsp. *szalmanii* (endemismo Ibérico- Magrebí que estaba ampliamente distribuida por toda la Península Ibérica), *C. serotinus* subsp. *clusii* y *C. serotinus* subsp. *serotinus* (endémicas de la Península Ibérica, que se localizan principalmente en el sur de la península, en las provincias costeras de Andalucía) (Talavera *et al.*, 1995; Aafi *et al.*, 2005; Navarro y Jiménez, 2009). Otro cambio reciente en la nomenclatura se ha realizado dentro de la especie *C. vernus*. Se reconoce la especie *C. vernus* subsp. *vernus* (anterior subsp. *albiflorus*) que se localiza en los Pirineos, y la subespecie *neapolitanus* (anterior subsp. *vernus*) que se ubica en los Montes de León (Guillén, 2014).

De acuerdo con el ITIS (The Integrated Taxonomic Information System) Catalogue of life 2010 y la clasificación de la familia *Iridaceae* publicada por Flora ibérica en 2014, la clasificación taxonómica de las especies españolas sería la siguiente:

## I. INTRODUCCIÓN

---

División: *Spermatophyta*  
Subdivisión: *Magnoliophytina* (Angiospermas)  
Clase: *Liliatae* (Monocotiledóneas)  
Subclase: *Liliidae*  
Orden: *Liliales*  
Familia: *Iridaceae*  
Subfamilia: *Crocoideae*  
Tribu: *Croceae*  
Género: *Crocus*  
Subgénero: *Crocus*  
Sección *Crocus*

Serie *Verni*:

Especie: ***Crocus vernus*** (L.) Hill. - Azafrán doblado  
subsp. ***vernus*** (Kit. ex Schult.)  
subsp. ***neapolitanus*** (Ker Gawl.)

Serie *Versicolores*:

Especie: ***Crocus cambessedesii*** J. Gay - Safrà bord o baleàric

Serie *Longiflori*:

Especie: ***Crocus nudiflorus*** Sm. - Azafrán  
Especie: ***Crocus serotinus*** Salisb. - Azafrán montesino  
Especie: ***Crocus clusii*** J. Gay. - Azafrán silvestre

Serie *Crocus*:

Especie: ***Crocus sativus*** L. - Azafrán

Sección *Nudiscapus*:

Serie *Carpetani*:

Especie: ***Crocus nevadensis*** Amo y Campo - Azafrán blanco  
Especie: ***Crocus carpetanus*** Boiss. y Reut. - Azafrán serrano

El género *Crocus* exhibe una gran diversidad de número cromosómico. Las especies del género *Crocus* son diploides (2n), a excepción de *C. sativus*, pudiendo ser el cariotipo  $2n = 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 44, 48$  o  $64$  (Mathew 1982; Beiki *et al.*, 2010). *C. sativus* es una excepción porque es una especie triploide ( $2n = 24; x = 8$ ). La evolución de los cariotipos parece caracterizarse por una amplia disploidía combinada con poliploidización (Rudall *et al.*, 1984; Goldblatt y Takei, 1997). La Tabla. 2 muestra el número de cromosomas de las especies silvestres de *Crocus* españolas que ha sido publicado por distintos autores hasta la actualidad.

Tabla. 2. . Especies silvestres españolas del género *Crocus* y su información citológica (Mathew, 1982; Pérez y Pastor, 2004; Castro y Roselló, 2006; Guillén, 2014).

<i>Crocus</i> sp	Subespecie	Número de cromosomas
<i>C. nevadensis</i>	-	2n = 26, 28, 30
<i>C. carpetanus</i>	-	2n = 64
<i>C. vernus</i>	subsp. <i>vernus</i>	2n = 8, 16
	subsp. <i>neapolitanus</i>	2n = 8
<i>C. serotinus</i>	-	2n = 22, 23, 24, 44
<i>C. clusii</i>	-	2n = 22
<i>C. nudiflorus</i>	-	2n = 48
<i>C. cambessedesii</i>	-	2n = 16

## 2 ORIGEN DEL AZAFRÁN (*C. SATIVUS* L.), LA ESPECIE CULTIVADA DE MAYOR IMPORTANCIA ECONÓMICA

La especie más conocida es *C. sativus*, cuyos largos estilos de color rojo son la especia más cara del mundo. Es altamente apreciada debido a los componentes colorantes, amargos y aromáticos que presentan sus estilos secos. Es una especie triploide y estéril, cultivada desde muy antiguo por el hombre (Fernández *et al.*, 2011; Keify y Beiki, 2012).

El origen botánico del azafrán no es claro, a pesar de que se han realizado varios estudios citológicos, morfológicos y citológicos. Las especies parentales ancestrales y los mecanismos de especiación no se han establecido todavía. Algunos autores han planteado que el azafrán se originó a partir de *C. cartwrightianus* ( $x= 8$ ;  $2n = 3x= 24$ ) por autotriploidia (Chichiricco, 1984; Grilli-Caiola *et al.*, 2004). En la Figura 4 podemos ver un dendrograma que refleja las relaciones de similitud entre estas especies. Otros autores han sugerido que surgió como aloploide a partir de la hibridación de *C. cartwrightianus* y *C. hadriaticus* o *C. thomasi*, ambos con  $2n=16$ , uno de los cuales tenía un gameto no reducido (Agayev, 2002; Jacobsen y Orgaard, 2004; Fernández, 2004; Castillo *et al.*, 2005; Frizzi *et al.*, 2007). Estudios posteriores han revelado diferencias leves entre *C. sativus* y *C. cartwrightianus*, *C. thomasi* y *C. hadriaticus*. De estas tres especies, *C. cartwrightianus* se considera el parental más probable del triploide *C. sativus*, que pudo aparecer debido a cruzamientos con otras especies fértiles (Frello *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2008; Grilli-Caiola y Canini, 2010). Semillas de *C. sativus* obtenidas tras fecundar sus flores con polen de *C. cartwrightianus*, presentaron una estructura superficial muy similar a la que presentan las semillas de la especie *C. cartwrightianus*, mientras que eran diferentes de las de *C. thomasi* y *C. hadriaticus* (Grilli-Caiola *et al.*, 2010).

## I. INTRODUCCIÓN

---

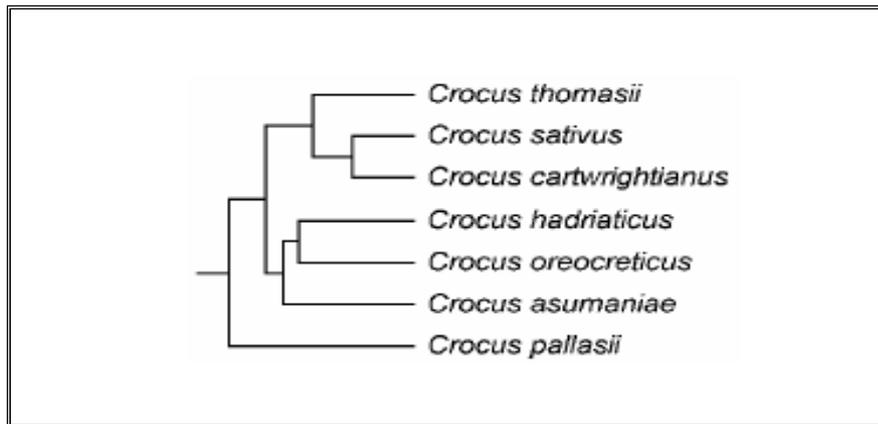


Figura 4 Dendrograma UPGMA, que refleja las relaciones de similitud existente entre varias especies de *Crocus*, incluido *C. sativus* (Grilli-Caiola et al., 2004).

A pesar de los numerosos estudios citológicos, morfológicos y cariológicos realizados para intentar esclarecer las especies ancestrales y el mecanismo de especiación de esta especie, todavía existe una gran controversia, por esta razón toman gran relevancia la información histórica y arqueológica sobre su origen (Beiki et al., 2010). En un estudio reciente sobre variabilidad y filogenia realizado mediante marcadores basados en retrotransposones, con diferentes poblaciones de *C. sativus*, se mostró la existencia de muy poca variabilidad genética entre dichas poblaciones, en contraste con el resto de especies de la serie *Crocus* ensayadas (Alsayied et al., 2015). Este hecho podría indicar que la aparición del híbrido triploide pudo suceder probablemente una sola vez. Asimismo dicho estudio confirma que la especie cultivada es una especie alotriploide y que los ancestros más probables son *C. cartwrightianus* y *C. pallasii* subsp. *pallasii* (Alsayied et al., 2015).

Estudios arqueológicos e históricos indican que la domesticación del azafrán data de 2000 a 1500 años a. C. La especie ha sido utilizada desde tiempos pre-helénicos y durante el periodo helénico. En un fresco que data de 1.700- 1.600 a. C se puede identificar las flores del azafrán en una pintura en el palacio de Minos en Knossos, en Creta. Otro fresco que data de 1.500 a. C., presenta a una joven cosechando azafrán, ceremoniosamente, en un fragmento de la pintura *Saffron Gatherers*, fresco del asentamiento de la Edad de Bronce de Akrotiri, en Santorini (Grecia) (Ferrence, 2004) (Figura 5). Sin embargo, a pesar de todas las evidencias del uso de las plantas del género *Crocus*, similar al azafrán, no existe una garantía de que lo que inspiró estos frescos fuera el azafrán que conocemos actualmente. Es posible que aquellas especies que se cultivaban fueran otras destinadas a usos similares, como podría ser *C. cartwrightianus* (Grilli-Caiola y Canini, 2010). Asimismo, se desconoce todavía si el azafrán ha sufrido alguna modificación durante estos milenios y, hasta hace poco, se desconocía si tiene uno o más ancestros (Grilli-Caiola y Canini, 2010).

El lugar más probable dónde se ubica el origen del azafrán es la región Mediterránea. Otros posibles lugares de origen se sitúa en la región formada por Turquía, Irán e India

(Grilli-Caiola y Canini, 2010). De acuerdo a otros autores (Alberini, 1990; Winterhalter y Straubinger, 2000), el azafrán se originó primero en Irán y Kashmir, desde dónde los fenicios introdujeron el cultivo en Grecia y Roma. Estas civilizaciones utilizaban la especia para teñir ropa, como condimento o como remedio medicinal (Basker y Negbi, 1983; Tammaro, 1987). La dispersión del cultivo por Europa se produjo después de que los árabes lo trajeran a España aproximadamente en el año 960 A.C.

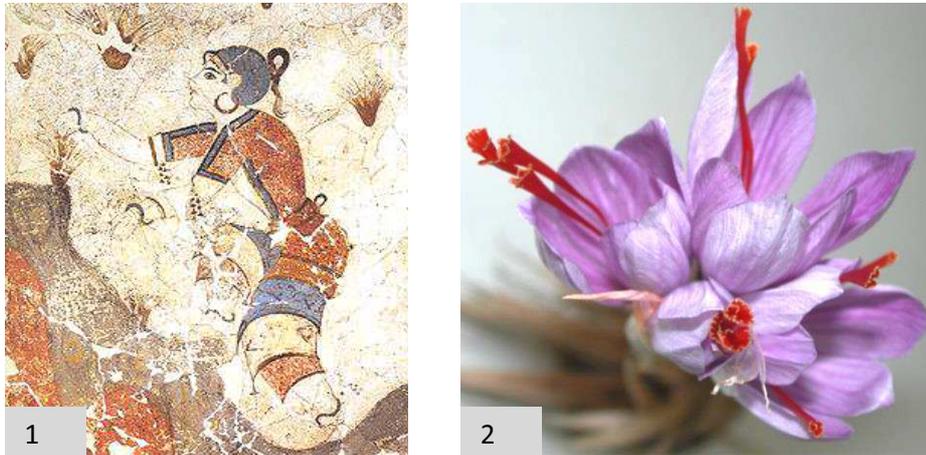


Figura 5 (1) Fresco del Palacio de Akrotiri en Thera, que representa la cosecha de las flores del azafrán (Grilli-Caiola y Canini, 2010). (2) Flores de la especie *Crocus sativus*.

La figura del azafrán en la mitología griega se corresponde con el héroe *Krokos*, muerto por Hermes accidentalmente en el juego del disco, y con el que el dios mantenía una relación amorosa. La leyenda dice que cuando la sangre de *Krokos* se vertía en el suelo, esta se transformaba en unas flores vistosas de estilos de color rojo (Bermejo-Barrera *et al.* 1996). En los Cantos de Salomón se mencionaba ya el nombre de *karkom*, cómo uno de los productos más alabados del reino vegetal. Con esta palabra, procedente tal vez de la India, está relacionado el nombre griego *Krokos* y el latino *Crocum* (*Crocus* de los poetas). El nombre arábico *záfaran* es muy similar a su denominación en distintas lenguas, habiendo sobrevivido sin casi alteración: español (azafrán), inglés (*saffron*), francés (*safran*), italiano (*zafferano*)...etc. (Basker y Negbi, 1983).

### 3 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y USOS DEL AZAFRÁN Y DE OTRAS ESPECIES DEL GÉNERO *CROCUS*

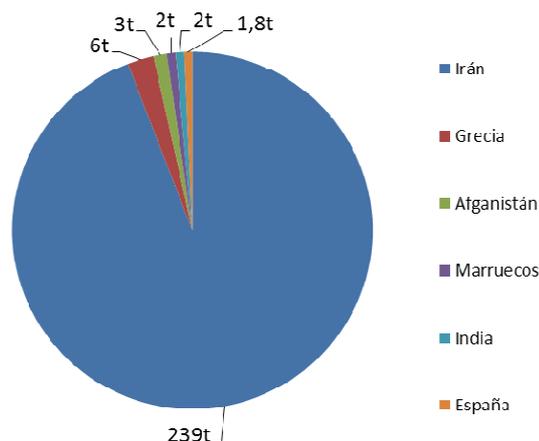
Actualmente, la especie de mayor importancia comercial es aquella a partir de la cual se obtiene el azafrán, *C. sativus*.

El azafrán como especia procede del tostado de los estilos rojos de las flores de *C. sativus* (Figura 6). Esta especia alimentaria aporta un color, sabor y aroma únicos que han conseguido convertirla en la especia más cara del mundo (Moraga *et al.*, 2009; Baghalian, *et al.*, 2010).



**Figura 6 Hebras de Azafrán**

La producción total anual de azafrán alcanza las 254 t (FAO <http://www.fao.org/home/es>, 2014; Banco Mundial, 2014). Según se puede observar en la Figura 7, la especia azafrán se produce en mayor medida en Irán (96% de la producción mundial, 239t anuales, principalmente en Khorasan), Grecia (6t, en Macedonia), India (2t, en Kashmir), Marruecos (2t) y España (1,8 t) (Estadísticas de la FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, 2015; Banco Mundial, <http://www.bancomundial.org>, 2014). También se registran algunas pequeñas producciones muy especializadas y reducidas en superficie, en países como Italia (100 kg en Cerdeña, L'Aquila y Cascia), Turquía (10 kg Saffran bulli), Suiza (1 kg en Mund), Francia (4 o 5 kg en Gatinais y Quercy), Israel, Pakistán, Azerbaiyán, China, India, Afganistán, Egipto, Emiratos Árabes Unidos, Japón, México y, recientemente, en Nueva Zelanda, Estados Unidos, Japón y Australia, en la región de Tasmania (McGimpsey *et al.*, 1997; Fernández, 2004). Algunas de estas producciones pequeñas se las denomina “cosechas boutique” (Katzer, 2001).



**Figura 7 La producción de Azafrán por países (expresada en toneladas) (FAO, 2014; Banco Mundial, 2015)**

España fue el país líder en la producción de este condimento, principalmente en las áreas de La Mancha y Teruel. Sin embargo, La Mancha sólo produce en la actualidad, aproximadamente, 1.290 kg anuales protegidos bajo la denominación de origen de vc

(Tabla 3 ) (Comisión de Regulación 464/2001, Registro otorgado por la Comisión de Regulación de Designaciones de Origen de la Comunidad Económica Europea; Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente (MAGRAMA), 2012).

El precio medio de la especia de azafrán fue de, aproximadamente, 5.000€ por kilogramo en el año 2012 (MAGRAMA, 2012). Este valor tan elevado de la especie se debe a que la recogida de las flores y la separación de las hebras del resto de la flor requieren de una gran cantidad de mano de obra. Para cosechar un kilogramo de especia es necesario coleccionar 130.000 - 150.000 flores y separar sus estilos del resto de la flor, realizándose todo el proceso manualmente (Fernández, 2004).

La escasa mejora en las técnicas de producción, junto con el incremento del nivel de vida de los países productores mediterráneos, ha sido la causa de que la extensión cultivada se haya reducido de forma notoria en la última década del siglo XX en España y otros países tradicionalmente azafraneros mientras que se ha extinguido en otros, como Alemania e Inglaterra (Fernández, 2004).

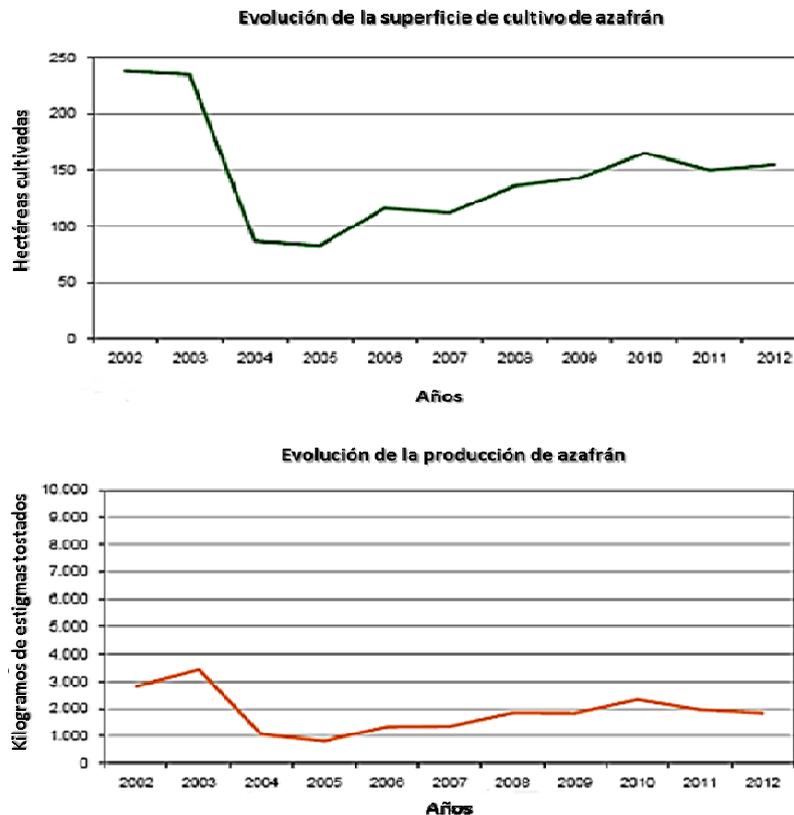
En 1930, se cultivaban en España 11.282 ha. A mitad de los años 90 se registraron solamente 1.162 ha y en 2005 sólo se contó con 83 ha. A partir de este momento se ha registrado un ligero ascenso de la producción, situándose en 2012 en 155 ha en producción y 1827 kg de azafrán producidos (Tabla. 3) (MAGRAMA, 2012; Fernández, 2004). En los últimos años el valor de la producción se ha visto incrementado considerablemente, concretamente un aumento del 350% respecto del año 2007 (Figura 8). Esta subida es debida, en parte, al aumento de la superficie, pero sobre todo al aumento del precio del azafrán, que en el periodo mencionado se ha duplicado (Instituto Técnico Agronómico de Albacete, 2013).

*Tabla. 3. Análisis provincial de superficies, rendimiento y producción (estigmas tostados) del cultivo de azafrán en España (MAGRAMA, 2012). \* Se conoce que el azafrán procedente de Canarias que aparece en las tablas oficiales es cártamo.*

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)			Rendimiento (Kg/ha)		Producción (Kg)
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío	
ARAGÓN (Teruel)	3		3	7		32
CASTILLA Y LEÓN (Valladolid)	1		1	3		3
CASTILLA-LA-MANCHA	59	45	104	11	15	1.290
Albacete	17	86	103	9	15	1443
Ciudad Real	5	-	5	6	-	30
Cuenca	20	-	20	5	-	100
Toledo	-	18	18	-	11	198
REGIÓN DE MURCIA	1	-	1	8	-	8
CANARIAS (S.C. de Tenerife)	-	4	4	-	6	24*
<b>ESPAÑA</b>	<b>47</b>	<b>108</b>	<b>155</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>1.827</b>

## I. INTRODUCCIÓN

Para asegurar el futuro de la producción de esta especia, los sistemas de cultivo y producción se deben modernizar, al mismo tiempo que es necesario adoptar medidas de propagación de cormos que aseguren un material de producción de alta calidad a todos los productores. También es preciso mejorar los métodos de evaluación de calidad de la especia, así como extender el uso del azafrán a más ámbitos (Fernández, 2004).



**Figura 8** Evolución de la superficie del cultivo en hectáreas (ha) y de la producción (kg) de azafrán (estigmas tostados) de España (Fuente: MAGRAMA, 2012).

La composición química de la especia azafrán es muy diversa: carbohidratos, minerales, mucílago, vitaminas (especialmente riboflavina y tiamina), pigmentos (crocetina, antocianos, carotenos, licopenos, zeaxantina, flavonoides,...), aminoácidos, proteínas y almidón entre otros (Abdullaev, 1993, 2002, 2004; Ríos *et al.*, 1998; Wintherhalter y Straubinger, 2002).

El azafrán presenta constituyentes químicos específicos que han sido aislados e identificados (Figura 9). Las sustancias responsables del color que tiene y que proporciona el azafrán especia a soluciones acuosas pertenecen al grupo de los pigmentos carotenoides. En los extractos acuosos de azafrán se encuentra una mezcla de diferentes ésteres glicosilados del ácido 8,8'-diapo- $\Psi,\Psi'$ -carotenedioico, denominado crocetina. Los azúcares que esterifican los extremos de la crocetina son glucosa, gentiobiosa y neapolitanosa. A diferencia de la mayoría de los carotenoides, estos ésteres tienen la particularidad de ser hidrosolubles y se les conoce también con el nombre de crocinas. Este nombre proviene del di-( $\beta$ -D-gentiobiosil) éster de crocetina, compuesto mayoritario

en el azafrán al que se llamó crocina cuando fue estudiado por primera vez por Aschoff en 1818 (Carmona *et al.*, 2006a).

Los responsables del sabor amargo y del aroma son productos que derivan de la oxidación de carotenoides, y son la picrocrocina y safranal respectivamente (Figura 9) (Leung, 1980; Winterhalter y Straubinger, 2000; Fernández, 2004; Hadizadeh *et al.*, 2007). Debido a la poca solubilidad en agua del safranal, en los extractos acuosos son los ésteres de crocetina y la picrocrocina los compuestos más destacables. Además, en los extractos acuosos se encuentran flavonoides del grupo de los kaempferoles que son interesantes por su posible contribución a las propiedades y atributos del azafrán especia, a pesar de encontrarse en el azafrán en menores proporciones que el resto de los compuestos mencionados (Carmona *et al.*, 2006a).

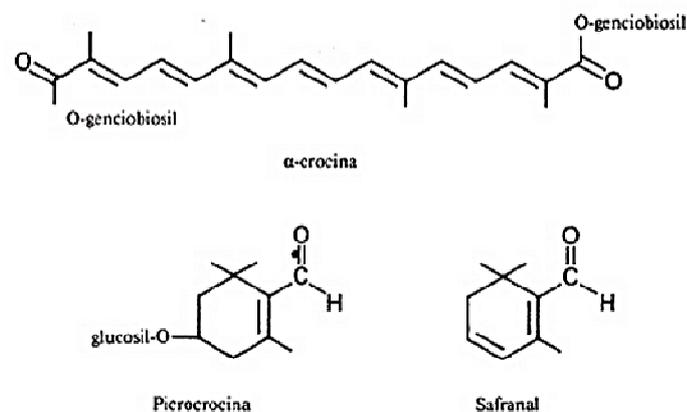


Figura 9 Estructura molecular de los compuestos más importantes del azafrán (Fuente: Fernández, 2004).

El azafrán ha sido ampliamente empleado en las antiguas civilizaciones mediterráneas (Grecia, Egipto y Roma), y también en zonas del medio y lejano este. El uso principal que se dio al azafrán fue alimentario, como especia, para dar sabor, color y aroma a los alimentos, como por ejemplo, salsas, requesón, pollo, carne, arroz, pasteles, mostaza, chocolate, licores, etc... En menor grado, se empleó como tinte y como ingrediente de perfumes. Durante los últimos años, el uso del azafrán como aditivo en la industria alimentaria, se ha potenciado gracias al interés general hacia la utilización de aditivos naturales (Kafi *et al.*, 2006). Del mismo modo, se está recuperando su uso como tinte en productos artesanales a base de algodón o madera (Libro Blanco del azafrán en Europa, 2007). El azafrán como aditivo alimentario está extendido mundialmente y caracteriza, al menos un plato, en casi todas las gastronomías tradicionales (Horne *et al.*, 2005).

El azafrán también ha formado parte de la medicina tradicional de muchas culturas. Se ha usado desde tiempos remotos para tratar diferentes problemas de la salud: asma, resfriados, desordenes cardiovasculares, problemas de hígado y bazo, desarreglos estomacales, diabetes, aligerar la menstruación, espasmos musculares, como afrodisíaco, para tratar el insomnio y calmar la ansiedad. Su uso externo ayuda a combatir problemas

## I. INTRODUCCIÓN

---

dermatológicos (Leung, 1980; Ríos *et al.*, 1998; Pérez-Bueno, 1989; Winterhalter y Stranbinger, 2000; Fernández, 2004; Kafi *et al.*, 2006).

Entre los metabolitos secundarios presentes en azafrán, los derivados de crocetina y safranal, son los que principalmente se están estudiando para evaluar su actividad biológica. En los años 50's, Miwa (1954) estudió el efecto inhibitorio del azafrán en el nivel de la bilirrubina en sangre. Gainer y Jones (1975) observaron un efecto reductor de la crocina y crocetina (principales carotenoides presentes en el azafrán) en los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre. Se ha visto que actúa como antioxidante, por reducir la susceptibilidad de las lipoproteínas a la oxidación en pacientes con enfermedades arterio-coronarias (Verma y Bordia, 1998). Zhang *et al.* (1994) estudiaron la acción de los extractos de azafrán en tratamientos para desórdenes neurodegenerativos y apoyan su uso en tratamientos para depresiones leves o moderadas (Zhang *et al.*, 1994). Otro estudio ha revelado la función protectora del azafrán frente el daño cromosómico, su actividad moduladora en la peroxidación de los lípidos, como también, su potencial antioxidante y detoxificante (Premkumar *et al.*, 2003). Tiene efecto antiinflamatorio y anticonceptivo y también antiepiléptico (Hosseinzadeh y Khosravan, 2002). Asimismo, actúa como regulador de la presión sanguínea (Fatehi, 2003). Se han observado los efectos positivos de extractos de azafrán en el tratamiento de pacientes asmáticos (Haggag *et al.*, 2003). El té de azafrán se está empleando como terapia complementaria en pacientes con psoriasis (Brown *et al.*, 2004).

Al principio de los años 90, un estudio reveló la acción inhibidora del crecimiento de células cancerígenas *in vivo* e *in vitro* (Nair *et al.*, 1991; Abdullaev *et al.*, 1992). En los últimos años, varios estudios han mostrado su potencial como agente anticancerígeno y antitumoral (Escribano *et al.*, 1999a, b, c y 2000; García-Olmo *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2000; Premkumar *et al.*, 2001; Abdullaev, 2002, 2004; Riverón-Negrete *et al.*, 2004; Tarantilis y Polissiou, 2004; Trujillo-Jiménez *et al.*, 2004). Los compuestos principales del azafrán que han sido estudiados por su actividad antitumoral son: crocina, safranal, pirocrocina, crocetina y  $\beta$ -caroteno (Abdullaev *et al.*, 2003).

A parte de estos usos médicos, se han propuesto numerosos usos alternativos (Kafi *et al.* 2006; Libro Blanco del azafrán en Europa, 2007). Por ejemplo, los restos de la flor que quedan después de separar los estigmas pueden ser usados como fuente de sustancias fenólicas (Hemmati y Rahimi, 1994, Kafi *et al.*, 2006). Las hojas pueden ser una fuente de alimentación animal (Valizadeh *et al.*, 1988, Kafi *et al.*, 2006). Por último, teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes y antibacterianas, la aplicación de extractos de azafrán obtenidos a partir de estigmas secos, puede ser un componente de interés en productos cosméticos, dermatológicos y protectores solares (Fekrat, 2004).

A pesar de que la importancia del género *Crocus* se debe principalmente a la especie cultivada *C. sativus*, también hay que considerar su uso en jardinería. Dentro del género *Crocus* existen aproximadamente unas 50 especies de interés en jardinería por el colorido de sus flores, siendo algunos genotipos objetos únicos de coleccionismo (Rashed-

Mohassel, 2006; Petersen *et al.*, 2008). En el año 2011, la superficie de plantas ornamentales cultivadas fue de 209.100 hectáreas (ha). En Europa se cultivaba el 43% de la superficie total y China es el segundo mayor productor (15%). Los Países Bajos es el mayor productor de flores y plantas ornamentales en Europa, con un 21,4% de la superficie cultivada de Europa, seguido de Alemania (13,9%) y España (12,3%) (<http://ec.europa.eu/eurostat>, datos 2011). En el periodo 2014-2015, la superficie de cultivo de bulbosas (*Tulipa* spp., *Lilium* spp., *Narcissus* spp., *Gladiolus* spp., *Hyacinthus* spp., *Iris* spp. y *Crocus* spp.) en los Países Bajos fue de 14.590,56 ha, de las cuales 407,6 ha corresponden a *Crocus* spp. (<http://www.bkd.eu/over-de-bkd>). Las especies del género *Crocus* de mayor importancia económica en jardinería son: *C. vernus*, *C. biflorus*, *C. chrysanthus*, *C. serotinus*, *C. speciosus*, *C. tommasinianus* y *C. sieberi* (Wiersema y León, 2013).

Hay que destacar un creciente interés en algunas de estas especies ornamentales y en otras especies silvestres debido a su posible uso como fuentes de colorantes y compuestos con interés medicinal o nutracéutico, ya que las crocinas y otros compuestos del azafrán, también se encuentran en los estigmas, e incluso en los tépalos de un buen número de especies de este género (Rubio *et al.*, 2013). Por otra parte, también hay que considerar en estas especies, la presencia de compuestos con actividad insecticida acumulados en las hojas, debida a la acumulación de compuestos de la familia de los flavonoides. Estos compuestos se han observado en las especies *C. serotinus* y *C. vernus*. Los extractos de *C. nevadensis* no mostraron actividad insecticida (Santana *et al.*, 2012). Además, debido a su tolerancia a la sequía del verano y a las bajas temperaturas durante el invierno, así como a sus flores de variados colores, surge la posibilidad de utilizar ciertas especies silvestres como plantas ornamentales en áreas donde las condiciones climáticas son desfavorables. Además, son una valiosa fuente de variabilidad genética en futuros programas de mejora de *C. sativus*. (Molina, RV, comunicación personal).

#### 4 MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *CROCUS*

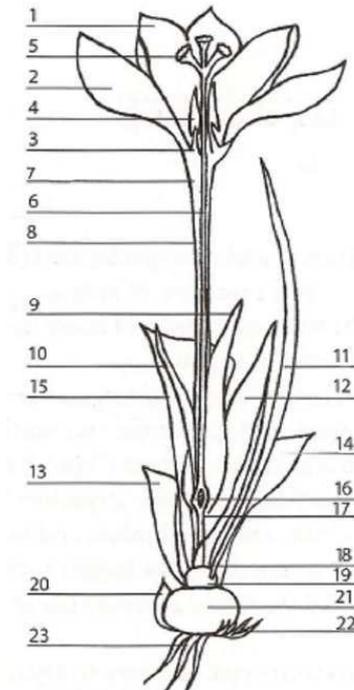
Las especies del género *Crocus* son plantas herbáceas, perennes y geófitas (Figura 10). Forman un tallo subterráneo llamado bulbo sólido o cormo, que cumple la función de propágulo, además de ser un órgano de reserva (Figura 11 y Figura 12). Entre todas las especies de este género, la más conocida y estudiada es *C. sativus*, conocido como azafrán. Ésta presenta mayor tamaño en todos sus órganos vegetativos y florales.

El cormo es un cuerpo sólido, generalmente subesférico, ovoide o piriforme, más o menos achatado y blanquecino. En el caso del azafrán, el cormo se conoce vulgarmente en La Mancha con el nombre de “cebolla” (Fernández, 2004; Guillén, 2014).

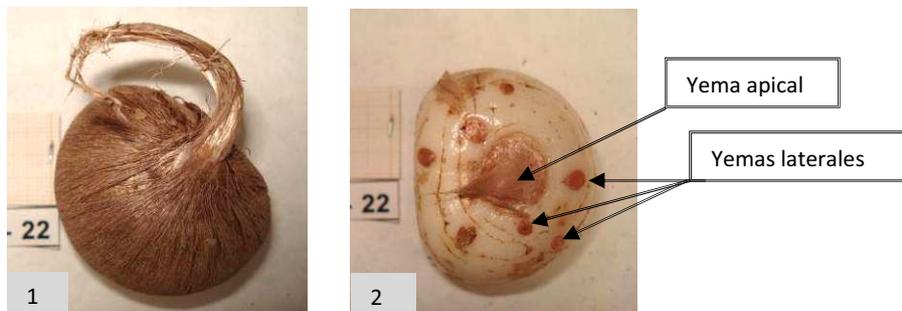
Las yemas se distribuyen en forma de hélice alrededor del cormo, pudiendo ser vegetativas o reproductivas. El número de yemas dependerá del tamaño del cormo (Figura 11). Las yemas florales se desarrollan en la parte superior del cormo. *C. sativus* puede contener de 8 a 12 yemas, aunque sólo de 2 a 4 llegan a brotar y formar una o

## I. INTRODUCCIÓN

varias flores. Sólo aquellos cormos con un diámetro mayor de 25 mm forman yemas florales (Navarro, 1998; Botella *et al.*, 2002; Fernández, 2004, Guillén, 2014).



**Figura 10** Esquema de una planta del género *Crocus* (Adaptado de Bowles, 1952, extraído de Rukšāns, 2010). Foto 1: 1. Tépalos internos, 2. Tépalos externos, 3. Filamentos del estambre, 4. Antera, 5. Estigma, 6. Estilo, 7. Garganta floral, 8. Tubo periántico, 9. Bráctea, 10. Bractéola, 11. Hojas, 12. Prófilo o espata basal, 13, 14 y 15. Catafilos, 16. Ovario, 17. Escapo, 18. Base de las hojas, 19. Cormo hijo, 20. Túnica, 21. Cormo madre, 22. Túnicas de la base, 23. Raíces.



**Figura 11** (1) Cormo de azafrán con túnicas protectoras; (2) Cormo de azafrán sin túnicas pudiéndose observar la yema apical y las yemas laterales.

En el género *Crocus*, el cormo se halla recubierto por túnicas formadas por fibras o capas papiráceas. Las capas están lignificadas y son de color ocre a casi negras (Figura 12). Las túnicas protegen al cormo de daños mecánicos, de enfermedades y limitan la pérdida de agua (Botella *et al.*, 2002). En el género *Crocus*, la diversidad de la forma de las túnicas es muy elevada, y en algunos taxones presenta una morfología muy característica. La capa más externa de las túnicas es la que se utiliza para la caracterización. Las túnicas pueden presentar estructuras papiráceas o fibrosas. Estas fibras son ásperas, de diferente grosor, y se disponen paralelamente o formando una red. Las túnicas papiráceas pueden

dividirse en la base o formar anillos concéntricos, o incluso presentar fibras paralelas en la base. Las túnicas fibrosas pueden mostrar diferentes grosores y niveles de entrecruzamiento (Mathew, 1982) (Figura 12).



**Figura 12** Ejemplos de variabilidad en la túnica de los cormos de *Crocus ssp.*

Los cormos producen dos tipos de raíces estructural y funcionalmente diferentes. Las raíces fibrosas, que emergen de la base del cormo madre, son rectas y delgadas, de un milímetro de espesor, y su función es absorber nutrientes (Figura 13.1). En la base de los cormos hijos se forman las raíces contráctiles, que tienen la apariencia de un órgano tuberoso, y son más gruesas que las anteriores (Figura 13.2) (Botella *et al.*, 2002; Fernández, 2004; Khalesi *et al.*, 2004a). Tirando y empujando, éstas últimas, permiten que los cormos se muevan en el suelo y se ubiquen a profundidad y posición óptimas para su futuro desarrollo (Gola *et al.*, 1965; Khalesi *et al.*, 2004a y b). Algunas especies forman estructuras estoloníferas que dan lugar a nuevos cormos (Mathew, 1982) (Figura 13.3).

## I. INTRODUCCIÓN

---



**Figura 13 (1) Raíces de cormos de azafrán. (2) Cormos de azafrán con raíz contráctil. (3) Estructuras estoloníferas**

Las hojas son lineales, estrechas y de color verde oscuro. La base aparece expandida formando las envueltas superiores del cormo (Figura 14). Las hojas tienen una prominente quilla central en el envés, que corresponde en el haz con una franja central blanquecina (Botella *et al.*, 2002). Esta línea blanquecina está formada por células parenquimáticas de la quilla que carecen de cloroplastos (Figura 14.3). López *et al.* (2000) describen que estas células llegan a romperse y forman grandes espacios acuíferos. En azafrán, la anchura de las hojas suele ser de 2 a 3 mm, y su longitud sobrepasa la de las flores y puede llegar a alcanzar alrededor de 50 cm (Pérez-Bueno, 1989; Negbi, 1990; Hagiladi *et al.*, 1992; Navarro, 1998; Fernández, 2004.). En cambio, en las especies silvestres la anchura y longitud suele ser menor, si bien, la disposición de los haces vasculares es similar para la mayoría de las especies estudiadas (Mathew, 1982; Guillén, 2014).

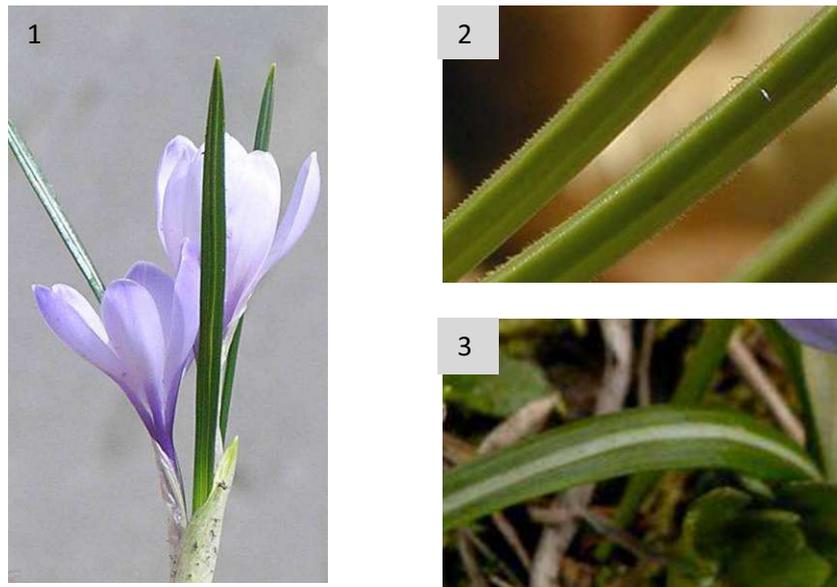


Figura 14 Hojas de *C. vernus*, delgadas, lineares de color verde oscuro, se observa la franja blanca central.

La hoja del género *Crocus* presenta una sección única y distintiva, formada por una quilla central y dos brazos laterales, cuyos márgenes generalmente se curvan hacia la misma (Figura 15). La única excepción es *C. carpetanus*. En cuanto a la forma de la quilla y de los brazos, la posición y la longitud relativa de los mismos, existe una elevada variabilidad que se estima de gran utilidad para su taxonomía (Rudall y Mathew, 1990).

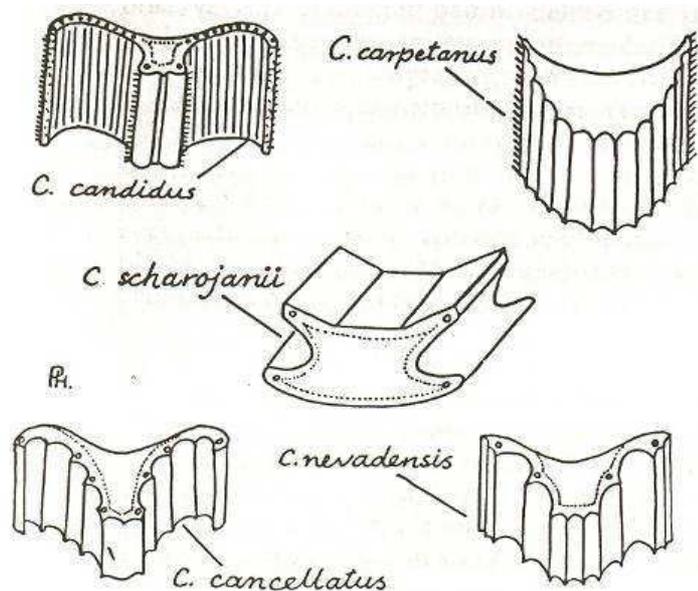


Figura 15 Secciones de la hoja de diferentes especies de *Crocus* spp. (Mathew, 1982).

Un cormo, dependiendo de su tamaño, puede tener de dos a tres brotes florales. Las flores alcanzan una altura máxima de 10-12 cm, y suelen presentarse en número de 1 a 3 flores por brote (Figura 16). En este género, la flor presenta seis tépalos. Estos tépalos presentan venación que puede mostrar colores que contrastan con el fondo del tépalo en mayor o menor intensidad. Las flores del género *Crocus* muestran una elevada

## I. INTRODUCCIÓN

---

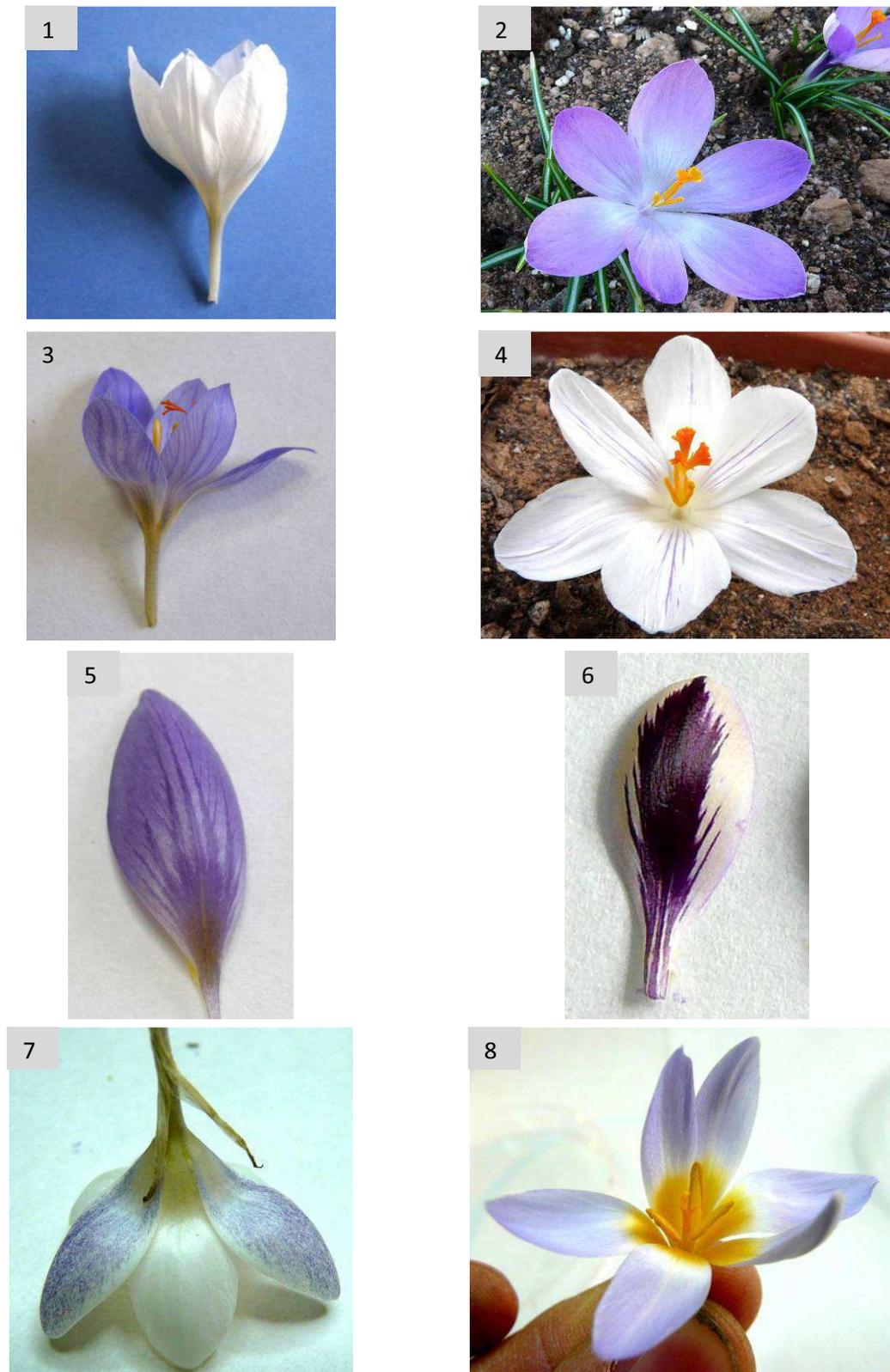
variabilidad en el color de los tépalos desde blanco, amarillo, marrón pálido, púrpura o lila, malva o azul. La presencia de venación en los tépalos externos, las manchas y las coloraciones degradadas de los colores son también muy variables dentro del género (Figura 17).



**Figura 16 (1) Cormos de azafrán con brotes florales (Fuente: [www.sragc.org.uk](http://www.sragc.org.uk), 2010). (2). Flor de *C. carpetanus* con bráctea visible. 3. Flor de *C. cambessedesii*, se observa estambres, estilos y garganta floral.**

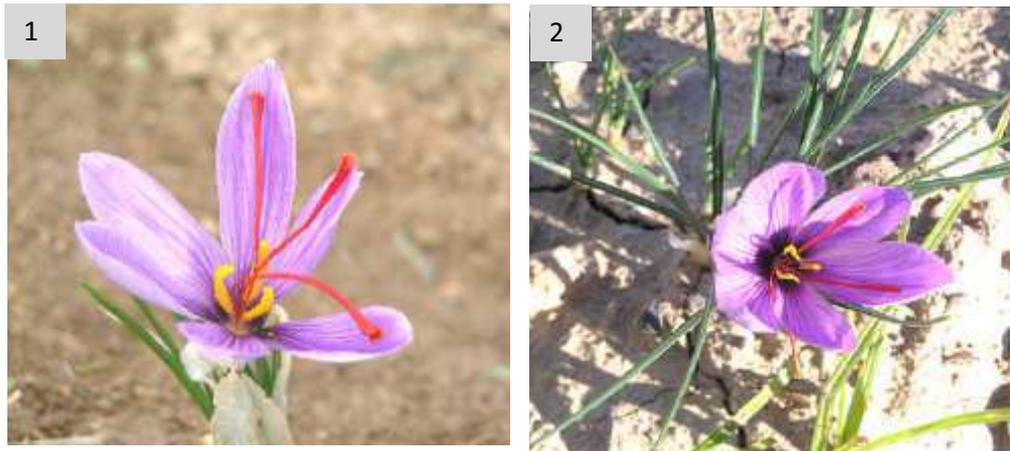
El color de las flores es debido a pigmentos biológicos que incluyen gran variedad de moléculas como carotenoides y flavonoides (Nørbæk *et al.*, 2002). Este rasgo es muy característico para algunas especies, y junto con su época de floración es un rasgo muy utilizado en la identificación cuando se colectan en su medio natural (Mathew, 1982).

Las flores, al igual que las hojas, emergen por el interior de unos tubos formados por las brácteas de recubrimiento y protección de las yemas (Pérez-Bueno, 1989; Navarro, 1998). La membrana más externa que se encuentra justo debajo de los catáfilos se llama espata basal. Las siguientes capas interiores se llaman brácteas y bractéolas. Ésta última es más interna y más pequeña que la anterior (Figura 10 y Figura 16 ) (Mathew, 1982).



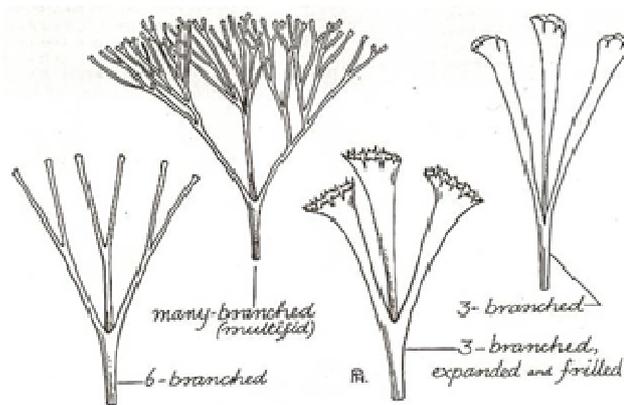
**Figura 17** Variabilidad presente en la coloración de los tépalos de *Crocus* ssp. 1. Tépalos de coloración uniforme. 2. Coloración degradada. 3. Venación continua y uniforme. 4. Venación discontinua. 5. Venación plumosa con mancha en la base. 6. Venación plumosa con mancha uniforme. 7. Moteado. 8. Manchas en la base de los tépalos internos.

## I. INTRODUCCIÓN

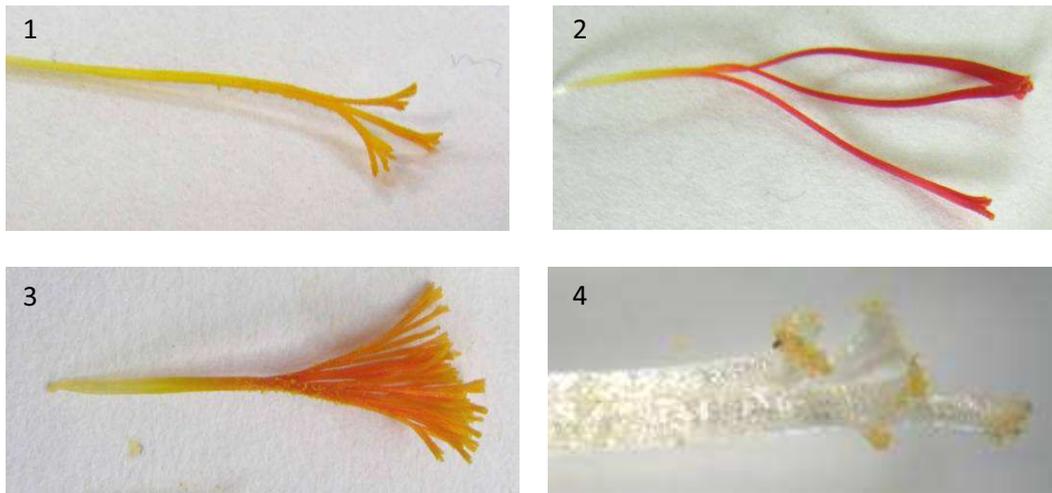


**Figura 18 Flores de azafrán. Se distingue el estilo ramificado en tres ramas de color rojizo sobre los tépalos y las hojas estrechas y lineares.**

El estilo es largo, y en su extremo final se presenta ramificado en tres o múltiples ramas de color blanco, amarillo rojizo o anaranjado, que constituyen la preciada especia en el caso de *C. sativus* (Figura 18). Los extremos ensanchados del estilo ramificado, los estigmas, son acanalados y presentan forma de maza o pequeña trompa. En la especie *C. sativus*, los estigmas comúnmente se conocen como “clavos del azafrán”. Al conjunto de la flor se la denomina “rosa del azafrán” (Pérez-Bueno, 1989; Negbi, 1990; Hagiladi *et al.*, 1992; Navarro, 1998). La variabilidad de la morfología del estilo es muy elevada observándose diferentes grados de ramificación: tres, seis o más de seis ramas. A la vez cada maza del estigma puede presentarse más o menos dividido (Figura 19, 20 y 21) (Mathew, 1982).

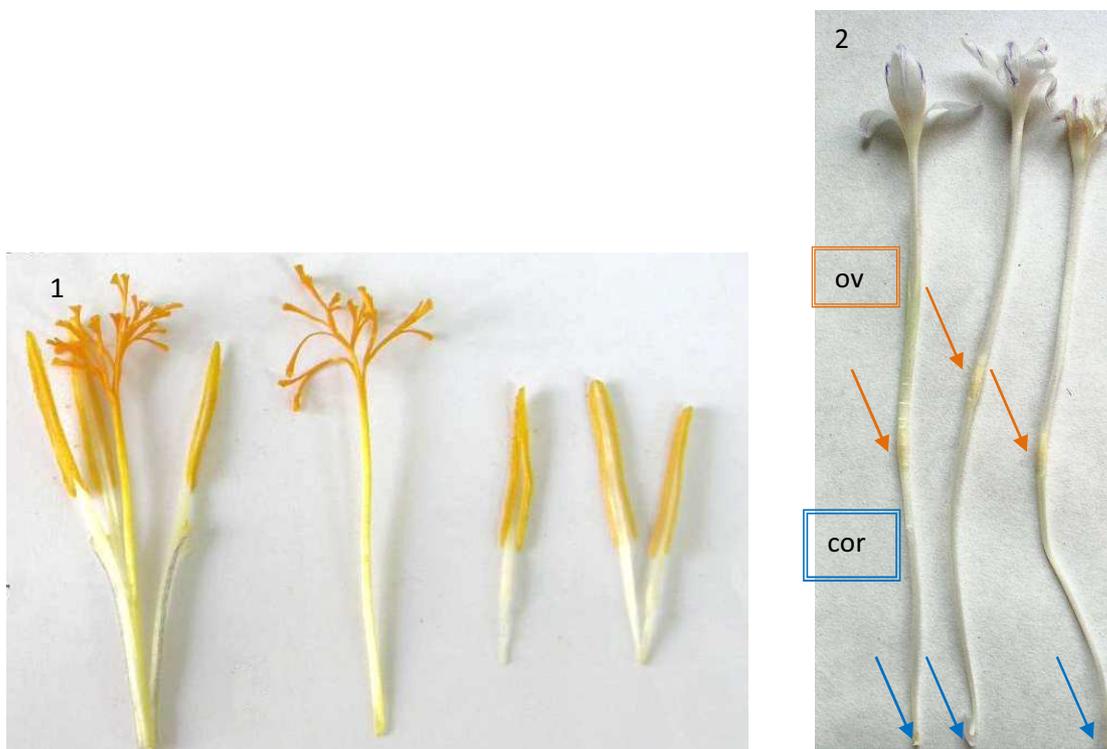


**Figura 19 Variabilidad de la ramificación del estilo (Mathew, 1982).**



**Figura 20** Variabilidad en el grado de ramificación del estilo. 1. Tres ramificaciones con mazas a su vez divididas. 2. Tres ramificaciones con mazas no divididas. 3. Muchas ramificaciones. 4. Cuatro ramificaciones de diferente longitud.

El ovario de la flor es subterráneo, y el fruto de las especies de *Crocus* es una cápsula que contiene numerosas semillas de color marrón o rojizo (Figura 21.2). La especie comercial, *C. sativus*, es una especie triploide ( $3n=24$ ) estéril (Chichiricco, 1984; De Mastro y Ruta, 1993; Fernández y Abdullaev, 2004). Es frecuente que las especies del género *Crocus* sean autoincompatibles (Chichiricco, 1996).



**Figura 21** (1). Estilos y estambres de *Crocus* spp. (2). Flores de *C. vernus*. Se puede observar la posición del ovario (ov) y el lugar de la inserción con el corno (cor).

## I. INTRODUCCIÓN

Dentro del género *Crocus* hay especies de floración otoñal, desde octubre a diciembre, o primaveral, desde febrero hasta junio. La emergencia foliar puede ocurrir durante la floración, o brevemente después, o incluso semanas más tarde, dependiendo de la especie. Esta salida de la hoja con posterioridad a la floración se denomina histerantia (Navarro, 1998; Hagiladi *et al.*, 1992).

El fruto de estas especies emerge de la superficie del sustrato, sobre un elongado pedicelo, para terminar su maduración. El ovario fecundado forma una cápsula con tres lóculos que contienen numerosas semillas (Figura 22). Una vez maduran estas cápsulas, las semillas se caen al sustrato y se dispersan, generalmente por hormigas. Las cápsulas de las especies de floración primaveral y otoñal alcanzan la madurez al mismo tiempo, al final de la primavera (Mathew, 1982). Estas semillas presentan en su superficie dos estructuras que caracterizan su forma. La carúncula es una estructura carnosa que forma parte de la inserción de las semillas en el ovario, cargada de sustancias lipídicas que atraen a hormigas que favorecen su dispersión (mirmecocoria). Asimismo algunas especies presentan rafe, que es un reborde o cresta que resulta de la soldadura del funículo con el tegumento cuando estos son anátropos (Font-quer, 1953).

La forma y el tamaño de la cápsula y de las semillas podrían ser muy útiles para la taxonomía del género, pero no hay conocimientos detallados sobre su morfología y anatomía. Los caracteres morfológicos de mayor interés en taxonomía, el tamaño y la forma de la semilla, la arquitectura de su superficie y el grado de desarrollo de accesorios (la carúncula y el rafe), muestran una elevada diversidad (Figura 22, 23 y 24) (Mathew, 1982).



Figura 22 Variabilidad presente en la morfología de la cápsula. 1. Oblonga. 2. Elipsoide. 3. Fusiforme

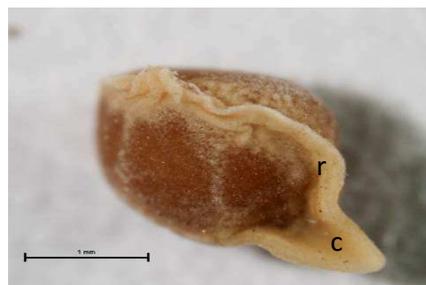


Figura 23 Semilla de *C. ancyrensis*. Se observa el rafe (r), y la carúncula (c).

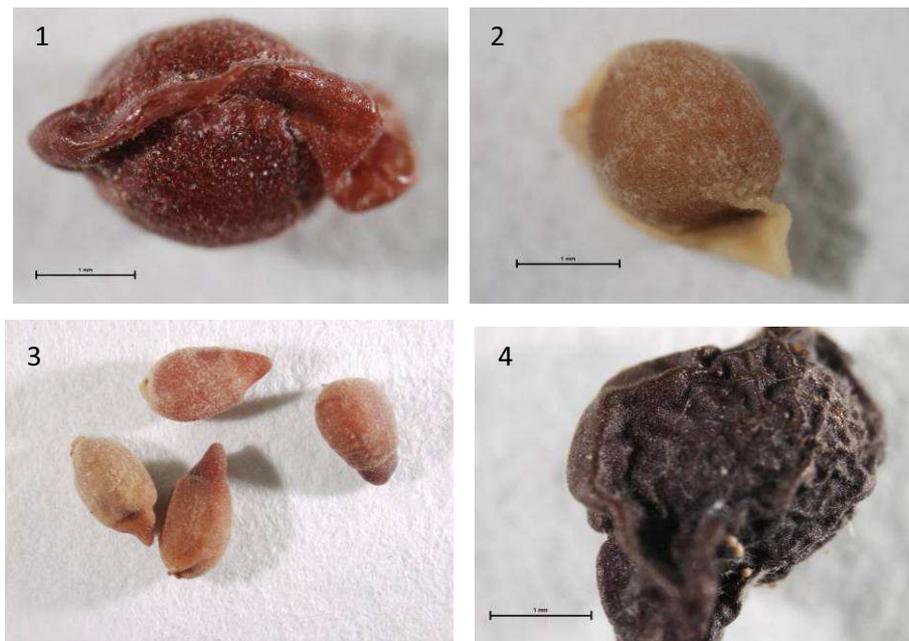


Figura 24 Variabilidad observada en la morfología de la semilla en especies del género *Crocus*. 1. *Globosa* (*C. flavus*). 2. *Subglobosa* (*C. ancyrensis*). 3. *Elipsoide* (*C. serotinus*). 4. *Superficie rugosa* (*C. fleischeri*).

El ciclo vital del cormo (Figura 25) es anual, siendo absorbido y reemplazado por nuevos cormos hijos, que comienzan a desarrollarse después de la floración y completan su ciclo antes del verano, (Fernández, 2004). Este cormo hijo se forma en la base de las yemas. En azafrán, la actividad fotosintética que realizan las hojas durante el invierno y los primeros meses de la primavera, es la principal fuente de fotoasimilados empleada para la formación de estos cormos de reemplazo (Figura 26).

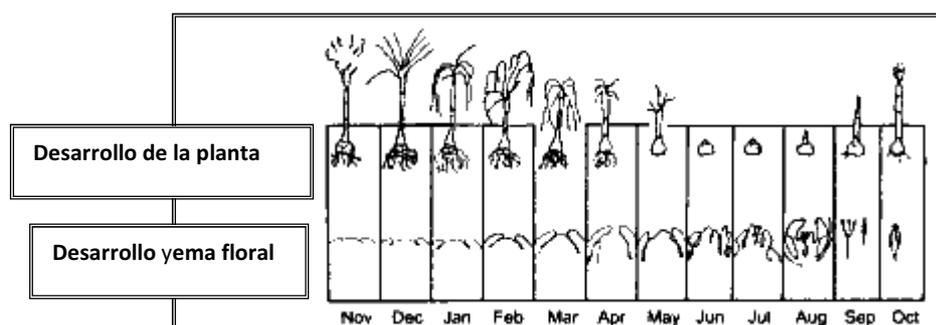
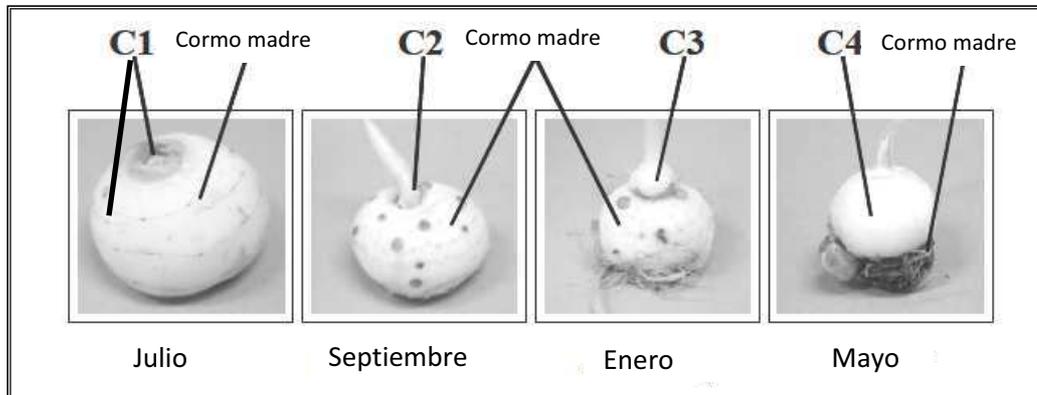


Figura 25 Ciclo biológico del azafrán. Se refleja el desarrollo de la planta y de las yemas florales (Fuente: Kafi, 2006)

En otras especies, la contribución relativa del cormo madre y de la actividad fotosintética a la formación del cormo hijo, no ha sido analizada. Únicamente, en la especie *C. vernus* se ha cuantificado que el cormo madre aporta cerca de un 20% de la materia necesaria para la formación de los cormos hijos (Lundmark *et al.*, 2009). En todo el género, antes del verano (de abril a mayo), las hojas se secan y los cormos permanecen en un aparente estado de latencia. A partir de este momento, sucede la formación de las yemas florales. En azafrán, se sabe que los cormos hijos formados en la base de brotes vegetativos que no han dado lugar a flores, formaran flores únicamente en las yemas

## I. INTRODUCCIÓN

apicales y dominantes. En cambio, en los cormos hijos desarrollados en la base de brotes florales, se habrán desarrollado 2 ó 3 yemas principales próximas a la yema que había dado flor y en las que puede tener lugar la inducción floral (Molina *et al.*, 2004c). En otras especies, este aspecto no ha sido estudiado.



**Figura 26** Estadios de desarrollo del cormo de azafrán: C1: Yemas latentes en la superficie del cormo madre. C2: desarrollo de la yema principal. C3: Cormo hijo en desarrollo, sujeto a la superficie del cormo madre. C4: Cormo hijo desarrollado, comienzo del periodo de latencia. (Fuente: Fernández, 2004).

## 5 LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO *CROCUS*

Como se mencionó anteriormente, en España se han identificado 7 especies silvestres del género *Crocus*. En la bibliografía existente, hasta la fecha (Mathew, 1982; Rukšāns, 2010; Guillén, 2014) se ha descrito, para las distintas especies, las características morfológicas, fenológicas y de situación geográfica que damos a continuación, si bien no hay estudios en profundidad sobre la variabilidad inter e intraespecífica.

### ***Crocus nevadensis* Amo y Campo**

Esta especie debe su nombre a Sierra Nevada (Granada) en el sudeste de España, donde se encuentra abundantemente. Se distribuye ampliamente en la Península Ibérica y en el noroeste de África (Fernández Lienres y Fernández López, 1996; Lorda López, 2001; Martínez Labarga y Nogales Ruiz, 2011). En España se localiza en la mitad este del país, donde crece en prados y pastizales ubicados en altitudes entre los 500 y 2.300 msnm. Según la descripción que se da de esta especie en Flora Ibérica (Guillén, 2014) la planta desarrolla entre 3 y 5 hojas, en ocasiones hasta 7, coetáneas con la flor. Florece entre febrero y abril, y el color de fondo de la flor varía del blanco al lila pálido, o bien puede ser malva violeta con venas oscuras. El estilo es aproximadamente igual o ligeramente más corto que los estambres, siempre de color blanquecino (Figura 27). La garganta floral es blancuzca o de un amarillo pálido y pubescente. La bractéola membranosa, blanca y a menudo subigual o mucho menor que la bráctea. El cormo tiene un diámetro de 1-1,5 centímetros y presenta forma ovoide, algo aplanada en la base. La cápsula es obovoidea y angulosa, y sus semillas trigonas de un pardo negruzco. En algunas sierras andaluzas se encuentran ejemplares de mayor tamaño, con túnicas muy densas.

Una especie cercana, con el que comparte, en general, la misma estructura morfológica es *C. carpetanus* (Mathew, 1982; Guillén, 2014).



Figura 27 Las flores de las especies *C. nevadensis* (1), *C. carpetanus* (2) y *C. vernus* (3)

#### ***Crocus carpetanus* Boiss. y Reut.**

Esta especie se ha descrito únicamente en la Península Ibérica, en el oeste, noroeste y centro de la misma. En España es común en la sierra de Guadarrama, pero también se puede encontrar en el oeste y suroeste de la provincia de Madrid, y en el noroeste de España, más concretamente en Zamora o Lugo (Cebolla-Lozano y Rivas-Ponce, 1994; García Río, 2006; Martín Blanco y Carrasco, 2005). Se localiza en suelos bastante profundos y no muy secos de prados y pastos de montaña, a altitudes muy variables (300-1900 msnm.). Se ha descrito que esta especie forma entre 2 y 4 hojas coetáneas con la floración. Un rasgo característico de *C. carpetanus* es la forma semicilíndrica de la sección de la hoja. La floración se ha observado entre marzo y mayo. El color de la flor varía considerablemente de un azul pálido lila a casi blanco (Figura 27). La garganta floral es blanca o ligeramente amarillenta y glabra. El estilo es más corto o brevemente más largo que los estambres, y toma color blanco o amarillo pálido. La bráctea y bractéola son casi iguales en longitud, membranosas y blancas. El cormo tiene un diámetro de 1 a 1,5 centímetros y presenta una forma desde ovoide a subsférica. Las tunicas externas son fibrosas, con fibras finamente reticuladas y en ocasiones extendida en un cuello diferenciado. La cápsula tiene forma fusiforme y contiene semillas subglobosas de un pardo pálido a rojizo (Mathew, 1982; Guillén, 2014).

#### ***Crocus vernus* (L.) Hill.**

*C. vernus* se distribuye ampliamente en toda Europa desde el norte de España, pasando por los Alpes hasta Ucrania (Mathew, 1982; Vigo Bonada, 1983; Carreras i Raurell *et al.*, 1993). Esta especie florece de marzo a junio (Figura 27). El estilo, en general, toma un color amarillo intenso o anaranjado-rojizo, raramente blanquecino. Desarrollan de dos a cuatro hojas, que aparecen parcialmente durante la antesis. Estas hojas aparecen envueltas en la bráctea membranosas y blanca, aunque a veces se presenta con venas verdes o purpúreas. La bractéola está siempre ausente. Se ha descrito que las tunicas externas están formadas por fibras finas, paralelas o reticuladas. El cormo

## I. INTRODUCCIÓN

---

toma formas variadas, desde subesférico a ovoide. Las cápsulas son elipsoidales y contienen semillas globosas, rojizas o pardas. Morfológicamente y citológicamente muestra una amplia variación. Esta especie comprende dos subespecies: *C. vernus* subsp. *vernus* de flor pequeña y estilo generalmente más corto que los estambres, y *C. vernus* subsp. *neapolitanus* de flor grande, tépalos purpúreos o de color lila, a veces con venas oscuras, y cuyo estilo siempre sobrepasa o iguala los estambres. En los Pirineos sólo las poblaciones pertenecientes a *C. vernus* subsp. *vernus* crecen. Sólo se ha descrito una población en León de la subespecie *neapolitanus* (Mathew, 1982; Guillén, 2014).

### ***Crocus serotinus* Salisb.**

Esta especie fue descrita por primera vez por Salisbury en 1806. Se distribuye ampliamente por la Península Ibérica y en el noroeste de África, principalmente en Marruecos (Valdés *et al.* 1987; Cebolla-Lozano y Rivas-Ponce, 1994; Aafi *et al.*, 2005; Laliga, 2007). En España crece en pastos ralos y prados de montaña, en substratos básicos o ácidos, de ordinario en ambientes no demasiado secos, en altitudes desde los 0 a 1900 msnm. Se puede encontrar de norte a sur en numerosas regiones, entre ellas se señalan León, Cuenca, Valencia, Jaén, Huelva y Cádiz. Presenta de 4 a 7 hojas coetáneas o desarrollándose inmediatamente tras la antesis. Se ha descrito que el período de floración comienza en septiembre y dura hasta diciembre. Las flores exhiben un color que varía de lila suave o lavanda, a un profundo color púrpura. En ocasiones exhiben venación de color más oscuro (Figura 28). La garganta es de ordinario pubescente, de color blanco, lila o de un amarillo claro. El estilo es de igual o menor tamaño que los estambres, de color amarillo o rojo-anaranjado. La bráctea es membranosa, blanca, aunque a veces verde hacia al ápice, mientras que la bractéola está ausente. El diámetro del corno observado es de 0,8 a 1,5 centímetros, tomando forma subesférica. Las túnicas externas contienen fibras paralelas. Se han observado cápsulas de forma elipsoide, con semillas ovoides y pardas (Mathew, 1982; Guillén, 2014).

### ***Crocus clusii* J. Gay.**

Esta especie se puede encontrar en la mitad oeste de la Península Ibérica, concretamente en las regiones del sur Cádiz y Huelva (Gil, 1985; Valdés *et al.*, 1987). Se localiza sobre pastizales secos y claros de pinar, de ordinario en substratos arenosos cerca del litoral (0-120 msnm). Desarrolla de 3 a 7 hojas de forma coetánea o inmediatamente tras la antesis (Figura 28). El período de floración es de septiembre a noviembre. Las flores son de color lila. La garganta floral es de ordinario pubescente y de color lila, blanco o amarillo claro. El estilo normalmente es de mayor longitud que los estambres y anaranjado. La bráctea es membranosa y blanca, aunque a veces es verde hacia el ápice. La bractéola está ausente. El diámetro del corno observado es de 1,4 a 3 cm, siendo subesférico y raramente estolonífero. La túnica más externa está formada por gruesas fibras reticuladas. La cápsula se ha descrito como elipsoide y las semillas como ovoides y pardo rojizas (Mathew, 1982; Guillén, 2014).



Figura 28 . Flores de *C. serotinus* (1) y *C. clusii* (2).

### ***Crocus nudiflorus* Sm.**

Esta especie del género *Crocus* se describió por primera vez en el siglo XVII por John Parkinson como una planta pirenaica. Esta planta se encuentra en el suroeste de Francia, el norte de España y también en Inglaterra (Mathew, 1982). En España, esta planta se encuentra en los Pirineos (Benito-Alonso, 2008) y en la Cordillera Cantábrica (Sánchez et Valdeolivas, 1995), en pastos, prados y claros de matorral, en substratos diversos, en zonas de baja altitud e incluso a 2000 msnm. Sus propiedades químicas han sido estudiadas y comparadas con las de la especie cultivada de *C. sativus*. Nelson (1950) observó que son muy similares y que por lo tanto, podría ser un posible sustituto en aquellos países donde *C. sativus* no se puede cultivar. Desarrolla de 3 a 4 hojas en la primavera, siendo ausentes durante la floración (histerantia). El período de floración se ha descrito desde septiembre a octubre. El color de sus flores es normalmente morado oscuro, pero se pueden encontrar formas de color lila-morado pálido (Figura 29). La garganta floral es glabra o finamente papilosa-pubescente, blanca o de color lila. El estilo es igual o más largo que los estambres, de color anaranjado. La bráctea es membranosa, blanca o teñida de verde. La bractéola está ausente. El diámetro del cormo observado es de 8 a 15 milímetros, tomando forma subsférica o piriforme. De ordinario, forma cormos estoloníferos. Las túnicas presentan fibras paralelas fuertes. Se ha descrito que las cápsulas son estrechamente elipsoidales, y contienen semillas pardas elipsoides (Mathew, 1982; Guillén, 2014).

### ***Crocus cambessedesii* J. Gay**

Su existencia fue publicada por primera vez en 1927 por Jacques Cambessèdes. Esta especie se localiza únicamente en Mallorca y Menorca (Alomar *et al.*, 1982; Castro y Rosselló, 2006). Se puede encontrar en zonas cercanas a la costa, como también en áreas montañosas de hasta 600 msnm. Desarrolla de 3 a 5 hojas coetáneas con la floración. Las hojas aparecen envueltas con la bráctea y bractéola que son aproximadamente del mismo tamaño, así como membranosas y blancas. El periodo de floración de *C. cambessedesii* se ha observado desde septiembre hasta febrero, habiéndose descrito

## I. INTRODUCCIÓN

---

diciembre como el mes de máxima floración. Un rasgo distintivo de esta especie son sus pequeñas flores, muy diferentes del resto de especies españolas de este género. Estas muestran tépalos oblanceolados u obtusos de un color variable desde blanco a lila pálido, a color lavanda-azul oscuro. (Figura 29). La garganta floral es glabra y blanca. El estilo de ordinario es más corto que los estambre y profundamente dividido en tres ramas anaranjadas o rojas. La cápsula es fusiforme y las semillas son piriformes y amarillentas. El diámetro del corno es de 10-15 milímetros, de subesférico a piriforme. Las tunicas externas son papiráceas que se divide en muchas fibras paralelas verticales en la base (Mathew, 1982, Guillén, 2014).

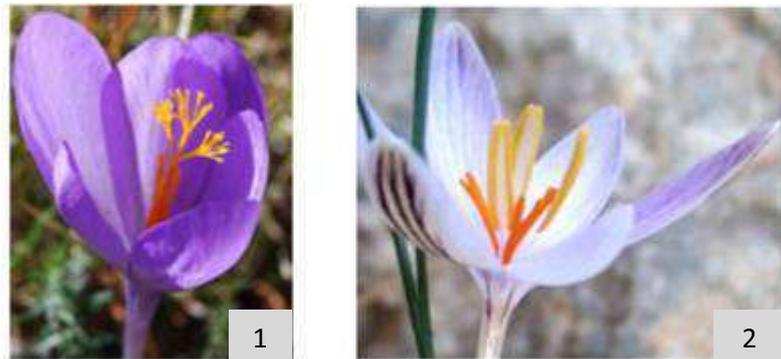


Figura 29 Las flores de las especies *C. nudiflorus* (1) y *C. cambessedesii* (2)

## 6 CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD DEL GÉNERO *CROCUS*

Hay un creciente interés en la preservación de la biodiversidad, centrada en la reducción de esta pérdida, especialmente en el caso de plantas de uso alimentario, medicinal u ornamental, debido a su importancia socioeconómica. La solución radica en la conservación de los recursos fitogenéticos, asegurando una diversidad representativa para su uso en los futuros programas de mejora.

El cultivo del azafrán padece un importante problema de erosión genética debido a la reducción de la superficie de cultivo dedicada a su producción. A esto hay que añadir la estrecha variabilidad genética asumida en la especie, ya que *C. sativus* es un híbrido estéril que no pueden producir semillas y que presenta propagación exclusivamente vegetativa. Así, en el primer congreso mundial sobre azafrán organizado por la *International Society for Horticultural Science* (ISHS) en Albacete (Octubre, 2003), se pone de manifiesto una situación que hace necesaria la aplicación urgente de medidas para proteger lo que aún quede de su biodiversidad. Además, dada la importancia de las restantes especies del género *Crocus*, tanto por su interés en jardinería, como por sus metabolitos secundarios, o como fuentes de variabilidad para la mejora de las especies cultivadas de mayor importancia socioeconómica, se vio de interés preservar la variabilidad existente en las mismas. Las primeras acciones para la conservación de la diversidad genética del azafrán y otros *Crocus* en España se inician en el año 2005, con la aprobación y puesta en marcha de un proyecto coordinado por el Centro de Investigación Agroforestal de Albaladejito (Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha), en el que se

integran también los equipos del Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Desarrollo Regional (Universidad de Castilla – La Mancha) y del Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Valencia (proyecto INIA RF2004-00032-C03). Estas acciones se han continuado con sucesivos proyectos INIA (RF2008-00012-C03; RF2011-00005-C03) que han permitido crear e iniciar el estudio de una amplia colección de recursos genéticos españoles del género *Crocus* que se conserva en el Banco de Germoplasma Vegetal del CIAF de Albaladejito. Paralelamente y entre los años 2007 y 2011 se desarrolló una acción internacional coordinada desde la Universidad de Castilla – La Mancha y cofinanciada por la Dirección General de Agricultura de la Comisión Europea (programa Agri Gen Res), que ha permitido crear una colección de germoplasma de azafrán y otras especies de *Crocus* de ámbito mundial, que también se conserva y gestiona en el BGV del CIAF de Albaladejito ([www.crocusbank.org](http://www.crocusbank.org)).

En el BGV del CIAF de Albaladejito se preservan actualmente 241 entradas de azafrán (*C. sativus*), la mayor parte de distintas zonas productoras españolas, pero también de procedentes de otros países donde se cultiva esta especie (Argentina, Nueva Zelanda, India, Marruecos, Irán, Afganistán, Francia, Grecia, Turquía, Hungría, Italia, Inglaterra y Azerbaiyán). También se conservan 355 entradas de más de 60 especies de *Crocus* (incluyendo todas las españolas), bien recogidas en sus hábitats naturales o bien adquiridas en viveros especializados. Las entradas de azafrán se conservan exclusivamente en forma vegetativa siguiendo un diseño que hace compatible la conservación y la utilización de estos materiales. En el caso de otras especies de *Crocus*, además de las colecciones vegetativas también se ha generado una amplia colección de semillas.



**Figura 30** Colecciones de *Crocus* del Banco Germoplasma Vegetal del CIAF de Albaladejito. Colección vegetativa de reserva (A) y Colección vegetativa de intercambio (B).

Esta colección está permitiendo estudiar las posibles diferencias entre materiales de distinta procedencia geográfica o cultivares comerciales y también seleccionar los mejores ejemplares de poblaciones naturales o cultivadas (Fernández *et al.*, 2009). Por otro lado, esta colección es una fuente de variabilidad genética que ayudará en futuros trabajos de mejora para especies de uso en jardinería, de utilidad por su contenido en

## I. INTRODUCCIÓN

---

metabolitos secundarios de diverso uso (colorantes, conservantes, uso medicinal, nutraceútico o biocida) o para la mejora del cultivo del azafrán. En este último aspecto tiene especial interés destacar las siguientes líneas de actuación:

- La selección de genotipos con diferentes periodos de floración, para extender el periodo de uso de instalaciones para producción a nivel industrial
- El desarrollo de variedades con histerantía (retraso de la salida de las hojas respecto la floración) para facilitar la recolección mecanizada de las flores (Valero *et al.*, 2004a).
- La obtención de cultivares resistentes a *Fusarium* que disminuyeran las pérdidas por este patógeno a la vez que permiten una densidad de plantación elevada, requerida en el cultivo bajo condiciones controladas.

## 7 ESTUDIOS DE VARIABILIDAD EN EL GÉNERO *CROCUS*

### 7.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y AGRONÓMICA

La gran mayoría de estudios de variabilidad para caracteres de interés agronómico en este género se han centrado en aquellos relacionados con la producción de azafrán por cormo. Para este tipo de caracteres, en diversos trabajos realizados en India (Munshi, 1992; Nevhi *et al.*, 2007), Irán (Ehsanzadeh *et al.*, 2004; Soheilvand *et al.*, 2007; Baghalian *et al.*, 2010) o Líbano (Yau *et al.*, 2006), se ha encontrado variabilidad de interés entre entradas, así como una elevada heredabilidad en sentido amplio (Munshi, 1992; Nevhi *et al.*, 2007). Asimismo, se ha tenido éxito en un trabajo de selección clonal llevado a cabo con materiales de Irán (Agayev *et al.*, 2009). No obstante, la falta de seguimiento del tamaño de los cormos a lo largo de esta selección no garantizó el que las diferencias entre clones fueran siempre diferencias genéticas. No obstante, hay que señalar que estos estudios están restringidos a un marco muy local y la mayoría se han desarrollado con materiales de Irán. En un estudio preliminar de evaluación, a partir de 62 entradas del BGV del CIAF de Albaladejito procedentes de muy distinto origen (Azerbaiyán, España, Francia, India, Irán, Italia, Marruecos, Nueva Zelanda y Turquía), también se encontró variación entre entradas para el peso de azafrán por flor y a la que se debía el 54% de la variación observada (Pastor-Férriz, 2011). En este trabajo hay que destacar también una importante variación entre entradas para el carácter precocidad de la floración (39%). La producción de cormos es un carácter para el que también se ha encontrado variabilidad de interés en distintos trabajos (Munshi, 1992; Ehsanzadeh *et al.*, 2004). Asimismo, se ha observado variación entre entradas de azafrán de muy diverso origen para caracteres relacionados con la producción de cormos, como nº de hojas o de brotes por gramo de cormo inicial (Pastor-Férriz, 2011).

En relación al resto de especies del género, hay que señalar que se han realizado diversos estudios de variabilidad morfológica y anatómica en los últimos diez años, pero todos de ellos sobre especies localizadas en el este de Europa, concretamente en Turquía (Ozdemir, 2004; Satil y Selvi, 2007; Ozdemir y Kiliç, 2008; Kandemir, 2010; Selvi y Satil,

2013). Turquía es un país especialmente rico en especies del género *Crocus*, habiendo sido identificadas un total de 73 especies (Mathew, 1984; Erol *et al.*, 2010; Candan, 2015). En estos trabajos se describen caracteres cuantitativos y morfológicos de diversos órganos de la planta (hojas, tallo, raíz, túnicas, flores,..etc.), así como cortes histológicos de hoja, tallo y raíces (Satil y Selvi, 2007; Kandemir, 2010; Selvi y Satil, 2013).

En estos estudios sobre distintas especies y subespecies del género *Crocus* en Turquía, (*C. danfordiae*, *C. fleischeri*, *C. speciosus*, *C. ancycensis*, *C. baytopiorum*, *C. biflorus* subsp., *C. cancellatus* subsp., *C. olivieri*, *C. pallasii*, y *C. chrysanthus*), se concluye que los caracteres morfológicos con mayor valor taxonómico son: la morfología de la túnica del cormo, la estructura del estilo, el color y tamaño de los tépalos y de la antera, el número de estigmas de los estilos, presencia o ausencia de pelos en la garganta floral, la presencia o ausencia de espata basal, número de hojas, momento de salida de la hoja respecto de la floración (sinantia o histerantia) y periodo floral (Ozdemir, 2004; Ozdemir y Kilingç, 2008; Kandemir, 2010; Selvi y Satil, 2013).

Si bien el tipo de túnica parece un carácter muy constante dentro de especie, en ninguno de los estudios revisados aparece este carácter como el único utilizado para diferenciar entre especies. Siempre es necesario utilizar otros adicionales, como la estructura del estilo, la anatomía de la hoja y el color de los tépalos (Ozdemir y Kilingç, 2008). Esto mismo sucede con la estructura del estilo y el color de los tépalos.

En relación al desarrollo de las túnicas hay que considerar que se ha observado variabilidad debida a factores ambientales. Las especies de regiones más secas, como *C. cancellatus* tiende a desarrollar túnicas con mayor número de capas, y son más persistentes, mientras que aquellos cormos que viven en hábitats más húmedos presentan túnicas más de menor espesor (Mathew, 1982).

En relación a la anatomía de las hojas, los estudios realizados por Erol y Kuçuker (2007) y Kandemir (2010), con algunas de estas especies que se desarrollan en Turquía (*C. fleischeri*, *C. gargaricus*, *C. wattiorum*, *C. antalyensis* y *C. olivieri*), muestran que la forma de la quilla, la posición y longitud de los brazos de las hojas, así como la forma del parénquima en empalizada y el número de surcos de la quilla, son características diferenciadoras de estas especies. A nivel microscópico, no se encontró variabilidad en la disposición de las células epidérmicas y de los estomas del envés. En el haz también se observaron pequeñas diferencias (Figura 31, Erol y Kuçuker, 2007). Un análisis numérico realizado sobre las variaciones anatómicas encontradas en la hoja de las especies de *C. fleischeri*, *C. danfordiae*, *C. chrysanthus*, reveló que esta variabilidad era de naturaleza interespecífica, y era debida, fundamentalmente, a la altura de las células de empalizada y la anchura de las células del parénquima esponjoso (Ozdemir *et al.* 2010).

## I. INTRODUCCIÓN

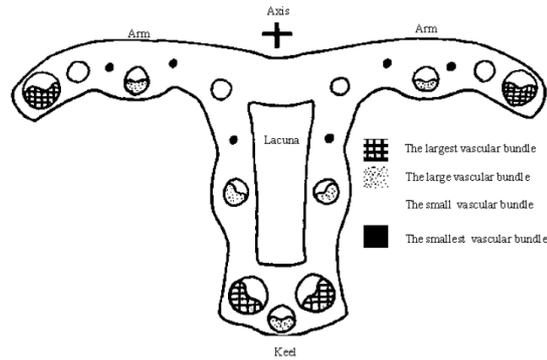


Figura 31 Diagrama de la sección de la hoja típica del género *Crocus*. Tipos de vasos vasculares (Erol y Kuçuker, 2007).

Se ha observado la influencia de los factores ambientales en la variabilidad de algunos de los caracteres relacionados con la anatomía de la hoja. Cuando la planta se desarrolla a mayor altitud, se incrementa la longitud y anchura del parénquima en empalizada y el espesor de la cutícula. Sin embargo, las dimensiones del parénquima esponjoso disminuían. Asimismo, se dan adaptaciones xeromorfológicas, que dan lugar a estomas más hundidos en la epidermis y a una estructura de la quilla triangular, con menos superficie (Kandemir, 2011).

También para las especies españolas del género, se estudió la variabilidad para la forma de la sección anatómica de la hoja y se observó diversidad interespecífica en la misma (Maw, 1886; Barra, 1982). En estos estudios, se aprecia la falta de las especies *C. cambessedesii* y *C. clusii* (incluida, anteriormente, como subespecie dentro *C. serotinus*) hasta el reciente trabajo de clasificación publicado en Flora Ibérica (Guillén, 2014). En las Figura 32 y 33 se observa la sección anatómica descrita por los autores para las diferentes especies españolas



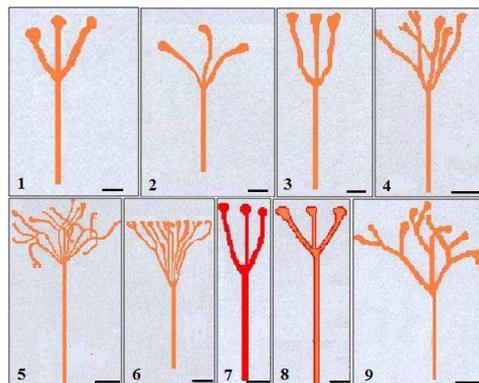
Figura 32 Sección anatómica de la hoja de 1. *C. vernus*, 2. *C. serotinus*, 3. *C. nudiflorus* y 4. *C. carpetanus* (Adaptada de Barra, 1982)



Figura 33 Sección anatómica de la hoja de 1. *C. nevadensis*, 2. *C. carpetanus* y 3. *C. sativus* (Adaptada de G. Maw, 1886)

Un análisis sobre la variabilidad intraespecífica en tamaño de las células epidérmicas y de los estomas de las hojas, reveló variabilidad en cuanto al tamaño de los estomas en diferentes poblaciones de *C. vernus* que presentaban diferente grado de poliploidía (Corneanu *et al.*, 2003).

Como hemos señalado con anterioridad, se ha descrito una elevada variabilidad interespecífica en el color de los tépalos o la estructura del estilo, siendo este último un carácter constante dentro de especie. En la Figura 34, se observan distintos tipos de estilos de *Crocus* spp. que crecen en Balıkesir (Turquía) que han sido descritos por Selvi y Satil (2013). No obstante, existen escasos estudios sobre variaciones intraespecíficas e intrapoblacionales. Si bien se han descrito, en trabajos antiguos, desarrollos anormales o flores albinas (Artyushenko y Kharkevich, 1956; Komendar y Neimet, 1980; citados por Mihaly, 1997), no podemos hablar de que se describa una variación genética importante dentro de estas poblaciones para la morfología floral. Se ha descrito, sin embargo, la existencia de variabilidad en caracteres cuantitativos de flor (longitud de anteras y estilos) entre poblaciones ubicadas a diferente altitud (Mihaly, 1997).



**Figura 34** Tipos de estilos de *Crocus* spp. que crecen en Balıkesir (Turquía). 1. *Crocus gargaricus*, 2. *C. chrysanthus*, 3. *C. biflorus* subsp. *nubigena*, 4. *C. flavus* subsp. *dissectus* 5. *C. olivieri* subsp. *istanbulensis* 6. *C. c idus* 7. *C. pallasii* subsp. *pallasii*, 8. *C. cancellatus* subsp. *mazziaricus* 9. *C. pulchellus* (Barra de escala: 2 mm) (Selvi y Satil, 2013).

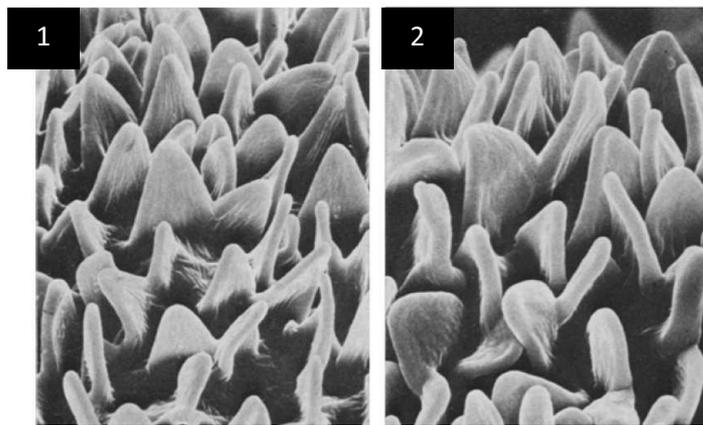
La única especie en la que se ha prestado más atención a las variaciones cuantitativas en la morfología floral ha sido la especie cultivada *C. sativus*, dada su repercusión económica. En trabajos que estudian la variabilidad entre entradas para el tamaño de la flor en materiales de India (Nehvi *et al.*, 2007) e Irán (Baghalian *et al.* 2010) encuentran diferencias significativas entre entradas y valores elevados de la heredabilidad en sentido amplio. Asimismo, en el trabajo ya mencionado, a partir de 62 entradas del BGV del CIAF de Albaladejito procedentes de muy distinto origen (Pastor-Férriz, 2011), los caracteres de morfología floral son aquellos que presentan los mayores valores de variabilidad, y están altamente correlacionados entre ellos. La variación en tamaño floral implica la existencia de variación para el tamaño del estigma, que es independiente del tamaño inicial del cormo y del nº de flores producidas, lo que tiene un gran interés a la hora de seleccionar materiales. No obstante, si bien el tamaño de estambres o tépalos tiene un interés secundario, es también un material que podría ser objeto de comercialización.

## I. INTRODUCCIÓN

---

La multiplicidad de las partes de la flor en ocasiones puede variar, aumentando o disminuyendo. Así, en azafrán se han observado flores anormales con 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 estilos (Aghamohammadi, 1977; Estilai, 1978). Sin embargo, nunca se ha demostrado que esta variabilidad tenga una base genética (Gaffari, 2009) sino que parece tratarse de anomalías del desarrollo poco frecuentes en condiciones habituales (43 flores de un total de 36 millones). Existen escasísimos trabajos publicados acerca de la variación morfológica del fruto y la semilla, a nivel inter o intraespecífico, en este género. En una tesis doctoral sobre la morfología, anatomía, citología y palinología de las especies *C. ancyrensis*, *C. sieheanus*, *C. chrysanthus* y *C. flavus* en Turquía (Candan, 2012), se concluye que las características micromorfológicas de las semillas son un recurso muy útil para distinguir entre taxones.

En un estudio muy anterior (Ryszard y Rafifiski, 1978), ya se puede observar la similitud de la estructura de la superficie de la cubierta de las semillas *C. albiflorus* y *C. vernus* subsp. *vernus* (Figura 35), que serían años más tarde incluidas dentro del mismo taxón



**Figura 35** Fotografías de la superficie de la semilla de *Crocus* spp. (Micrografías electrónicas de barrido): 1. *Crocus albiflorus* y 2. *Crocus vernus* subsp. *vernus* (Adaptado de Ryszard y Rafifiski, 1978).

En relación a los estudios de variación dentro del grupo de especies españolas de *Crocus*, hay que señalar que si bien recientemente se ha publicado en Flora Ibérica una monografía sobre el género *Crocus* (Guillén, 2014), que incluye descripciones morfológicas y fenológicas de cada especie, así como una clave de identificación, no existen estudios detallados de variación intraespecífica, salvo el anteriormente citado sobre la variación intraespecífica en el tamaño de los estomas en diferentes poblaciones de *C. vernus* (Corneanu *et al.*, 2003). Tampoco existen estudios más detallados de variación entre especies, salvo los antes citados en referencia a la anatomía de las hojas. Para la realización de la clave de identificación se han considerado de especial interés para diferenciar entre especies los siguientes caracteres morfológicos y fenológicos: periodo de floración en su ambiente natural, presencia o ausencia de la hojas durante la floración, presencia o ausencia de pilosidad en la garganta floral, tamaño de las hojas y de los tépalos, sección transversal de la hoja, estructura de la túnica, color y estructura del

estigma. Con la excepción del tamaño de la hoja, todos estos caracteres se han señalado de utilidad para diferenciar entre especies, tanto en los estudios previamente mencionados sobre variabilidad interespecífica en especies procedentes de Turquía, como en la monografía ampliamente utilizada sobre el género *Crocus* "The genus *Crocus*" de B. Mathew (1982).

## 7.2 CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y FENOLÓGICA

Con la excepción de los estudios sobre la fisiología del desarrollo del cormo de *C. vernus* (Badri *et al.*, 2007; Lundmark *et al.*, 2009) y algunos estudios sobre la germinación de las semillas de especies de este género (Vurdu, 2004; Fu *et al.*, 2013; Carta *et al.*, 2014), los estudios sobre la fisiología del género *Crocus* se han centrado en el azafrán y, fundamentalmente, en la fisiología de la floración y producción de cormos.

Los geófitos del género *Crocus* finalizan su desarrollo cuando llega la época estival. La senescencia de las hojas va seguida de la senescencia de las raíces, antes de que entren en estado de latencia aparente por las altas temperaturas (Khodorova y Boitel-Conti; 2013). Cuando los cormos de remplazo han alcanzado su tamaño final, en sus yemas no ha tenido lugar la **diferenciación de primordios florales**. En azafrán se ha observado (Molina *et al.*, 2005a; Koocheki *et al.*, 2010) que un régimen de temperaturas constantes de entre 23 y 27°C, durante esta época estival, induce la diferenciación floral. Se requiere un período mínimo de alrededor de 50 días. El efecto combinado de temperaturas superiores (30°C), durante periodos cortos (30 días), seguidos de una incubación a 23°C, acortan el periodo de iniciación floral. Periodos más extensos (de más de 150 días) a 23-27°C o superiores producen el aborto de un gran número de flores. La humedad relativa debe mantenerse entre 80% y 85% (Molina *et al.*, 2004c, 2005a). La aplicación de diferentes periodos de incubación a 25°C permitiría escalonar la floración desde mediados de septiembre a mediados de diciembre (Molina *et al.*, 2004b, 2005a). En la Figura 36 se puede observar un cultivo forzado de azafrán. La aplicación de frío tras la inducción de los meristemos florales, produce el aborto de las flores que se están desarrollando. Temperaturas de 0°C o inferiores dañan el cormo (Molina *et al.* 2005b; Amooaghaie, 2007). También en la especie cultivada *C. sativus* se ha descrito que un periodo de bajas temperaturas (< 10°C) tras la latencia estival del cormo y la inducción de los meristemos, da lugar una reducción de la producción de flores, y una disminución del tamaño de la planta (Çavuşoğlu, 2010).

El género *Crocus* comprende especies de floración tanto otoñal como primaveral, si bien no existen trabajos en profundidad sobre la fisiología de la floración en especies distintas del azafrán. No obstante, teniendo en cuenta que en numerosas especies bulbosas de floración primaveral, como *Iris*, *Tulipa*, o *Hyacinthus*, la diferenciación de yemas vegetativas a yemas florales ocurre durante este periodo estival (Hartsema, 1961; Le Nard y De Hertog, 1993; citado por Molina *et al.*, 2005a), parece lógico plantearse que también la diferenciación floral en el género *Crocus* pudiera darse durante este período.

## I. INTRODUCCIÓN

---



**Figura 36 Cultivo forzado bajo condiciones microclimáticas controladas (Foto ITAP, Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete; Fuente: Libro Blanco del azafrán en Europa, 2007). 2. Floración de azafrán (*C.sativus*) en cultivo forzado (extraída de Valero et al., 2004b).**

**La salida de la flor** en azafrán requiere temperaturas muy distintas de aquellas en que tiene lugar la diferenciación de primordios florales. Así, la iniciación floral se produce de forma óptima a temperaturas inferiores a la temperatura de incubación, a 15-17°C (Plessner *et al.*, 1989; Molina *et al.*, 2004b y 2010; Vafabakhsh *et al.*, 2009). La floración en condiciones naturales tiene lugar en otoño, cuando las temperaturas descienden y se dan los primeros riegos. Una combinación de temperatura y agua disponible en el suelo son factores importantes que controlan la floración (Gresta *et al.*, 2008). En otras especies de *Crocus* de floración primaveral (*C. vernus* y *C. flavus*) se ha descrito que requieren secuencias térmicas de calor-frío-calor para florecer (Wilkins, 1985). Si bien se conoce el momento de floración de la gran mayoría de especies en su ambiente natural, habiéndose observado floración de las especies otoñales desde octubre hasta diciembre, y de las especies primaverales desde finales de febrero hasta mayo (Mathew, 1982; Pérez y Pastor, 1994; Sanz y Redó, 1998), no existen estudios fisiológicos del proceso de emergencia de la flor en condiciones controladas, y no se sabe si ciertas especies que florecen tardíamente podrían adelantar su floración en otras condiciones térmicas, o de disponibilidad de agua. En relación con las especies españolas, objeto de estudio en esta tesis, no existen estudios detallados sobre su fenología y los factores ambientales que la modifican. No obstante, a partir de los datos de recolección de estas especies en la bibliografía y en la red Anthos (Sistema de información de las plantas de España. Real Jardín Botánico, CSIC- Fundación Biodiversidad. Recurso electrónico en [www.anthos.es](http://www.anthos.es)) es posible observar la variabilidad fenológica en relación al lugar de recogida. Estos datos se recogen en las 7 tablas que damos a continuación (Tabla. 4-10).

**Tabla. 4.** Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie *C. serotinus*. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica.

Localidad	Altura (msnm)	Floración	Autores
Pontevedra: Vigo y Fanelos de Montes	15 y 830	01/10	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
La Coruña: S <sup>a</sup> a Capelada y El Ferrol	60 y 115	14/10	Pino-Pérez <i>et al.</i> (2008)
Lugo: S <sup>a</sup> del Xistral y S <sup>a</sup> do Courel	716 y 1000	31/10	Pino-Pérez <i>et al.</i> (2007)
Orense: Verín	400	14/10	Pino-Pérez <i>et al.</i> (2008)
León: S <sup>a</sup> de la Cabrera y Majúa	1200 y 1800	21/11	Nieto-Feliner (1985)
Palencia: S <sup>a</sup> del Brezo	1800	18/09	Aedo <i>et al.</i> (2001)
Soria: Quintana y Vinuesa	980 y 1107	15/10	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Ciudad Real: P.N. Cabañeros	800	06/10	Vaquero (1990)
Ciudad Real: Campo de Calatrava	800	19/10	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Alicante: Subsector Alcoyano-Dianense	12-1300	03/10	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Jaén: Chilluevar	1200	03/11	Fernández-Lienres y Fernández-López (1996)
Jaén: S <sup>a</sup> de San Andrés	600 - 1000	05/11	García-Rojo (2006)
Granada: PN S <sup>a</sup> Baza y PN S <sup>a</sup> Nevada	1980 y 2500	23/10	Navarro y Jiménez (2009)
Cádiz: Chiclana y Grazalema	30 y 800	05/11	Pérez y Pastor (1994)

**Tabla. 5.** Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie *C. clusii*. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica.

Localidad	Altura (msnm)	Floración	Autores
Huelva: Hinojos	30-100	01-19/11	Pérez y Pastor (1994)
Cádiz: Facinas	30-100	20/11	Pérez y Pastor (1994)

**Tabla. 6.** Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie *C. nudiflorus*. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica.

Localidad	Altura (msnm)	Floración	Autores
Cantabria : Camargo y La Calzada	40 y 150	26/09-12/10	Sánchez y Valdeolivas (1995)
Guipúzcoa: Hernani y Legazpia	320 y 870	30/10	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Huesca: Aísa y PN de Ordesa - Monte Perdido	1800 y 2180	03/09-11/11	Benito-Alonso (2006)
León: Picos de Europa	1000 y 2000	20/09-28/11	Navas (1988)
Palencia: S <sup>a</sup> Peña Labra	1220	04/11-25/10	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Soria: S <sup>a</sup> de la Cebollera y Picos de Urbión	1500 y 1700	09/09-24/10	Zubizarreta <i>et al.</i> (2000)
Ciudad Real: La Atalaya y Lagunas de Ruidera*	670 y 800	03/10	Pablos-Alcázar (2004)

\*Es posible que aunque citada como *C. nudiflorus*, se trate de *C. serotinus*.

## I. INTRODUCCIÓN

**Tabla. 7.** *Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie C. cambessedesii. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica.*

Localidad	Altura (msnm)	Floración	Autores
Ibiza: San Antonio	30	28/12	Roselló y Sáez (2000)
Mallorca: Isla Sa Dragonera	10 -100	28/12	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Mallorca: Marina de Lluçmajor	20 – 100	28/12	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Mallorca: PN de Llevant	30	21/11	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Mallorca: Pollença	100	28/12	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Mallorca: Escorca	1350	28/12	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Menorca: Cala en Blanes	20	28/12	Moreno-Saiz y Sainz-Ollero (1992)
Menorca: Algayarens	10	07/12	Roselló y Sáez (2000)
Menorca: Mahón	30	27/12	Roselló y Sáez (2000)

**Tabla. 8.** *Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie C. vernus. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica.*

Localidad	Altura (msnm)	Floración	Autores
Huesca: Torla	1540-1750	21/05	Benito- Alonso (2008)
Hueca: Fanlo	1900-2150	03/05	Benito-Alonso (2008)
Huesca: Puertólas	1720-1985	23/05-21/07	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>

**Tabla. 9.** *Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie C. nevadensis. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica.*

Localidad	Altura (msnm)	Floración	Autores
Huesca: Ribagorza y Jacetaina	760 y 1720	07/02-29/03	Moreno-Saiz y Sainz -Ollero (1992)
Lérida: Camarasa y Solsona	350 y 930	02/03	Moreno- Saiz y Sainz- Ollero (1992)
La Rioja: Lazagurria	400	06/02	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
La Rioja: Los Tomillares y Alcanadro	430	24/02	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Guadalajara: Villanueva de Alcorcón	1200	01/03	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Cuenca: Barajas de Melo	670	15/02	Sanz y Redó (1998)
Cuenca: Ciudad encantada	1400	16/03	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Valencia: Sierra del Negrete	1000	02/03-09/03	Barra (1983)
Albacete: S <sup>a</sup> de Alcaraz	1150	07/02	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Albacete: S <sup>a</sup> Calar del Mundo	1400	10/02	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Jaén: S <sup>a</sup> de Segura y S <sup>a</sup> de Cazorla	1350 y 1550	11/02	Sotomayor (1979)
Granada: S <sup>a</sup> de Huétor y S <sup>a</sup> Nevada	1800 y 2000	27/02-05/03	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Córdoba: Carcabuey	600	22/02	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Murcia: S <sup>a</sup> de Mojantes	1200	02/03	Ortiz (1979)
Murcia: S <sup>a</sup> de la Muela	1250	19/03	Ortiz (1979)

Tabla. 10. Fechas de floración según puntos geográficos de colecta de la especie *C. carpetanus*. Se indica altura (msnm) y la cita bibliográfica.

Localidad	Altura(msnm)	Floración	Autores
Pontevedra: Covelo	830	23/03	Camaño-Portela <i>et al.</i> (2009)
Orense: Penagacha	950	08/02	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Orense: S <sup>a</sup> do Xurés	1500	30/04	Camaño-Portela <i>et al.</i> (2008)
León: S <sup>a</sup> de la Cabrera	1700	02/02	Nieto-Feliner (1985)
León: Montes Aquilanos	1700	16/04	Nieto-Feliner (1985)
Ávila: S <sup>a</sup> de Gredos	2050	18/03	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Madrid: S <sup>a</sup> de Guadarrama	1200-2100	20/03	Cebolla Lozano y Rivas Ponce (1994)
Cáceres: PN Monfragüe	500	12/03	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Cáceres: La Vera	750	06/03	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Cáceres: S <sup>a</sup> de Gata	600-1200	06/03	<a href="http://www.anthos.es">http://www.anthos.es</a>
Toledo: Montes de Toledo	1000	01/03	Moreno Saiz y Sainz Ollero (1997)

Se observa que existe variación tanto entre especies como dentro de una misma especie y en función del lugar de recolección. Así, entre las especies otoñales la más temprana es *C. nudiflorus* que puede florecer a primeros de septiembre en lugares de elevada altitud. No obstante, en esta misma especie, se observa floración hasta noviembre en algunas entradas recolectadas (Tabla. 6). La especie otoñal más tardía es *C. cambessedesii* (Tabla. 7), que florece en el mes de diciembre, tanto a altitudes de menos de 100 msnm como en zonas altas de montaña (1350 msnm).

Las especies de floración primaveral inician su floración en febrero. *C. nevadensis* florece desde principios de febrero a finales de marzo (Tabla. 9). *C. carpetanus* también inicia su floración en febrero. No obstante, en la mayoría de localizaciones, se observa su floración durante el mes de marzo, y se han llegado a señalar para algunas entradas fechas de floración en abril. (Tabla. 10). La especie primaveral más tardía es *C. vernus*, que florece durante el mes de mayo. Su floración se ha registrado en escasas ocasiones y siempre en zonas del Pirineo de elevadas altitudes (Tabla. 8).

Hay que tener en cuenta un factor no registrado en estas bases de datos que es la disponibilidad de agua durante el año citado, lo que podría explicar las diferencias observadas que no son debidas a la altitud, si bien no pueden descartarse diferencias genotípicas dentro de especie. Cuando las condiciones climáticas son las adecuadas, el tamaño del cormo es el factor principal que determina la capacidad de floración, de forma que en numerosos trabajos se ha descrito una relación muy estrecha entre el tamaño del cormo y la floración, en la especie cultivada (Pandy y Srivastava 1979; Negbi *et al.*, 1989; De Mastro y Ruta, 1993; Le Nard y De Hertog, 1993, De Juan *et al.*, 2009). Ahora bien, aunque el tamaño del cormo afecta a la cantidad de flores no está

## I. INTRODUCCIÓN

---

relacionado con el tamaño de la flor (De Mastro y Ruta 1993; Baghalian *et al.*, 2010; Pastor-Férriz, 2011). En otras especies de *Crocus* no se ha publicado esta relación numérica entre el tamaño del cormo y la floración, si bien es de esperar que exista. En otras especies de bulbosas de la misma familia como *Gladiolus* (Bose *et al.* 2003; Uddin *et al.* 2002; Sharma y Gupta, 2003) el tamaño del cormo madre mejora la floración al aumentar el número de flores por cormo.

En el género *Crocus* **la salida de la hoja** puede ocurrir de forma simultánea a la floración, unos días después, o retrasarse un largo período de tiempo. Este último fenómeno fisiológico consistente en la aparición de las flores antes que las hojas (histerantia), no es raro en plantas bulbosas. En algunas especies de *Crocus* silvestres de floración otoñal (*C. nudiflorus*, *C. speciosus*, *C. pulchellus*, entre otros), la salida de la hoja se presenta meses después de acabada la floración. Este fenómeno aparece en especies de floración otoñal que se desarrollan en zonas de inviernos fríos y de alta montaña. Las hojas emergen cuando las temperaturas vuelven a subir tras el invierno. En secciones transversales de tallo de estas especies, se ha visto la presencia de hojas sin desarrollar y en estado latente hasta que emergen (Ozdemir y kilinç, 2008).

Este carácter tiene una especial importancia en la especie cultivada que no presenta histerantia, ya que con el conocimiento y control de este proceso en azafrán, se podrían obtener producciones de flores sin hojas, lo que facilitaría la recolección mecanizada y sin dañar la parte vegetativa de la planta. Se sabe que las condiciones de secano retrasan la salida de la hoja. En cualquier caso, el no aplicar agua retrasa la aparición de brotes, hojas y flores (Moya *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2004a). No obstante, se desconoce la fisiología de este proceso, y la influencia de la temperatura en el mismo.

En las especies de *Crocus*, florezcan en primavera u otoño, con o sin hojas, el desarrollo de las hojas alcanza su máximo desarrollo justo cuando el fruto comienza a madurar (Foerste, 1892).

La fisiología del **desarrollo del cormo** en el género *Crocus* ha sido poco estudiada, existiendo trabajos únicamente en la especie cultivada (Renau-Morata *et al.*, 2013) y en *C. vernus* (Badri *et al.*, 2007; Lundmark *et al.*, 2009). En el azafrán, el desarrollo del cormo hijo comienza tras la floración que tiene lugar en otoño, y concluye con anterioridad a la senescencia total de las hojas, que tiene lugar al final de la primavera. En *C. vernus*, que florece en primavera, la salida de la hoja es anterior a la floración y se ha descrito que, al inicio de la floración, ya existe una cierta acumulación de almidón en los nuevos cormos (Badri *et al.*, 2007). En esta especie, también se ha observado que, a temperaturas elevadas, el crecimiento del cormo cesa antes que aparezcan señales visuales de senescencia de las hojas. En ambas especies, parece que la duración de la hoja, por sí sola, no es el factor que determina el final del crecimiento del cormo (Lundmark *et al.*, 2009; Renau-Morata *et al.*, 2013). Los trabajos realizados en *C. vernus* y azafrán parecen señalar que una disminución en la demanda de fotoasimilados por parte del cormo puede conducir a la acumulación de azúcares en hojas, lo que, a su vez, conduce a la senescencia

de las mismas (Lundmark *et al.*, 2009; Renau-Morata *et al.*, 2013). Los trabajos desarrollados en *C. vernus* apoyan la hipótesis de que la fuerza de sumidero del cormo es el factor más importante en determinar la duración de la vida de la hoja, y un factor muy relevante en este proceso es la temperatura (Lapointe, 2001; Badri *et al.*, 2007).

Generalmente, la tasa de crecimiento y el tamaño final de las plantas se reduce cuando el desarrollo vegetativo ocurre a bajas temperaturas, aunque estas plantas estén adaptadas a estas condiciones (Körner y Larcher, 1988). Sin embargo, en geófitos efímeros que brotan al principio de la primavera como es *C. vernus*, se ha observado que crecen mejor a bajas temperaturas, alcanzando un mayor desarrollo final de sus órganos vegetativos (De Hertogh y Le Nard, 1993; Nault y Gagnon, 1993; Lapointe y Lerat, 2006). Lundmark *et al.* (2009) han propuesto que es una variación en la partición de fotoasimilados, cuando el crecimiento tiene lugar a mayores temperaturas, lo que da lugar a una biomasa final menor, y que estas diferencias no se deben a una duración de la hoja limitada. En otras especies de *Crocus* no se ha estudiado este proceso. La información obtenida a partir de empresas productoras de azafrán (comunicación personal de técnicos que trabajaron en la *Compañía General del azafrán de España S.A.*), parece indicar que la situación en la especie cultivada podría ser distinta, ya que se obtienen cormos de mayor tamaño en lugares con climas más cálidos. En azafrán se ha observado que cuando la brotación se produce a temperaturas elevadas, el número de brotes por cormo se reduce, lo que podría dar lugar a cormos de mayor tamaño (Molina *et al.*, 2010).

La mayoría de las especies de *Crocus* se pueden multiplicar tanto por semillas como por cormos. Debido a la esterilidad, unas pocas especies se propagan únicamente por cormos (Negbi *et al.*, 1989; Plessner *et al.*, 1989), como la especie cultivada azafrán, *C. sativus* (especie triploide) (Chichiricco, 1984; Ghaffari, 1985).

Cuando las semillas de *Crocus* son sembradas directamente tras su cosecha, dan resultados aceptables en la mayoría de casos. La **germinación de las semillas** en otoño, de especies que sacan sus hojas antes del invierno, es muy común y poco problemática. No obstante, algunas plántulas no superan el frío del invierno. En estos casos, se debe adelantar la siembra (Rukšāns, 2010). Bowles (1952) recomienda sembrar no más tarde de la primera semana de septiembre.

Son escasos los trabajos realizados sobre la rotura de la latencia en el género *Crocus*. Cuando no se han utilizado tratamientos y la germinación se ha dado a temperatura ambiente, las semillas de la especie primaveral *C. olivieri* comienzan a germinar 154-179 días después de la siembra, en el mes de octubre y noviembre (Vurdu, 2004). Ahora bien, la emergencia de la radícula se puede promover por la aplicación de un periodo de altas temperaturas (almacenamiento a temperaturas elevadas o *after-ripening*, cercanas a los 20°C). Este fenómeno se ha observado, tanto en especies de floración primaveral como otoñal (Carta *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2013). Este hecho tendría sentido biológico ya que un periodo estival necesario para romper la latencia, previene la germinación de las semillas

## I. INTRODUCCIÓN

---

durante el verano, teniendo ésta lugar posteriormente a temperaturas más bajas y cuando hay disponibilidad de agua. No obstante, se observó germinación sin este tratamiento *after-ripening* cuando la germinación se produce a temperaturas más elevadas (20°C día/10°C noche) (Carta *et al.*, 2014).

La estratificación en frío, después de un periodo de *after-ripening*, es necesaria para promover la salida del brote al exterior en especies de floración primaveral temprana como *C. neapolitanus*. No obstante, otras especies de floración primaveral temprana como *C. etruscus* y *C. ilvensis* no presentan ningún tipo de latencia, y la salida del brote al exterior sucede de forma continua y lentamente (Carta *et al.*, 2014). Sin embargo en especies de floración otoñal, como es el caso de *C. cartwrightianus*, la aplicación de frío intenso (4°C) perjudica la germinación (Grilli-Caiola, 2005).

El efecto de los tratamientos con GA<sub>3</sub> varía entre especies. Así, son inefectivos en la germinación de *C. alatavicus* (Fu *et al.*, 2013) Sin embargo, semillas de las especies *C. olivieri* subsp. *balansae*, *C. chrysanthus*, *C. baytopiorum*, *C. pallasii* subsp. *pallasii* incrementaron su tasa de germinación (80%) tras aplicar GA<sub>3</sub> (4 horas, 250 ppm) (Haspolat *et al.*, 2013).

Hay que señalar que en algunas especies se ha observado que la emergencia de la radícula y la emergencia del cotiledón a la superficie sucede de forma separada en el tiempo, siendo procesos fisiológicos con distintos requerimientos térmicos (Carta *et al.*, 2014). Así, por ejemplo, en *C. alatavicus* (de floración otoñal tardía) en condiciones naturales, la radícula emerge a principios de otoño, y la emergencia de los cotiledones se retrasa hasta la siguiente primavera (Fu *et al.*, 2013). En esta especie el desarrollo del brote está controlado por una latencia del epicótilo.

En la mayoría de las especies de *Crocus*, se obtienen cormos con capacidad de florecer, al cabo de cuatro años de engordar los cormos procedentes de semillas, pero en algunas especies el tamaño de floración del cormo se alcanza a los 18 meses de cultivo, como es el caso de *C. gargaricus* (Rukšāns, 2010). El tiempo que tarda un cormo de 1g en alcanzar el peso de producción de flores máxima suele ser de tres años (Benschop, 1993).

### 7.3 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA

#### 7.3.1 METABOLITOS SECUNDARIOS EN ESTILOS Y TÉPALOS DE AZAFRÁN Y OTRAS ESPECIES DE *CROCUS*.

Las flores del género *Crocus* muestran una elevada variabilidad en el color de los tépalos desde blanco, amarillo, marrón pálido, púrpura o lila, malva o azul. También el color de los estigmas varía desde blanco, amarillo, naranja a rojo intenso, como en el caso del azafrán y especies relacionadas. Estos colores de las flores son debidos a la presencia de pigmentos biológicos que incluyen carotenoides y flavonoides (Ríos *et al.*, 1996; Abdullaev, 1993, 2002, 2004; Wintherhalter y Straubinger, 2002).

La gran mayoría de los estudios sobre análisis químico realizado en el género *Crocus* se centran en los estilos de la especie cultivada azafrán (*C. sativus*), si bien también se han llevado a cabo estudios en los tépalos de estas especies (Nørbæk *et al.*, 2002; Rubio Moraga *et al.*, 2013). También se ha publicado algún trabajo sobre el contenido en carotenoides en los estilos de otras especies (Castillo *et al.*, 2008; Moraga *et al.*, 2013).

Los principales metabolitos secundarios responsables de las propiedades del azafrán, y que se acumulan durante el desarrollo del **estilo** son derivados de carotenoides. Los productos resultantes de la rotura y oxidación de estos carotenoides son los carotenoides *cis* y *trans* crocinas, la picrocrocina, y el producto de su degradación que es un compuesto aromático, el safranal (Tarantilis *et al.* 1995; Kanakis *et al.*, 2004; Carmona *et al.*, 2006a).

Las crocinas ( $C_{44}H_{64}O_{24}$ ) incluyen las crocinas 1-4, que son ésteres glucosilados de la *trans*-crocetina, siendo la crocina 1 la más abundante en azafrán y la más estudiada en farmacología. La *cis*-crocetina y sus derivados glicosídicos son componentes minoritarios. Las crocinas son solubles en agua y se oxidan en presencia de luz y oxígeno, por esta razón se recomienda preservar la especia de la luz y el aire (Carmona *et al.*, 2006a).

El azafrán también contiene en menor cantidad picrocrocina ( $C_{16}H_{26}O_0$ ) y su aglicona safranal. La picrocrocina [4-( $\beta$ -D-glucopiranosilo)-2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-carboxaldehído] es un glucósido incoloro responsable del sabor característico de la especia. Éste es un compuesto soluble en agua y en alcohol, ligeramente soluble en éter y cloroformo. El safranal (2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadien-1-carboxaldehído  $C_{10}H_{14}O$ ) es un compuesto lípidico volátil, poco soluble en agua, responsable del aroma. Éste normalmente se cuantifica mediante cromatografía de gases o espectroscopia de FT-IR (Pappas *et al.*, 2007).

Actualmente, la vía más apoyada para la biosíntesis de la crocetina es la degradación oxidativa de un carotenoide, la zeaxantina (Figura 37) (Pfander y Schurtenberger, 1982). Ésta se sintetiza en los cromoplastos del estigma a través de la ruta biosintética de los carotenoides (Castillo *et al.*, 2005; Ahrazem *et al.*, 2010) y es el precursor de los apocarotenoides de azafrán. El enzima CCD2, localizado en el cromoplasto (Ahrazem *et al.* . En prensa. Comunicación personal), cataliza la rotura de los dobles enlaces 7,8 y 7'-8' de este carotenoide para dar lugar a una molécula de dialdehído de crocetina y dos de 8-hidroxi- $\beta$ -ciclocitral (Fruschiante *et al.*, 2014). Estos dos productos son oxidados y glucosilados (Moraga *et al.*, 2004) para producir los apocarotenoides solubles que se acumulan en las vacuolas (Grilli y Canini, 2004). La picrocrocina podría también producirse a partir de la zeaxantina por la actividad de una dioxigenasa (Lourdes Gómez-Gómez, comunicación personal).

## I. INTRODUCCIÓN

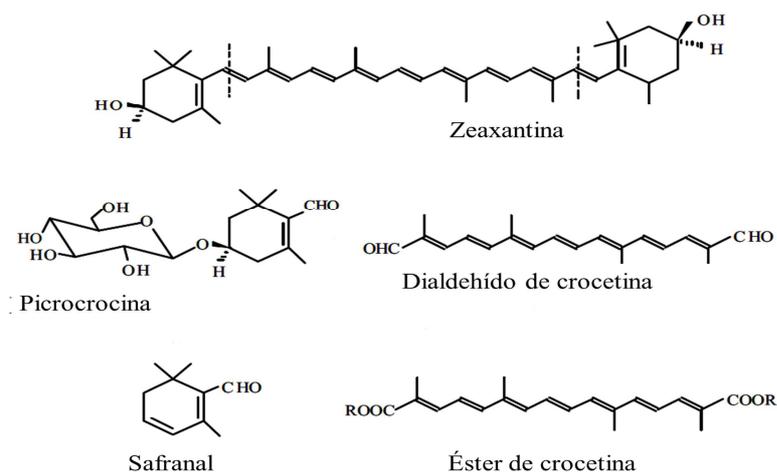


Figura 37 Estructura molecular de los compuestos más importantes del azafrán (Adaptado de Carmona *et al.*, 2006b).

Se ha descrito que la picrocrocina, por acción del calor producido en el tostado de los estigmas, se descompone dando lugar al aldehído volátil llamado safranal responsable del aroma (Himeno y Sano, 1987; Lozano *et al.*, 1999) (Figura 38). El proceso de tostado de los estigmas depende de las tradiciones culturales de cada país. Tras la evaluación de diferentes sistemas de deshidratación, Carmona *et al.* (2005) ha revelado que es preferible que el tiempo de deshidratación sea corto, en torno a media hora, y a temperaturas superiores a 70°C. La transformación de la picrocrocina en safranal durante el proceso de deshidratación tiene lugar bien por la temperatura que se alcanza o por la acción de glicosidasas (Himeno y Sano, 1987; Iborra *et al.*, 1992; Lozano *et al.*, 1999).

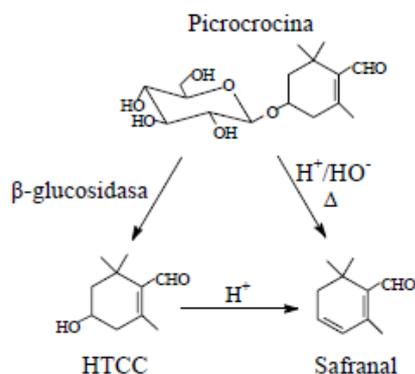


Figura 38 .Esquema de la formación química o enzimática del safranal a partir de la picrocrocina (Himeno y Sano, 1987).

Otra vía de obtención del safranal tendría lugar a partir de la crocina por la acción de una carotenasa (Figura 39). Carmona *et al.* (2006a) observaron cómo los compuestos odorantes C9 y C10 no se encuentran en gardenia y sí en azafrán por la presencia de dicho enzima. Estos resultados son coherentes con los obtenidos anteriormente por Himeno y Sano, 1987, que observaron que en el momento de la anthesis se producía, además de la disminución del contenido de picrocrocina, un descenso muy importante del contenido de crocina al que no encontraron una explicación adecuada.

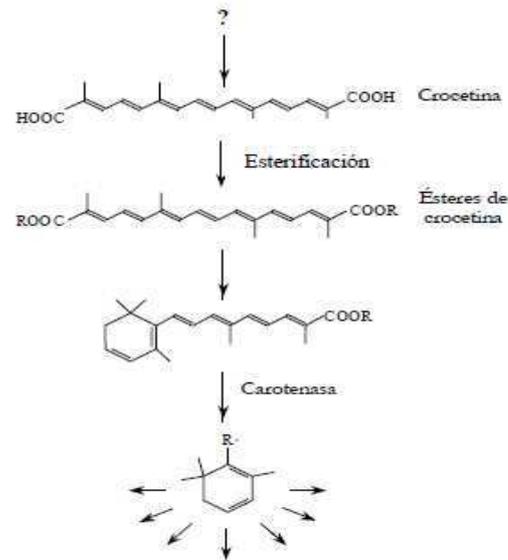


Figura 39 . Hipótesis para la formación de compuestos volátiles presentes en el aroma del azafrán a partir de los ésteres de crocetina (Carmona *et al.*, 2006a).

Tomando como referencia los trabajos de Himeno y Sano (1987), Carmona *et al.* (2006a) sugieren una nueva hipótesis de generación del aroma a partir de las crocinas, que de forma esquemática se recoge en la Figura 40. Este trabajo sugiere que durante el desarrollo del estigma, el compuesto HTCC (4-hidroxi-2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadien-1-carbaldehído), formado a partir de las crocinas, podría transformarse en picrocrocina. En el momento de la antesis, una o varias glicosilas actuarían sobre la picrocrocina, convirtiéndola, de nuevo, en HTCC. La concentración del HTCC crecería mucho, y no sólo por la transformación de la picrocrocina, sino también porque una carotenasa actuaría activamente sobre las crocinas (Carmona *et al.*, 2006a). El safranal se produciría a partir del HTCC.

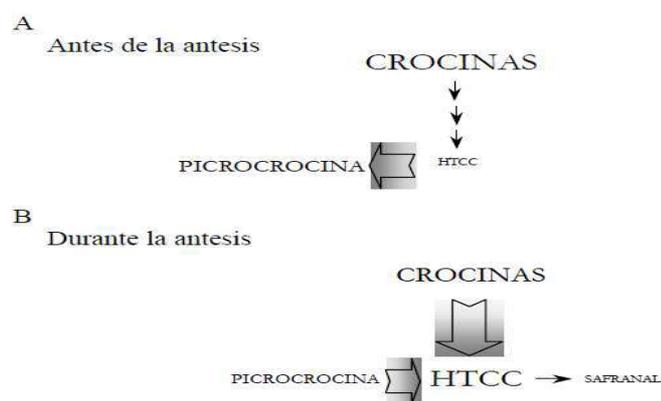


Figura 40 Hipótesis de la formación de HTCC y safranal antes de (A) y durante la antesis de *C. sativus* (B) según Carmona *et al.* (2006a).

También se han identificado flavonoides en los estigmas del azafrán. El primer flavonoide identificado en un extracto de estigmas de azafrán con metanol y agua fue el

## I. INTRODUCCIÓN

---

kaempferol diglucósido (Tarantilis *et al.*, 1995). Otros flavonoides presentes en los estigmas de azafrán son cinco derivados del kaempferol. Se identificaron los flavonoides kaempferol-3-soforósido, kaempferol-3-soforósido-7-glucósido y kaempferol-3,7,4-O-triglucósido, y se detectó la presencia de kaempferol tetrahexósido y kaempferol-3-dihexósido (Carmona *et al.*, 2007).

La variabilidad observada entre diferentes muestras de la especie azafrán principalmente dependen de los métodos empleados en el secado de los estigmas, en la extracción y en el análisis (Kanakis *et al.*, 2004; Lozano *et al.*, 2000; Zareena *et al.*, 2001 extraído de Lage y Cantrell, 2009). La temperatura del secado es un factor determinante. También las condiciones edafoclimáticas del cultivo, el cosechado, la monda, la manipulación de los estigmas, el almacenado, y envasado tienen gran influencia (Carmona *et al.*, 2005).

La altitud dónde se desarrolla el cultivo de azafrán influye positivamente en la producción de crocinas. La textura del suelo (arcillosa) se relaciona directamente con la producción de safranal (Lange y Cantrell, 2009). La calidad del azafrán también se ha observado que está relacionada inversamente con el número de flores por corno y positivamente con el peso de los estigmas (Gresta *et al.*, 2008).

Ensayos llevados a cabo con azafrán iraní de diferentes orígenes geográficos, señalan la posible existencia de diferencias genéticas para la producción de crocinas, picrocrocina y safranal (Baghalian *et al.*, 2010). Asimismo, el análisis de azafrán de diferentes orígenes geográficos también mostró diferencias en el contenido en kaempferol 3-soforósido (Carmona *et al.*, 2007).

Existen escasos trabajos sobre la caracterización fitoquímica de los estigmas de las restantes especies de *Crocus*. En el trabajo publicado por Castillo *et al.* (2005) en diferentes especies que pertenecen tanto a la sección *Nudiscapus* como *Crocus*, y dentro de esta última, a las series *Crocus*, *Longiflori* y *Versicolor*, se señala el mayor nivel de apocarotenoides de las especies que se ensayan de la serie *Crocus* (*C. cartwrightianus*, *C. hadriaticus*, *C. sativus* y *C. pallasii*).

Asimismo, resultados previos del proyecto europeo CROCUSBANK (AGRI GEN RES 018, 2007-2011) año 2010 (comunicación personal del Laboratorio de Química y Tecnología de los Alimentos, de la Facultad de Química de la Universidad Aristotélica de Tesalónica, en Grecia) señalan que el perfil de apocarotenoides de los estigmas de las especies *C. cartwrightianus*, *C. thomasi* y *C. longiflorus* es, en cierto modo, el más similar a aquel que presenta la especie cultivada (de un total de 17 especies diferentes analizadas, que no incluyen ni *C. hadriaticus*, ni *C. pallasii*). Sin embargo, el poder colorante de estas especies silvestres es muy reducido, en comparación con el de la especie. Los parámetros relacionados con el poder aromático y el sabor, sí que muestran valores similares con el azafrán. Basándose en las diferencias cualitativas y cuantitativas observadas en el análisis de los cromatogramas obtenidos mediante HPLC sugieren que la

identificación de otros metabolitos distintos a los carotenoides será de gran utilidad para diferenciar las especies silvestres, ya que estos componentes se encuentran en mayor cantidad.

En un trabajo reciente (Moraga *et al.*, 2013), se estudia el contenido en crocinas de los estilos de otras 7 especies (*C. ancyrensis*, *C. angustifolius*, *C. chrysanthus*, *C. olivieri*, *C. korolkowii*, *C. vitellinus* y *C. sieberi*). Se observan diferencias entre especies y, con alguna excepción (*C. olivieri* y *C. vitellinus*), no existe una mayor similitud entre especies de la misma serie.

En los **tépalos** de las especies de *Crocus* se han identificado antocianinas, siendo las principales antocianinas presentes la petunidina y la delfinidina (Nørbæk *et al.*, 2002). Los pigmentos crocinas también son responsables de las coloraciones de los pétalos amarillos que presentan algunas especies de *Crocus* (Moraga *et al.*, 2013). Ambos compuestos, antocianinas y carotenoides, a menudo se presentan en los mismos órganos, y su combinación incrementa la variedad de colores.

En un estudio realizado por Nørbæk *et al.* (2002) en que se analizó mediante HPLC el contenido en antocianos y otros flavonoides en 70 especies, 43 cultivares y 6 híbridos artificiales del género *Crocus*, se detectaron 9 antocianinas. Los genotipos analizados podían separarse en 7 quimiotipos de acuerdo con su contenido en 3,7-di-O-, 3,5-di-O-glucósidos o 3-O-rutinósidos de delfinidina y petunidina, y a la presencia de 3,7-di-O-malonil-glucósidos de petunidina y malvidina y de delfinidina 3-O-glucósido-5-O-malonilglucósido. Estos antocianos sólo se han encontrado en *Crocus* y pueden ser característicos de este género. En cada taxón se detectaron los mismos 18 flavonoides. Sin embargo, se dieron diferencias cuantitativas y 4 quimiotipos fueron definidos por un mayor contenido en flavonoides. Los autores afirman que los patrones de composición de antocianinas pueden ser una herramienta de interés para complementar las clasificaciones taxonómicas basadas en caracteres morfológicos y citológicos. La mayoría de los quimiotipos definidos están representados en las diferentes series, pero estos datos químicos pueden ser útiles para diferenciar entre especies. Para todas las especies, excepto las de la serie *Biflora* los datos sobre composición química en estos compuestos fueron muy similares para todas las subespecies y entradas de una misma especie, y los quimiotipos dentro de una serie fueron más similares que entre series. No obstante, en 6 especies los análisis sugieren la necesidad de una mayor investigación.

En relación a las especies españolas, hay que señalar que en los tépalos de flores de las especies *C. carpetanus*, *C. clusii*, *C. serotinus*, *C. nudiflorus* y *C. sativus* se ha identificado la presencia delfinidina 3,5-di-O- $\beta$ -glicósido y petunidina 3,5-di-O- $\beta$ -glicósido. El flavonoide petunidina 3-O- $\beta$ -rutinósido se ha identificado únicamente en *C. carpetanus* y *C. sativus*, y el flavonoide delfinidina 3-di-O- $\beta$ -glicósido-5-O- $\beta$ -(6-O-malonil) glicósido en las especies *C. nudiflorus* y *C. sativus*. En tépalos de *C. sativus* se han detectado una mayor variabilidad de flavonoides, hasta un total de siete diferentes (Nørbæk *et al.*, 2002).

Recientemente, los tépalos de 7 especies de *Crocus* (*C. ancyrensis*, *C. angustifolius*, *C. chrysanthus*, *C. olivieri*, *C. korolkowii*, *C. vitellinus* y *C. sieberi*) fueron analizados, poniéndose de manifiesto la presencia de crocinas altamente glucosiladas en estos tejidos (Moraga *et al.*, 2013). El  $\beta$ -caroteno era el precursor de estas crocinas y algunas de ellas contenían ramnosa, lo que no se había publicado con anterioridad. Al comparar los perfiles de crocinas de tépalos y estigmas de estas 7 especies se encuentran diferencias, incluyendo la presencia de nuevos carotenoides. Además, cada especie muestra un perfil característico y no hay una relación con la filogenia de las especies. Esta identificación de crocinas en tépalos tiene especial interés, dado el amplio abanico de aplicaciones de estos compuestos en medicina, cosmética e industrias agroalimentarias y de colorantes.

### 7.3.2 TÉCNICAS APLICADAS EN LA DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES EN LOS ESTILOS DE AZAFRÁN Y OTRAS ESPECIES DE *CROCUS*

En general, la gran mayoría de los estudios sobre análisis químico de los estilos realizados en el género *Crocus* han tenido como uno de los objetivos principales la evaluación de la calidad de la especia azafrán y la detección de fraudes (Lozano *et al.*, 1999; Ordoudi y Tsimidou, 2004; Maggi *et al.*, 2011; Ordoudi *et al.*, 2014). Exponemos, a continuación, las técnicas más utilizadas para estos fines y los compuestos que son capaces de detectar.

#### *Análisis de estilos de azafrán mediante espectrofotometría del UV-Vis*

El análisis de los pigmentos presentes en los estilos se puede realizar mediante diferentes métodos espectrofotométricos, que incluyen la espectrofotometría del ultravioleta-visible (UV-Vis) (Orfanou y Tsimidou, 1996; Sánchez *et al.* 2008 a y b).

El espectro de UV-Vis de una solución acuosa de azafrán presenta tres bandas de absorciones principales y típicas de los compuestos carotenoides (Figura 41). La primera banda se encuentra entre 400 y 500 nm es característica de todos los pigmentos carotenoides. La segunda banda se presenta en la región ultravioleta entre 320 y 340 nm y se atribuye principalmente a la presencia de los enlaces dobles *cis* en las crocinas, característico de la absorbancia de todos los mono-*cis*-carotenoides. La tercera banda se observa en 256 nm de la longitud de onda, y corresponde con los enlaces glicosil éster de las crocinas. Los isómeros *cis* muestran siempre estas tres bandas de absorción. Los isómeros *trans* muestran dos bandas de absorción, la primera entre 400-500nm y la segunda a 246 nm (Tarantilis *et al.* 1995).

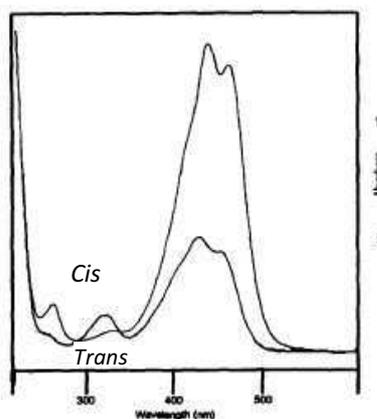


Figura 41 Espectro el UV-visible de los isómeros *cis*- y *trans*-crocin-4 (Tarantilis *et al.*, 1995).

Sin embargo, cambiando el solvente se pueden inducir variaciones en la  $\lambda_{\text{max}}$  y la absorbancia (Speranza *et al.*, 1984). Por esto, en metanol puro los extractos de azafrán muestran cuatro picos a 253, 319, 430 y 455 nm ( $\lambda_{\text{max}} = 430$  nm), mientras que en metanol-agua (50:50) se observan tres bandas a 256, 323 y 437 nm ( $\lambda_{\text{max}} = 437$  nm) (Tarantilis *et al.* 1994).

El espectro UV-Vis de la picrocrocina (Figura 42) exhibe una banda amplia característica a 250 nm debido al cicloaldehído  $\alpha,\beta$ - insaturado presente en la molécula; y una segunda banda a 350 nm. La oxidación del grupo aldehído da lugar a la forma ácida de la picrocrocina y es responsable de la banda de absorción que aparece a 246 nm en el espectro. El compuesto volátil safranal presenta una banda característica en el espectro de absorción del UV a 308 -310 nm (Tarantilis *et al.* 1994).

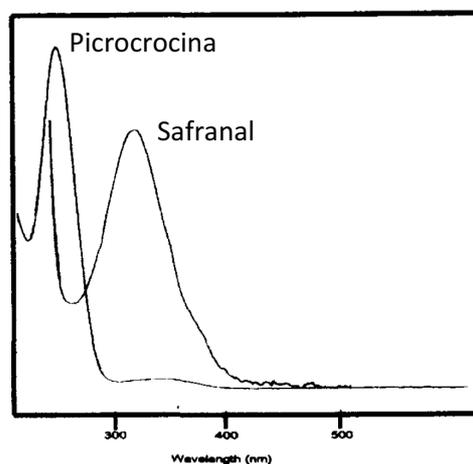
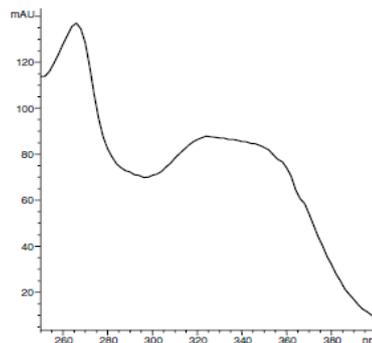


Figura 42 Espectro UV-vis de la picrocrocina y safranal (Tarantilis *et al.* 1995).

Otros compuestos flavonoides también están presentes en el extracto de azafrán. Estos compuestos presentan sus máximos de absorbancia en las longitudes de onda 260 y 380 nm (Figura 43).



**Figura 43** Espectro de absorbancia en el UV del compuesto flavonoide kaempferol-3,7,40-triglucoside. (Carmona et al. 2007)

### *Análisis de estilos de azafrán mediante cromatografía HPLC*

La cromatografía es una técnica muy eficiente en el análisis de los componentes del azafrán. La técnica cromatográfica más popular es la técnica de cromatografía líquida de alta presión o alta eficacia (HPLC), con detección en el UV-Vis. Esta técnica se ha usado para la cuantificación de crocinas, y para la determinación de picrocrocina, safranal, HTCC y diferentes flavonoides. La más comúnmente aplicada es la técnica HPLC en fase reversa (RP-HPLC), acoplada también con un detector de UV-vis, y más a menudo con un detector de fotodiodo (DA) (Caballero-Ortega *et al.*, 2007; Tarantilis *et al.*, 1994) y con un espectrómetro de masas (Tarantilis, 1995). La cromatografía de gases combinada con un espectrofotómetro de masas para detectar compuestos volátiles es frecuentemente utilizada (Narasimhan *et al.*, 1992; Tarantilis y Polissiou, 1997; Carmona *et al.*, 2006b). La cuantificación por separado de los análogos de las crocinas mediante HPLC es difícil. Es posible cuantificar de forma simultánea más de un metabolito aplicando el método del estándar externo (Li *et al.*, 1999).

En los perfiles cromatográficos, la representación de la señal del detector UV-Vis frente al tiempo (tiempo de retención) da una serie de picos que corresponden a cada uno de los analitos. Este gráfico resultante, que se le conoce como cromatograma, se puede emplear para llevar a cabo análisis cualitativos y cuantitativos.

Los cromatogramas típicos de un extracto de azafrán realizado con una mezcla de agua-metanol (50:50) obtenido a 440 nm es el que se muestra en la Figura 44 (Tarantilis *et al.* 1994).

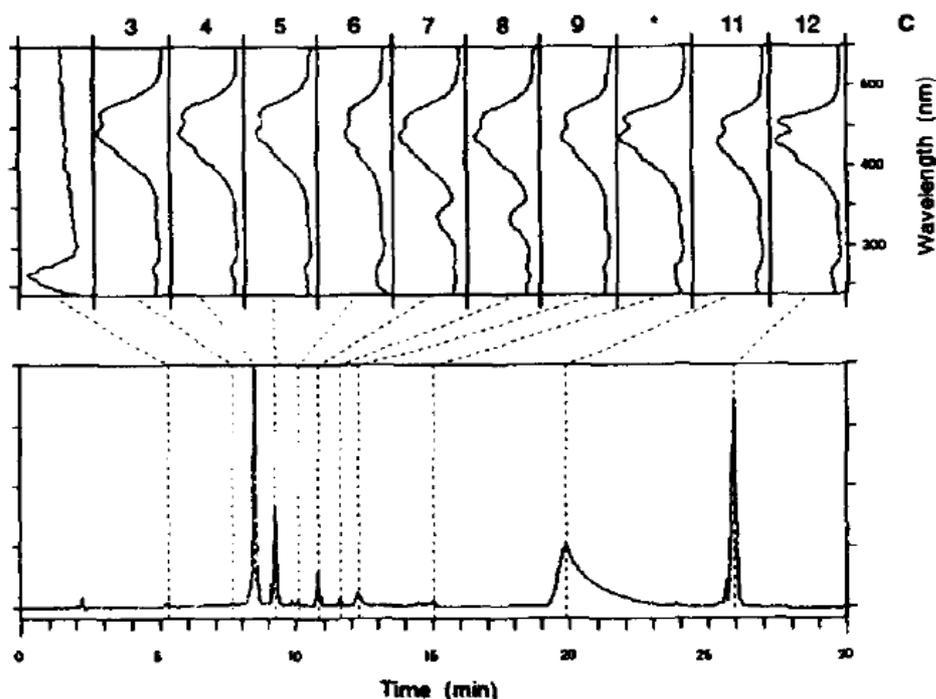


Figura 44 Perfil cromatográfico de *C. sativus* a 440 nm obtenido mediante HPLC (Tarantilis *et al.* 1994).

Los picos 3, 4, 5, 6 y 9 pertenecen a *trans*-crocinas y los picos 7 y 8 a las *cis*-crocinas. Los picos 11 y 12 podrían identificarse como crocina y dimetilcrocina, respectivamente. Los tres picos menores con tiempos de retención 14,4 min, 16,8 min y 26,3 min son también carotenoides. Según el tiempo de retención, las *trans/cis*-crocinas eluyen entre los minutos 8,5 y 15 min, las *trans/cis*-crocina en los minutos 20 y 20,5 y las *cis/trans*-dimetilcrocina en los minutos 25,8 y 26,3 (Tarantilis *et al.* 1994).

Los cromatogramas obtenidos a partir de un extracto de azafrán en metanol-agua (50:50) estudiado en las longitudes de onda 250, 310 y 440 nm se muestra a continuación en la Figura 45 (Lozano *et al.* 1999).

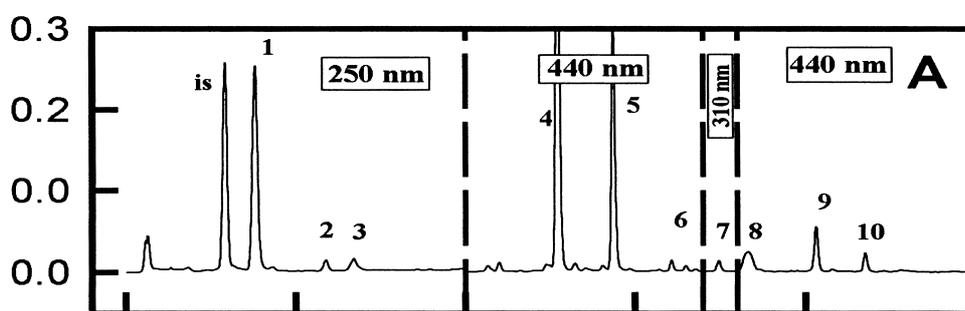


Figura 45 Perfil de HPLC de un extracto de estilos de azafrán a 250, 310 y 440 nm (Lozano *et al.* 1999).

Teniendo en cuenta el tiempo de retención y el espectro de cada pico se han identificado los principales compuestos. El pico (1) corresponden a la picrocrocina, el (2) al HTCC, el (3) al kaempferol 3-gentiobiosil, el (4) a la crocina 1, el (5) a la crocina 2, el (6) a la

## I. INTRODUCCIÓN

---

crocina 3, el (7) a safranal, el (8) a la crocina 4, el (9) a la crocina 5 y el (10) a la crocina 6 y (is) al estándar interno (Lozano *et al.*, 1999).

### *Análisis de los estilos de Crocus mediante FT-IR*

La espectroscopía en el cercano infrarrojo (NIR, 10,000–4000  $\text{cm}^{-1}$ ) o mediano infrarrojo (MIR, 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ ), o Raman, en combinación con la quimiometría, ha demostrado ser muy útil en la cuantificación de los componentes principales de azafrán. Presenta las ventajas de que no requiere una preparación compleja de las muestras, permite trabajar sin solventes, sin consumir o destruir la muestra, y la adquisición de datos (espectros) es muy rápida. Los avances más significativos en la técnica se produjeron con el desarrollo de instrumentos que incorporan el método de transformada de Fourier (FT-IR), que ha mejorado la calidad de los espectros y minimizado el tiempo requerido para la obtención de datos. Una de las grandes ventajas de la espectroscopia IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, films, gases o superficies son algunos ejemplos.

Los principales picos de los espectros típicos de FT-IR de azafrán y su posible asignación a grupos químicos es la siguiente (Anastasaki *et al.*, 2010a; Coates, 2000; Kanou *et al.*, 2005; Nikonenko *et al.*, 2005; Sun, 2009):

- 3400  $\text{cm}^{-1}$  debido al grupo hidroxil (-OH).
- 3000-2830  $\text{cm}^{-1}$  se observan dos picos que corresponden a los enlaces C-H.
- 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  es la región de diferentes grupos característicos. El grupo carboxilo (-C=O, ésteres, cetonas, aldehídos), agua disponible y el anillo aromático.
- 1500-800  $\text{cm}^{-1}$  comprende la región de la huella dactilar. Los picos de esta región están asociados con los grupos radicales -CH<sub>2</sub>-, CH<sub>3</sub>-, -OH, C-C, C-O, C-O-C. La región espectral 1200-800  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona con la presencia de azúcares y polisacáridos.
- 980-945 y 780-700  $\text{cm}^{-1}$  debidos a la presencia de los isómeros C-H (*trans*-) y C-H (*cis*-) respectivamente.

Estudios llevados a cabo por Nakanishi y Solomon (1977) y Socrates (1997) utilizaron el espectro obtenido mediante la técnica de FT-IR para comparar el contenido en carotenoides entre azafrán y otras especies. En estos trabajos, se observó que la región de mayor interés se encuentra entre el número de onda 1500 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , ya que era en esta franja del infrarrojo donde presentan los máximos de absorción de radiación los compuestos que presentan los grupos -CH<sub>2</sub>-, CH<sub>3</sub>-, -OH, C-C, C-O, C-O-C. Los picos de absorción en la región de 800 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  están relacionados con la presencia de azúcares y polisacáridos (Pappas *et al.*, 2003). Es por ello que esta región se denomina “huella digital” y es de gran utilidad para comparar las especies de *Crocus* por su contenido en

carotenoides. No obstante, trabajos posteriores desarrollados por Tsimidou *et al.* (comunicación personal) han considerado conveniente ampliar la región de mayor interés hasta los 1800  $\text{cm}^{-1}$ .

Las crocinas y crocetas, en estado sólido tienen bandas de absorción en los números de onda 1706 y 1664  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, característicos de los grupos carbonilos, y en los números de onda 1228 y 1243  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a los ésteres o grupos ácidos. Dos bandas adicionales fuertes de absorción de las crocinas se localizan en 3402 y 1071  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a los grupos O–H y C–O de estos ésteres glucosílicos. Los picos de absorción O–H de la crocina a 3400  $\text{cm}^{-1}$  son menos intensos y menos amplios que en el caso de las crocetas (Tarantilis *et al.*, 1998). El safranal presenta bandas de absorción en la región espectral 1692 a 900  $\text{cm}^{-1}$  debido a los grupos carbonilos (Pappas *et al.*, 2007).

En general, las principales diferencias entre el perfil de los estigmas de azafrán y el de las otras especies del mismo género radica en la fuerte presencia de bandas en 1708  $\text{cm}^{-1}$  y en 1233  $\text{cm}^{-1}$  en *C. sativus*. Sin embargo, en las especies *C. cartwrightianus*, *C. thomasi* y *C. longiflorus* se ha detectado la presencia de bandas débiles a 1708  $\text{cm}^{-1}$  y a 1233  $\text{cm}^{-1}$  (Tarantilis *et al.*, 1998; Anastasaki *et al.*, 2010a).

Muestras de azafrán de diferentes países (Grecia, Italia, Irán y España) analizadas mediante espectroscopia de FT-MIR y FT-NIR mostraron el mismo perfil en la región 2000 – 700  $\text{cm}^{-1}$ . La única forma de discriminar su origen fue mediante la visualización de los espectros obtenidos a partir de extractos no-polares de los estigmas. Los picos observados en el infrarrojo debidos a la presencia de enlaces carbonilos (1745, 1670  $\text{cm}^{-1}$ ) y dobles enlaces (1600  $\text{cm}^{-1}$ ) son los responsables de la diferenciación (Zalacain *et al.*, 2005; Anastasaki *et al.*, 2010a). La variabilidad observada en esta zona se debe a diferencias en la composición del extracto, en términos de contenido lipídico y de safranal, debido a diferencias en el tratamiento post-cosecha que se realiza en las diferentes áreas de producción.

Entre todas las técnicas expuestas hay que señalar que la espectrofotometría UV-Vis es aquella más utilizada a nivel de industrial para determinar la calidad del azafrán. La calidad del azafrán está químicamente definida como la suma del poder colorante de sus pigmentos, la capacidad dar sabor amargo a la picrocrocina y la intensidad aromática de los compuestos volátiles (Carmona *et al.*, 2006a). La valoración de las características químicas que definen las calidades del producto se describen detalladamente en la Norma I.S.O. (International Standard Organization) 3632-1 y 2, creada en 1975, y revisada posteriormente en los años sucesivos. La norma se ha convertido en la más exhaustiva y la más utilizada en el comercio internacional del azafrán. En esta norma, las principales características del azafrán, según las cuales se clasifica la especie en categorías, se determinan mediante espectrofotometría UV-Vis de su extracto acuoso: poder amargo (expresado como  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  a 257 nm, longitud de onda en la que la picrocrocina muestra su máximo de absorbancia), aroma ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  a 330 nm, ídem para el safranal) y poder

## I. INTRODUCCIÓN

---

colorante ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  a 440 nm, ídem para la crocina). Este parámetro  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  se obtiene a partir de una fórmula dónde D es la absorbancia medida en las diferentes longitudes de onda, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm.

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{D \times 10000}{m(100 - H)}$$

Dónde D es la absorbancia; m es la masa de la muestra de azafrán en gramos; H es la humedad y el contenido volátil de la muestra, expresado en masa (%m/m).

Varios autores señalan que este método no es específico y es inadecuado para dar una categoría de calidad en el mercado internacional, al no establecer una concentración del compuesto (crocina, picrocrocina o safranal) para cada categoría de calidad, sino que simplemente establece un valor mínimo de absorbancia molar obtenido mediante espectrofotometría de UV-Vis (Lozano *et al.*, 1999; Pardo *et al.*, 2002; Carmona y Alonso, 2003; Zougagh *et al.*, 2005). Aunque la absorbancia a 440nm está relacionada con el contenido en ésteres de la crocetina, no es posible evaluar las propiedades aromáticas y de sabor de la especia mediante las técnicas propuestas por la Norma I.S.O. 3632-1 y 2. Un inconveniente de la valoración de la fuerza aromática de esta norma es el uso del agua como disolvente, ya que el safranal es no polar y no presenta una buena solubilidad en agua. Además, la valoración de la absorbancia a 330 nm detecta a la vez el estero isómero *cis*-crocina y safranal. La absorbancia del primer compuesto es mucho mayor que la de safranal (Alonso *et al.*, 1996; Hadizadeh *et al.*, 2007; Tarantilis *et al.*, 1994). Por otro lado, la absorbancia detectada a 330 nm utilizada para valorar el poder amargo, nos indica a la vez la presencia de isómeros *trans*-crocina y picrocrocina. La presencia de este último componente es minoritaria (Carmona *et al.*, 2006a).

### 7.4 ESTUDIOS DE MARCADORES MOLECULARES EN EL GÉNERO *CROCUS*

Varios estudios de diversidad molecular se han llevado a cabo en el género *Crocus* con diferentes tipos de marcadores moleculares. *C. sativus* ha sido la especie más estudiada. Ésta es una especie triploide que sólo puede ser reproducida vegetativamente dada su irregular meiosis (Chichiricco, 1984). Debido a esta condición, cabe esperar una menor variabilidad, tanto por su esterilidad como porque el sistema reproductivo hace difícil el mantenimiento de mutaciones que pueden surgir espontáneamente y que dan lugar a quimeras. Dado el valor comercial del azafrán con denominación de origen, se han realizado muy diversos trabajos con el fin de establecer protocolos que garanticen la autenticidad de un origen dado. También se han llevado a cabo estudios con especies silvestres o de jardinería, con el fin de discriminar entre ellas y estudiar su variabilidad a nivel molecular. Asimismo, se han utilizado marcadores moleculares con el fin de revisar la actual taxonomía de este género.

Los trabajos sobre variabilidad de la especie cultivada *C. sativus* realizados con marcadores moleculares muestran resultados contradictorios. Diversos trabajos señalan la existencia de variación para marcadores de distinto tipo. Así, Imran *et al.* (2010)

encuentran una considerable cantidad de variabilidad genética al llevar a cabo una caracterización molecular de 10 genotipos de élite de azafrán de la India basada en 21 marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). El trabajo Beiki *et al.* (2010), realizado también mediante marcadores RAPD, encuentra variabilidad entre las 6 entradas de azafrán analizadas. Keify y Beiki (2012), que utilizaron 26 cebadores para el análisis RAPD y 30 para marcadores tipo SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*) observaron también variabilidad en seis poblaciones de *C. sativus*, de seis diferentes centros de producción en Irán. Nemati *et al.* (2012) en su trabajo realizado mediante microsatélites con material procedente de la India, encontró polimorfismos en 50 individuos de *C. sativus* pertenecientes a 5 poblaciones alejadas. Fluch *et al.* (2010) utilizando marcadores EST-SSR (*Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat*) y secuencias de plastidios encuentran diferencias al analizar 28 muestras procedentes de diferentes países (Irán, España, Alemania, Italia y Francia).

Sin embargo, no se observa variabilidad intraespecífica para la especie *C. sativus* en el trabajo de Grilli-Caiola *et al.* (2004). Este equipo trabajó con marcadores RAPD y no encontró variabilidad entre 5 cultivares de *C. sativus* de diferentes países. La misma conclusión obtiene Moraga *et al.* (2009) que, utilizando marcadores de tipo RAPD, ISSR y microsatélites, no encuentran diferencias entre 41 entradas de azafrán de muy diverso origen (Azerbaiyán, Argentina, China, España, Irán, India, Italia, Marruecos, Nueva Zelanda, Reino Unido y Turquía). En otro análisis realizado mediante RAPD por Castillo *et al.* (2005), no se observaron diferencias entre las entradas de *C. sativus* procedente de diferentes países.

Otros trabajos que tienen en cuenta otras especies obtienen idénticos resultados, no encuentran variabilidad intraespecífica en la especie *C. sativus*. Así, Alavi-Kia *et al.* (2008) mediante marcadores del tipo retrotransposón, LTR-RTN (*Long Terminal Repeat - Retrotransposon*), estudió la relación filogenética entre 9 especies del género *Crocus* de Irán (*C. almehensis*, *C. michelosnii*, *C. cancellatus*, *C. caspius* y *C. gilanicus*, entre otras) y la especie cultivada *C. sativus*. Concluyó que estas especies iraníes presentaban un alto grado de diversidad, interespecífica e intraespecífica, a excepción de *C. sativus*. Alsayied *et al.* (2015) en un estudio sobre variabilidad y filogenia, realizado mediante marcadores basados en retrotransposones, IRAP (*Inter-Retroelement Amplified Polymorphisms*), con diferentes poblaciones de *C. sativus*, *C. cartwrightianus*, *C. pallasii*, *C. thomasii*, *C. asumaniae*, y *C. oreocreticus*, entre otras, observaron un elevado polimorfismo entre las distintas poblaciones dentro de la misma especie, con la excepción de la especie cultivada *C. sativus*. Este estudio confirma que la especie cultivada es una especie alotriploide y que los ancestros más probables son *C. cartwrightianus* y *C. pallasii* subsp. *pallasii* (Alsayied *et al.*, 2015).

Trabajos realizados exclusivamente con otras especies diferentes de *C. sativus*, encuentran variabilidad intra e interespecífica para otras especies del género. Frello y Heslop-Harrison (2000) a partir del análisis de secuencias de ADN repetitivo observó

variabilidad intraespecífica e interespecífica para las subespecies de *C. vernus*. Mediante el análisis de la variabilidad del gen de *C. sativus*  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (BCH), Castillo *et al.* (2005) estudiaron la diversidad molecular presente en 19 especies, pertenecientes a las secciones *Crocus* y *Nudiscapus* del género *Crocus*, incluyendo la especie *C. sativus*. La detección de bandas de diferente tamaño posibilitó la diferenciación de estas especies, rebelándose como una herramienta de gran utilidad. En la misma línea, Sik *et al.* (2008), mediante marcadores RAPD, en combinación con ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), encontró una alta variabilidad intraespecífica e interespecífica en 56 muestras que representan 19 especies de *Crocus*, (no incluyendo *C. sativus*) de diversas poblaciones de Turquía occidental. El trabajo de Beiki *et al.* (2010), realizado mediante marcadores RAPD, encuentra variabilidad entre 5 especies diferentes de *Crocus* silvestres colectados en Irán, constituidas por 24 entradas. Dentro de la serie *Crocus*, Larsen *et al.* (2015), en un estudio realizado mediante marcadores microsatélites y AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) observó una elevada y significativa variación genética dentro de especies.

Varios trabajos realizados mediante técnicas moleculares han revisado la taxonomía de este género basada en caracteres morfológicos (Mathew, 1982 y Guillén, 2014). La división en las secciones *Nudiscapus* y *Crocus* de este género, han sido apoyada por los diversos trabajos que utilizan técnicas moleculares (Castillo *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2008; Harpke *et al.*, 2013, 2014, 2015). Sin embargo, dentro de la sección *Crocus*, trabajos basados en secuencias de plástidos (Seberg y Petersen (2009), Harpke *et al.* (2013, 2014, 2015) y Larsen *et al.* (2015), de ADN repetitivo (Frello y Heslop-Harrison, 2000), y de microsatélites (Fluch *et al.*, 2010), no resuelven la separación de sus series propuesta por los estudios morfológicos. Dentro de la serie *Crocus*, distintos trabajos (Petersen *et al.*, 2008; Alsayied *et al.*, 2015) apoyan la clasificación Mathew (1982). Harpke *et al.* (2013), mediante secuencias del ADN plastidial y nuclear, también reconocen que la clasificación de Mathew es válida, excepto en el caso de las dos series, *Longiflori* y *Versicolores*.

### **8 ESTADO ACTUAL DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA COLECCIÓN DE AZAFRÁN Y ESPECIES DEL GÉNERO *CROCUS* DEL BANCO DE GERMOPLASMA VEGETAL DE CUENCA**

La caracterización del germoplasma es un trabajo imprescindible para disponer de una fuente útil de variabilidad genética. El valor del germoplasma conservado está estrechamente relacionado con la disponibilidad y fiabilidad de la información acerca de las entradas.

Recientemente se ha publicado la lista de descriptores para el género *Crocus* (Bioversity International, UPV, UCLM, JCCM., 2015). Esta publicación se basa en estudios de evaluación realizados sobre las accesiones de azafrán y de otras especies, tanto ornamentales como silvestres, que se conservan en el BGV del CIAF de Albaladejito, y teniendo también en cuenta criterios taxonómicos (Mathew, 1982). Proporciona un sistema de descripción y codificación de validez universal para la gestión de los datos

relacionados con la conservación, multiplicación y caracterización/evaluación de los recursos fitogenéticos. Comprende cinco tipos de descriptores, los relacionados con la *ficha de pasaporte* (datos observados durante la colecta de la nueva adquisición), *descriptores de manejo del material vegetal* (multiplicación y conservación), *descriptores de ambiente y localización*, que describen las características del suelo y ambiente del campo dónde se evalúa el material vegetal, *descriptores de caracterización* que permiten la discriminación de los diferentes fenotipos de forma visual y rápida (se buscan caracteres heredables) y *descriptores de evaluación*, que comprenden los caracteres fisiológicos, fenológicos y de interés agronómico relacionados con la producción de flores y cormos, la susceptibilidad a estreses bióticos y abióticos, los caracteres bioquímicos, citológicos y moleculares (su expresión puede depender del ambiente y requieren complejos métodos bioquímicos o moleculares).

A lo largo del desarrollo de los proyectos de recolección, multiplicación y caracterización de germoplasma de azafrán y otras especies del género *Crocus*, tanto de ámbito nacional como internacional, anteriormente citados, se ha llevado a cabo la caracterización de gran cantidad de entradas para muy diversos caracteres tanto morfológicos como fisiológicos y agronómicos, pero también de tipo bioquímico, citológico y moleculares. El nº de entradas evaluadas y el nº de descriptores, se muestra en la tabla siguiente (Tabla. 11), y los resultados obtenidos están siendo elaborados para la publicación de diversos trabajos.

## I. INTRODUCCIÓN

**Tabla. 11. Número de entradas y descriptores evaluados de azafrán y otras especies de *Crocus* conservadas en el Banco de Germoplasma Vegetal del CIAF de Albaladejito (Cuenca).**

TIPO DE CARACTERES	<i>Crocus</i> de jardinería y especies silvestres		<i>C. sativus</i> L. (azafrán)	
	Nº de entradas evaluadas	Nº de descriptores evaluados	Nº de entradas evaluadas	Nº de descriptores evaluados
Morfología floral (cualitativos)	68	64	66	50
Morfología de la hoja (cualitativos)	30	4	66	4
Morfología del cormo	271	3	66	3
Morfología de las cápsulas	40	2-4		
Morfología de las semillas	40	5		
Producción de azafrán y tamaño órganos florales			62	9
Desarrollo vegetativo			66	6
Fenología	251	2-3	221	2-3
Susceptibilidad a estreses abióticos	14	1	40	1
Susceptibilidad a estreses bióticos	11	2	12	2
Características bioquímicas y marcadores metabólicos	31	3-6	38	3-6
Marcadores moleculares	5-12	4	6-16	4
Marcadores citogenéticos	3-7	3	1-2	3

El trabajo de caracterización desarrollado con las especies silvestres españolas del género tanto a nivel morfológico como de su fisiología, su caracterización bioquímica y un estudio preliminar sobre el posible empleo de marcadores moleculares para diferenciar especies en estado vegetativo, constituyen el objetivo general de esta tesis doctoral, que se desarrolla en los objetivos específicos que se indican continuación.

## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



### **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

#### Objetivo 1:

Dentro del objetivo general de mantener y ampliar la colección de germoplasma del género *Crocus* en España, que se conserva en el Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca (BGVC), así como de establecer las bases para la conservación *in situ* de ciertos materiales en los que se considerara una alternativa de interés, se plantea el objetivo de revisar la localización de las distintas especies del género y, a partir de los datos de las colectas realizadas y de la información bibliográfica, establecer las condiciones eco-edafológicas del ambiente forestal en que habitan estas especies. Al mismo tiempo, interesa completar la prospección y recogida de material genético de especies silvestres del género *Crocus*.

#### Objetivo 2:

Caracterización morfológica del germoplasma de las diferentes especies españolas de *Crocus* que se encuentran conservadas en el BGVC con el fin de conocer la variabilidad existente para caracteres de interés agronómico, evaluar su posible uso, así como mejorar y agilizar la identificación de las diferentes especies silvestres de *Crocus*.

#### Objetivo 3:

Con objeto de llevar a cabo, de forma eficaz, tareas de conservación, caracterización y multiplicación de los materiales del género *Crocus* prospectados y conservados en el Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca, se considera el estudio de la fisiología de los procesos de germinación, brotación, floración, desarrollo vegetativo y formación del cormo hijo, de forma que sea posible definir las condiciones de temperatura más adecuadas durante los distintos procesos para obtener cormos hijos del mayor tamaño posible con capacidad de florecer y fructificar, y cuyas semillas presenten tasas altas de germinación. Además, se prestará especial atención al proceso de inducción floral y desarrollo de la flor por el interés que tiene el espaciado de la floración en este género tanto con fines ornamentales, como para obtener una fuente de variación genética que permita espaciar la floración en azafrán.

#### Objetivo 4:

Dada la importancia de los compuestos carotenoides y flavonoides de estas especies y el creciente interés medicinal de sus apocarotenoides, un objetivo de esta tesis es la caracterización fitoquímica de los estigmas de las especies silvestres españolas de *Crocus* mediante el uso de espectrofotometría de ultravioleta-visible (UV-Vis) y de cromatografía líquida de alta presión o alta eficacia con detector del UV-Vis (HPLC-DAD).

#### Objetivo 5:

Es de especial interés disponer de herramientas moleculares que permitan una identificación rápida de especies que crecen en el mismo ambiente compartiendo nicho ecológico y que no requiera esperar hasta obtener cormos con capacidad de floración y

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

fructificación. Con este objetivo, se ha realizado un estudio preliminar del uso de marcadores moleculares de tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*-Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), de tipo EPIC (*Exon-Primed Intron-Crossing*) y de tipo microsatélite (SSR, *Simple Sequence Repeat microsatélite*).

# **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1 LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE FORESTAL DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO *CROCUS*

Se realizó un trabajo previo bibliográfico que consistió en la búsqueda de información sobre localizaciones y fechas de recolección de las diferentes especies del género *Crocus* en España. Se emplearon recursos disponibles en la web, como las bases de datos del Proyecto Anthos y del Real Jardín Botánico de Madrid ([www.anthos.es](http://www.anthos.es)), y textos como Flora Ibérica (Guillén, 2014) o *La flora dels Països Catalans* (De Bolòs y Vigo, 1996). También se contactó con personal responsable de diferentes instituciones y Parques Naturales que pudieran tener información actualizada y conocieran las fechas de floración que es el estadio más claro para su identificación.

Se elaboraron protocolos de recolección que facilitaron mucho la toma de datos sobre las entradas prospectadas. Estos protocolos o fichas de recolección incluyen datos de diverso tipo: a) Identificación del recolector y/o donante de la entrada; b) Identificación de la entrada; c) Identificación de la zona de recolección; d) Datos etnobotánicos; e) Clima; f) Tipo de suelo; g) Estreses abióticos o bióticos dominantes. Se ha intentado describir con la mayor precisión las Comunidades Vegetales y las características de la zona de recolección. Al mismo tiempo se tomaron gran cantidad de fotografías que podrían ayudar en la posterior caracterización de la zona de recolección.

Las entradas recolectadas fueron depositadas en el Banco de Germoplasma Vegetal del Centro de Investigación Agroforestal de Albadalejito (CIAF), ubicado en Cuenca y dependiente de la Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural de la Junta de Comunidades de Castilla - La Mancha, y forman parte de la Colección Nacional de Germoplasma de Azafrán y otros *Crocus* que se conserva actualmente en este centro (Figura 46 y Figura 47).



**Figura 46** Colección de Reserva de *Crocus* spp. del Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Colección depositada en macetas, ubicada bajo umbráculo y con riego por goteo automatizado.

Los materiales son multiplicados en la finca experimental del mismo Centro, que se localiza a 950-1000 msnm, con una temperatura anual media de 11,5°C, y una

### III MATERIAL Y MÉTODOS

---

precipitación entre 550 a 600 mm, principalmente concentrada en primavera y otoño. Las características edáficas son las típicas del área, suelos franco arenosos, pH alcalino (7,6-8,4), conductividad eléctrica normal (<400 mmhos/cm) y un bajo contenido en materia orgánica (1-2,5%). Los materiales más exigentes son multiplicados en jardineras en condiciones adecuadas.



**Figura 47** Colección Vegetativa de Multiplicación de *Crocus spp* en el Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca.

Con la información bibliográfica disponible y con la adquirida en las jornadas de recolección se ha podido hacer una representación gráfica de la distribución del género *Crocus* en España. En el presente trabajo, se presentan los mapas de localización, las recolecciones efectuadas y de las que se dispone de material en el Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca, así como una descripción de los ecosistemas forestales en los que aparecen dichas especies cercanas al azafrán. En la elaboración de los mapas de distribución, se han tenido en cuenta aquellas citas con fecha de recolección posterior al año 1980. Para el estudio de la vegetación se ha seguido la metodología de la escuela sigmatista de Braun Blanquet (1979) con las aportaciones y actualizaciones de Alcaraz (1996) e Izco y del Arco (2003).

## 2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO *CROCUS*

Con el objetivo de caracterizar las diferentes especies españolas de *Crocus*, se evaluaron caracteres cuantitativos y cualitativos relacionados con la morfología floral, el crecimiento vegetativo y los frutos y semillas.

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Los datos se tomaron sobre plantas de la colección de propagación vegetativa ubicada en el BGV de Albadalejito, en el CIAF de Cuenca, con el material de *Crocus* procedentes de las colectas.

El material utilizado en ese ensayo procede de Colección Vegetativa de Multiplicación de *Crocus* spp del CIAF de Cuenca. Se realizaron ensayos con bloques de 10 plantas por entrada, dispuestos al azar.

Los ensayos de caracterización morfológica se realizaron durante dos años. En estos dos años se tomaron datos de forma continua para abarcar el ciclo vital completo de las distintas especies, que muestran comportamientos diferentes en el desarrollo floral y vegetativo. Una selección representativa de las entradas que forman parte de la colección se ha incluido en los estudios de caracterización. Algunas entradas no se han incluido en todos los análisis por no disponer de suficientes datos morfológicos de cada momento del desarrollo.

Para la evaluación de los caracteres se caracterizaron un máximo de 60 entradas para los caracteres relacionados con el tamaño de las hojas y la producción vegetativa. La flor se caracterizó en 55 de estas entradas; y el fruto y las semillas en 51 entradas. El desarrollo de flores, y la posterior formación de frutos con semillas viables, no se produjo en el 100% de las entradas evaluadas. El número de entradas evaluadas por especie varió entre 3 y 19. Esto es debido a que en especies como *C. vernus* (3 entradas), *C. cambessedesii* (4 entradas) y *C. clusii* (7 entradas) la recolección fue más escasa, y también su conservación y multiplicación en el campo es más complicada. Hay que añadir, que se trata de especies de distribución muy localizada, y en ocasiones se desarrollan en zonas de colectas restringidas. En el caso de *C. vernus* y *C. cambessedesii* se adquirió material de vivero y tras comprobar su autenticidad y comportamiento en campo, también se consideraron para la caracterización morfológica.

Los datos de producción vegetativa y los relacionados con el tamaño de la hoja se cuantificaron sobre plantas con hoja adulta, completamente formada, un mes antes del inicio de la seca. La longitud de la hoja fue tomada desde el nivel del suelo hasta la punta de la hoja, y la anchura de las hojas medida en la mitad de la longitud de la hoja. Las flores fueron colectadas de cada entrada a primeras horas de la mañana antes de que la flor estuviera completamente abierta. En el laboratorio se separó cada órgano para su caracterización (Figura 48). Los frutos se evaluaron cuando estaban maduros y aún no se

### III MATERIAL Y MÉTODOS

habían abierto para liberar las semillas. Las semillas se analizaron cuando habían completado su desarrollo. Los cormos y su túnica exterior se evaluaron cuando las plantas habían completado su ciclo.

El número de plantas evaluado por entrada ha sido muy variable dependiendo del momento del desarrollo. En general se han evaluado 10 plantas por entrada, aunque en algunas fases del desarrollo más delicadas (floración o formación del fruto) se observaron 5 plantas por entrada. El número de flores y cápsulas caracterizadas por entrada se sitúa entre 5 y 10, ya que la formación de flor y posterior cuajado del fruto son procesos que presentaron más problemas fuera de su hábitat. El número de semillas evaluadas se sitúa en torno a 4 y 10 por cápsula.



Figura 48 Medida de la longitud del tépalo externo de *C. serotinus*.

## 2.2 CARACTERES EVALUADOS

Para la caracterización de las plantas se consideraron principalmente los parámetros incluidos en la lista preliminar de descriptores del género, que sirvió de base para la versión definitiva publicada por *Bioversity International*, UPV, UCLM y JCCM (2015) representada en la Figura 49. Los caracteres cualitativos y cuantitativos y los distintos niveles observados para cada carácter, están ampliamente reflejados en el anejo 2. La determinación de los colores se realizó mediante la carta de colores de la *Royal Horticultural Society* (2001).



Figura 49 Portada del "Descriptors for Crocus (*Crocus spp.*)" editado por Bioversity International.

Se evaluaron los siguientes caracteres cuantitativos y cualitativos:

- Cuantitativos:
  - Longitud de las hojas al final del desarrollo (cm)
  - Anchura de la hoja (mm)
  - Número de hojas en el brote principal
  - Número de brotes por cormo
  - Longitud de los tépalos externo e interno (mm)
  - Anchura de los tépalos externo e interno (mm)
  - Longitud de la antera (mm)
  - Longitud del filamento (mm)
  - Longitud del estilo (mm)
  - Número de flores por brote
  - Altura de la flor desde el suelo (mm)
  - Altura del fruto (mm)
  - Longitud de la cápsula (cm)
  - Anchura de la cápsula (cm)
  - Longitud de la semilla (mm)
  - Anchura de la semilla (mm)
  - Peso de las semillas (mg)
  - Número de semillas por fruto
  
- Cualitativos:
  - Forma del tépalo externo e interno
  - Ápice del tépalo externo e interno
  - Patrón de fondo del tépalo externo e interno
  - Color general del tépalo externo e interno
  - Patrón de venación del tépalo externo e interno
  - Tipo de venación del tépalo externo e interno
  - Patrón de color de venación del tépalo externo e interno
  - Color de la venación del tépalo externo e interno
  - Continuación de las venas hacia el tubo floral
  - Localización de las manchas del tépalo externo e interno
  - Color de las manchas del tépalo externo e interno
  - Color del inicio del tubo floral

- Color de la garganta floral
- Pubescencia de la garganta floral
- Coloración del filamento del estambre
- Grado de ramificación del estilo
- Coloración del estilo
- Fragancia de la flor
- Hojas en el periodo floral
- Época de floración
- Textura de la bráctea
- Color de la bráctea
- Visibilidad de la bractéola
- Color de la bractéola
- Tamaño de la bractéola
- Forma de la cápsula
- Color de la cápsula
- Forma de la semilla
- Superficie de la semilla
- Color de la superficie
- Desarrollo de la carúncula
- Desarrollo del rafe
- Forma de excrecencias
- Presencia de cera
- Forma de la hoja
- Aspecto de la túnica
- Color de la túnica
- Persistencia de la túnica
- Presencia de estolones

#### **2.3 ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS CON LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.**

Los caracteres considerados en la caracterización, cuantitativos y cualitativos, se analizaron por separado y también de forma conjunta.

##### **2.3.1 ANÁLISIS DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS**

Con el fin de estudiar la naturaleza de la variación para cada carácter, se realizó en primer lugar un análisis de la varianza jerárquico para estimar las componentes de

varianza, es decir, el porcentaje de variación debido a diferencia entre especies, entradas dentro de especie, y entre plantas dentro de entrada.

A nivel de especie, un análisis de la varianza simple entre entradas permitió valorar la variabilidad presente dentro de las especies. Para comprobar si las diferencias encontradas en los valores cuantitativos en las diferentes especies eran significativas se realizó un análisis de LSD (*Least Significant Differences*).

Se realizó un análisis de correlaciones a nivel de especie, entradas y plantas. Los datos empleados en el análisis fueron los del año 2 (2011) por ser más completo. Los resultados de estos análisis se tuvieron en cuenta para la selección de caracteres en análisis posteriores de componentes principales. Todos los análisis estadísticos indicados se realizaron utilizando el programa *Statgraphics Plus*, versión 5.1.

Finalmente, con una selección de estos caracteres, se realizó un análisis de componentes principales (ACP). El ACP es un método de reducción de datos que se aplica con el objeto de clarificar las relaciones entre dos o más caracteres y dividir la varianza total de los caracteres originales en un número limitado de nuevas variables incorrelacionadas. Esto permite la visualización de las diferencias entre los individuos y la identificación de posibles grupos. La reducción se consigue por transformación lineal de las variables originales en un nuevo grupo de variables conocidas como Componentes Principales (PC). Para su cálculo, se empleó el programa *NTSYS pc 2.0* (Rohlf, 1996).

El paso previo en este análisis, es la transformación de la matriz original de datos en otra cuyos valores están comprendidos entre 1 y 0. Con estos datos estandarizados se obtuvo la matriz de correlaciones a partir de la cual se realizó el ACP. Los datos cuantitativos se transformaron de la siguiente forma:

$$X_{ij}e = \frac{X_{ij} - \min_j}{(\max_j - \min_j)}$$

Dónde:  $X_{ij}e$  es el valor medio estandarizado del carácter  $j$  para la entrada  $i$ ;  $X_{ij}$  es el valor medio del carácter  $j$  para la entrada  $i$ ;  $\min_j$  es el valor mínimo de las medias de todas las entradas para el carácter  $j$ ;  $\max_j$  es el valor máximo de las medias de todas las entradas para el carácter  $j$ .

En la siguiente tabla se presentan las entradas evaluadas en el presente análisis de componentes y coordenadas principales; así como en la construcción de los dendrogramas realizados en los apartados siguientes (Tabla. 12).

### III MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla. 12. 1. Entradas de las especies silvestres españolas del género *Crocus* evaluadas en el análisis de componentes y coordenadas principales a partir de los caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos. Se indica el nombre de la muestra utilizado en el análisis y la provincia de origen. Siendo: Cam: *C. cambessedesii*; Carp: *C. carpetanus*; Nev: *C. nevadensis*; Nu: *C. nudiflorus*; S: *C. serotinus*; Clu: *C. clusii*; V: *C. vernus*. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1. (Continúa).**

MUESTRA	ENTRADA	PROVINCIA DE ORIGEN	MUESTRA
<i>C. nudiflorus</i>	Nu.45	BCU003176	Burgos
	Nu.38	BCU002556	Huesca
	Nu.39	BCU002557	Huesca
	Nu.40	BCU002558	Huesca
	Nu.72	BCU003001	Huesca
	Nu.88	BCU002944	Huesca
	Nu.43	BCU002777	La Rioja
	Nu.44	BCU003123	La Rioja
<i>C. serotinus</i>	S.49	BCU002550	Albacete
	S.55	BCU002742	Albacete
	S.56	BCU002743	Albacete
	S.68	BCU003175	Burgos
	S.48	BCU002367	Ciudad Real
	S.52	BCU002775	Cuenca
	S.57	BCU002959	Cuenca
	S.63	BCU002978	Granada
	S.47	BCU001657	Jaén
	S.54	BCU002741	La Coruña
	S.64	BCU003181	León
	S.67	BCU003174	León
<i>C. vernus</i>	S.50	BCU002618	Valencia
	S.51	BCU002619	Valencia
	V.89	BCU001658	Huesca
	V.102	BCU003018	Vivero
	V.70	BCU001822	Vivero
	V.71	BCU002998	Vivero

**Tabla. 12.2. Entradas de las especies silvestres españolas del género *Crocus* evaluadas en el análisis de componentes principales y coordenadas principales a partir de los caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos. Se indica el nombre de la muestra utilizado en el análisis y la provincia de origen. Siendo: Cam: *C. cambessedesii*; Carp: *C. carpetanus*; Nev: *C. nevadensis*; Nu: *C. nudiflorus*; S: *C. serotinus*; Clu: *C. clusii*; V: *C. vernus*. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1.**

ESPECIE	MUESTRA	ENTRADA	PROVINCIA DE ORIGEN
<i>C. cambessedesii</i>	Cam.91	BCU001683	Mallorca
	Cam.1	BCU001685	Mallorca
	Cam.91	BCU001683	Mallorca
	Cam.2	BCU003130	Vivero
<i>C. carpetanus</i>	Carp.3	BCU002696	Orense
	Carp.4	BCU002835	Ávila
	Carp.5	BCU002836	Ávila
	Carp.6	BCU002837	Ávila
	Carp.7	BCU002838	Ávila
	Carp.10	BCU002973	Madrid
	Carp.8	BCU002971	Madrid
	Carp.9	BCU002972	Madrid
	<i>C. clusii</i>	Clu.60	BCU002964
Clu.61		BCU002965	Cádiz
Clu.62		BCU002966	Cádiz
Clu.58		BCU002960	Huelva
Clu.59		BCU002963	Huelva
Clu.78		BCU002962	Huelva
Clu.96		BCU002961	Huelva
<i>C. nevadensis</i>	Nev.17	BCU002359	Cuenca
	Nev.21	BCU002689	Cuenca
	Nev.22	BCU002694	Cuenca
	Nev.26	BCU002871	Cuenca
	Nev.27	BCU002976	Granada
	Nev.28	BCU002977	Granada
	Nev.29	BCU002979	Granada
	Nev.18	BCU002380	Jaén
	Nev.30	BCU002980	Jaén
	Nev.31	BCU002981	Jaén
	Nev.32	BCU002982	Jaén
	Nev.24	BCU002697	Pamplona
	Nev.25	BCU002698	Pamplona
	Nev.15	BCU001742	Valencia
Nev.16	BCU001743	Valencia	

#### 2.3.2 ANÁLISIS DE LOS CARACTERES CUALITATIVOS

Con los caracteres cualitativos se realizaron histogramas. Para ello se calcularon, en primer lugar, los porcentajes de cada uno de los niveles existentes en cada carácter. Se elaboraron las representaciones gráficas utilizando el programa Excel de *Microsoft Office*.

La prueba de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) se utilizó para evaluar la relación de dependencia entre los distintos niveles de un carácter y las especies, mediante el programa *Statgraphics Plus*, versión 5.1.

A partir de los análisis previos, histogramas y test  $\chi^2$ , se seleccionaron los caracteres cualitativos con los que se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales y un análisis clúster de las entradas.

El análisis de coordenadas principales (ACoP) se realizó con los caracteres cualitativos escindidos en un número de caracteres equivalente al número de niveles que poseen (Romesburg, 2004), quedando la nueva matriz en otra cuyos valores son 1 y 0, dependiendo de la presencia o ausencia de un determinado carácter en los distintos niveles para cada una de las entradas. A partir de este análisis, se realizó una selección de aquellos caracteres que tienen una mayor correlación ( $\geq 0,5$ ) con las tres primeras coordenadas para utilizar en análisis posteriores. Para el ACoP, se empleó el programa NTSYS pc 2.0 (Rohlf, 1996).

Las entradas que se evaluaron en el ACoP son las que figuran en la tabla mostrada en el apartado anterior (Tabla 12).

Además del ACoP, se realizó un análisis clúster. El análisis clúster se realizó con las mismas entradas con las que se realizó el ACoP (Tabla 12). Este análisis clúster se refiere a un grupo de técnicas multivariantes que permiten la agrupación de los individuos u objetos según su similitud.

El análisis clúster se obtiene a partir de la matriz de datos binarios, con los que se realiza el cálculo de la matriz de distancias con el programa PHYLTOOLS 1.32. (<http://www.plantbreeding.wur.nl>) mediante el coeficiente de similitud *Simple Matching*. La fórmula de este coeficiente es  $s_{ij}=(a+d)/(a+b+c+d)$ , donde  $s_{ij}$  es la proporción de caracteres que comparten las dos muestras  $i$  y  $j$ ,  $a$  es el número de caracteres que comparten las muestras,  $b$  es el número de caracteres exclusivos de  $i$ ,  $c$  el número de caracteres exclusivos de  $j$  y  $d$ , el número de caracteres ausentes en ambas muestras. Este tipo de medida considera como coincidencia dos situaciones: la presencia de un carácter en las dos muestras y la ausencia del carácter en ambas muestras.

La consistencia de la agrupación se calculó mediante la técnica *bootstrapping* que permite la generación de 100 matrices de similitud. Estas matrices se utilizan para diseñar el clúster aplicando el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average*- Método de medias no ponderadas) (Sneath y Sokal, 1973) mediante el programa NEIGHBOR del paquete informático PHYLIP 3.57c (Felsenstein, 1993). El árbol

consenso se generó mediante el programa CONSENSE, que forma parte también del paquete PHYLIP. El árbol generado se visualiza mediante el programa TREEVIEW 3.0 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

El método de ligamiento puede generar distorsiones respecto los datos de similitud originales. La cuantificación de dicha distorsión se midió mediante el coeficiente de correlación cofenético (Romesburg, 2004). Este coeficiente se calcula mediante el programa NTSYS pc 2.0.

#### **2.3.3 ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS Y CUALITATIVOS**

Se realizó un análisis de coordenadas principales, utilizando conjuntamente caracteres cuantitativos y cualitativos transformados. Las entradas que se evaluaron en el presente análisis de coordenadas principales, combinando los dos tipos de caracteres morfológicos, son las que figuran en la tabla mostrada en el apartado anterior (Tabla. 12).

Para realizar este análisis considerando conjuntamente los caracteres cuantitativos y cualitativos es necesario transformar los caracteres cualitativos. Cada uno de los caracteres cualitativos se escindió en tantos como opciones presentaba (Romesburg, 1984), estando formada la matriz de datos por 1 y 0 dependiendo de la presencia o ausencia de un determinado nivel del carácter en la entrada correspondiente. Cada número 1 de la matriz de datos se dividió por la raíz cuadrada del número de niveles posibles que presentaba dicho carácter (Cole-Rogers *et al.*, 1997). Con la matriz así transformada y añadiendo la matriz estandarizada de los datos cuantitativos se hizo el análisis de coordenadas principales.

Además del ACoP, se realizó un análisis clúster considerando conjuntamente los datos cuantitativos y cualitativos juntos. A partir de la matriz de datos estandarizados, mediante el cálculo de la matriz de distancias (Distancia euclídea media) y finalmente del método de agrupamiento UPGMA se obtuvieron los clúster (Sneath y Sokal 1973).

#### **2.4 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LA MORFOLOGÍA DE LAS SEMILLAS Y DE LAS HOJAS**

El estudio de caracterización morfológica de la cubierta de las semillas se realizó con lupa binocular (Leika modelo MZAPO) y microscopio electrónico de barrido (Jeol ISM-5410 de 10 Kw), en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Politécnica de Valencia. Se observaron un mínimo de dos entradas por especie (Tabla. 13).

### III MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla. 13. Entradas de especies silvestres del género *Crocus* evaluadas en la caracterización de la morfología de la cubierta de la semilla. Se indica la provincia de origen. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1.**

ESPECIE	ENTRADAS	ORÍGEN
<i>C. nevadensis</i>	BCU002969	Cuenca
	BCU002981	León
<i>C. carpetanus</i>	BCU002696,	Orense
	BCU002971	Madrid
<i>C. vernus</i>	BCU002935, BCU003198	Huesca
<i>C. serotinus</i>	BCU001657	Jaén
	BCU002550	Albacete
	BCU002970	Cuenca
<i>C. clusii</i>	BCU002963	Huelva
	BCU002966	Cádiz
<i>C. nudiflorus</i>	BCU002944	Huesca
	BCU003176	Burgos
<i>C. cambessedesii</i>	BCU001683, BCU001685	Mallorca

Para la caracterización de la anatomía de las hojas, se fijaron en FAE segmentos de las diferentes especies (10% formol, 5% ácido acético glacial y 50% etanol) durante 16 h, que fueron posteriormente deshidratados en series de etanol y embebidos en Technovit 7100, siguiendo las especificaciones de uso del producto. Se realizaron secciones de 2  $\mu\text{m}$  usando un ultramicrotomo (Reichert y Jung), en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Politécnica de Valencia, y los cortes se montaron en portas cubiertos con poli-L-lisina. La tinción se llevó a cabo con azul de toluidina (0,02%). Las preparaciones se observaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse E600. Estas preparaciones permanentes se realizaron en 2-4 entradas por especie y con 3-5 plantas por entrada, ya que observaciones preliminares, en fresco, habían mostrado una gran similitud de la sección de la hoja entre distintas entradas de una especie. Las entradas que fueron utilizadas en la caracterización se reflejan en la siguiente tabla (Tabla. 14).

**Tabla. 14.** Entradas de especies silvestres del género *Crocus* evaluadas en la caracterización de la anatomía de las hojas. Se indica la provincia de origen. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1.

ESPECIE	ENTRADAS	ORÍGEN
<i>C. nevadensis</i>	BCU002359	Cuenca
	BCU002981	León
<i>C. carpetanus</i>	BCU002696,	Orense
	BCU002835	Ávila
<i>C. vernus</i>	BCU002935, BCU003198	Huesca
<i>C. serotinus</i>	BCU001657	Jaén
	BCU002741	La Coruña
	BCU002775	Cuenca
	BCU003174	León
<i>C. clusii</i>	BCU002960, BCU002963	Huelva
	BCU002966	Cádiz
<i>C. nudiflorus</i>	BCU002944, BCU002556	Huesca
	BCU003176	Burgos
<i>C. cambessedesii</i>	BCU001680, BCU001685	Mallorca

## 3 FENOLOGÍA DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS* SILVESTRES

### 3.1 COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO EN UN AMBIENTE PROTEGIDO

Con el objetivo de conocer las diferencias en fenología de las diversas especies de *Crocus* silvestres se tomaron datos correspondientes a la brotación (emergencia del brote sin apertura de catafilos), salida de hoja (emergencia de brotes con apertura de catafilos y visibilidad de la hoja), período de floración, formación de cápsula y secado de la hoja y de la cápsula de las diversas entradas disponibles de las distintas especies, en la colección ubicada bajo umbráculo dentro de la finca experimental del CIAF de Albadalejito (Figura 50).

En este ensayo se pudo estudiar la fenología de todas las especies y la diferencia entre ellas comparando la variación entre especies frente a la variación intraespecífica que corresponde a la variación entre entradas. El número de entradas dentro de cada especie varía mucho en función del material colectado de cada una, y para cada entrada se ensayaron 10 plantas, si bien no todos los cormos sembrados tuvieron un tamaño adecuado para florecer. Se realizaron ensayos en cultivo protegido con bloques de 10 plantas por entrada, dispuestos al azar. La colección sobre la que se estudió la fenología se ubica bajo umbráculo, está plantada en jardineras con sustrato universal y con suministro de riego por goteo automatizado (Figura 46).

El número total de entradas evaluadas fue de 112 correspondientes a las siete especies de *Crocus* silvestres estudiadas (Tabla. 15). El origen de cada entrada se puede observar en el anejo 4. Para más información referente a las entradas se puede consultar el anejo 1 y el Inventario Nacional de Recursos Fitogenéticos (<http://www.inia.es/IniaPortal/goUrlDinamica.action?url=http://wwwsp.inia.es/Investigacion/centros/crf>) o el Sistema de Documentación del BGV de Cuenca.



**Figura 50** Umbráculo donde se ubica la colección sobre la que se realizó el estudio de fenología. 2. Jardineras de la misma colección durante la brotación.

Tabla. 15. Entradas de *Crocus silvestres* españoles evaluadas en el estudio de fenología. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1.

ESPECIE	PROVINCIA	ENTRADAS
<b>C. cambessedesii</b> J. Gay	Mallorca	BCU001680, BCU001682, BCU001683, BCU001685
	VIVERO	BCU003130
<b>C. carpetanus</b> Boiss. & Reut.	Ávila	BCU002835, BCU002836, BCU002837, BCU002838
	Madrid	BCU002971, BCU002972, BCU002973, BCU002974, BCU002987
	Ourense	BCU002696
<b>C. clusii</b> J. Gay	Huelva	BCU002960, BCU002961, BCU002962, BCU002963
	Cádiz	BCU002964, BCU002965, BCU002966, BCU002967
<b>C. nevadensis</b> Amo	Cuenca	BCU002871, BCU002969, BCU003012, BCU002355, BCU002356, BCU002359, BCU002687, BCU002689, BCU002690, BCU002693, BCU002694, BCU002695
	Granada	BCU002976, BCU002977, BCU002979, BCU002980, BCU002386, BCU002387, BCU002388
	Huesca	BCU002992, BCU002993, BCU002994, BCU002999
	Jaén	BCU002981, BCU002982, BCU002380, BCU002381, BCU002382, BCU002383, BCU002384, BCU002385
	Lérida	BCU002988, BCU002989, BCU002990
	Pamplona	BCU002697, BCU002698
	Valencia	BCU001742
<b>C. nudiflorus</b> S.M.	Burgos	BCU003176
	Huesca	BCU002944, BCU003000, BCU003001, BCU003002, BCU003003, BCU003004, BCU003015, BCU002556, BCU002557, BCU002558, BCU002559
	La Rioja	BCU003123, BCU002776, BCU002779
	Lérida	BCU003005, BCU003006, BCU003007
<b>C. serotinus</b> Salisb	La Coruña	BCU002741
	Albacete	BCU002550, BCU002740, BCU002742
	Burgos	BCU003175
	Ciudad Real	BCU002366, BCU002367, BCU002685, BCU002686
	Cuenca	BCU002873, BCU002970, BCU003013, BCU002743, BCU002775
	Granada	BCU002978
	Huelva	BCU002959
	Jaén	BCU001655, BCU001657
	León	BCU003172, BCU003173, BCU003174, BCU003177, BCU003178, BCU003179, BCU003180, BCU003181
Toledo	BCU001704, BCU001705	
Valencia	BCU002618, BCU002619	
<b>C. vernus</b> subsp. <b>vernus</b> (Ker Gawl.)	VIVERO	BCU002998, BCU003018, BCU001822, BCU002730

#### 3.2 COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO EN UN AMBIENTE CONTROLADO

Se realizó un estudio de fenología evaluando los mismos caracteres anteriormente descritos (apartado 3.1) con cormos de las especies *C. serotinus*, *C. nudiflorus*, *C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus* pero cultivados en cámara. Este material fue donado por el BGV de Cuenca, y procede del obtenido durante las jornadas de colectas tras ser multiplicado y conservado en sus instalaciones. Las entradas suministradas para realizar estos ensayos fueron: BCU002695 de *C. nevadensis* (Olmeda del Rey, Cuenca), BCU002971 de *C. carpetanus* (Montejo de la Sierra, Madrid), BCU002998 de *C. vernus* (Comercial), BCU002775 de *C. serotinus* (Sierra de Altomira, Cuenca) y BCU002944 de *C. nudiflorus* (Benasque, Huesca). Con este mismo material se realizaron los posteriores ensayos de fisiología. Se evaluaron tres macetas (con cinco cormos de tamaño homogéneo cada una) de cada especie. Para este experimento no se pudo disponer de material de la especie de *C. cambessedesii* y *C. clusii* (Figura 51).

Las macetas donde se plantaron los cormos se rellenaron con una mezcla compuesta por sustrato universal y un tercio de arena. Todo el material vegetal se ha desarrollado bajo las mismas condiciones térmicas. Los cormos se inducen a flor a 23 °C durante los tres meses de junio, julio y agosto para después bajar la temperatura hasta los 17°C a final de septiembre. Se mantuvo esta misma temperatura hasta el final del ciclo vital de las plantas. Se realizó un riego periódico según sus necesidades con disolución Hoagland al 50% (Hoagland y Arnon, 1950). El control de temperaturas se realizó mediante una cámara de cultivo con control de temperatura y del fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad) con luz blanca y fría (Sylvania L2505 115W 6.6A EVV.) (Figura 51).



**Figura 51 (1).** Macetas del ensayo de fenología en ambiente controlado. Floración de la especie *C. serotinus*. (2) Macetas ensayo de *C. nevadensis*, tras la floración.

#### 3.3 COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO EN SU AMBIENTE NATURAL

En este apartado se consideran los datos del momento de la floración obtenidos durante las diferentes prospecciones realizadas por toda España de las entradas colectadas.

### 3.4 INFLUENCIA DEL TAMAÑO DEL CORMO EN LA FENOLOGÍA

Se realizó un ensayo con varios lotes de cormos para estudiar la influencia del tamaño de los cormos en su fenología, en su brotación y su capacidad de florecer.

Se empleó la especie *C. serotinus* y la entrada BCU002775 por la mayor disponibilidad de material vegetal. Se ensayaron 2-3 lotes con 5-10 cormos por tratamiento. Se establecieron cuatro tratamientos según los siguientes rangos de peso de los cormos: menor de 0,06 g, entre 0,1 y 1g, entre 1 y 1,5 g y entre 1,5 y 2 g (Figura 52 ). Los cormos de menor tamaño se obtuvieron tras la germinación de semillas de frutos desarrollados por este mismo material.

Estos cormos se incubaron a 23°C durante los meses de verano y posteriormente se bajaron las temperaturas hasta los 17°C a finales de septiembre.

El control de temperaturas se realizó mediante cámaras MEDILOW con iluminación a 45 cm de las bandejas mediante dos fluorescentes de luz blanca y fría (Sylvania 4 CFL 13W 2700K) y fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad). Las macetas se rellenaron con una mezcla de sustrato universal y un tercio de arena. Se realizó un riego periódico según sus necesidades con disolución Hoagland al 50%. Todos los ensayos posteriores de fenología y fisiología se realizaron en estas mismas condiciones de cultivo.



**Figura 52** Influencia del tamaño del cormo en la fenología: 1. Cormos con peso > 1,5 g; 2. Cormos con peso 1-1,5 g; 3. Cormos con peso 0,1 – 1 g; 4. Cormos con peso < 0,06 g.

### 3.5 INFLUENCIA DEL PESO EN LA DIFERENCIACIÓN FLORAL

Con el objetivo de estudiar la influencia del peso en la diferenciación floral se evaluó la formación de flor en cormos de diferente peso.

Se trabajó con una especie de floración otoñal sin histerantia (*C. serotinus*), una especie de floración otoñal con histerantia (*C. nudiflorus*), una especie de floración a final del invierno (*C. nevadensis*), y una especie que florece más adentrada la primavera (*C. vernus*). Las entradas utilizadas para realizar estos ensayos fueron: BCU002695 de *C. nevadensis* (Olmeda del Rey, Cuenca), BCU002971 de *C. carpetanus* (Montejo de la Sierra, Madrid), BCU002998 de *C. vernus* (Comercial), BCU002775 de *C. serotinus* (Sierra de Altomira, Cuenca) y BCU002944 de *C. nudiflorus* (Benasque, Huesca).

Se conservaron los cormos tras la cosecha, a la temperatura estimada como óptima (23°C) para la diferenciación floral en ensayos previos (ver en el apartado 2.1. de resultados de Fisiología) y tomando como referencia el estudio realizado sobre la influencia de la temperatura en la formación de la flor del azafrán de Molina *et al.* (2005a).

Se utilizaron 35-40 cormos por especie, divididos en 4 lotes de cormos con diferentes peso, que se muestrearon en el momento en el que se esperaba observar la diferenciación floral del meristemo. Los cormos seleccionados para el muestro se clasificaron en los siguientes rangos de pesos (g): 0,5-0,79; 0,8-1,09; 1,1-1,49; 1,5-2,59. Este ensayo se realizó durante dos años, para ampliar el experimento y también para confirmar los resultados. Las condiciones de cultivo son las reflejadas en el apartado 3.4.

#### **3.6 ANÁLISIS DE DATOS DE LOS ENSAYOS DE FENOLOGÍA**

Con el fin de estudiar la naturaleza de la variación para cada carácter, se realizó en primer lugar un análisis de la varianza jerárquico para estimar las componentes de varianza, es decir, el porcentaje de variación debido a diferencia entre especies, y entradas dentro de especie. A nivel de especie, un análisis de la varianza simple entre entradas permitió valorar la variabilidad presente dentro de las especies. Para comprobar si las diferencias encontradas en los valores cuantitativos en las diferentes especies eran significativas se realizó un análisis de LSD (*Least Significant Differences*).

Todos los análisis estadísticos indicados se realizaron utilizando el programa Statgraphics Plus, versión 5.1.

## 4 FISIOLÓGÍA DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS SILVESTRES*

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

Este apartado tiene como objetivo el estudio de la influencia de la temperatura en el ciclo vital de las especies que comprende la diferenciación del primordio floral durante el periodo de aparente reposo en el cormo hijo que ha completado su desarrollo, la brotación o aparición del brote principal envuelto en catafilos, la salida de la hoja y la floración, la formación del fruto, el desarrollo del cormo hijo y el secado de la hoja. También se aborda el estudio de la fisiología de la germinación de las semillas.

El material utilizado en todos estos ensayos pertenece siempre a las mismas entradas conservadas en el BGV de Cuenca: BCU002695 de *C. nevadensis* (Olmeda del Rey, Cuenca) (Figura 53), BCU002971 de *C. carpetanus* (Montejo de la Sierra, Madrid), BCU002998 de *C. vernus* (Comercial), BCU002775 de *C. serotinus* (Sierra de Altomira, Cuenca) y BCU002944 de *C. nudiflorus* (Benasque, Huesca). También se utilizó material comercial de la especie *C. serotinus* (BCU001824) para completar los ensayos. Se evaluó la fenología de esta entrada y su comportamiento no presentó diferencias con la entrada silvestre.



**Figura 53** Material vegetal empleado en los ensayos de fisiología cedido por el Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Cormos de la especie *C. nevadensis* colectado en Olmeda del Rey (BCU002695).

Las semillas utilizadas en el estudio de la fisiología de la germinación proceden de las entradas previamente descritas y fueron recolectadas en el mismo año en el que se realizó el ensayo. Durante dos meses hasta la puesta en marcha del ensayo, las semillas fueron conservadas en un recipiente hermético con gel de sílice a temperatura entre 2 y 6°C. Las condiciones de cultivo son las mismas que las indicadas en el apartado 3.4.



Figura 54 Cámara MEDLOW con iluminación. Macetas en cultivo de los ensayos de fisiología.

#### 4.2 METODOLOGÍA DE LOS ENSAYOS DE FISOLOGÍA

Las temperaturas seleccionadas para los distintos ensayos se basan en los trabajos publicados sobre la floración de la especie cultivada *C. sativus* (Molina *et al.*, 2005a), en aquellos sobre el desarrollo vegetativo, llevados a cabo con plantas silvestres de *C. vernus* (Bradi *et al.*, 2007 y Lundmark *et al.*, 2009; Renau-Morata *et al.*, 2013), así como en otros trabajos sobre el proceso de germinación de especies turcas de Vurdu *et al.* (2004) y Grilli-Caola (2005).

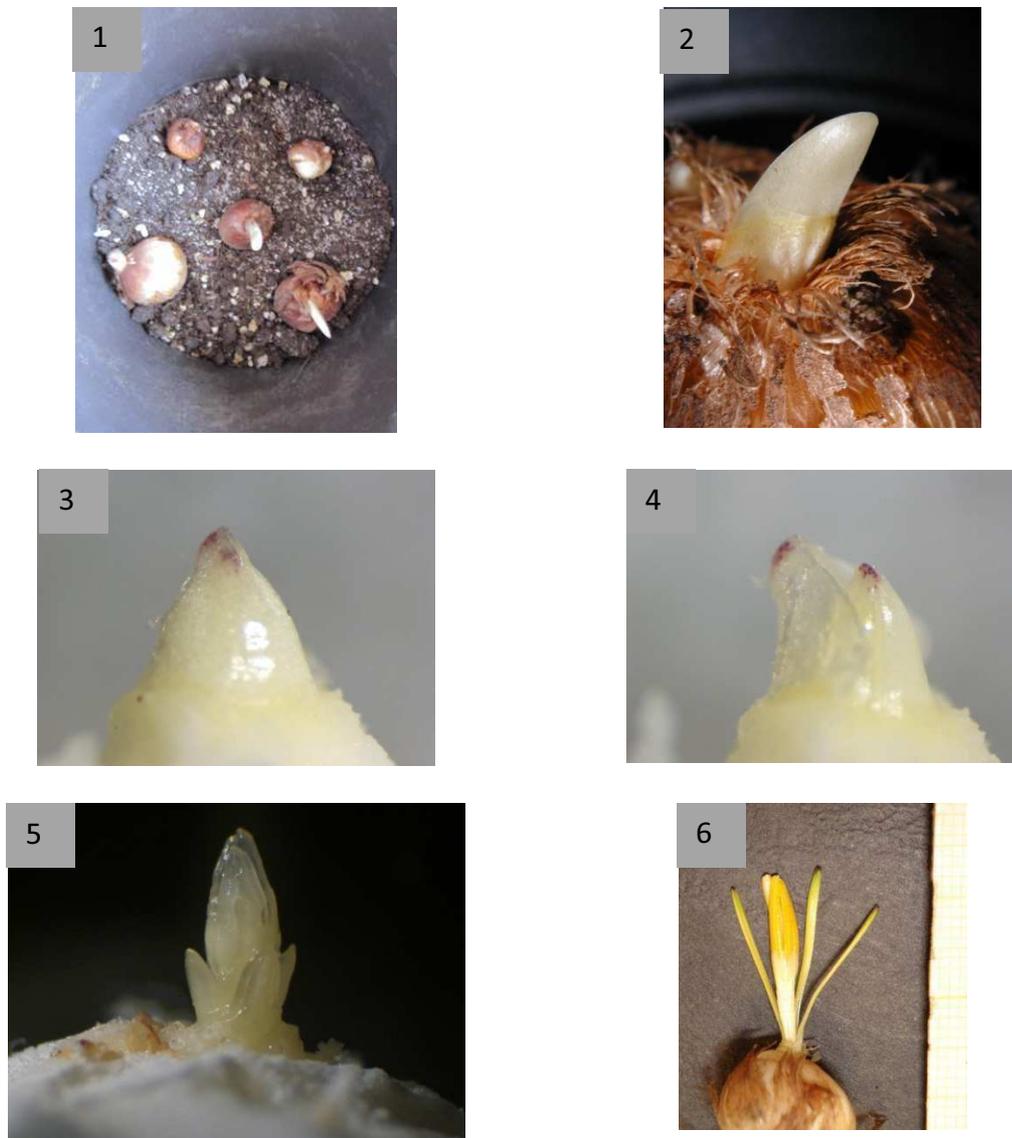
##### 4.2.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA INDUCCIÓN FLORAL

Este estudio se realizó con el objetivo de establecer las condiciones de conservación más adecuadas de los cormos tras el arrancado, para obtener el máximo de diferenciación floral, así como para conocer el momento de la diferenciación floral en las especies de *Crocus* españolas. Se trabajó con una especie de floración otoñal sin histerantia (*C. serotinus*), una especie de floración otoñal con histerantia (*C. nudiflorus*), una especie de floración a final del invierno (*C. nevadensis*), y una especie que florece más adentrada la primavera (*C. vernus*).

Se conservaron los cormos a distintas temperaturas tras la cosecha (10°C, 23°C y 30°C), y se fueron muestreando cormos a intervalos regulares para observar el estado de diferenciación floral de los meristemas de las distintas especies. Este ensayo se realizó durante dos años, para ampliar el experimento y también para confirmar los resultados. *C. serotinus*, especie que presentó diferenciación floral a 30°C, se ensayó en el siguiente año el almacenamiento a 35°C.

La incubación se inicia poco después de cosecharse los cormos. El muestreo comienza a mediados de julio y se finalizó en el momento en que la mayoría de los cormos muestreados mostraron diferenciación floral. Se dispuso de diferentes lotes de entre 35-40 cormos cada uno, que se muestrearon en diferentes fechas a lo largo del periodo de incubación. Se toma como referencia el estudio realizado sobre la influencia de la temperatura en la formación de la flor del azafrán de Molina *et al.* (2005a).

En la Figura 55 se muestran fotos del desarrollo de los meristemas durante la incubación. Las fotos de este estudio fueron realizadas mediante una lupa Leica MZ APO que lleva incorporada una cámara digital JVC.



**Figura 55** *Influencia de la temperatura en el desarrollo de los brotes. Distintas fases del proceso de observación del meristemo en desarrollo de los cormos incubados. 1. Cormos de C. serotinus BCU002775, 2. Yema de C. vernus BCU002998, 3 y 4. Yemas de C. nevadensis BCU002695, 5. Yema floral de C. nudiflorus BCU002944, 6. Flor de C. vernus BCU002998*

#### 4.2.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA FLORACIÓN Y EN EL TAMAÑO DE LA FLOR

Se trabajó con una especie otoñal (*C. serotinus*) y dos especies de primavera. Se eligieron como especies primaverales *C. nevadensis* y *C. vernus*, ya que la primera florece a finales de invierno y un poco antes de que empiece la primavera (finales febrero-primeros de marzo), y la segunda ya bien entrada la primavera (finales de marzo).

### III MATERIAL Y MÉTODOS

Para cada especie, se realizaron 2-4 réplicas por tratamiento térmico con, aproximadamente, 10-30 cormos por réplica, dependiendo del material disponible en el BGV de Cuenca. Dado que existían ligeras variaciones en el número de cormos por tratamiento, se midió la variable número de flores por cormo. Se observó su evolución diaria y su valor final. Al mismo tiempo se valora el periodo de floración (días) y los días hasta la floración de cada tratamiento. En relación al tamaño de la flor se evaluó la longitud media (mm) y la vida media (días) de las flores en cada tratamiento.

En función de la fenología de las especies, se aplicaron diferentes tratamientos con objeto de ensayar:

1) Relación de la temperatura con la precocidad y la intensidad de la floración en especies de primavera y de otoño.

2) Necesidad de un período de temperaturas invernales para que tenga lugar la floración en especies de primavera.

Con objeto de comprobar la necesidad de un tratamiento frío en especies primaverales para inducir la salida de la flor, los cormos se sembraron en septiembre y se mantuvieron en las cámaras de cultivo donde se bajaron las temperaturas progresivamente hasta alcanzar 5°C en el mes de noviembre, 2°C en diciembre y, de nuevo, 5°C en enero para la especie *C. nevadensis*. A partir de finales de enero, se aplicaron dos tratamientos térmicos, 10 y 17°C, con objeto de comprobar la influencia de la temperatura, una vez pasada la época fría, en la precocidad e intensidad de la floración. Como tratamiento control, se bajó progresivamente la temperatura desde verano hasta noviembre a 10°C y se mantuvo en este valor (Figura 56).

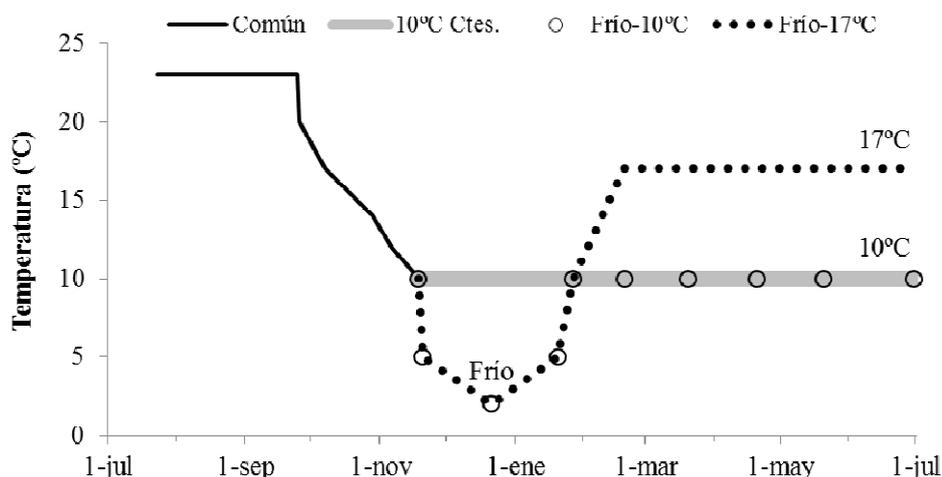


Figura 56 Tratamiento térmico de los ensayos de floración realizados con cormos de *C. nevadensis*.

Para la especie *C. vernus* de floración más tardía, el período de frío se prolongó hasta primeros de marzo (Figura 57).

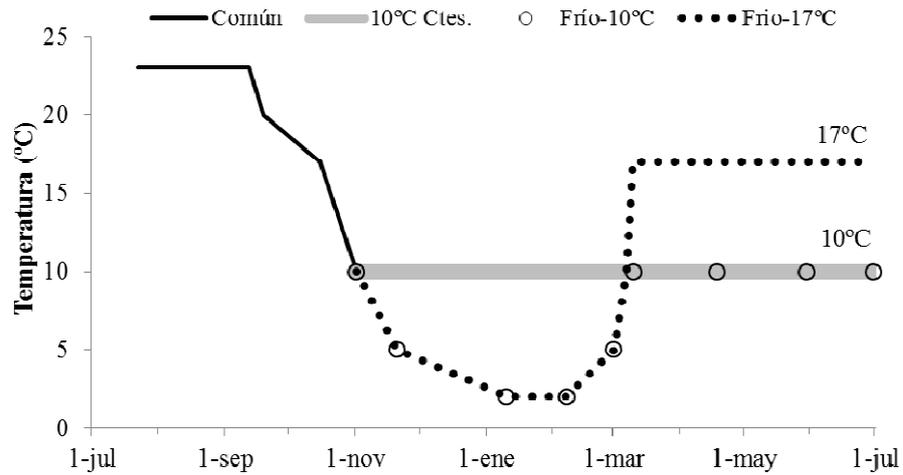


Figura 57 Tratamiento térmico de los ensayos de floración realizados con cormos de *C. vernus*.

En la especie otoñal, *C. serotinus*, se estudió la influencia de la temperatura en la precocidad y la intensidad de la floración. A finales de septiembre, los cormos se sembraron y mantuvieron a diferentes temperaturas: 10°C, 17°C y 30°C (Figura 58).

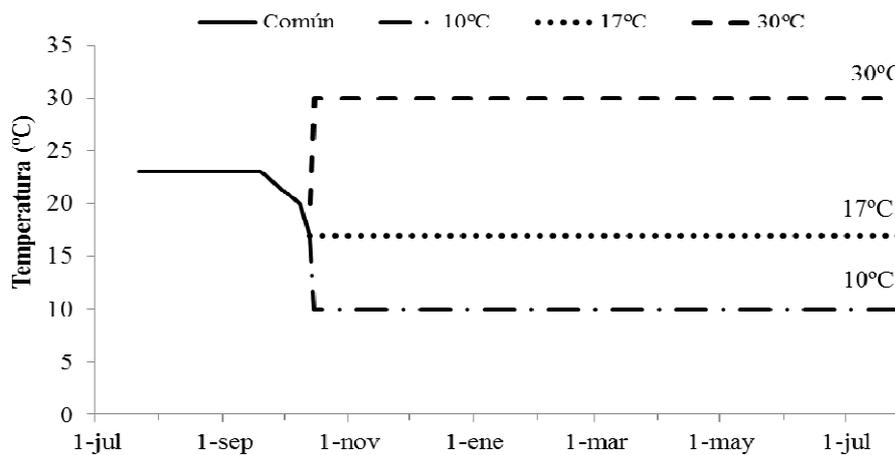


Figura 58 Tratamiento térmico de los ensayos de floración realizados con cormos de *C. serotinus*.

En la Figura 59 se muestran fotos del crecimiento de las flores a diferentes temperaturas para cada especie estudiada.

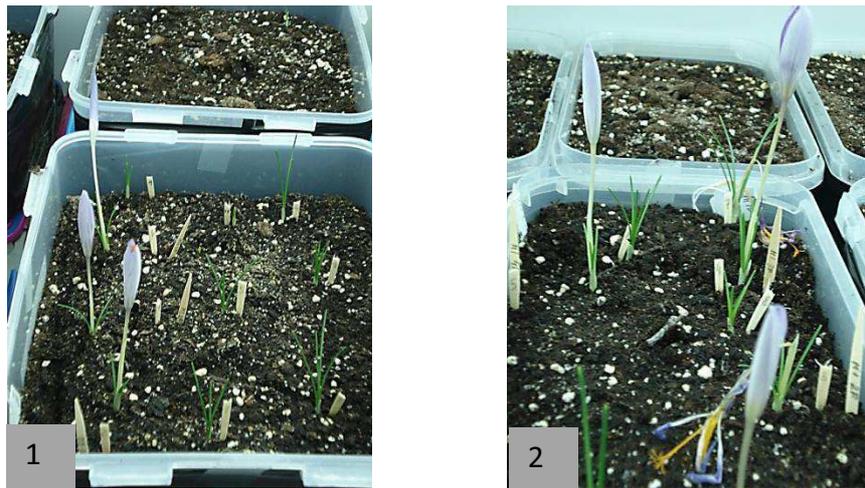


Figura 59 Influencia de la temperatura en la floración de cormos de *C. serotinus* (BCU002775) (1) 10°C y (2). 17°C.

#### 4.2.3 INFLUENCIA DE UN PERIODO FRÍO EN EL CRECIMIENTO DE LA YEMA FLORAL DE ESPECIES PRIMAVERALES.

Con objeto de estudiar el retraso de la floración de las especies primaverales, en caso de que no pudiera explicarse por diferencias en el estado de desarrollo a finales de verano, se planteó el estudio de la influencia de las bajas temperaturas en el proceso de crecimiento de la yema hasta la floración de las especies primaverales.

Este proceso se estudió en *C. nevadensis*, que florece en febrero (en las condiciones naturales), y en la especie *C. vernus*, que florece finales de marzo.

Se midió el crecimiento de las flores desde la base del cormo, desde septiembre hasta la floración. Por cada especie, fecha de medida y tratamiento térmico, se midieron entre 5-10 plantas. Se intentó trabajar con cormos lo más homogéneos posible en tamaño.

Los tratamientos térmicos aplicados a cada especie se representan en la Figura 60 y Figura 61.

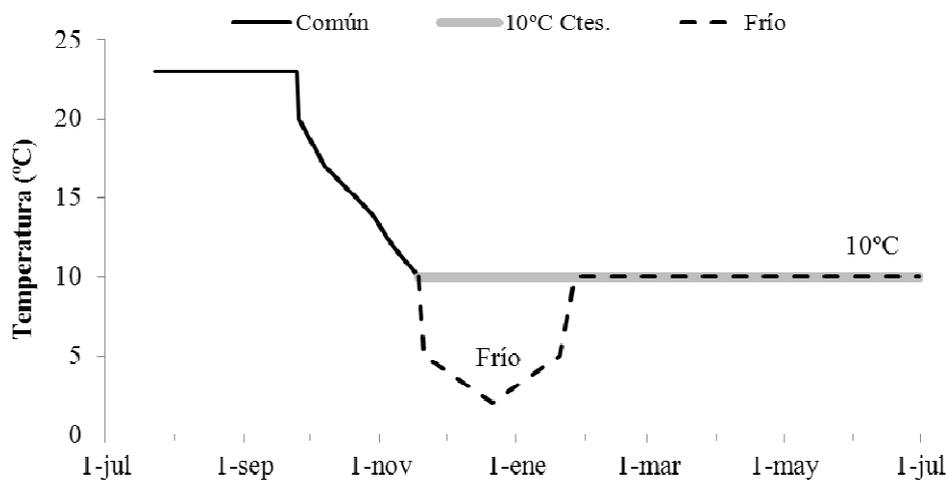


Figura 60 Tratamiento térmico de los ensayos previos a la floración realizados con cormos de *C. nevadensis*.

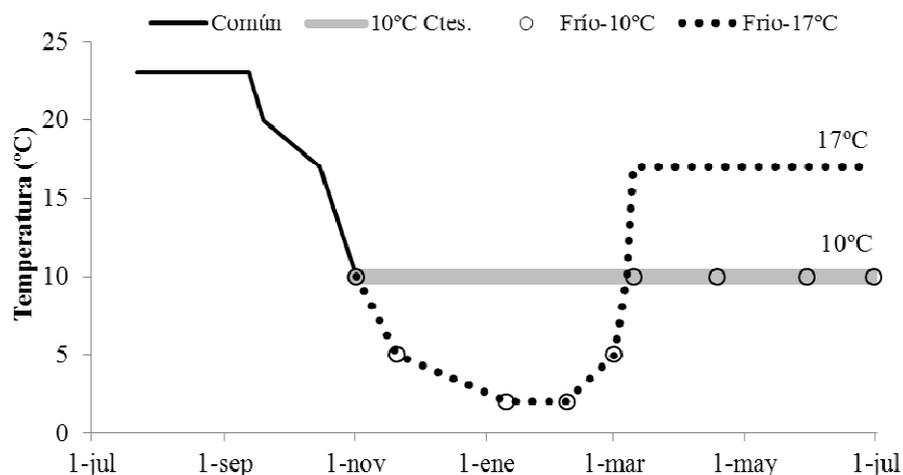
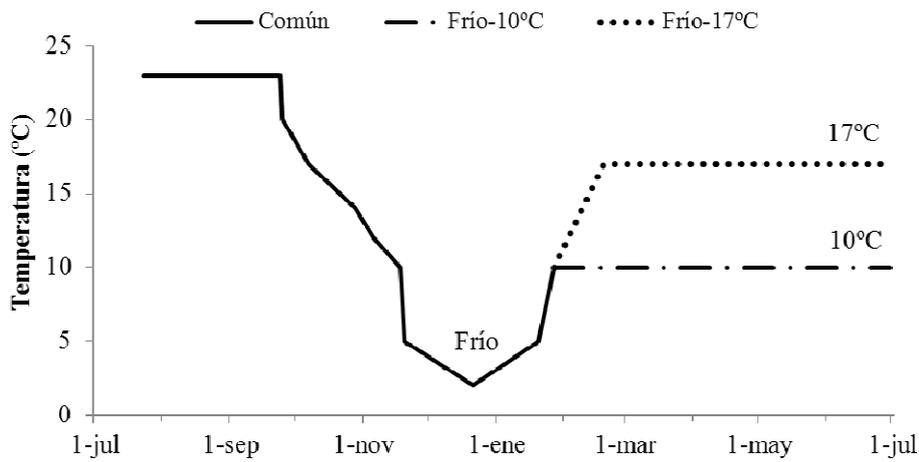


Figura 61 Tratamiento térmico de los ensayos previos a la floración realizados con cormos de *C. vernus*

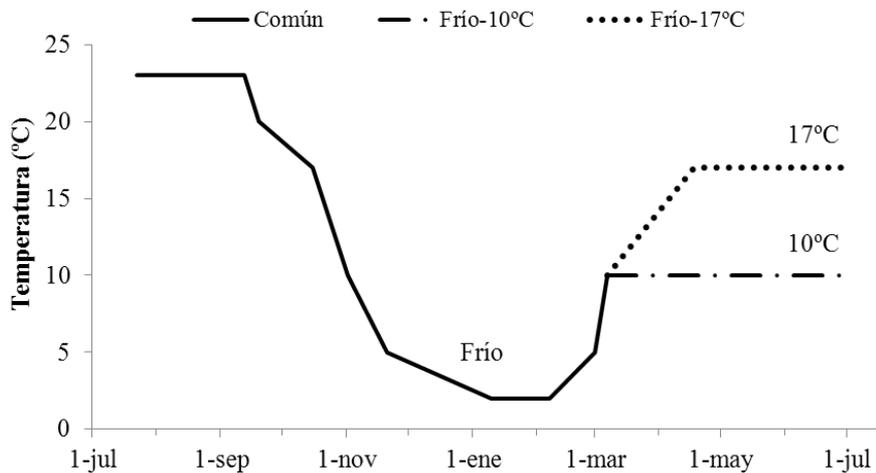
#### 4.2.4 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO VEGETATIVO, EN LA FORMACIÓN DEL FRUTO Y EN LA SENESCENCIA DE LAS HOJAS

Con objeto de comprobar la influencia de la temperatura en el desarrollo posterior a la floración, tanto de especies de floración primaveral como otoñal, se sometieron las plantas a dos regímenes térmicos distintos, de temperaturas altas y bajas, durante su desarrollo vegetativo.

En especies de floración primaveral, tras mantenerse temperaturas elevadas en verano que podrían inducir la formación de la flor (23°C), se bajó progresivamente la temperatura hasta llegar a temperaturas invernales de 2-5°C. Este periodo de frío invernal se aplicó desde la segunda quincena del mes de noviembre hasta finales del mes de enero o febrero, según la especie. Posteriormente, se elevaron las temperaturas hasta 10°C o hasta 17°C, descritas como temperaturas adecuadas para la floración y el desarrollo vegetativo en azafrán y *C. vernus* (Bradi *et al.*, 2007 y Lundmark *et al.*, 2009). En *C. nevadensis* (Figura 62) y *C. carpetanus*, de floración más temprana, la elevación se produjo a principios de febrero. En *C. vernus*, de floración más tardía, a principios de marzo (Figura 63). A partir de esta fecha, se mantuvieron las temperaturas de 10 ó 17°C hasta el final del cultivo.

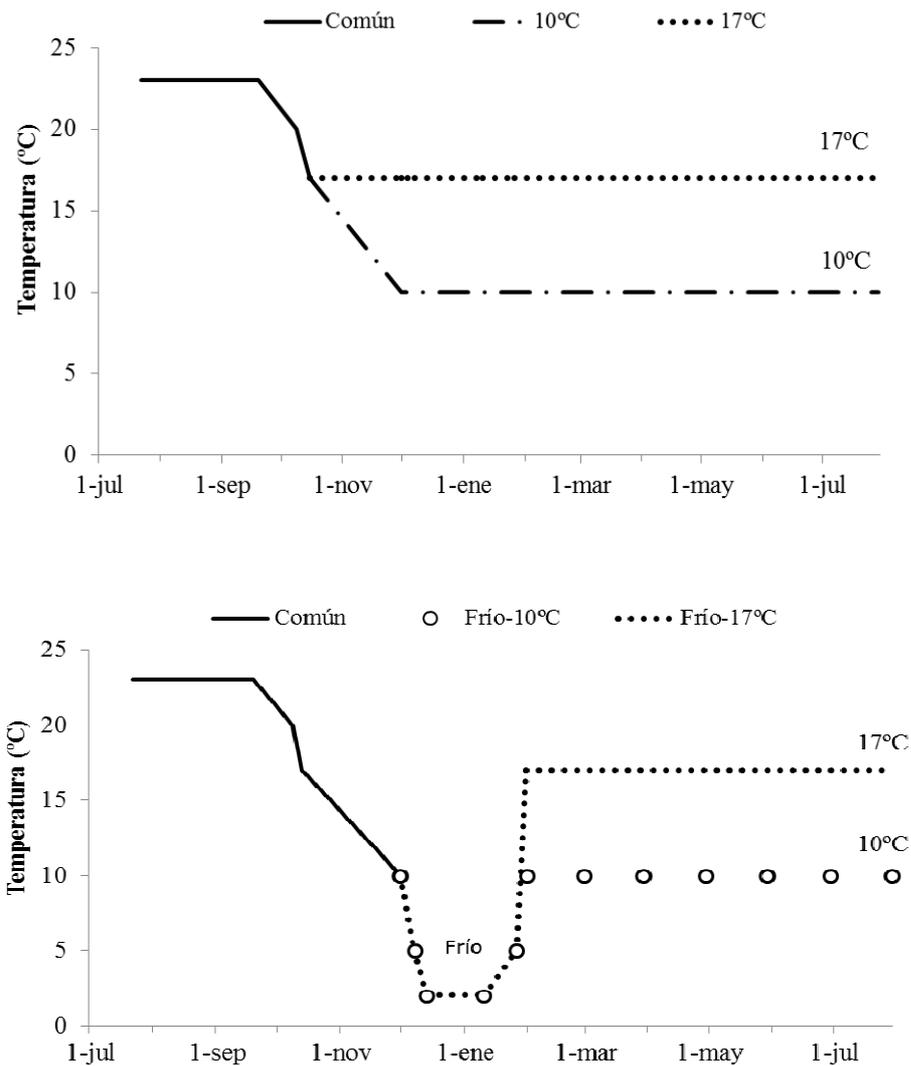


**Figura 62** Tratamientos térmicos aplicados a la especie *C. nevadensis* para estudiar su desarrollo vegetativo.



**Figura 63** Tratamientos térmicos aplicados a la especie *C. vernus* para estudiar su desarrollo vegetativo.

En *C. serotinus*, de floración otoñal, tras el mantenimiento de temperaturas de 23°C en verano para inducir el desarrollo de la flor, se bajaron a finales de septiembre hasta 17°C para promover la floración, tal como se describe en *C. sativus* (Molina *et al.*, 2005a). Con objeto de observar la influencia de la temperatura en el desarrollo vegetativo, un lote de plantas se mantuvo a esta temperatura hasta final del cultivo. En otro lote, la temperatura se bajó a primeros de noviembre hasta 10°C, y se mantuvo también hasta el final del cultivo (ver Figura 64). Asimismo, en esta especie de brotación y floración otoñal, se estudió el efecto en el desarrollo vegetativo de las bajas temperaturas aplicadas tras la floración (frío invernal de menos de 5°C). Este frío invernal se aplicó desde el mes de diciembre hasta finalizar febrero, cuando se dividió el material en dos lotes. Un lote se desarrolló a 10°C y el segundo a 17°C, hasta el final del ciclo (gráfica inferior de la Figura 64).



**Figura 64** Diferentes tratamientos térmicos aplicados en *C. serotinus* para estudiar su desarrollo vegetativo (superior) sin periodo de frío invernal y (inferior) bajo la influencia de un periodo de frío invernal.

En la especie *C. nudiflorus*, de floración otoñal e histerantia, tras la incubación a 23°C en verano y la floración a 17°C en septiembre, se aplicó frío invernal desde diciembre hasta febrero. Posteriormente, se elevó la temperatura hasta 10°C o hasta 17°C, temperaturas adecuadas para la floración y el desarrollo vegetativo (Figura 65).

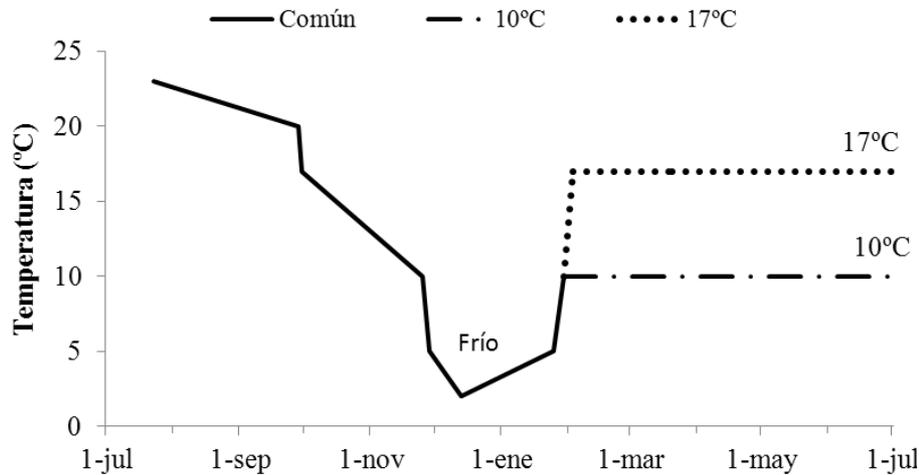


Figura 65 Tratamientos térmicos aplicados a la especie *C. nudiflorus* para estudiar su desarrollo vegetativo.

Se midió el desarrollo vegetativo en distintos órganos (raíz, cormo y hojas) desde septiembre hasta mayo-junio, en que tiene lugar la seca del espartillo (Figura 66). No obstante, hay que tener presente que algunos órganos, como las raíces, pueden comenzar su desarrollo antes que otros. Así por ejemplo, el desarrollo del cormo hijo se observa siempre con posterioridad a las raíces y hojas. Por cada especie, fecha de medida y tratamiento térmico, se midieron entre 5-10 plantas. Se intentó trabajar con cormos lo más homogéneos posible en tamaño.



Figura 66 Cormos de *C. carpetanus* durante el ensayo de desarrollo vegetativo

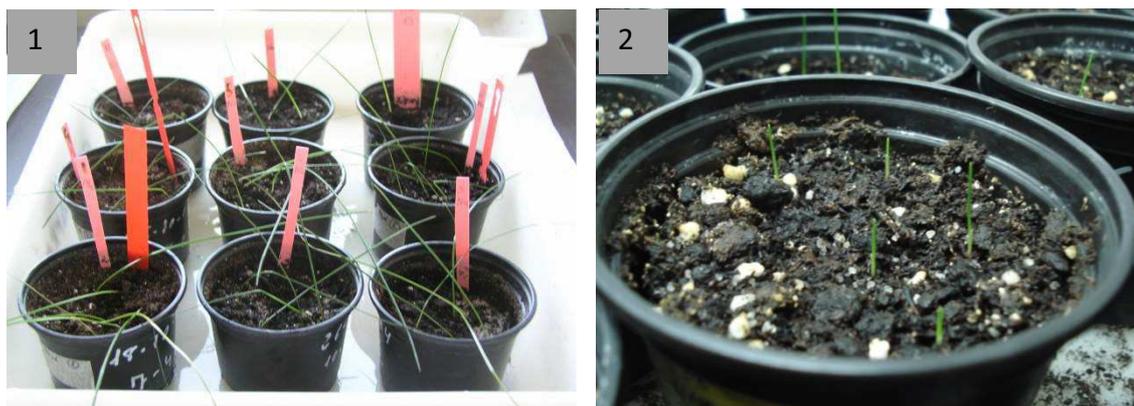
#### 4.2.5 DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES IDÓNEAS DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Se trabajó con cinco especies de las siete que se han identificado en el territorio español. Dos de estas especies son de floración otoñal, una que brota y florece simultáneamente en otoño (*C. serotinus*) y otra desarrolla su hoja después del invierno (*C. nudiflorus*) (Figura 67). Dentro de las especies de floración primaveral, se ha estudiado *C. nevadensis*, si bien florece al final del invierno, y brota con anterioridad a la floración. *C. carpetanus*, que muestra una brotación y floración simultánea y ligeramente más retrasada que la anterior. Y por último, *C. vernus*, que brota y florece al final de la primavera.

Para la especie de floración otoñal, se estudió el efecto del almacenamiento en seco a temperaturas elevadas (23°C) durante diversos períodos de tiempo (0, 15, 30, 45, 60 y 80 días). Sabemos que el fruto madura a finales de primavera y no germina hasta otoño. Asimismo, se analizó el efecto de dos temperaturas diferentes de germinación (10 y 17°C), tras un período de almacenamiento en seco de 45 días, que resultó favorecer la germinación de esta especie. La elección de los valores para los parámetros estudiados se basó en estudios preliminares con otras especies no españolas (*C. flavus*) de las que se dispuso de material con anterioridad a trabajar con nuestros materiales silvestres.

En las especies *C. nudiflorus*, *C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus*, se estudió tanto el efecto del almacenamiento en seco a 23°C durante diferentes períodos (0, 15, 30, 45 y 60 días), así como la influencia de someter a las semillas a diferentes períodos (0, 15, 30, 45 y 60 días) de estratificación fría (4-5°C) tras el almacenamiento en seco. Igualmente se ensayaron dos temperaturas de germinación (10 y 17°C).

Se trabaja con semillas procedentes de colectas y se realizan tres replicas por tratamiento con 7 semillas cada una. Se siembran en macetas con sustrato y aplica el riego una vez se inicia la fase de germinación a 10°C o a 17°C.



**Figura 67** Semillas de (1) *C. serotinus* y (2) *C. nudiflorus* tras la germinación

### III MATERIAL Y MÉTODOS

## 5 VARIABILIDAD DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DE *CROCUS* PARA EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES EN SUS ESTILOS

### 5.1 MATERIAL VEGETAL

Los estigmas proceden de flores colectadas en la colección del BGV de Cuenca ubicado en el CIAF de Albadalejito en Cuenca. No obstante, debido a la baja disponibilidad de flores en algunas entradas, también se han incluido en estos análisis flores que se colectaron durante las jornadas de colecta (Tabla. 16).

Tras la recolección de las flores se realizó la monda. Los estigmas frescos separados de los restos florales se secaron a 35°C durante 24h. Posteriormente y hasta su análisis se almacenaron a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

*Tabla. 16. Muestras utilizadas en la caracterización fitoquímica. Se indica el número de entrada del BGV de Cuenca de procedencia de los estilos, la especie, el origen de la colecta del material vegetal y el lugar de la colecta de las flores. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1.*

MUESTRA	ENTRADA	ESPECIE	ORÍGEN	COLECTADO EN
3001	BCU003001	<i>C. nudiflorus</i>	Burgos	Burgos
3176	BCU003176	<i>C. nudiflorus</i>	Huesca	CIAF Albadalejito (Cuenca)
2741	BCU002741	<i>C. serotinus</i>	A Coruña	CIAF Albadalejito (Cuenca)
2550	BCU002550	<i>C. serotinus</i>	Albacete	CIAF Albadalejito (Cuenca)
3175	BCU003175	<i>C. serotinus</i>	Burgos	Burgos
2775	BCU002775	<i>C. serotinus</i>	Cuenca	CIAF Albadalejito (Cuenca)
3181	BCU003181	<i>C. serotinus</i>	León	León
1657	BCU001657	<i>C. serotinus</i>	Jaén	CIAF Albadalejito (Cuenca)
2619	BCU002619	<i>C. serotinus</i>	Valencia	CIAF Albadalejito (Cuenca)
3018	BCU003018	<i>C. vernus</i> subsp. <i>vernus</i>	Vivero	CIAF Albadalejito (Cuenca)
3198	BCU003198	<i>C. vernus</i> subsp. <i>vernus</i>	Huesca	Huesca
3192	BCU003192	<i>C. carpetanus</i>	Ávila	Ávila
3189	BCU003189	<i>C. nevadensis</i>	Cuenca	Cuenca
3190	BCU003190	<i>C. nevadensis</i>	Jaén	Jaén
1642	BCU001642	<i>C. sativus</i>	Cuenca	CIAF Albadalejito (Cuenca)

### 5.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Todos los análisis se realizaron en los laboratorios del departamento de Química de la Universidad Aristotélica de Tesalónica (Grecia) bajo la tutela de la Dra. M. Tsimidou, durante una estancia financiada por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y al Ministerio de Ciencia y Educación (Beca predoctoral INIA, Bec-2008-0146).

El método de preparación de la disolución es similar al recomendado por las especificaciones técnicas estándar ISO 3632-2 (2003). Se modifica por la adición de agua a la disolución (50%).

Los estigmas se trituraron en un mortero de ágata hasta reducirlos a polvo fino. Se realizó una extracción 0,05:100 (g de muestra por ml de solvente), utilizándose como tal, la mezcla de agua y metanol (50:50), ambos de alta pureza. Esta maceración se favoreció mediante agitación (1000 rpm) durante una hora, a temperatura ambiente y en oscuridad. La solución de trabajo se filtró antes de examinarla en los espectrofotómetros (filtro RC-55, 13 mm diámetro interno; 0,45 µm diámetro del poro). La solución stock se reservó y almacenó a 5°C y en oscuridad. Con esta disolución se trabajó mediante espectrofotometría UV-Vis y cromatografía líquida (HPLC-DAD) para la obtención de los perfiles fitoquímicos.

Con las muestras de menor cantidad de estigma, se aplicó el protocolo de Tarantilis *et al.* (1995), para extraer los compuestos de forma óptima. Los estigmas se dejaron en maceración en una mezcla de agua y metanol (50:50) durante 24 horas, con agitación ocasional. La Tabla. 17 refleja el proceso de extracción realizado con cada muestra.

**Tabla. 17. Proceso de extracción realizado con cada muestra. \* Overnight: Los estigmas se dejaron en maceración en una mezcla de agua y metanol (50:50) durante 24 horas, con agitación ocasional.**

Nº BCU	ESPECIES	ORIGEN DE LA ENTRADA	PROCESO EXTRACCIÓN
BCU001657	<i>C. serotinus</i>	Jaén	1 hora de agitación
BCU002741	<i>C. serotinus</i>	La Coruña	<i>Overnight*</i>
BCU003175	<i>C. serotinus</i>	Burgos	<i>Overnight</i>
BCU002775	<i>C. serotinus</i>	Cuenca	1 hora de agitación
BCU003181	<i>C. serotinus</i>	León	<i>Overnight</i>
BCU002775	<i>C. serotinus</i>	Cuenca	1 hora de agitación
BCU002550	<i>C. serotinus</i>	Albacete	<i>Overnight</i>
BCU002619	<i>C. serotinus</i>	Valencia	<i>Overnight</i>
BCU003001	<i>C. nudiflorus</i>	Huesca	<i>Overnight</i>
BCU003176	<i>C. nudiflorus</i>	Burgos	<i>Overnight</i>
BCU003018	<i>C. vernus</i>	Vivero	1 hora de agitación
BCU003198	<i>C. vernus</i>	Huesca	1 hora de agitación
BCU003192	<i>C. carpetanus</i>	Jaén	1 hora de agitación
BCU003189	<i>C. nevadensis</i>	Cuenca	1 hora de agitación

#### 5.3 ESPECTROSCOPIA DEL UV-VIS

Se registraron los espectros de orden cero de los extractos en el rango de  $\lambda$  (nm) de 200-600nm, mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV 1601 (Kyoto, Japan) y unas cubetas de cuarzo (1cm x 1cm x 4cm). Las medidas de la absorbancia de cada extracto se obtuvieron por triplicado. Se calculó también la segunda derivada de este espectro con el programa UVPC 1601 (Personal Spectroscopy Software, v.3.9, Shimadzu). El factor de suavizado fue de 17 puntos experimentales, medidos cada 10 nm.

El coeficiente de variación de las distintas repeticiones de las medidas de espectroscopía fue siempre inferior a 0,05, presentando una adecuada repetitividad.

##### 5.3.1 EVALUACIÓN DEL FACTOR $E_{1cm}^{1\%}$ SEGÚN LA ISO 3632-2.

El factor  $E_{1cm}^{1\%}$  es un parámetro de calidad ISO 3632-2 que permite evaluar las variables de calidad del azafrán: el poder colorante, el sabor y el aroma. Es necesario medir en triplicado la absorbancia del extracto de la muestra en tres longitudes de onda: 257 nm, 330 nm y 440 nm. Su ecuación es la siguiente:

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{D \times 10000}{m(100 - H)}$$

Dónde: **D** es el valor de la absorbancia; **m** es la masa evaluada (g) y **H** es la humedad y contenido volátil de la muestra, expresado en masa (% m/m). La humedad y el contenido volátil de la muestra son expresados como porcentaje usando la relación:

$$H = ((\text{peso inicial} - \text{peso seco}) / \text{peso inicial}) \times 100$$

El valor de la humedad se estableció en un 10 % m/m.

El factor  $E_{1cm}^{1\%}$  en cada longitud de onda se expresan como la media de tres réplicas.

#### 5.4 CROMATOGRAFIA DE HPLC-DAD

La absorbancia se registró entre 200-550 nm, para poder detectar carotenoides y flavonoides presentes en las muestras. Los carotenoides presentan tres picos de máxima absorción en su espectro de UV-Vis en las siguientes longitudes de onda: 250, 320 y 400-500 nm. Sin embargo, los flavonoides manifiestan su máximo de absorbancia entre los 260- 380 nm.

Para la determinación de metabolitos se empleó un sistema HPLC (4000 Thermo CA, USA, con un autosampler (Midas, Spark, The Netherlands), y un detector de matriz de diodo (DAD, 6000LP, Thermo). La separación se realizó en una columna de fase reversa (LiChroCART Superspher 100 RP-18, 125 x 4 mm de diámetro interno, 4  $\mu$ m de diámetro Merck, KGaA, Darmstadt, Germany). Se inyectó una alícuota de 20  $\mu$ l de la muestra que se eluyó en condiciones gradiente de acetonitrilo/agua (de 20/80 a 100/0 en 20 min) a un flujo de 0,5 ml/min. Se observaron los cromatogramas a 250, 310 y 440 nm.

## 5.5 IDENTIFICACIÓN

Mediante la técnica cromatográfica HPLC-DAD ha sido posible la identificación de dos de los picos presentes en las muestras analizadas, con el método de adición del analito puro o estándar (*spiking*). Se corren en este sistema 2 estándares correspondientes a dos flavonoides muy abundantes en tejidos vegetales (Kaempferol-3-O-glucósido y kaempferol-3-O-rutinósido). Se comprueba en los cromatogramas de todas las muestras, si en el tiempo de elución de alguno de los estándares existe algún pico. Si coincide, se examina la  $\lambda_{\text{máx}}$  para ver si son similares y se aplica el método de identificación.

### 5.5.1 ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA IDENTIFICACIÓN

Se realizó un análisis de coordenadas principales (ACoP) para determinar si era posible agrupar las entradas de las distintas especies en función de la ausencia o presencia de los principales picos cromatográficos identificados que corresponden a carotenoides y flavonoides, y cuáles son los compuestos más discriminantes. A partir de esta identificación se construyó una matriz cuyos valores son 1 y 0, dependiendo de la presencia o ausencia de un determinado pico para cada una de las entradas caracterizadas. Se descartaron los picos presentes en todas las especies y que no eran discriminantes entre las mismas. Para el cálculo del ACoP se empleó el programa NTSYS pc 2.0 (Rohlf, 1996).

Las 15 entradas que se evaluaron en el presente ACoP son las que figuran en la tabla mostrada en el apartado de material vegetal (Tabla. 17).

Además del ACoP, se realizó un análisis clúster (ver apartado 2.3.2. de Material y Métodos).

## 5.6 CUANTIFICACIÓN

Los métodos para cuantificar a partir del perfil cromatográfico obtenido mediante HPLC son muy diversos. En todos ellos se emplea el área del pico o la altura del pico. El cálculo se basa en la relación de proporcionalidad entre la señal del detector (**R**) y la cantidad de sustancia (**m**) (Macrae, 1983).

$$R: a \times m$$

Este factor **a** no es fácil de predecir y es característico de cada sustancia. Este factor **a** es a su vez, la inversa del factor respuesta (**FR**).

$$FR = DR / m$$

Dónde **DR** es el área del pico correspondiente al componente a analizar y **m** es la masa del analito o concentración.

Este factor FR sí que se puede calcular. Los equipos cromatográficos que se emplean en la actualidad disponen de integradores electrónicos que integran los picos de los cromatogramas y se obtienen la altura y el área de cada pico. Ambos parámetros se

pueden utilizar para cuantificar los distintos compuestos, siendo el área del pico el más utilizado y el que se emplea en este trabajo. Se calcula inyectando una masa de concentración conocida del analito puro y calculando el área de ese pico en el cromatograma. Teniendo en cuenta el tiempo de retención en el cromatograma de la muestra, se calcula el área de ese pico y con el factor calculado antes, podemos tener la concentración del analito en la muestra (Macrae, 1983).

El método más utilizado en HPLC para calcular la concentración de un analito es el método del estándar o patrón externo. Consiste en la preparación de estándares de concentración semejante al analito en la muestra. Se realiza el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones de trabajo. La concentración de analito en la mezcla se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia:

$$P = \frac{A_m C_s}{A_s} D 100$$

Dónde **P** es el porcentaje de analito en la muestra, **A<sub>m</sub>** y **A<sub>s</sub>**, son las áreas de la muestra y el estándar respectivamente, **C<sub>s</sub>** es la concentración del estándar y **D** es un factor de dilución. Este método requiere la utilización de un estándar de referencia y su exactitud dependerá ampliamente de la calidad del estándar utilizado (Quattrocchi *et al.*, 1992; Lage y Cantrell, 2009).

En el presente trabajo se realizó la cuantificación de las crocinas totales y de los flavonoides totales utilizando como patrón externo:

- 1) Cuantificación de crocinas totales expresada como crocina 1 (Crocina *trans*-4GG).
- 2) Cuantificación de flavonoides totales expresados como Quercetina, utilizando como patrón Quercetina dihidrato ( $\geq 99\%$ ) adquirido en Extrasynthese (Genay, France).

El protocolo que se siguió para realizar la identificación fue el siguiente:

1. Preparación de una serie de disoluciones de concentraciones crecientes, del patrón correspondiente al compuesto a cuantificar. El intervalo de concentraciones ha de ser similar a la concentración del analito en la muestra problema.

2. Inyección en el sistema HPLC del mismo volumen de cada una de las disoluciones patrón, así como del extracto de la muestra. De esta forma tendremos los distintos cromatogramas de los patrones (un cromatograma para cada disolución patrón) y el cromatograma de la muestra.

3. Elaboración de una tabla con la concentración de analito y el área del pico correspondiente a cada concentración.

4. Construcción de la recta de calibrado, mediante la representación del área del pico frente a la concentración o masa del compuesto.

5. A partir de la recta de calibrado se calcula la concentración de analito sustituyendo “y” por el área del pico del analito en el cromatograma de la muestra y despejando “x” que corresponde a la concentración de analito.

Con los valores de las áreas de cada pico del cromatograma a 440nm, que corresponden a crocinas, y conociendo el espectro de absorción en el UV-Vis de cada una, calculamos el porcentaje de crocinas *trans* y *cis*, respecto el total de crocinas, para cada entrada analizada.

#### **5.6.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA CUANTIFICACIÓN**

Se estudió la variabilidad interespecífica en el contenido en crocinas totales, el porcentaje de crocinas *trans* y *cis*, así como en la presencia de flavonoides totales, a partir de un análisis de la varianza simple. Para comprobar si las diferencias encontradas eran significativas se realizó un análisis de LSD (*Least Significant Differences*). Estos análisis estadísticos indicados se realizaron utilizando el programa *Statgraphics Plus*, versión 5.1.

## 6 ESTUDIO PRELIMINAR DEL USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS* EN ESTADO VEGETATIVO

Se han puesto a punto protocolos y se han ensayado marcadores de tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*- Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), una metodología basada en la amplificación de intrones, utilizando cebadores diseñados en base al flanqueo de exones en PCR, conocido como EPIC (*Exon-Primed Intron-Crossing*); y microsatélites (SSR, *Simple Sequence Repeat microsatélite*, o STR, *Short Tandem Repeat*).

### 6.1 ANÁLISIS MEDIANTE MARCADORES RAPD

#### 6.1.1 MATERIAL VEGETAL

Se analizaron un total de 133 muestras de hojas correspondientes a las ocho especies de *Crocus* (*C. nevadensis*, *C. nudiflorus*, *C. vernus subsp. vernus*, *C. carpetanus*, *C. serotinus*, *C. clusii*, *C. cambessedesii* y *C. sativus*) que habitan en España (Tabla. 18). Las muestras se recogieron sobre 26 entradas cedidas por el Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca que conserva la colección nacional de azafrán y otros *Crocus*.

Las entradas analizadas se seleccionaron según su procedencia para que el conjunto de entradas seleccionadas por especie fueran representativas de la variabilidad presente en España (ver introducción). Se consideraron localidades representativas de todo el área de distribución de cada especie, estableciendo la hipótesis de que aparecerán mayores diferencias genéticas cuanto más distantes se hallen las zonas de colecta. Se eligieron puntos localizados en el norte, sur y otros en la zona media a fin de evidenciar algún tipo de intercambio genético si es que este se produjese. El muestreo de individuos fue realizado al azar de entre los que formaban parte de la entrada. Se muestrearon entre 1 y 8 individuos por zona de colecta, dependiendo de la disponibilidad de material vegetal. Las especies con una menor distribución geográfica, *C. vernus* colectado en Pirineos y *C. cambessedesii* en Mallorca se representaron con una y dos poblaciones respectivamente. Especies con más amplia distribución y con dificultades para su identificación mediante marcadores morfológicos, como *C. serotinus* y *C. clusii*, se analizaron 7 y 6 poblaciones, respectivamente.

Las hojas muestreadas fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de la extracción.

**Tabla. 18. Muestras utilizadas en el análisis de RAPD. Se relaciona con su número de entrada del BGVCU, la especie, provincia de procedencia y el número de muestras. Para más información sobre las entradas consultar anejo 1.**

Muestra	Entrada	Especies	Provincia	Nº muestras
Cam 1-Cam5	BCU001680	<i>C. cambessedesii</i> J. Gay	Mallorca	5
Cam6-Cam 11	BCU001685	<i>C. cambessedesii</i> J. Gay	Mallorca	6
C1-C5	BCU002987	<i>C. carpetanus</i> Boiss. & Reut.	Madrid	5
C6-C10	BCU002696	<i>C. carpetanus</i> Boiss. & Reut.	Ourense	5
C11-C15	BCU002835	<i>C. carpetanus</i> Boiss. & Reut.	Ávila	5
N1-N5	BCU002969	<i>C. nevadensis</i> Amo	Cuenca	5
N6-N10	BCU002981	<i>C. nevadensis</i> Amo	Jaén	5
N11-N15	BCU002992	<i>C. nevadensis</i> Amo	Huesca	5
Nu1-Nu5	BCU003176	<i>C. nudiflorus</i> S.M.	Burgos	5
Nu6-Nu10	BCU003015	<i>C. nudiflorus</i> S.M.	Huesca	5
Nu11-Nu15	BCU003123	<i>C. nudiflorus</i> S.M.	La Rioja	5
S1-S5	BCU002741	<i>C. serotinus</i> Salisb.	La Coruña	5
S6-S10	BCU001657	<i>C. serotinus</i> Salisb.	Jaén	5
S11-S15	BCU002775	<i>C. serotinus</i> Salisb.	Cuenca	5
S16-S20	BCU002978	<i>C. serotinus</i> Salisb.	Granada	5
S21-S26	BCU003174	<i>C. serotinus</i> Salisb.	León	6
S27-S32	BCU002619	<i>C. serotinus</i> Salisb.	Valencia	6
S33-S38	BCU002959	<i>C. serotinus</i> Salisb.	Huelva	6
CL1-CL8	BCU002963	<i>C. clusii</i> J.Gay	Huelva	8
CL9-CL15	BCU002960	<i>C. clusii</i> J.Gay	Huelva	7
CL16 y CL17	BCU002961	<i>C. clusii</i> J.Gay	Huelva	2
CL18-CL24	BCU002964	<i>C. clusii</i> J.Gay	Cádiz	7
CL25-CL31	BCU002966	<i>C. clusii</i> J.Gay	Cádiz	7
CL32	BCU002965	<i>C. clusii</i> J.Gay	Cádiz	1
V1-V6	BCU003198	<i>C. vernus subsp. vernus</i> (Ker Gawl.)	Huesca	6
C+	-	<i>C. sativus</i> L.	Castilla- La Mancha	1

### 6.1.2 EXTRACCIÓN DE ADN Y CUANTIFICACIÓN

El ADN fue extraído de tejido foliar congelado a -80°C previamente. Se trituraron finamente 100 mg de tejido mediante un mortero y nitrógeno líquido. El producto obtenido se reservó en un tubo de 1,5 ml para realizar las extracciones mediante el kit comercial DNeasy Mini Kit (Qiagen). El ADN extraído se cuantificó mediante el espectrofotómetro JENWAY 6305.

### 6.1.3 PCR

En un estudio preliminar se probaron los oligonucleótidos OPA-04, OPR-05 y 06, OPL-11 y 16, y OPK-09 y 15 de Operon Tech, seleccionados por Moraga *et al.* (2009) en un trabajo de variabilidad en azafrán (Tabla. 19). Finalmente se seleccionaron los cebadores que mayor número de bandas mostraron: OPL-11 y OPL-16. La reacción de amplificación del ADN mediante PCR se realizó de acuerdo con este mismo trabajo. La mezcla de la reacción de 20 µl de volumen final contenía: 2 µl de tampón de reacción 10x, 2 µl de

### III MATERIAL Y MÉTODOS

mezcla de 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTPs, 1,6  $\mu\text{l}$  de disolución 0,4  $\mu\text{M}$  de oligonucleótidos, 1 unidad de Taq DNA polimerasa y 2  $\mu\text{l}$  de extracto de ADN genómico (con aproximadamente 10-20 ng de ADN). La concentración final de  $\text{Mg}^{+2}$ , como  $\text{MgCl}_2$ , fue de 2,5 mM. En cada reacción se utilizó una muestra de *C. sativus* como control positivo, y un control negativo, que consistió en todos los reactivos menos ADN.

Tabla. 19. Nombre y características de los cebadores descritos por Moraga et al. (2009).

Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Temperatura de anillamiento (°C)
OPL-11	ACG ATG AGC C	34,7
OPL-16	AGG TTG CAG G	34,7
OPR-06	GTC TAC GGC A	34,1
OPR-07	ACT GGC CTG A	36
OPK-09	TGA GCA CGA G	35
OPK-15	CTC CTG CCA A	34,1

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador (iCycler de Bio-Rad) con las condiciones reflejadas en la Tabla. 20.

Tabla. 20. Condiciones de PCR y número de ciclos por cada paso

Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Desnaturalización (x1)	2:00	94
Amplificación (x45)	0:30	94
	0:30	X <sup>1</sup>
	2:00	72
Elongación final (x1)	10:00	72

X<sup>1</sup>: La temperatura de amplificación fue diferente para cada par de cebadores (Tabla. 19).

La reproducibilidad y repetitividad de los perfiles de amplificación fueron comprobadas para cada cebador utilizado. En los análisis estadísticos, sólo se consideraron las bandas que se reproducían de forma clara y consistente. En todas las amplificaciones se introdujeron controles negativos y positivos para descartar posibles anomalías. Todas las amplificaciones del ADN se realizaron por duplicado.

#### 6.1.4 ELECTROFORESIS

Los fragmentos generados en la amplificación fueron separados por tamaño en geles de agarosa al 1,5% en TBE 0,5% (Anejo 7). El marcador de peso molecular utilizado fue Gene Ruler™ Ladder Mix (Thermo Scientific). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y visualizados por iluminación con luz UV. Los patrones RAPD fueron fotografiados, y la imagen fue impresa y grabada en un archivo digital para más tarde ser impresa en una impresora HP Photosmart de alta resolución.

### 6.1.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los fragmentos amplificados, identificados por el cebador utilizado y su tamaño en pares de bases (pb), se contabilizaron como presencia (1) o ausencia (0) de bandas homólogas, generando así una matriz de fenotipos RAPD. Dado que los marcadores RAPD son dominantes, asumimos que cada banda representaba el fenotipo de un locus bialélico (Williams *et al.*, 1990).

Se construyeron matrices de 1 y 0 que constituyen los fenotipos RAPD. A partir de esta matriz se han generado matrices de distancias entre genotipos, empleando el índice de Dice (1945) mediante el paquete informático PHYLTOOLS 1.32. (<http://www.plantbreeding.wur.nl>). El coeficiente de similitud genética de Dice es  $s_{ij}=2a/(2a+b+c)$ , donde  $s_{ij}$  es la similitud entre dos muestras  $i$  y  $j$ ,  $a$  es el número de bandas compartidas,  $b$  es el número de bandas exclusivas para  $i$ ,  $c$  el número de bandas exclusivas para  $j$  y  $d$  el número de bandas ausentes en ambas muestras. Esta medida establece la similitud entre dos muestras considerando el ratio entre bandas coincidentes y el total de bandas consideradas. Este coeficiente considera como coincidencia la presencia de la banda en las dos muestras y da doble peso a esta coincidencia. La fiabilidad de las relaciones determinadas se estimó mediante *bootstrapping*, generando 100 matrices de similitud.

El método de agrupamiento UPGMA se utilizó para diseñar el dendrograma y se elaboró mediante el paquete informático PHYLIP (ver apartado 2.3.2. de Material y Métodos).

## 6.2 ANÁLISIS MEDIANTE MARCADORES DE TIPO EPIC

### 6.2.1 MATERIAL VEGETAL

Las muestras utilizadas en este estudio provienen del Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca, y corresponden con las mismas entradas utilizadas en el análisis de RAPD.

Este estudio preliminar mediante marcadores de tipo EPIC se realizó con un total de 73 individuos, que incluyen un máximo de tres individuos de cada población por especie, de las entradas que figuran en la Tabla. 18.

### 6.2.2 PCR

Para la amplificación de marcadores tipo EPIC, se emplearon oligonucleótidos diseñados para azafrán para una  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (BCH) por Castillo *et al.* (2005) (Tabla. 21). Los oligonucleótidos usados (F:TGCACGTTCCGGCATCACATCCA; R: GAACTTCTCCGAGTGGTGGATC) amplifican una región localizada entre el Intrón I y el Intrón II del gen. La temperatura de anillamiento utilizada fue de 60,9°C y 57,1°C respectivamente. Para la PCR se emplearon las condiciones descritas en la Tabla. 21. Las condiciones de amplificación se han modificado a partir de las descritas en el trabajo de

### III MATERIAL Y MÉTODOS

Castillo *et al.* (2005). Se aumenta la temperatura de anillamiento desde 55°C a 60°C para obtener bandas más específicas (Alcázar, 2013).

Para esta PCR se utilizaron 30 ng de ADN genómico que se amplificó en un volumen final de 25 µl, que contenía 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTPs, 0,6 µM de cada cebador y 1U de Taq DNA polimerasa (ROCHE). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador (iCycler de Bio-Rad). En cada reacción se utilizó una muestra de *C. sativus* como control positivo, y un control negativo, que consistió en todos los reactivos menos ADN.

**Tabla. 21.** Condiciones de PCR y número de ciclos para cada paso (Castillo *et al.*, 2005, con modificaciones de Alcázar, 2013).

Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Desnaturalización (x1)	2:00	94
Amplificación (x30)	0:15	94
	0:30	60
	0:45	72
Elongación final (x1)	7:00	72

#### 6.2.3 ELECTROFORESIS

Los productos de la PCR se amplificaron en un gel de agarosa al 2% en las condiciones previamente descritas en el apartado 6.1.4.

### 6.3 ANÁLISIS MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MICROSATÉLITES

#### 6.3.1 MATERIAL VEGETAL

Las muestras utilizadas en este estudio provienen del Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca, y corresponden con las mismas entradas utilizadas en el análisis de RAPD. No obstante, el número de individuos utilizado es más reducido y la numeración de los individuos no coincide con la utilizada en los análisis de RAPD.

El estudio preliminar mediante marcadores microsatélites se realizó con 34 muestras presentes en la Tabla. 18. Se analizaron entre 3-4 individuos de cada población. Estos individuos se seleccionaron entre las entradas siguientes de cada especie: BCU002992 y BCU002969 de *C. nevadensis*, BCU002987 de *C. carpetanus*, BCU003198 de *C. vernus*, BCU002959 y BCU002775 de *C. serotinus*, BCU003015 de *C. nudiflorus*, BCU002960, BCU002961 y BCU002964 de *C. clusii* y por último de la especie *C. cambessedesii* se muestrearon de las entradas BCU001680 y BCU001685.

#### 6.3.2 PCR

El ensayo se realizó con los pares de cebadores 13, 36, 47, 50, 55 y 62M seleccionados a partir de los trabajos desarrollados para azafrán por Moraga *et al.* (2009) (Anejo 5) y los cebadores Cs8, Cs11, Cs20, Cs28, Cs39 y Cs42 descritos por Nemati *et al.* (2012) (Anejo 6).

Para la PCR de los cebadores descritos por Moraga *et al.* (2009) se aplicaron las condiciones que describen los mismos autores. Se utilizaron 30 ng de ADN genómico que se amplificó en un volumen final de 25 µl, que contenía 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTPs, 0,4 µM de cada cebador y 1U de Taq DNA polimerasa (ROCHE).

Para la PCR de los cebadores descritos por Nemati *et al.* (2012) se aplicaron las condiciones descritas por los autores con las modificaciones realizadas por Alcázar (2013) para mejorar la amplificación en las especies silvestres. Se utilizaron 25 ng de ADN genómico que se amplificó en un volumen final de 15 µl, que contenía 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTPs, 0,4 µM de cada cebador y 1 U de Taq DNA polimerasa (ROCHE). Ambas amplificaciones fueron realizadas en un termociclador (iCycler de Bio-Rad).

En cada reacción se utilizó una muestra de *C. sativus* como control positivo, y un control negativo, que consistió en todos los reactivos menos ADN. La reacción se llevó a cabo tal y como se describe en la Tabla. 22.

Tabla. 22. Condiciones de PCR y número de ciclos por cada paso

Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Desnaturalización (x1)	2:00	94
Amplificación (x30)	0:45	94
	0:45	X <sup>1</sup>
	2:00	72
	10:00	72

X<sup>1</sup>: La temperatura de amplificación fue diferente para cada par de cebadores (Anejos 5 y 6).

### 6.3.3 ELECTROFORESIS

Los productos de la PCR se amplificaron en un gel de agarosa al 0,5% en TBE en las condiciones previamente descritas en el apartado 6.1.4 de Material y Métodos.



# **IV. RESULTADOS**



**1. Localización de las  
diferentes especies de  
*Crocus* spp. en la Península  
Ibérica**



## 1 LOCALIZACIÓN DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE *CROCUS* EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

A continuación, se describe la distribución geográfica de las distintas especies de *Crocus* silvestres en el territorio nacional basada, fundamentalmente, en las citas posteriores a 1980.

### 1.1 *C. NEVADENSIS*

La especie *C. nevadensis* se distribuye por la zona este de la Península Ibérica (Figura 68), desde Pirineos hasta Sierra Nevada (Granada). En la Península Ibérica, las poblaciones ubicadas en Navarra, Lérida y Huesca son identificadas bajo la subespecie *marcetii*. Las localizadas en Albacete, Córdoba, Granada y Jaén son denominadas *C. nevadensis*, en sentido amplio.

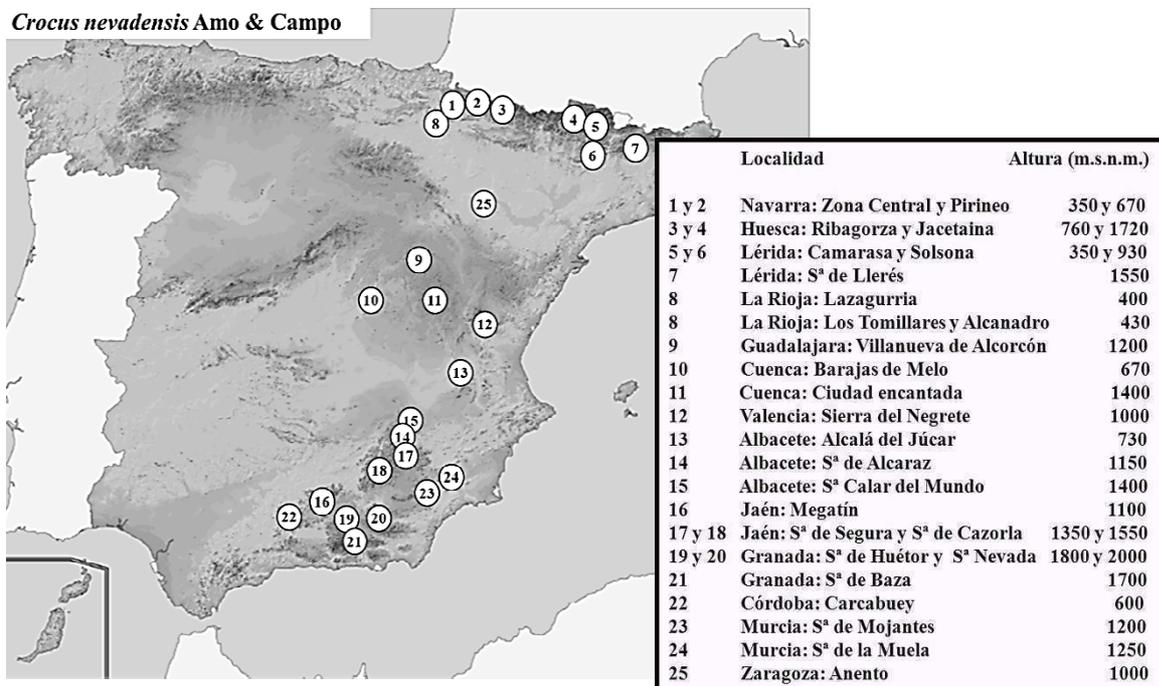


Figura 68 Distribución de la especie *C. nevadensis*, de floración primaveral, en la Península Ibérica.

Al respecto, hay autores que dicen que la subespecie *marcetii* es endémica del Prepirineo español, desde Lérida hasta Navarra, mientras que las poblaciones restantes son de origen ibero-norteafricano (Fernández-Lienres y Fernández-López, 1996; Lorda-López, 2001; Martínez-Labarga y Nogales-Ruiz, 2011).

La mayoría de las citas (155) se localizan en el norte de la Península Ibérica (Navarra con 116, Huesca con 19 y Lérida con 15). Los puntos de referencia de las provincias situadas más al sur (Granada, Jaén, Almería y Murcia) son mucho menores (21).

### 1.2 *C. CARPETANUS*

*C. carpetanus* se distribuye, principalmente, en lo que se llama el Macizo Herciniano (Figura 69). Este macizo es un arco de montañas que transcurren por la zona centro y

#### IV. RESULTADOS

centro-oeste de la Península Ibérica, incluyendo el Sistema central y la Cordillera Cantábrica (García-Río, 2006).

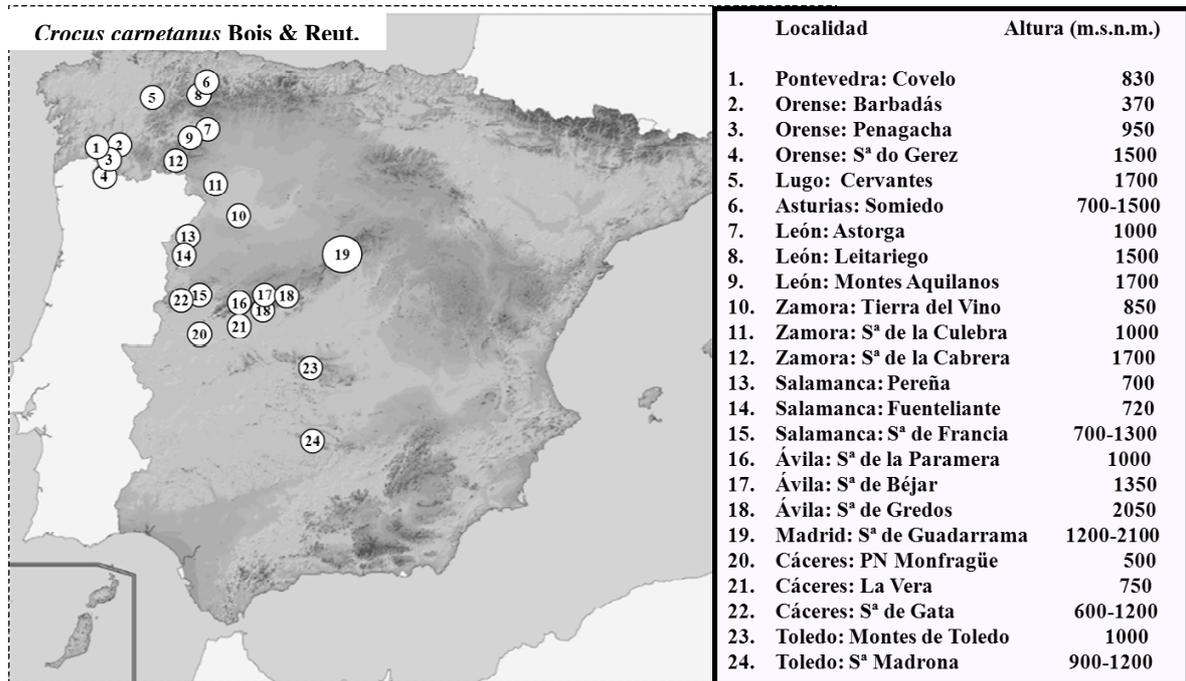


Figura 69 Distribución de la especie *C. carpetanus*, de floración primaveral, en la Península Ibérica.

Esta especie, es casi endémica de este sistema montañoso, si bien alcanza otras áreas donde también predominan materiales silíceos: S<sup>a</sup> Madrona y Montes de Toledo, en Toledo, y Ciudad Real (Martín-Blanco y Carrasco, 2005). En el Sistema Central, se encuentran la mayoría de los lugares de localización de esta especie (172 puntos de recolección del total de 230), concretamente en la Sierra de Guadarrama (1200- 2100 msnm) y en la Sierra de Gredos (1350-2050 msnm). El mayor número de poblaciones se han localizado en Madrid (110 citas referenciadas): Alameda del Valle, Canencia, Navacerrada, Horcajo de la Sierra, Montejo de la Sierra, Rascafría, entre otros (Cebolla-Lozano *et al.*, 1994).

#### 1.3 C. VERNUS

En España se tienen referencias de la existencia, principalmente, de una subespecie: *C. vernus* subsp. *vernus*. No obstante, existe una cita que ubica la especie *C. vernus* subsp. *neapolitanus* en los Montes de León (Romero-Rodríguez, 1983), siendo esta la única referencia que existe de esta subespecie en la Península Ibérica.

*C. vernus* subsp. *vernus* se distribuye por diferentes valles de la cordillera de los Pirineos (Figura 70). La provincia donde se ha localizado, mayoritariamente, es Huesca (41 citas posteriores al año 1991). En esta provincia, se localiza principalmente en los valles de Pineta (1700 msnm), de Añisclo (1700-2150 msnm), d'Anglós (2000 msnm), de Bujaruelo (1500 msnm) y de Ordesa (1700 msnm) (Benito-Alonso, 2005). Otras citas referencian poblaciones en la provincia de Gerona (En Vall de Ribes, con una altitud de

1725-2300 msnm) (Vigo-Bonada, 1983). También en Lérida (Hospital de Viella, 1650 msnm) se han localizado otras poblaciones (Carreras i Raurell *et al.*, 1993).

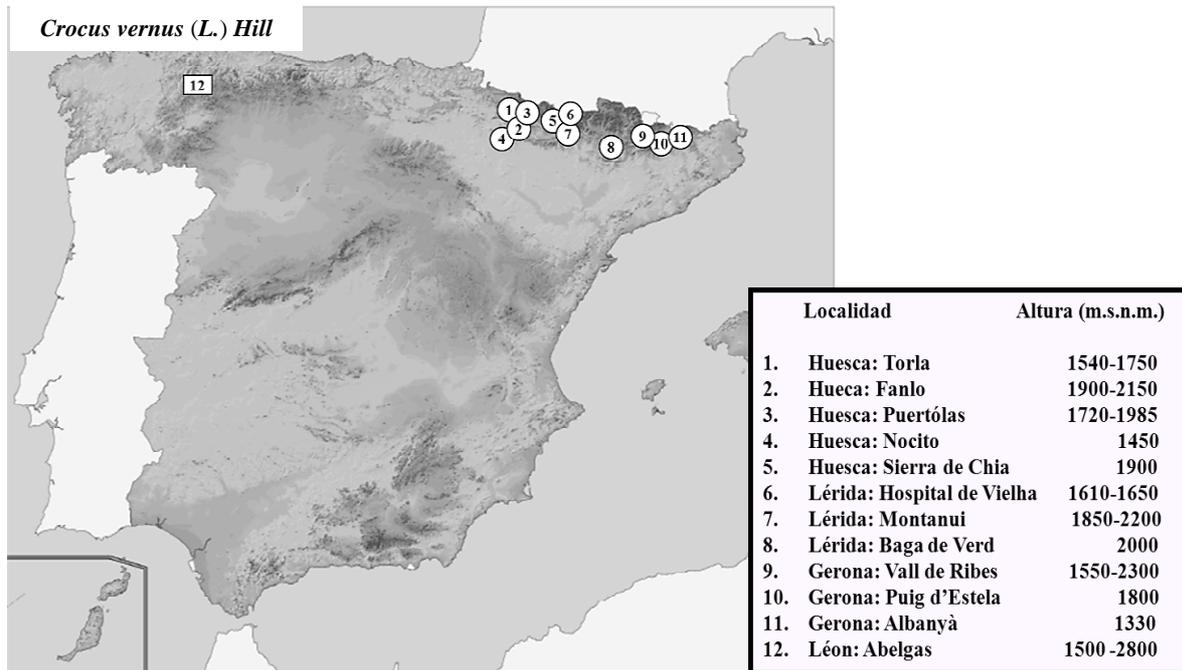


Figura 70 Distribución de la especie *Crocus vernus*, de floración primaveral, en la Península Ibérica. Leyenda: ○ *C. vernus* subsp. *vernus*, □ *C. vernus* subsp. *neapolitanus*.

#### 1.4 C. SEROTINUS Y C. CLUSII

En el inicio de este trabajo, *C. salzmanii*, *C. serotinus* y *C. clusii* eran consideradas subespecies del mismo taxón, por sus grandes similitudes morfológicas y fisiológicas. Según la nueva clasificación publicada por el CSIC (Guillén, 2014), se reconocen en España como especies autónomas con caracteres propios bien diferenciados y distribuciones geográficas bien definidas, la especie *C. serotinus* y la especie *C. clusii*. Este cambio ha supuesto el considerar el actual *C. serotinus* como la antigua subespecie *salzmanii* y el actual *C. clusii*, como las anteriores subespecies *clusii* y subespecie *serotinus*.

*C. serotinus* es un endemismo Ibérico- Magrebí que está ampliamente distribuido por toda la Península Ibérica (Valdés *et al.* 1987; Cebolla-Lozano y Rivas-Ponce, 1994; Aafi *et al.*, 2005; Laliga, 2007). En cambio, *C. clusii* es endémica de la Península Ibérica, y se localiza, principalmente en las provincias costeras de Andalucía (Gil, 1985; Pérez-Latorre *et al.*, 2003; López *et al.*, 2011) (Figura 71).

Muchas son las citas que hacen referencia a la antigua especie *C. serotinus*, sin distinguir subespecies. Éstas hablan de su localización en zonas costeras de Galicia, cordillera Cantábrica, el Sistema Central, los Montes de Toledo y Sierra Nevada (En la Figura 71 se representa como un triángulo) (Cebolla-Lozano *et al.*, 1994; Camaño *et al.*, 2005, Pino-Pérez *et al.*, 2009). El hecho de que *C. clusii*, haya sido referenciada únicamente en Andalucía, salvo una excepción, que es la localización de siete poblaciones

## IV. RESULTADOS

próximas en los Montes de León (Romero-Rodríguez, 1983), hace pensar que, con una alta probabilidad, se trate de lo que actualmente se clasifica como *C. serotinus*.

Un amplio estudio del género *Crocus* en Andalucía representa las distribuciones de *C. clusii* (morfológicamente similar al anterior *C. serotinus* subsp. *serotinus*) en las zonas arenosas costeras del sur-oeste de Andalucía, en la costa atlántica de las provincias de Huelva y Cádiz (Gil, 1985; Valdés *et al.*, 1987). En este mismo estudio, otras poblaciones de *C. serotinus* subsp. *clusii* se ubican en las zonas costeras mediterráneas de suelos pedregosos y ácidos de Cádiz. Hay que añadir a esta descripción, dos citas que han identificado esta especie en la Sierra de San Andrés, justo en los límites entre la provincia de Ciudad Real y Jaén (Hervás-Serrano, 2000; Fernández-García-Rojo, 2006), y una población descrita en la Sierra de Aracena, en Huelva (Rivera y Cabezudo, 1985) (Figura 71).

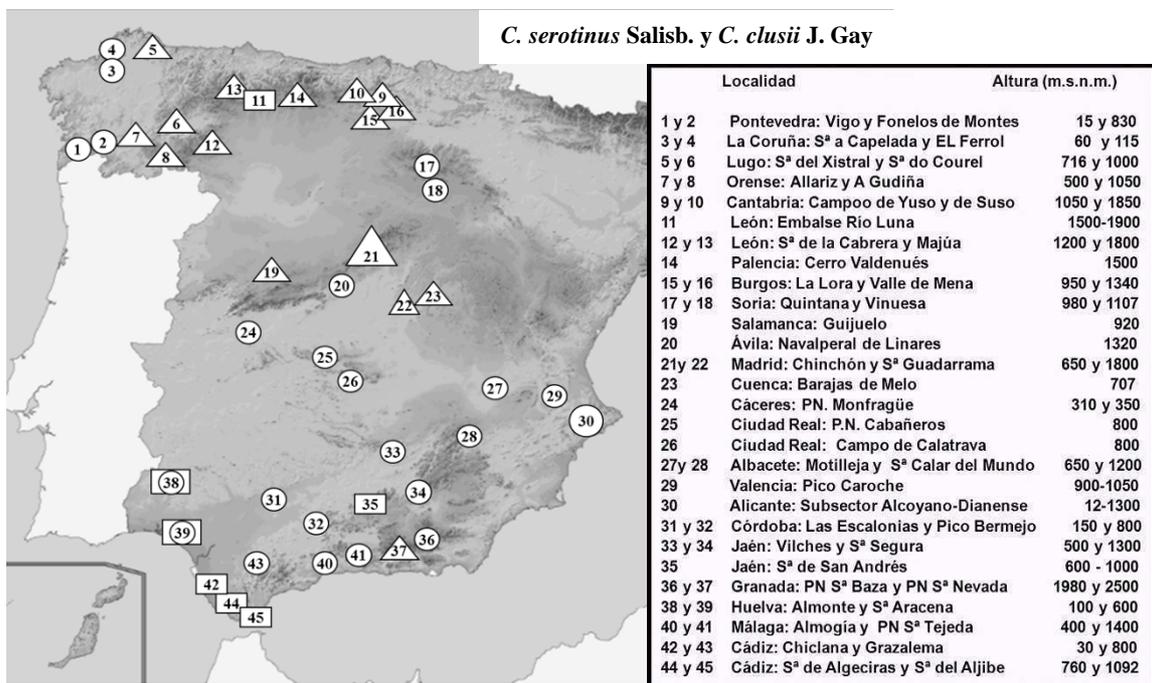


Figura 71 Distribución de las especies *C. serotinus* y *C. clusii*, de floración otoñal, en la Península Ibérica. Leyenda:

*C. serotinus* o *C. clusii*, *C. serotinus*, *C. clusii*

Madrid es la provincia en las que mayor número de poblaciones se han identificado de *C. serotinus* (91 citas). Ciudad Real y Alicante presentan el mayor número de poblaciones localizadas de *C. serotinus* (23 y 27 citas respectivamente). *C. clusii* sólo ha sido citado en 13 ocasiones (14 poblaciones).

### 1.5 *C. NUDIFLORUS*

*C. nudiflorus* se localiza, principalmente, en la zona norte de la Península Ibérica (Cordillera Cantábrica y Pirenaica) (Figura 72). Atendiendo al número de citas, en los Pirineos y sus proximidades se han realizado el mayor número de identificaciones de estas flores, 212 de un total de 258. Las provincias más representativas son Navarra, Huesca y Gerona.

En Navarra, se han localizado poblaciones en el Pirineo desde una altura de 480 a 1700 msnm (Lorda-López, 1989). En Huesca, se han encontrado en diferentes valles: Valle Pineta, Valle Bujaruelo y Valle Añisclo, con altitudes que oscilan entre los 1650 y los 2380 msnm (Benito-Alonso, 2008). En Gerona, se han encontrado en distintas localidades de la Vall de Ribes, a altitudes de 1150 hasta 1900 msnm (Vigo-Bonada, 1983). La cordillera Cantábrica, los Montes Vascos, la Sierra de la Demanda y los Picos de Urbión presentan el resto de localizaciones (Navarro-Sánchez, 1986; Medrano-Moreno, 1987; Sánchez y Valdeolivas, 1995).

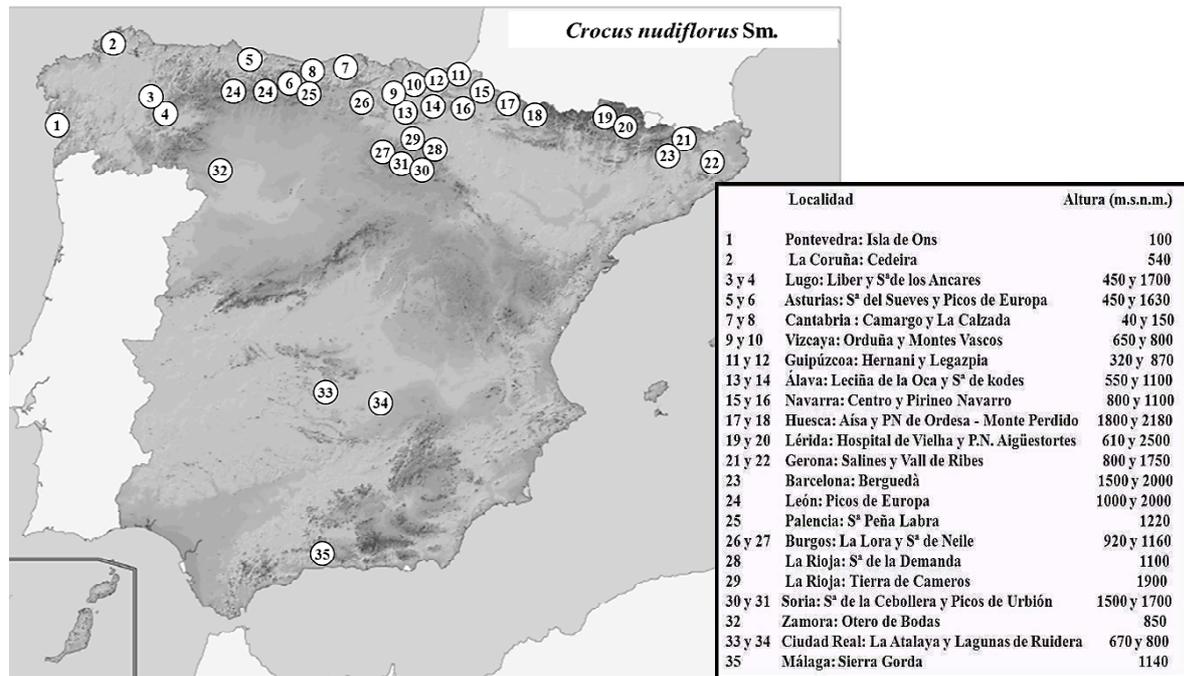


Figura 72 Distribución de la especie *C. nudiflorus*, de floración otoñal, en la Península Ibérica.

Siendo de más relevancia la presencia de esta especie en la zona norte de la Península, cabe citar tres referencias de poblaciones fuera del área habitual de distribución de la especie, incluso en la mitad sur de la Península: Zamora (en Otero de Bodas, citada por Gutiérrez García en 1998), Ciudad Real (La Atalaya y Lagunas de Ruidera, identificadas por Pablos-Alcaraz en 2004 y por Martín-Blanco y Carrasco en 2005) y Málaga (en Sierra Gorda, citada por Pérez Latorre *et al.* en 2009). Contrasta con estas citas el comentario de un autor que dice que esta especie se distribuye únicamente por la Cordillera Cantábrica y Pirenaica (Barra, 1982).

### 1.6 C. CAMBESSEDESII

La especie *C. cambessedesii* es un endemismo de las Islas Baleares. Las citas encontradas que referencian su localización, posteriores al año 1980, son 22. Las poblaciones encontradas se ubican principalmente en las islas de Mallorca (12) y Menorca (9) (Alomar *et al.*, 1982; Moreno-Saiz y Sainz-Ollero, 1997; Castro y Rosselló, 2006). Esta planta se puede encontrar cerca de la playa e incluso a mayores altitudes en la Sierra de la Tramontana (1350 msnm) (Figura 73).

## IV. RESULTADOS

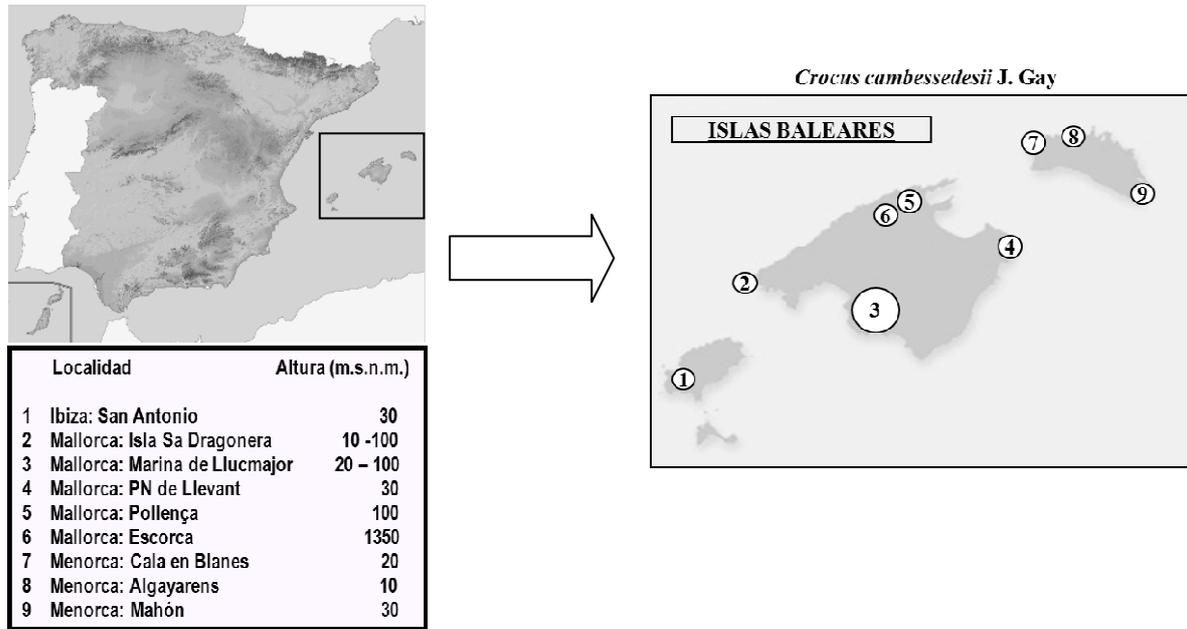


Figura 73 Distribución de la especie *C. cambessedesii*, de floración otoñal, en la Península Ibérica.

## 2 ENTRADAS DE *CROCUS* SILVESTRES ESPAÑOLES COLECTADAS Y MANTENIDAS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA VEGETAL DE CUENCA.

Los materiales de *Crocus* silvestres españoles que han servido de base para el desarrollo de los diferentes estudios realizados en esta tesis doctoral, proceden de las expediciones realizadas durante 5 años por personal del CIAF de Albaladejito, Departamento de Biología Vegetal de la Universidad Politécnica de Valencia e Instituto de Desarrollo Regional de la Universidad de Castilla – La Mancha, en el marco de los proyectos nacionales coordinados INIA RF2004-00032-C03, INIA RF2008-00012-C03 y el europeo 018-AgriGenRes. En estas expediciones se han recogido un total de 112 entradas. Las entradas que se incluyen en este apartado son 60 y constituyen una muestra representativa de la distribución de este género en España (Tabla 23 y Tabla 24). La especie primaveral *C. nevadensis* está representada por 24 entradas de Pirineos, del Sistema Ibérico y de la Cordilleras Béticas. *C. carpetanus*, especie primaveral también, está representada por 10 poblaciones procedentes de la Orense, Sierra de Gredos (Ávila) y Somosierra (Madrid). La recolección de *C. vernus*, de floración primaveral tardía y efímera, fue muy compleja, como también lo es su mantenimiento, por lo que no todos los materiales colectados se han podido conservar finalmente en el BGV de Cuenca (Tabla 23 y Figura 74).



**Figura 74** Aspecto de las flores de las diversas especies silvestres españolas del género *Crocus*. 1) *C. nevadensis*; 2) *C. carpetanus*; 3) *C. vernus*; 4) *C. serotinus*; 5) *C. nudiflorus*; 6) *C. cambessedesii*.

La especie otoñal *C. serotinus* está representada con 22 entradas. Se colectaron 8 poblaciones de la especie *C. clusii* en el sur de Andalucía, en Cádiz (Chipiona y Puerto Real) y en Huelva (Doñana y Aracena). Se han estudiado las túnicas y se observa claramente que no corresponden con la especie *C. serotinus*, ya que presentan túnicas reticuladas. Se realizó una jornada de colectas en la Cordillera Cantábrica con el objetivo de encontrar *C. clusii*, tal y como citaba la bibliografía, pero tras estudiar el material colectado, no se ha llegado a una conclusión firme de que pueda tratarse de esta especie. Otra especie otoñal, *C. nudiflorus* está representada por 17 poblaciones recolectadas en las provincias: Huesca, Lérida, La Rioja y Burgos. Aunque se cita en la bibliografía, en las jornadas de colectas a los Montes de León no se encontraron individuos de esta especie. El endemismo Balear *C. cambessedesii*, especie de floración otoñal tardía, está representada por cuatro entradas localizadas en la isla de Mallorca (Tabla 24).

#### IV. RESULTADOS

En las Tabla 23 y Tabla 24 se muestra la correspondencia de las poblaciones referenciadas en la bibliografía con las entradas presentes en el BGV de Cuenca. En ocasiones, se han encontrado poblaciones en lugares donde no se habían citado antes. En estos casos se indica la provincia y la población dónde se localizaron.

**Tabla 23 Entradas conservadas en el BGV de Cuenca de especies españolas del género *Crocus* de floración primaveral. Correspondencia entre las poblaciones de referencia bibliográfica y el número de entrada del BGV de Cuenca. Cuando no se indica el número de población de referencia es porque su localización no se ha descrito con anterioridad.**

ESPECIES	POBLACIONES DE REFERENCIA	ENTRADAS COLECTADAS
<i>Crocus nevadensis</i>	1. Navarra	BCU002697, BCU002698
	3. Huesca	BCU002992, BCU002993, BCU002994
	5. Lérida	BCU002988, BCU002989, BCU002990
	10. Cuenca	BCU002693, BCU002694
	Cuenca: Motilla del Palancar	BCU002355, BCU002356, BCU002359
	Cuenca: Olmeda del Rey	BCU002871, BCU002969
	12. Valencia	BCU001742, BCU001743, BCU001744
	18. Jaén	BCU002980, BCU002981, BCU002982
	20. Granada	BCU002976, BCU002977, BCU002979
<i>Crocus carpetanus</i>	3. Orense	BCU002696
	18. Ávila	BCU002835, BCU002836, BCU002837, BCU002838, BCU003192
	19. Madrid	BCU002971, BCU002972, BCU002973, BCU002974
<i>Crocus vernus</i>	1. Huesca	BCU002935, BCU003198

**Tabla 24 Entradas conservadas en el BGV de Cuenca de especies españolas del género *Crocus* de floración otoñal: Correspondencia entre las poblaciones de referencia bibliográfica y el número de entrada del Banco de Germoplasma de Cuenca. Cuando no se indica el número de población de referencia es porque su localización no se ha descrito con anterioridad.**

ESPECIES	POBLACIONES DE REFERENCIA	ENTRADAS COLECTADAS
<i>Crocus serotinus</i>	La Coruña: Mazaricos	BCU002741
	11. León	BCU003172, BCU003173 , BCU003179, BCU003181
	15. Burgos	BCU003177, BCU003175
	21. Madrid	BCU002975
	23. Cuenca	BCU002970, BCU002775
	Toledo: Mesas de Ocaña	BCU001704, BCU001705
	27. Albacete	BCU002740, BCU002742
	26. Ciudad Real	BCU002685, BCU002686,
	29. Valencia	BCU002618, BCU002619
	Jaén: Sierra de Cazorla	BCU001655, BCU001657
	37. Granada	BCU002978
	38. Huelva	BCU002959
<i>Crocus clusii</i>	39. Huelva	BCU002960, BCU002961, BCU002962, BCU002963
	42. Cádiz	BCU002964, BCU002965, BCU002966, BCU002967
<i>Crocus nudiflorus</i>	27. Burgos	BCU003176
	28. La Rioja	BCU002776, BCU002777, BCU002779
	29. La Rioja	BCU003123
	Huesca: Sierra de Guara	BCU003000, BCU003001
	18. Huesca	BCU002735, BCU002736
	Huesca: Benasque	BCU002556, BCU002557, BCU002558, BCU002559, BCU002944
20. Lérida	BCU002737, BCU002738, BCU002739	
<i>Crocus cambessedesii</i>	5. Mallorca	BCU001683
	4. Mallorca	BCU001680, BCU001682
	6. Mallorca	BCU001685

A continuación, se expone de forma más extensa una descripción del ambiente en el que las entradas de cada especie fueron colectadas. Se muestran los mapas de la distribución para cada especie de *Crocus* silvestre, donde se indican las poblaciones de referencia según las citas bibliográficas y las colectadas, que son mantenidas en el BGV de Cuenca. En los mapas se han representado las poblaciones muestreadas con aros que engloban las poblaciones de referencia, que son las poblaciones de las citas bibliográficas.

### 3 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE FORESTAL DE LAS DIVERSAS ESPECIES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO *CROCUS*.

Las especies españolas del género *Crocus* se localizan frecuentemente en estaciones montañosas, si bien también podemos encontrar algunas poblaciones de especies de floración otoñal cerca de zonas costeras. En el ambiente forestal, se encuentran en prados o pastizales de naturaleza efímera, con agostamiento estival y, generalmente, fuera de la sombra de los árboles. No se suelen localizar en los prados de siega, pues la mayor altura de las plantas integrantes de esta comunidad supone una competencia por la luz y nutrientes que termina por desplazar a los representantes del género *Crocus*.

La mayoría de los suelos donde se desarrollan las distintas especies de *Crocus* son litosoles, con una cantidad de materia orgánica disponible muy limitada. Quizás por este motivo, las distintas especies de este género están asociadas -en mayor o menor medida- a la presencia de deyecciones de animales. También es posible que los rumiantes que pastan en estos lugares, coman las cápsulas llenas de semillas, y actúen como agentes dispersores de las semillas no destruidas a su paso por el tracto digestivo.

Veremos, a continuación, la distribución particular de cada una de las especies:

#### 3.1 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO *C. NEVADENSIS*

*C. nevadensis* es una especie ampliamente distribuida en el este de España, de norte a sur (Figura 75). Ha sido localizada en prados y pequeños herbazales efímeros correspondiente a la Clases: a) *Thero-Brachypodietea* Br.-Bl. 1947, que se corresponde con zonas subestépicas de pequeñas gramíneas anuales de ambientes secos o semiáridos, y b) *Festuco-Brometea* Br.-Bl. & R. Tx. 1943 que agrupan los pastizales mesoxerófilos o mesófilos, ricos en hemicriptófitos cespitosos de pequeña talla, que se desarrollan sobre sustratos básicos. No obstante, hay que señalar que esta especie también se ha encontrado, en alguna ocasión, creciendo sobre suelos silíceos.

Se han recolectado 24 poblaciones localizadas en la vertiente mediterránea, incluyendo las siguientes provincias: Navarra, Huesca, Lérida, Cuenca, Valencia, Granada y Jaén.

En las entradas que se recolectaron en **Huesca** el estrés predominante es el frío. La entrada BCU002992 se recolectó en Biasaurri (1018 msnm) sobre material silíceo y suelo pardo, pedregoso y húmedo (Figura 76.1). La vegetación típica de montaña estaba formada por bojs (*Buxus sempervirens*), pino rojo (*Pinus sylvestris*), hayas (*Fagus* spp.), quejigos (*Quercus faginea*) y alguna encina (*Quercus ilex*). Las poblaciones de Jaca se colectaron cerca de la localidad de Atarés (700 msnm), sobre suelo calizo y muy pedregoso (BCU002993 y BCU002994). Las muestras se colectaron en una zona poblada por un robledal cerrado (*Quercus* spp.), brezos (*Erica* spp.), aliagas (*Genista* spp.) y quejigares (*Quercus faginea*), como también diferentes especies de briófitos. Estas dos localidades están próximas a Pirineos y presentan clima lluvioso con inviernos muy fríos.

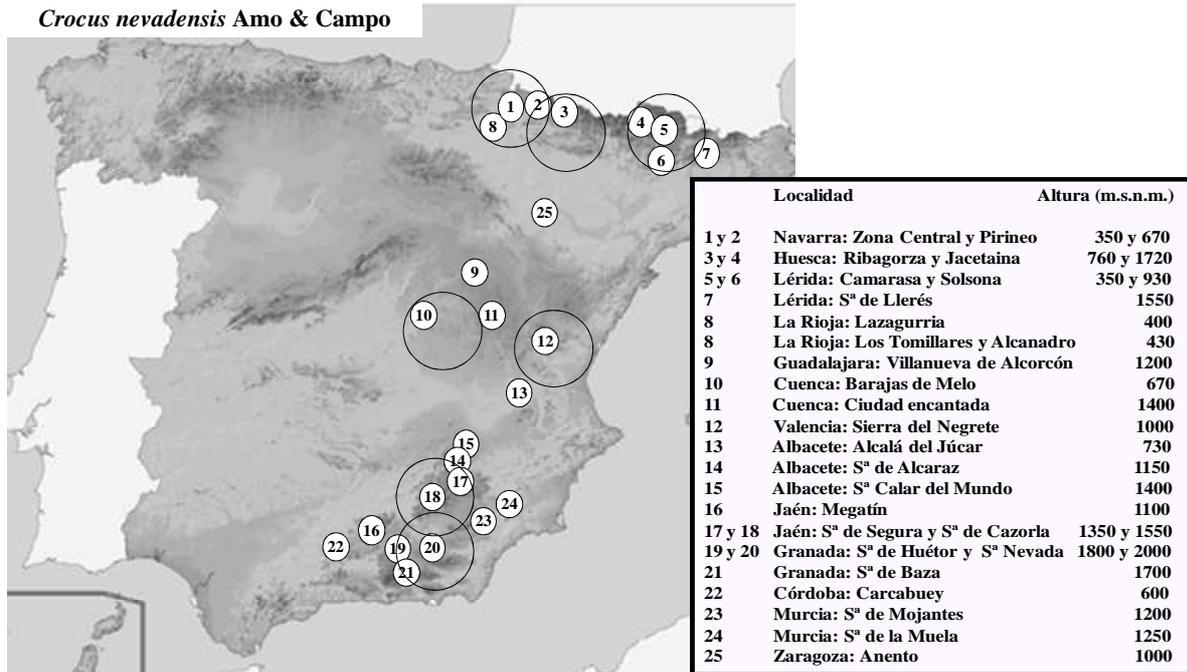


Figura 75 Mapa de distribución de las especies de *C. nevadensis*, de floración primaveral, en la Península Ibérica y localidades colectadas. Leyenda: ① Poblaciones de referencia, ○ Poblaciones colectadas

Los materiales procedentes de **Lérida** se colectaron en diversas localidades. Se identificó una población en la localidad de Camarasa (BCU002988), sobre un suelo pedregoso y con materiales yesosos. El monte mediterráneo estaba formado por enebros (*Juniperus* spp.), romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*), aliagas (*Genista* spp.), encinas (*Quercus ilex*), robles de hoja pequeña (*Quercus faginea*), y narcisos (*Narcissus* spp.). También se colectó material en Ager y en Vilanova Meià (BCU002989 y BCU002990 respectivamente), en una ladera con bosque mediterráneo continental formado por bojs (*Buxus sempervirens*), romero (*R. officinalis*), salvia (*Salvia officinalis*), tomillo (*T. vulgaris*), aliagas (*Genista* spp.), encinas (*Quercus ilex*), coscoja (*Quercus coccifera*), violetas (*Viola* spp.). Estas dos localidades se encuentran más próximas a Pirineos y a mayor altitud (780-880 msnm, respectivamente) que Camarasa, por lo que allí el clima es más fresco y lluvioso. En las tres, el estrés dominante es el frío invernal.

En la provincia de **Cuenca** se recolectaron en tres localidades distintas: Altomira, Motilla del Palancar y Olmeda del Rey. Las entradas de Motilla del Palancar (BCU002355, BCU002356 y BCU002359) se colectaron sobre un suelo muy pedregoso cubierto por diferentes especies de matorrales basófilos. La zona presenta un suelo pardo-calizo poblado con encinares (*Quercus ilex*), alcornoques (*Quercus suber*), coscojares (*Quercus coccifera*), acebuchales (*Olea europaea* var. *sylvestris*) y romeros (*R. officinalis*). Las entradas recogidas en la Sierra de Altomira (BCU002693 y BCU002694) a 1150 msnm se localizaron sobre un suelo de naturaleza calco-dolomítica. Es una zona árida cubierta mayoritariamente por bosques y matorrales mediterráneos, dominando el paisaje los

#### IV. RESULTADOS

---

pinares de pino carrasco (*Pinus halepensis*), matorrales de sabina negral (*Juniperus phoenicea*, Buxo-Juniperetum phoeniceae y *Rhamno lycioidis-Juniperetum phoeniceae*) y romerales termófilos (*Cistus clusii-rosmarinetum*) (Figura 76.2).

Las poblaciones que se colectaron en el término de Olmeda del Rey (BCU002871 y BCU002969), se encontraron en una planicie y en las orillas de una pista forestal próxima a unas parcelas cultivadas con almendros (1100 msnm). El suelo es calizo y pedregoso poblado con pino negral (*Pinus nigra*), roble quejigo (*Quercus faginea*), coscoja (*Quercus coccifera*), pinsapares (*Abies pinsapo*) y sabinas albares (*Juniperus thurifera*). El estrés característico de estas zonas es el calor estival y la sequía.

Las entradas BCU002976, BCU002977 y BCU002979 procedentes de **Granada**, Sierra Nevada, se colectaron a una altura entre 1600 y 1800 msnm. En estas localizaciones el verano es seco y cálido y el invierno frío. El estrés predominante de la zona es el frío invernal pero también la sequía estival. El material se localizó sobre un suelo pardo-calizo. Las plantas aparecieron a la sombra de pinos (*Pinus sylvestris*), y otros pinos de hoja más corta, roble melojo (*Quercus pyrenaica*), y encinas (*Quercus* spp.) principalmente, y matorral mediterráneo formado por majuelos (*Crataegus monogyna*), merenderas (*Colchicum montanum*) y erizones (*Echinopartum horridum*) (Figura 76.3).

Las entradas localizadas en **Jaén**, se recolectaron en la Sierra de Cazorla, a una altitud de 1100-1300 msnm. Las condiciones climáticas de Jaén son similares a las de Granada. En estas localizaciones el verano es seco y cálido y el invierno frío. El suelo en ambas localizaciones es pardo-calizo y pedregoso. Las procedentes de Quesada (BCU002980 y BCU002982) se colectaron sobre una ladera con mucha pendiente y vegetación formada por majuelos (*Crataegus monogyna*), pinos (*Pinus* spp.), encina (*Quercus* spp.), coscojares (*Quercus coccifera*), alcornoques (*Quercus suber*) y acebuches (*O. europaea* var. *sylvestris*) (Figura 76.4). La entrada prospectada en el paraje denominado "EL Chorro" (BCU002981) se encontró sobre un terreno muy rocoso y con mucha pendiente. La vegetación acompañante estaba formada por pino laricio (*Pinus nigra*), coscojares (*Quercus coccifera*), y diferentes especies de matorral mediterráneo como el espliego (*Lavandula* spp.).



**Figura 76 Ambiente forestal en el que se han colectado las especies *C. nevadensis* y *C. carpetanus*. 1) *C. nevadensis* en Basaurri (Huesca, BCU002992); 2) *C. nevadensis* en la Sª de Altomira (Cuenca, BCU002694); 3) *C. nevadensis* en Sª Nevada (Granada, BCU002977); 4) *C. nevadensis* en Sª de Cazorla (Jaén, BCU002982); 5) *C. carpetanus* en Robregordo (Madrid, BCU002972); 6) *C. carpetanus* en Montejo de la Sierra (Madrid, BCU002971); 7) *C. carpetanus* en Montejo de la Sierra (Madrid, BCU002971); 8) *C. carpetanus* en Navarredonda de Gredos (Ávila, BCU003192).**

## IV. RESULTADOS

---

Las entradas procedentes de **Valencia** aparecieron en zonas de verano seco y fresco e invierno frío, siendo el frío y la sequía estival los estreses dominantes. Las tres localizaciones presentan un suelo pardo-calizo. Una población se recolectó en el término de Cofrentes (BCU001742,) en una colina a 735 msnm en las Hoces del Cabriel. Se localizó la muestra en un pastizal, de una etapa de sustitución del encinar, con romero (*R. officinalis*), tomillo (*T. vulgaris*) y aliaga (*Ulex parviflorus*). Otras las poblaciones (BCU001743 y BCU001744) se recolectaron en la Sierra de Negrete (Utiel) a 1180 msnm, en un monte bajo de encinar con gamón (*Asphodelus racemosus*) y erizón (*Erinacea anthyllis*).

Dos entradas se colectaron en **Navarra** (BCU002697 y BCU002698), sobre un suelo pardo-calizo. Estas zonas presentan un verano seco y fresco, y un invierno frío, como las localidades valencianas donde se localizan los ejemplares recolectados. La primera de las localidades es Artajona. En este paraje la vegetación es un encinar-pinar, con sotobosque de coscojas, y en las zonas más bajas de este lugar, la vegetación es un romeral ralo (perteneciente a *Rosmarineta officinalis*), enriquecido por la presencia de aliagas (*Genista scorpius*), gamón blanco (*Asphodelus albus*) y dátilo (*Dactylis glomerata*). La segunda de las localidades donde se recolectaron ejemplares de *Crocus* fue en el término de Lazagurría. El estrés dominante es el frío y la sequía estival. La altitud de la ubicación se estimó entre 600-700 msnm.

### 3.2 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO *C. CARPETANUS*

*C. carpetanus* es una especie acidófila, que se encuentra en el centro y noroeste de España (Figura 77). Se desarrolla exclusivamente sobre sustratos originados a partir de rocas graníticas, o esquistos, ocupando los espacios abiertos en los melojares de la Subalianza *Quercenion pyrenaicae* Rivas-Martínez 1975, perteneciente a la Clase *Quercus-Fagetea* Br.-Bl. & Vlieger 1937.

Se han recolectado 10 poblaciones en diferentes localidades: en Orense, en Ávila, en diferentes puntos de la Sierra de Gredos, y en Madrid, en Somosierra. Las entradas prospectadas en **Ávila**, en la Sierra de Gredos, a una altitud de 1651 a 1779 msnm, crecen en un clima de montaña moderado, donde el frío es el estrés dominante. Las entradas BCU002835, BCU002836 y BCU002837 se colectaron en diferentes puntos del Puerto de la Peñanegra (Santiago del Collado), las poblaciones BCU002838 y BCU003192 fueron colectadas en San Martín de la Vega del Alberche (Piedrahita) y la entrada BCU003192 fue colectada en Navarredonda de Gredos (Figura 76.8). En las tres localizaciones, los cormos se recolectaron sobre material compuesto por granito y esquistos, con una elevada humedad edáfica y abundante materia orgánica. El monte estaba formado por cervunales (*Nardus stricta*) como formador de estos céspedes, acompañado por diferentes plantas gramíneas como también el piorno serrano (*Cytisus balansae*), encina dulce (*Q. rotundifolia*), abedules (*Betula* spp.) y un bosque de rebollos (*Quercus pyrenaica*).

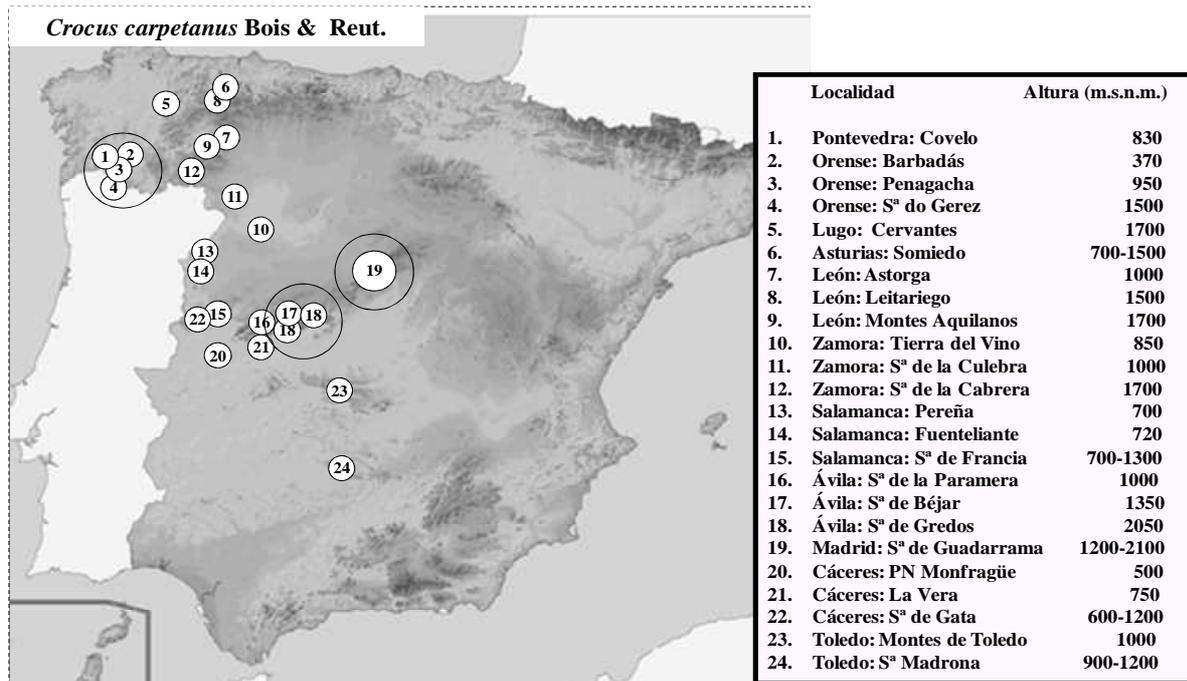


Figura 77 Distribución de las especies de *Crocus carpetanus*, de floración primaveral, en la Península Ibérica y localidades colectadas. Leyenda: ① Poblaciones de referencia, ○ Poblaciones colectadas.

La entrada BCU002696 se recolectó **Orense**, en la localidad de Requiás (Muíños), en la Sierra del Sures a 1100 msnm. El clima de esta región es templado lluvioso con inviernos fríos, siendo el frío el estrés dominante. El suelo está dominado por estructuras graníticas compuestas, principalmente, por cuarzos, feldespatos y micas. La vegetación próxima estaba formada por amplios matorrales con algunos endemismos como el lirio de monte (*Iris boissieri*). Robledales y elementos mediterráneos de alcornoques (*Quercus suber*), madroño (*Arbutus unedo*), pino silvestre (*Pinus sylvestris*), tejo (*Taxus baccata*), pino piñonero (*Pinus pinea*) y roble melojo (*Quercus pyrenaica*), también formaron parte del entorno de la zona de colecta.

Cuatro entradas de *C. carpetanus* se colectaron en **Madrid** en Somosierra. El clima en esta zona es templado de veranos secos y frescos e invierno frío, siendo el frío el estrés dominante. La entrada BCU002971 se colectó en la Dehesa de Montejo de la Sierra (1242 msnm). La zona es un robleal de *Quercus pyrenaica* sobre suelo arenoso procedente de la descomposición de esquistos (ácido). Esta presenta el lastón (*Brachypodium retusum*) como cespitosa (Figura 76.6 y Figura 76.7). Tres entradas (BCU002972, BCU002973 y BCU002974) se colectaron de zonas diferentes de la Acebeda de Robregordo, a una altitud de 1356 a 1468 msnm. Se trata de una acebeda con *Ilex aquifolium* y algún ejemplar de melojo (*Quercus pyrenaica*) sobre suelo ácido de humus mull forestal (Figura 76.5).

### 3.3 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO *C. VERNUS*

*C. vernus* es una especie que se encuentra en el noreste de España (Figura 78), asociada con elevada frecuencia a las deyecciones de rumiantes. Coloniza gleras junto con

#### IV. RESULTADOS

gramíneas y hemcriptófitos de pequeño porte, constituyendo la vegetación pionera de estos prados en pendiente, denominada *Poo ligulatae-Festucetum hystricis* (Font Quer 1954) O. Bolòs 1962. Las 2 entradas de *C. vernus* han sido recolectadas en la provincia de Huesca, en Pirineos.

Una de las entradas se recolectó en Aragüés del Puerto (**Jaca**), en los **Llanos de Lizarra** (BCU002935). La altitud de la zona de colecta fue de 1581 msnm. El clima es de montaña con inviernos muy fríos y veranos frescos, siendo el frío invernal el estrés dominante. Los ejemplares de *Crocus* se localizaban en un pastizal con herbazales supramediterráneos y oromediterráneos desarrollados sobre sustratos húmiferos, dónde se da una rápida descomposición de gramíneas y ciperáceas. Se observó abundante pedregosidad superficial originada por la alteración de rocas calcáreas disgregadas debido a los fenómenos de crioturbación. En las inmediaciones la vegetación arbolada está compuesta por acebo (*Ilex aquifolium*), pino negro (*Pinus uncinata*) y tejo (*Taxus baccata*) (Figura 79). Algunos de los ejemplares colectados en esta zona correspondieron a *C. nudiflorus*.

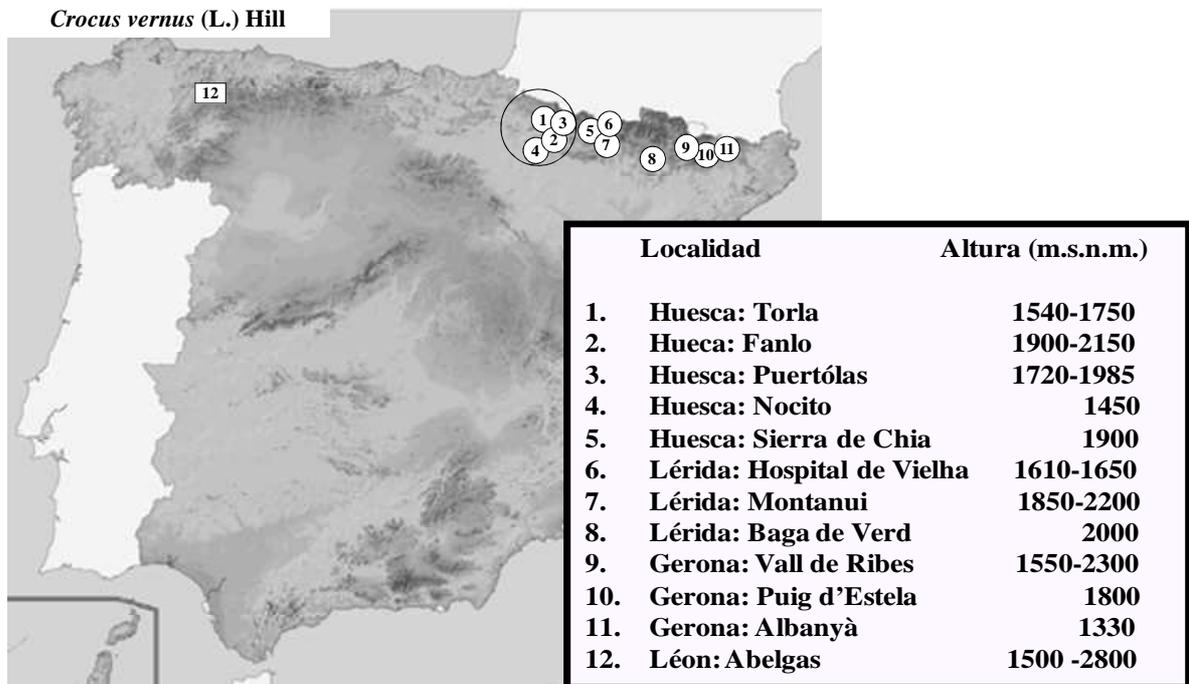


Figura 78 Distribución de *Crocus vernus*, de floración primaveral, en la Península Ibérica y localidades colectadas.

Leyenda 1. ○ *C. vernus* subsp. *vernus*, □ *C. vernus* subsp. *neapolitanus*. Leyenda 2: ① Poblaciones de referencia, ○ Poblaciones colectadas.



**Figura 79** Ambiente forestal en el que se han colectado las especies *C. vernus*. 1) *C. vernus* en Llanos de Lizarra en Jaca (Huesca, BCU002935); 2) *C. vernus* en Llanos de Lizarra en Jaca (Huesca, BCU002935); 3) *C. vernus* en Refugio de Boyeros en Jaca (Huesca, BCU003198); 4) *C. vernus* en en Refugio de Boyeros en Jaca (Huesca, BCU003198).

Otra entrada fue recolectada en **Refugio de Boyeros** en el Valle de Aisa en Jaca (BCU003198). La altitud de la zona de colecta fue de 1560 msnm. El clima es de montaña con inviernos muy fríos y veranos frescos, siendo también el frío invernal el estrés dominante. La comunidad donde se recoge la muestra es un cervunal pisoteado, con regaliz de montaña (*Nardo trifoliatum*), llantén mediano (*Plantago media*), quitameriendas (*Merendera pyrenaica*) y castaña de tierra (*Conopodium majus*) (Figura 79).

### 3.4 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO *C. SEROTINUS* Y *C. CLUSII*

*C. serotinus* es una especie de amplia distribución en España (Figura 80) que coloniza tanto sustratos acidófilos (como por ejemplo en la provincia de Huelva), como sustratos ricos en bases (como sucede en la Comunidad Valenciana). Se ha localizado en zonas aclaradas de pinares, formando parte de la comunidad de *Tuberarietea guttatae* Br.-Bl., 1952 em. Rivas-Martínez, 1978, concretamente en la asociación *Saxifrago tridactylites-Hornungietum petraeae* Izco, 1974, que es una formación de terófitos efímeros de pequeña talla, indiferente por la naturaleza del sustrato. En general, ocupa estaciones pedregosas y poco nitrificadas, en la que no existe prácticamente competencia con las

#### IV. RESULTADOS

plantas vivaces. Sin embargo, *C. clusii* es una especie observada únicamente en el sur de la Península Ibérica, en Huelva y Cádiz (Figura 80), que coloniza sustratos acidófilos.

Se han recolectado 22 poblaciones de la especie *C. serotinus* y 8 de la especie *C. clusii*, ambas especies distribuidas en 23 localidades diferentes.

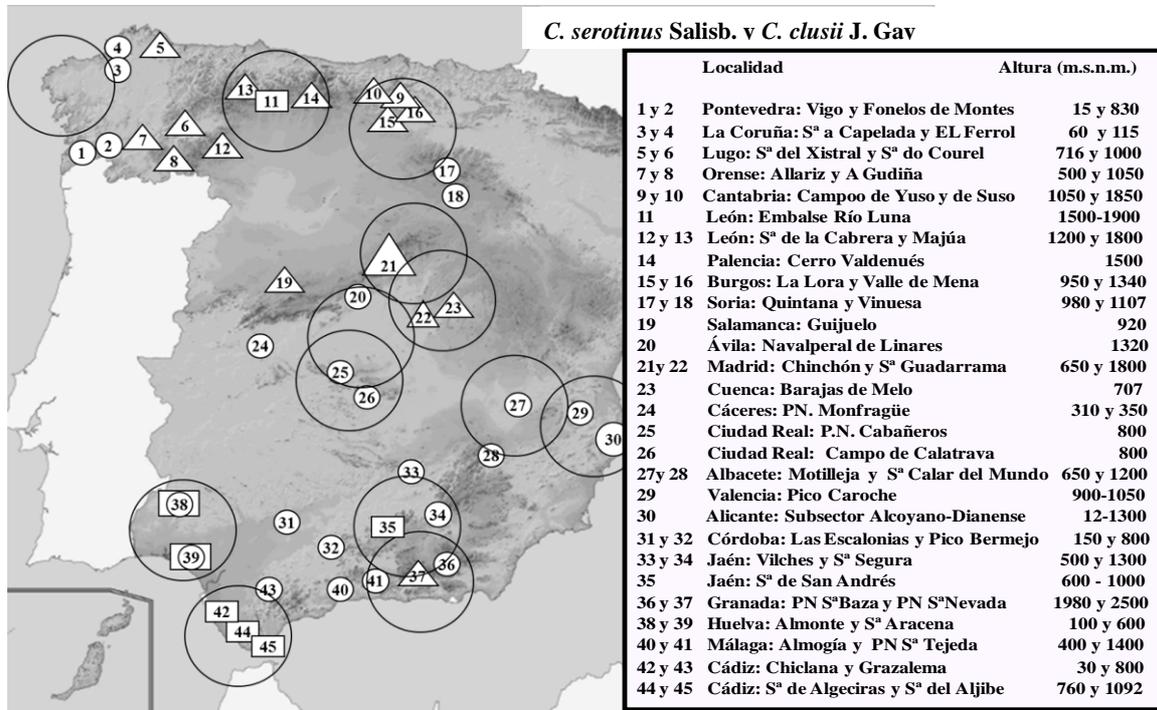


Figura 80 Distribución de las especies *C. serotinus* y *C. clusii*, de floración otoñal en la Península Ibérica y localidades colectadas. Leyenda 1:  $\triangle$  *C. serotinus* o *C. clusii*,  $\bigcirc$  *C. serotinus*,  $\square$  *C. clusii*. Leyenda 2:  $\textcircled{1}$  Poblaciones de referencia,  $\bigcirc$  Poblaciones colectadas

*C. serotinus*, más ampliamente distribuida y también más abundante que *C. clusii*, se ha recolectado en 12 provincias: La Coruña, León, Burgos, Cuenca, Albacete, Ciudad Real, Toledo, Valencia, Jaén, Granada, Huelva y también en la Comunidad de Madrid.

La entrada BCU002741 de **La Coruña** fue colectada en Mazaricos, a 937 msnm, y a menos de 2 km de la costa del océano Atlántico, en las proximidades del río Xallas. El clima es templado lluvioso con invierno suave. Los cormos se localizaron sobre material silíceo. La vegetación próxima estaba formada por *Genisto berberidae-Ericetum tetralicis*, como también por robles (*Quercus* spp.) y hayas (*Fagus* spp.).

La entrada BCU002978 de **Granada**, fue colectada en Sierra Güéjar, junto a una población de *C. nevadensis*, a 1600 msnm, en una zona muy pedregosa, con encinas (*Quercus ilex*) y donde es frecuente el paso de ganado. Es una zona de matorral mediterráneo con encinas dulces (*Quercus rotundifolia*).

En Robregordo (**Madrid**), junto a poblaciones de *C. carpetanus*, se localizó una entrada de *C. serotinus* (BCU002975) a 1242 msnm, en una acebeda con *Ilex aquifolium* y algún ejemplar de melojo (*Quercus pyrenaica*) sobre suelo ácido de humus mull forestal. Otras especies de la zona son el rosál silvestre (*Rosa pouzini*), helecho (*Pteridium aquilinum*),

retama (*Sarothamnus scoparius*) y lastón (*Brachipodium retusum*). En esta zona, los veranos son secos y frescos y los inviernos fríos.

Otras dos poblaciones se colectaron en **Burgos** (BCU003177 y BCU003175), en el municipio de Merindad del Rio Ubierna, aproximadamente a 1000 msnm. Los cormos fueron recolectados en una vaguada pedregosa, de suelo pardo-calizo. Los veranos en estas localidades son frescos, y los inviernos fríos, siendo el frío invernal el estrés dominante. Melojos (*Quercus pyrenaica*), pino negral (*Pinus nigra*), brezos (*Erica* spp.), gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*), tomillo (*Thymus vulgaris*), y aliagas (*Genista* spp.), entre otros, eran la vegetación que acompañaba a *C. serotinus*.

En **Cuenca**, se localizaron dos poblaciones en la sierra de Altomira (BCU002970 y BCU002775), donde comparten hábitat con la especie *C. nevadensis*.

En la provincia de **León** fueron recolectadas cuatro poblaciones. Estos cormos fueron colectados sobre un material silíceo en la parte leonesa de la Cordillera cantábrica, a una altitud de entre 1100 y 1395 msnm. El clima en la zona es lluvioso con invierno frío, siendo éste el estrés predominante. Dos de estas entradas se ubicaban en Barrios de Luna (BCU003173 y BCU003179), en las proximidades del embalse de Barrios de Luna (Figura 81.1). Los cormos crecían en los alrededores de parcelas de pasto para el ganado vacuno. La vegetación próxima eran brezales (*Erica* spp.) con robles de hoja ancha (*Quercus* spp.), como también roble melojo (*Quercus pyrenaica*) y hayas (*Fagus* spp.). En ocasiones, las plantas emergían de los mismos excrementos. Las otras dos entradas se colectaron en las localidades de Pola de Gordón (BCU003181) y en Villamanín (BCU003172) (Figura 81.4). Las especies acompañantes eran robles melojo (*Quercus pyrenaica*), hayas (*Fagus* spp.), erizones (*Echinopartum horridum*) y otras especies pratenses.

En **Albacete**, se prospectaron dos poblaciones (BCU002740 y BCU002742), sobre un suelo pardo-calizo en el valle del río Tus, en la Sierra del Segura a 1300 y 1442 msnm, respectivamente. El clima en la zona es templado, de veranos secos y cálidos e inviernos fríos. El estrés dominante es la sequía estival. Los cormos de *C. serotinus* crecían en un bosque de pino negral (*Pinus nigra*), encina dulce (*Quercus rotundifolia*), abetos (*Abies* spp.), abedules (*Betula* spp.) y matorral rastrero.

Otras dos entradas se localizaron en la provincia de **Ciudad Real**, en la localidad de Almagro (BCU002685 y BCU002686), en un cerro del Campo de Calatrava a 687 msnm. Se localizaron sobre un suelo pardo-calizo y pedregoso. El bosque mediterráneo próximo a cultivos de olivos estaba formado por encina (*Quercus* spp.), alcornocal (*Quercus suber*) y acebuchal (*Olea europaea* var. *sylvestris*). La zona presenta verano seco y cálido e invierno frío. El estrés predominante es la sequía.

En **Toledo** se recolectaron materiales en Villarrubia de Santiago (BCU001704 y BCU001705), en la planicie llamada Mesa de Ocaña a 680 msnm. En una zona con una pendiente del 10% sobre suelo de margas yesíferas. El clima es templado de verano seco y cálido e invierno frío, siendo la sequía estival el estrés dominante. La vegetación

#### IV. RESULTADOS

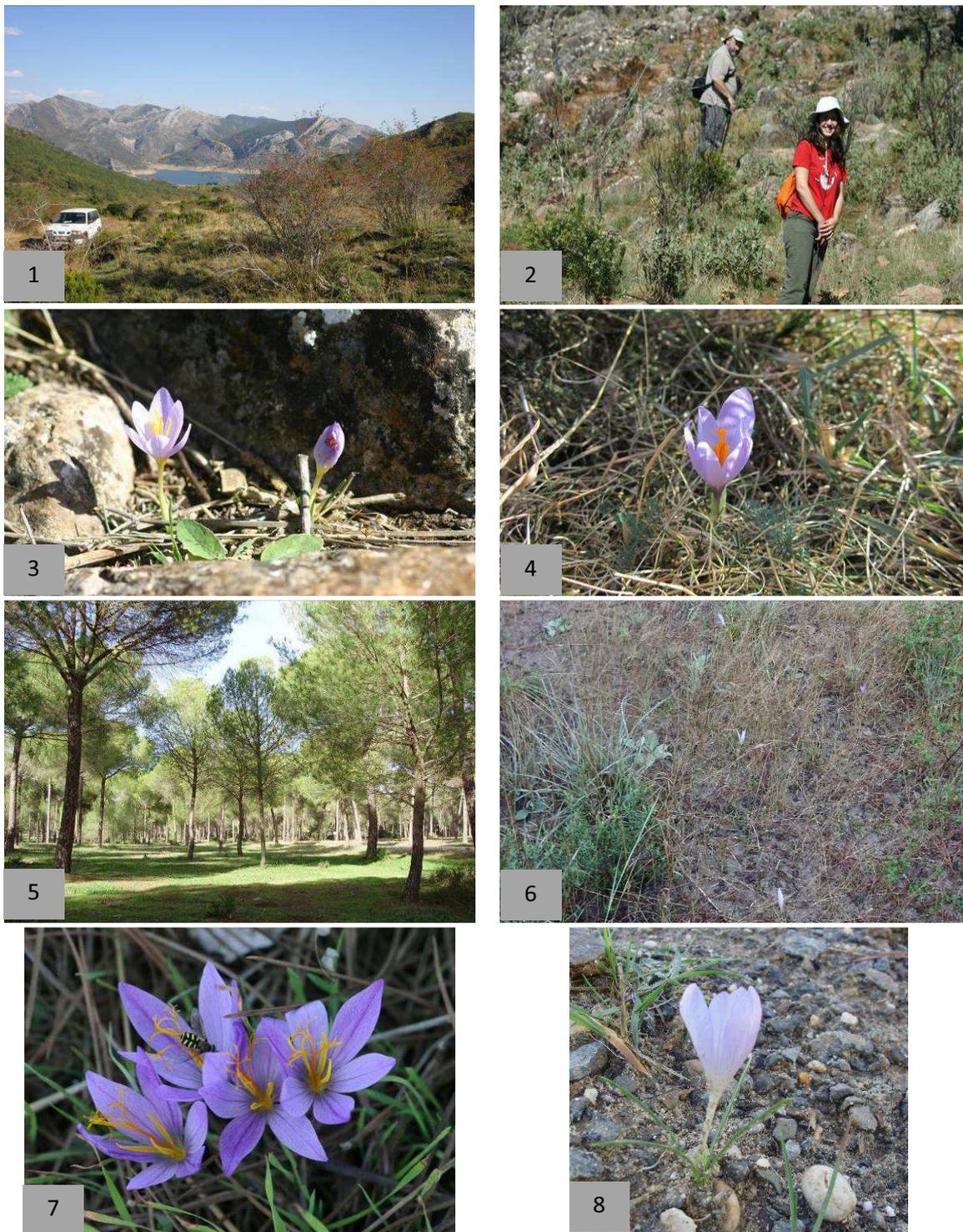
---

próxima estaba formada por bosque mediterráneo con encinar (*Quercus* spp.) y alcornoque (*Quercus suber*).

En la provincia de **Jaén**, en las proximidades a la Sierra de Cazorla, sobre margas calizas, se colectaron dos entradas. El clima es templado de verano seco y cálido e invierno frío, y los estreses dominantes son el frío y la sequía estival. Una de las entradas se localizó en el paraje de Juanfría a 1500 msnm (BCU001655), en un pastizal de alta montaña con erizón (*Erinacea anthyllis*), rosál silvestre (*Rosa* ssp.) y agracejo (*Berberis vulgaris*). La entrada BCU001657 se encontró en Puertollano (1800 msnm), en un pastizal anual efímero situado entre el sotobosque formado por enebro común (*Juniperus communis* subsp. *hemisphaerica*), sabina rastrera (*Juniperus sabina*) con erizones de *Erinacea anthyllis*, y con un dosel de pino negro (*Pinus nigra* subsp. *salzmanii*).

Dos poblaciones se recolectaron en el monte Caroché (**Valencia**), a unos 1100 msnm (BCU002618 y BCU002619), en la zona de transición valenciano – manchega. El clima predominante en la zona es templado con verano seco y caluroso e invierno seco. La vegetación del enclave es un pinar de *Pinus halepensis* con abundante sotobosque, perteneciente a la Clase *Rosmarinetea officinalis*. Los *C. serotinus* recolectados se localizaban en un área despejada, colonizada por plantas camefíticas pertenecientes a la Alianza *Sideritido incanae-Salvion lavandulifoliae*, que se corresponde con los salviares, aulagares y tomillares de óptimo castellano-maestrazgo-manchego, de óptimo meso y supramediterráneos, y de marcada apetencia continental. En las proximidades hay una Microrreserva de Flora, donde una de las especies que se protegen es precisamente *C. serotinus*.

La entrada BCU002959 se colectó en la Sierra de Aracena (**Huelva**). El clima predominante en la zona es templado con verano seco y caluroso e invierno seco. En la zona visitada, la vegetación está dominada por la presencia de alcornoque (*Quercus suber*) y castaño (*Castanea sativa*); como sotobosque se encuentra: lentisco (*Pistacia lentiscus*), cornicabra (*Pistacia terebinthus*), tojo (*Ulex minor*) y jara (*Cistus ladanifer*) entre otros. Entre el pastizal dominado por alfilereras (*Erodium cicutarium*) aparecen los ejemplares de *C. serotinus* (Figura 81.2 y Figura 81.3).



**Figura 81** Ambiente forestal en el que se han colectado las especies *C. serotinus* y *C. clusii*. 1) *C. serotinus* en Barrios de Luna (León, BCU003173); 2 y3) *C. serotinus* en S<sup>a</sup> de Aracena (Huelva, BCU002959); 4) *C. serotinus* en Villamanín (León, BCU003172); 5) *C. clusii* en Hinojos (Cádiz, BCU002963); 6) *C. clusii* en Laguna de la Paja (Cádiz, BCU002966); 7 y 8) *C. clusii* en el Coto de Doñana (Huelva, BCU002960)

La especie *C. clusii* se ha colectado en Huelva y Cádiz. En **Huelva** se observaron cuatro poblaciones. Dos de ellas fueron colectadas en el Coto Doñana. La vegetación de la zona

#### IV. RESULTADOS

---

de una de las poblaciones (BCU002960) está dominada por la presencia de *Pinus pinea* (pino piñonero). Como sotobosque se encuentra el lentisco (*Pistacia lentiscus*) y la esparraguera (*Asparagus acutifolius*). En el herbazal donde se encontraba verrucaria (*Heliotropium europaeum*), se localizaron los ejemplares de *C. clusii* (Figura 81.7 y Figura 81.8). En la segunda zona de recolección del Coto Doñana (BCU002961), la vegetación está dominada por la presencia de pino piñonero (*Pinus pinea*) y alcornoques (*Quercus suber*). No hay sotobosque, y se pasa directamente a un herbazal muy ralo, que aparece en la época húmeda del año. Se ha detectado la presencia de la gramínea cola de conejo (*Lagurus ovatus*), que es una especie típica de dunas, lo que indica lo arenoso que es el sustrato. Allí se han herborizado ejemplares de *C. clusii*. Las entradas BCU002962 Y BCU002963 se colectaron en dos zonas de la localidad de Hinojos. Se trata de una gran formación boscosa de pino piñonero (*Pinus pinea*), bajo del cual hay un matorral formado por: lentisco (*Pistacia lentiscus*), palmito (*Chamaerops humilis*), torvisco (*Daphne gnidium*) y la especie endémica almendrillo hembra (*Mercurialis elliptica*) (Figura 81.5). En los claros del denso pinar aparecen los ejemplares de *C. clusii*. El clima predominante en la zona es templado con verano seco y caluroso e invierno seco.

En **Cádiz** se recolectaron otras cuatro entradas. El clima predominante en la zona es templado con verano seco y caluroso e invierno seco. La entrada BCU002964 se colectó junto a la carretera de Chipiona a Rota. El sustrato es de naturaleza arenosa de un color rojizo muy característico. Este pinar es un área recreativa rodeada de construcciones de baja altura, donde la especie dominante es el pino piñonero (*Pinus pinea*) y como especies acompañantes se encuentran: aliso de mar (*Lobularia marítima*), balsamilla (*Salvia verbenaca*), palmito (*Chamaerops humilis*), mijo mayor (*Piptatherum miliaceum*) y lentisco (*Pistacia lentiscus*). En los claros del pinar se localizan los ejemplares de *C. clusii*.

La accesión BCU002965 se colectó en un pequeño rodal de *Pinus pinea* (pino piñonero), situado en las proximidades del Hospital de Puerto Real, rodeado de construcciones y carreteras. El entorno se encuentra bastante eutrofizado (manifiesta nitrofilia), lo que no impide el desarrollo de algunos ejemplares de *C. clusii*. La vegetación está formada por pino piñonero (*Pinus pinea*) como especie arbórea dominante, que presenta un sotobosque de lentisco (*Pistacia lentiscus*) y olivilla (*Phillyrea angustifolia*); en los claros del pinar se encuentra un tapiz de oca amarilla (*Oxalis corniculata*). La zona de colecta de la accesión BCU002966, como en los casos anteriores, se trata de un pinar de pino piñonero, situado en las proximidades de la denominada Laguna de la Paja, en el desvío al núcleo urbano conocido como Juan Cebada. Es un pinar abierto, poco denso de pino piñonero, con abundante matorral formado por ejemplares de: lentisco (*Pistacia lentiscus*), palmito (*Chamaerops humilis*), mirto (*Myrtus communis*), jara negra (*Cistus salvifolius*) y rubia (*Rubia peregrina*) (Figura 81.6). En los claros aparecen los ejemplares de *C. clusii*. El lugar de colecta de BCU002967 está próximo al anterior, y se diferencia por la presencia de eucaliptos (*Eucalytus camaldulensis*) entre los pinos, así como una importante presencia de coscoja (*Quercus coccifera*) como elemento del sotobosque.

Como en los casos precedentes, en los claros de esta formación aparecen los ejemplares de *C. clusii*.

### 3.5 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO *C. NUDIFLORUS*

*C. nudiflorus* es una especie que se localiza, preferentemente, en prados de montañas cantábricas y pirenaicas (Figura 79), formando parte de los herbazales de la Alianza *Cynosurion cristati* R. Tx. 1947, perteneciente a la Clase *Molinio-Arrhenatheretea* R. Tx. 1937, que engloba a los pastizales de plantas perennes que mantienen a lo largo del año una cierta humedad edáfica, sin llegar al encharcamiento, que proviene del deshielo de la nieve. Estos herbazales se destinan para pastos de alta montaña, o como prados de siega. No obstante, también se pueden encontrar poblaciones en otras localidades de Burgos y La Rioja y, han sido descritas poblaciones en el sur de España. Crece tanto sobre suelo básico como ácido.

Las 17 entradas de *C. nudiflorus* colectadas en este trabajo, han sido localizadas en Burgos, La Rioja, Huesca y Lérida. La entrada BCU003176 de **Burgos** se colectó en el municipio Los Altos a 1080 msnm, en las Hoces del alto Ebro y del Rudrón. Se localizó en una vaguada sobre un suelo calizo, pedregoso, con alto contenido en materia orgánica. El clima de la zona es templado lluvioso con invierno frío, siendo el frío el estrés dominante. El bosque estaba formado por hayas (*Fagus* spp.), coscoja (*Quercus coccifera*), melojo (*Quercus pyrenaica*), pino negral (*Pinus nigra*), pino albar (*Pinus sylvestris*) y quejigal (*Quercus faginea*). El monte bajo estaba poblado por gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*), brezos (*Erica* spp.), tomillo (*Thymus vulgaris*), aliagas (*Genista* spp.), azafrán de marzo (*Gagea villosa*), martagón (*Lilium martagon*), quitameriendas (*Merendera montana*), espárrago prusiano (*Ornithogalum pyrenaicum*) y beata maría (*Polygonatum odoratum*).

Tres poblaciones colectadas se localizaron en **La Rioja**, en diferentes sierras del Sistema ibérico. El clima es templado de verano seco y fresco, y con invierno frío. Una de estas poblaciones se recolectó en San Millán de la Cogolla (BCU002776), ubicado en la Sierra de la Cogolla a 1360 msnm, en un bosque subhúmedo continental sobre suelo ácido, formado por encinas (*Quercus rotundifolia*), hayas (*Fagus* spp.), rebollar (*Quercus pyrenaica*), quejigal (*Quercus faginea*) y pino albal (*Pinus sylvestris*). También con arbustos como el majuelo (*Crataegus monogyna*), endrino (*Prunus spinosa*), rosál silvestre (*Rosa canina*), avellano (*Corylus avellana*), retama (*Retama* spp.), brezo (*Erica* spp.) o zarzamora (*Rubus fruticosus*). Asimismo, crecían plantas aromáticas como tomillo (*Thymus vulgaris*) y romero (*Rosmarinus officinalis*). En Manzanares de Rioja se recolectaron las accesiones BCU002777 y BCU002779 sobre un pastizal de montaña de suelo ácido en una cumbre de baja altura de la Sierra de Pradilla (1270msnm). La vegetación dominante estaba formada por matorral de jara (*Cistus* spp.) salpicado con cantueso (*Thymus* spp.), milenrama (*Achillea millefolium*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), y ejemplares aislados de encina (*Quercus rotundifolia*), rebollo (*Quercus pyrenaica*) y hayedos (*Fagus sylvatica*). La última de las poblaciones (BCU003123) se localizó en **Villoslada de Cameros** en la Sierra Cebollera a 1415 msnm,

#### IV. RESULTADOS

sobre un suelo ácido (Figura 83.4). La vegetación próxima está formada por matorrales: enebro rastrero (*Juniperus* spp.), brezales de montaña ibérica (*Erica* spp.), brezo (*Calluna vulgaris*), el cervuno (*Nardus stricta*), y también por formaciones abedulares (*Betula* spp.), robledales atlánticos, encinares montanos (*Quercus* spp.), acebedas (*Ilex* spp.), y otras especies como son los tilos (*Tilia* spp.), arces (*Acer* spp.), serbales (*Sorbus* spp.), mostajos (*Sorbus* spp.), olmos de montaña (*Ulmus* spp.) y fresnos (*Fraxinus* spp.).

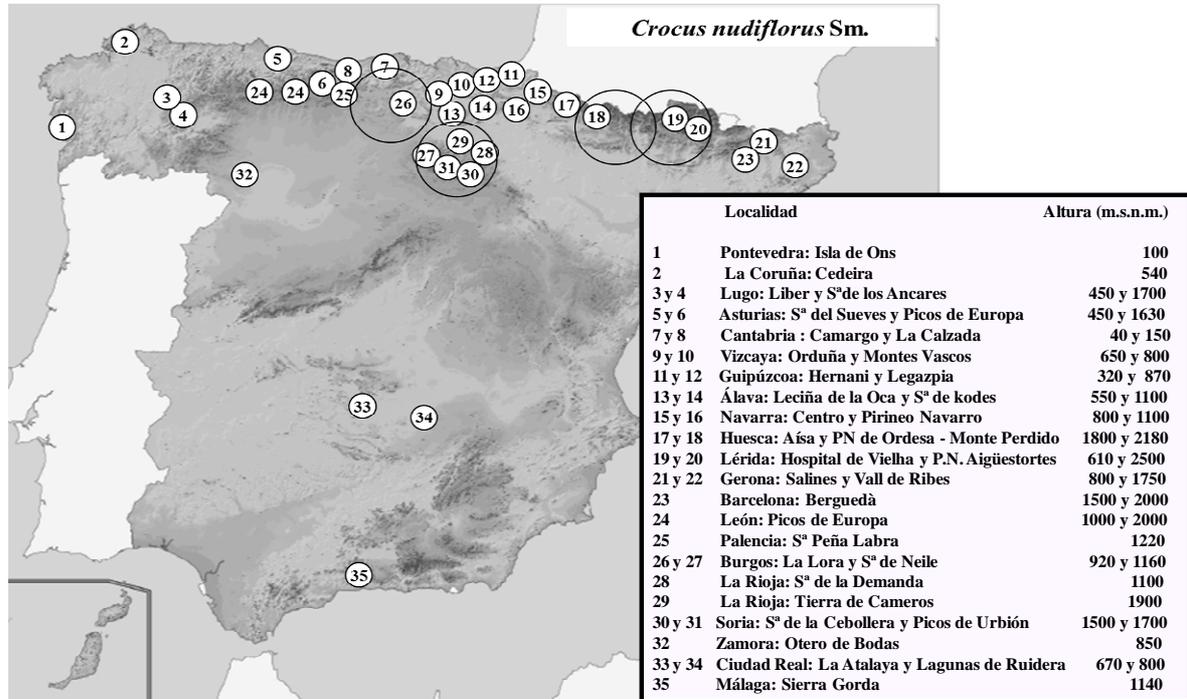


Figura 82 Distribución de *C. nudiflorus*, de floración otoñal, en la Península Ibérica y localidades colectadas. Leyenda: ① Poblaciones de referencia, ○ Poblaciones colectadas.

En **Huesca**, se localizaron nueve poblaciones, dos de ellas en Boltaña (BCU003000 y BCU003001), una localidad próxima a la Sierra de Guara (a una altitud de 1299-1340 msnm), dónde el verano es seco y fresco y el inviernos frío, siendo éste el periodo de estrés dominante. Los cormos de *C. nudiflorus* se recolectaron sobre un suelo pardocalizo, en un monte con boj (*Buxus sempervirens*), pinus silvestre (*Pinus sylvestris*), pino carrasco (*Pinus halepensis*), enebros (*Juniperus* spp.), abedules (*Betula* spp.), carrasca (*Quercus ilex*), quejigo (*Quercus faginea*), gamones (*Asphodelus* spp.), gencianas (*Genciana* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), erizones (*Echinopartum horridum*) y aconitos (*Aconitum* spp.) (Figura 83.2).



**Figura 83** Ambiente forestal en el que se han colectado las especies *C. nudiflorus* y *C. cambessedesii*. 1) *C. nudiflorus* en Benasque (Huesca, BCU002557); 2) *C. nudiflorus* en Sª de Guara (Huesca, BCU003000); 3) *C. nudiflorus* en Benasque (Huesca, BCU002944); 4) *C. nudiflorus* en Villoslada de Cameros (La Rioja, BCU003123); 5) *C. cambessedesii* en Formentor (Mallorca, BCU001683); 6) *C. cambessedesii* en Es Replà (Mallorca, BCU001680); 7) *C. cambessedesii* en Cam Mameta (Mallorca, BCU001685)

## IV. RESULTADOS

---

Cuatro poblaciones se recolectaron en Benasque (Huesca), en los Pirineos (a una altitud entre 1200 y 2000 msnm) en las inmediaciones del parque natural (BCU002556, BCU002557, BCU002558, BCU002559 y BCU002944) (Figura 83.1 y Figura 83.3). El clima es de montaña con inviernos muy fríos y veranos frescos, siendo el frío invernal el estrés dominante. La zona de recolección se corresponde con los claros de un pinar de la Clase *Pino-Juniperetea*, que representan los bosques de coníferas de las etapas maduras y climáticas de las altas montañas continentales (pisos oromediterráneo y supramediterráneo). Por degradación dan lugar a pastizales ralos de la asociación *Poo ligulatae-Festucetum hystricis*, donde son frecuentes el pastoreo (por lo que supone de nitrificación del medio) y la crioturbación por nieve. El paraje objeto de la recolección se enriquece por la presencia de los siguientes taxones: conejitos (*Lamium amplexicaule*), mielenrama (*Achillea millefolium*), bojs (*Buxus sempervirens*) y helecho (*Pteridium aquilinum*), entre otras.

Dos de las poblaciones se colectaron en Laspuña (BCU002735 y BCU002736), en la zona de “preparque” del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido (Huesca). La altitud de la zona de colecta fue de 1275 a 1890 msnm. El clima es de montaña con inviernos muy fríos y veranos frescos. La vegetación también se corresponde, con la Clase fitosociológica de *Pino-Juniperetea*, más concretamente a las formaciones de la asociación *Junipero sabinae-Pinetum sylvestris*. Se trata de un pinar de pino silvestre (*Pinus sylvestris*) y pino negro (*Pinus uncinata*), enriquecido con la presencia de sabina rastrera (*Juniperus sabina*) y enebro (*Juniperus communis* subsp. *hemisphaerica*). Los ejemplares de *C. nudiflorus* fueron recolectados en las zonas más aclaradas y soleadas, dentro de pastizales de la Alianza *Cynosurion cristati*, donde hay que destacar la presencia abundante de quitameriendas (*Merendera pyrenaica*). Cuando la profundidad del suelo lo permite se destaca la presencia de hayas (*Fagus sylvatica*).

En la provincia de **Lérida** se localizaron tres entradas (BCU002737, BCU002738 y BCU002739). Una población se prospectó en Boí, dentro de la zona denominada como “preparque” del Parque Nacional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici, más concretamente en las cercanías de la estación de esquí del complejo Boí-Taüll Resort. La altitud de la zona de colecta fue de aproximadamente 2100 msnm. El clima es de montaña con inviernos muy fríos y veranos frescos, siendo el frío invernal el estrés dominante. La vegetación donde se localiza el taxón pertenece a la Clase *Thlaspietea rotundifolii*. Se trata de una formación orófila y glareícola integrada por plantas hemicriptófitas y vivaces de escasa biomasa, especializados en colonizar lugares con abundante pedregosidad superficial, como son los márgenes de caminos forestales.

### 3.6 CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE EN QUE SE HA COLECTADO *C. CAMBESSEDESII*

Este endemismo balear tiene una distribución altitudinal que va desde roquedos calizos próximos a la playa hasta unos 600 msnm en la Sierra de Tramontana (Figura 84). En ambos enclaves, los ejemplares se localizan en el interior de fisuras y de los orificios de rocas calcáreas carstificadas. Este taxón aparece generalmente asociado con la

gramínea cervero (*Brachypodium retusum*), tanto en las zonas costeras como en las zonas más al interior, también sometidas al efecto de la maresía que recorre toda la isla.

Las cuatro entradas se colectaron en Mallorca, en zonas costeras, dónde los veranos son secos y los inviernos suaves. Los cormos se localizaron sobre un suelo pardo-calizo y pedregoso. Estas son plantas rupícolas, crecen en las grietas de las rocas presentes en el terreno. La entrada BCU001680, fue recolectada en **Es Replà** (Artà) a 164 msnm (Figura 83.6) y otra en **Partida de Fuster** (BCU001682) en un acantilado entre la Cala Mesquida y el Cabo Freu (Capdepera) a 32 msnm. Estas entradas se localizaron cerca del Puig de Son Moret, en las Sierras de Llevant a menos de 3 km de la costa. La tercera entrada se localizó en **Formentor** a 170 msnm (BCU001683) y a menos de 2 km de la costa, y la cuarta entrada BCU001685 en **Can Mameta** (Caimari) a 250 msnm (Figura 83.7) y a 10,64 km del Mar Mediterráneo, en la Sierra de Tramuntana.

#### *Crocus cambessedesii* J. Gay

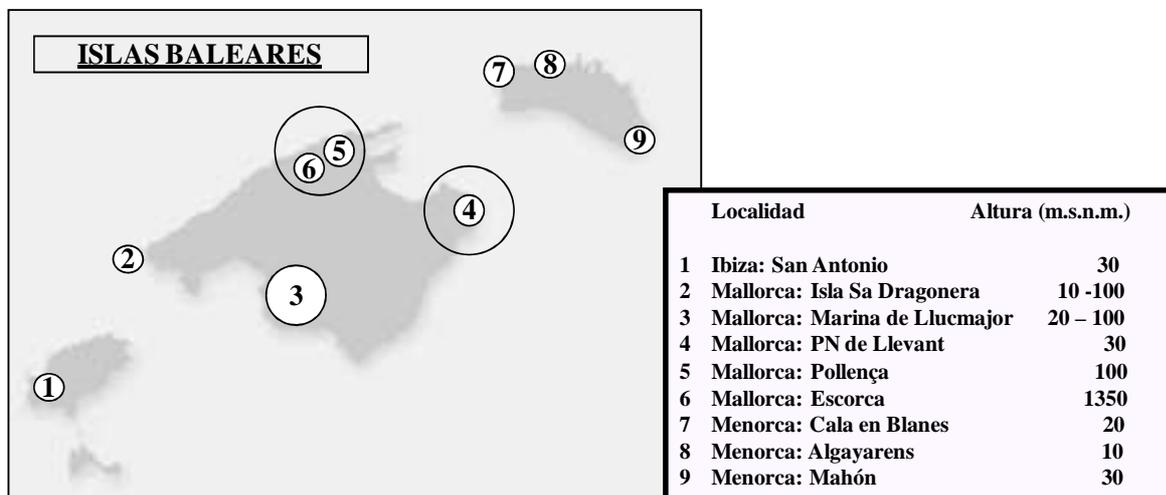


Figura 84 Distribución de la especie *C. cambessedesii*, de floración otoñal, en la Península Ibérica y lugares colectados. Leyenda: ① Poblaciones de referencia, ○ Poblaciones colectadas.

La vegetación típica de estas zonas es xerófila, ya que tiene que soportar la aridez estival. La especie dominante es la encina (*Quercus* spp.). El sotobosque es leñoso, espinoso y aromático, con especies como el lentisco (*Pistacia lentiscus*), el aladierno (*Rhamnus alaternus*), numerosas lianas como la zarzaparrilla (*Smilax aspera*) y, en los claros, las jaras (*Cistus* spp.), el romero (*R. officinalis*) y el tomillo (*T. vulgaris*). En el cortejo florístico aparecen especies como el pino carrasco (*Pinus halepensis*) y el pino piñonero (*Pinus pinea*), la sabina (*Juniperus* spp.) o el madroño (*Arbutus unedo*).

Toda la información de pasaporte referente a las entradas colectadas de las especies silvestres españolas del género *Crocus*, está conservada en el Sistema de Documentación del BGV de Cuenca, y en su mayor parte, también está actualmente incorporada al Inventario Nacional de Recursos Fitogenéticos (<http://www.inia.es/IniaPortal/goUrlDinamica.action?url=http://wwwsp.inia.es/Investigacion/centros/crf>).



**2. Caracterización  
morfológica de las especies  
silvestres españolas del  
género *Crocus* spp.**



## 1 VARIABILIDAD PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS CUANTITATIVOS

### 1.1 ESTRUCTURA DE LA VARIACIÓN ENTRE LAS ESPECIES SILVESTRES DE *CROCUS* PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS CUANTITATIVOS

#### 1.1.1 CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE FLORES.

Para la mayoría de los caracteres relacionados con el tamaño de los órganos florales, la principal fuente de variación es interespecífica, a la que se debe entre el 40% y el 60% de la variabilidad observada (Tabla 25).

*Tabla 25 Componentes de la varianza para los caracteres relacionados con la morfología floral.*

CARACTERES	Varianza entre especies		Varianza entre entradas		Varianza dentro de entradas	
	%	gl	%	gl	%	gl
Longitud del tépalo externo	56,79	6	10,24	46	32,97	215
Anchura del tépalo externo	56,58	6	7,42	46	36,00	233
Longitud del tépalo interno	52,13	6	8,73	46	39,14	237
Anchura del tépalo interno	36,76	6	13,36	46	49,88	233
Longitud de la antera	41,47	6	17,69	46	40,84	231
Longitud del filamento	17,25	6	22,12	46	60,63	231
Longitud del estilo	63,52	6	3,02	47	33,46	227
Altura de la flor	46,44	6	19,06	35	34,40	161
Nº de flores por brote	17,31	6	10,13	31	72,56	167

La varianza entre entradas dentro de la misma especie muestra valores inferiores, estando entre el 3% y el 22%. Sin embargo, es de destacar la variabilidad existente dentro de entradas, con una importante componente ambiental o epigenética. Para algún carácter, como es la longitud del filamento del estambre, esta variación es mayor que la variación interespecífica (Tabla 25).

Hay que destacar el carácter número de flores por brote con una variación entre plantas dentro de entrada que explica el 73% de la variabilidad observada y una variabilidad interespecífica menor del 20% (Tabla 25).

#### 1.1.2 CARACTERES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO.

Para caracteres como la anchura de la hoja, la longitud de la hoja cuando la planta florece y el número de hojas presentes en la floración, la principal fuente de variación se observa entre especies. Sin embargo, el número brotes por cormo y el número hojas en el brote principal tienen una fuerte componente de variación entre plantas dentro de la misma entrada debida fundamentalmente a factores ambientales y de tamaño de cormo, sin poder excluir diferencias genéticas (Tabla 26).

## IV. RESULTADOS

La varianza entre entradas no es en ningún caso superior a las componentes anteriormente mencionadas (Tabla 26).

Tabla 26 Componentes de la varianza para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo.

CARACTERES	Varianza entre especies		Varianza entre entradas		Varianza dentro de entradas	
	%	gl	%	gl	%	gl
Longitud máxima de la hoja	35,51	6	27,72	64	36,77	686
Anchura de la hoja	52,09	6	20,99	61	26,93	601
Nº brotes por cormo	22,28	6	25,45	59	52,27	451
Nº hojas brote principal	13,92	6	13,10	63	72,98	646
Longitud hojas en floración	56,22	6	17,95	25	26,83	103
Nº hojas en floración	88,08	6	1,54	20	10,37	76

### 1.1.3 CARACTERES RELACIONADOS CON EL FRUTO Y LA SEMILLA.

La variabilidad observada para las características de la cápsula, es fundamentalmente debida a la variación entre plantas dentro de la misma entrada. Las componentes de variación entre especies y entre entradas son menores y no explican más del 25% de la variabilidad observada (Tabla 27).

Tabla 27 Componentes de la varianza para los caracteres relacionados con el fruto y la semilla.

CARACTERES	Varianza entre especies		Varianza entre entradas		Varianza dentro de entradas	
	%	gl	%	gl	%	gl
Altura del fruto	22,73	6	5,29	46	71,98	214
Longitud de la cápsula	13,43	6	10,08	46	76,49	214
Anchura de la cápsula	5,17	6	22,47	46	72,36	223
Nº semillas por cápsula	21,17	6	13,50	46	65,33	227
Longitud semillas	47,78	6	30,77	49	21,46	399
Peso semillas	53,33	6	32,20	48	14,47	226

Sin embargo, la variación en las dimensiones de la semilla es debida fundamentalmente a diferencias entre especies.

## 1.2 VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS EN LAS DISTINTAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS*.

### 1.2.1 *C. NEVADENSIS*

#### 1.2.1.1 CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE FLORES.

Los caracteres relacionados con la morfología floral evaluados en diferentes entradas de *C. nevadensis*, muestran variabilidad, siendo superiores las diferencias para los caracteres longitud del tépalo externo y altura de la flor. La longitud del filamento del

estambre y el número de flores desarrolladas por brotes son los caracteres que más uniformidad presentan dentro de esta especie (Tabla 28).

**Tabla 28 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de *C. nevadensis*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ )**

ENTRADAS	Longitud tépalo externo (mm)		Anchura tépalo externo (mm)		Longitud tépalo interno (mm)		Anchura tépalo interno (mm)	
BCU002697	24,21	ab	7,35	abc	22,36	ab	7,89	abc
BCU002698	23,42	ab	6,98	ab	21,75	ab	7,90	abc
BCU002990	29,94	cde	6,76	a	28,43	cd	6,82	a
BCU002992	22,59	ab	5,95	a	22,35	ab	7,35	ab
BCU002993	26,59	bcd	5,94	a	25,41	bc	7,11	a
BCU002994	25,31	abc	6,19	a	24,18	bc	7,91	abc
BCU002694	22,40	ab	6,17	a	20,94	ab	6,38	a
BCU002871	23,18	ab	6,66	a	21,11	ab	7,00	a
BCU002359	20,05	a	5,87	a	18,57	a	6,97	a
BCU001742	33,45	e	8,95	bc	31,00	d	9,52	bcd
BCU002380	25,74	bc	7,43	abc	25,04	bc	9,77	cd
BCU002980	24,07	ab	5,73	a	23,22	ab	6,88	a
BCU002982	30,80	de	9,04	c	28,53	cd	10,82	d
BCU002976	24,42	ab	6,41	a	22,50	ab	7,21	ab
BCU002979	24,46	ab	6,15	a	23,13	ab	7,23	ab

ENTRADA	Longitud estilo (mm)		Longitud antera (mm)		Longitud filamento (mm)	Altura flor (mm)	Nº flores por brote
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2			
BCU002697		23,22 bc		8,32 a	4,99 ab	45,27 abc	1,25 ab
BCU002698		20,77 ab		9,10 ab	4,44 a	49,06 abcd	1,25 ab
BCU002990	24,00 abc		10,04 abc		7,06 b	70,00 e	1,00 a
BCU002992	19,67 a		8,69 a		5,37 ab	55,00 bcde	1,00 a
BCU002993	20,40 a		8,54 a		5,05 ab	62,25 de	1,00 a
BCU002994	22,60 abc		9,49 ab		5,23 ab	60,52 cde	1,00 a
BCU002694	24,16 abc	26,64 c	9,95 abc	11,54 bc	4,61 a	41,40 ab	1,83 ab
BCU002871	21,95 ab	21,13 ab	9,22 ab	11,33 bc	4,81 ab	44,63 abc	1,70 ab
BCU002359	24,00 abc		10,84 bcd		4,36 a	37,25 a	2,05 b
BCU001742		28,45 c		13,37 c	7,09 b	66,00 e	1,00 a
BCU002380	22,17 abc	18,76 ab	9,92 abc	7,49 a	6,45 ab	39,62 ab	1,23 ab
BCU002980	25,67 bc	20,79 ab	11,53 cd	9,08 ab	6,09 ab	42,63 ab	1,00 a
BCU002982	26,49 c		12,05 d		6,23 ab	62,75 de	1,00 a
BCU002976	26,75 c	17,16 a	11,09 bcd	7,95 a	5,99 ab	44,04 abc	1,00 a
BCU002979	25,67 bc	18,18 ab	12,54 d	8,43 a	5,46 ab	60,12 cde	1,00 a

#### IV. RESULTADOS

Las flores que presentan menor tamaño de corola y de altura desde el suelo, son las observadas en la entrada BCU002359, procedente de Motilla del Palancar (Cuenca). No obstante, la longitud de su antera es de tamaño medio. Esta entrada es la que presenta el mayor número de flores por brote dentro de esta especie (2 flores por brote) (Tabla 28).

El mayor tamaño de flor se observa dentro de las entradas BCU001742 y BCU002982, colectadas en Cofrentes (Valencia) y Quesada (Jaén) respectivamente, si bien, la longitud del filamento de la antera de la entrada andaluza es de tamaño medio. El número de flores por brote evaluado en estas dos entradas tiene valores mínimos, de una flor por brote (1.2.1.2)

##### 1.2.1.2. CARACTERES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO.

Los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo muestran una variabilidad mayor que los caracteres observados durante la floración, siendo destacables los caracteres anchura y longitud de hoja y el número de hojas desarrolladas en el brote principal (Tabla 29).

**Tabla 29 .1. Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de *C. nevadensis*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ). (Continúa)**

ENTRADAS	Longitud máxima hoja (cm)		Anchura hoja (mm)		Nº brotes por cormo		Nº hojas del brote principal			
							Año 1		Año 2	
BCU002697	9,18	a	1,30	ab	1,40	b	3,00	a	5,80	f
BCU002698	10,74	ab	1,56	abcde	1,00	a			4,88	def
BCU002988	17,59	e	1,27	ab	1,00	a			3,22	abc
BCU002989	14,30	bcde	1,15	a	1,00	a			3,00	abc
BCU002990	15,01	cde	1,34	abc	1,00	a			2,70	ab
BCU002992	17,80	e	1,14	a	1,00	a			3,13	abc
BCU002993	14,80	cde	1,32	abc	1,00	a			3,71	bcde
BCU002994	17,93	e	1,55	abcde	1,00	a			3,88	bcde
BCU002999	14,18	bcde	1,51	abcd	1,00	a			2,00	a
BCU002694	11,37	abc	2,39	g	1,43	b	4,20	bc	4,43	cdef
BCU002871	10,74	ab	2,06	fg	1,50	b	4,20	bc	5,20	ef
BCU002359	11,25	abc	1,97	ef	1,33	b	3,30	ab	5,89	f
BCU001742	10,78	ab	1,53	abcde	1,00	a			2,00	a
BCU001743	11,90	abcd	1,75	cdef	1,00	a			2,50	ab
BCU002380	14,94	cde	1,79	def	1,00	a	4,80	c	3,75	bcde
BCU002980	15,85	de	1,69	bcdef	1,00	a			4,30	cde
BCU002982	15,14	cde	1,45	abcd	1,00	a			3,56	bcd
BCU002976	15,41	de	1,75	cdef	1,00	a			2,33	ab
BCU002979	16,84	e	1,63	bcde	1,00	a			3,78	bcde

**Tabla 29.2. Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de *C. nevadensis*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ )**

ENTRADAS	Longitud hojas en floración (cm)		Nº hojas en floración	
BCU002697	4,35	ab	4,50	ab
BCU002698	5,64	b	5,60	bc
BCU002990	5,61	b	3,50	a
BCU002992	4,46	ab	4,00	a
BCU002993	4,90	b	4,50	ab
BCU002994	2,35	a	4,20	ab
BCU002694	4,31	ab	5,00	abc
BCU002871	3,82	ab	4,83	ab
BCU002359	4,16	ab	4,25	ab
BCU001742	7,80	c	5,00	abc
BCU002380	4,63	b	4,67	ab
BCU002980	5,08	b	4,50	ab
BCU002982	4,83	b	5,00	abc
BCU002976	4,44	ab	6,33	c
BCU002979	5,70	b	4,80	ab

Los valores de longitud máxima de la hoja se observan en una entrada de Lérida (BCU002988), varias colectadas en Huesca (BCU002992 y BCU002994) y una localizada en Granada (BCU002979). Al mismo tiempo, las entradas de Lérida y Huesca desarrollan los valores mínimos de anchura de hojas. Las entradas de la provincia de Cuenca (BCU002694, BCU002871 y BCU002359) son las que desarrollan una hoja más ancha, si bien su longitud se encuentra entre las de menor valor. El número brotes por cormo, aunque presenta valores muy similares entre entradas, es levemente superior en estas entradas de Cuenca y en la BCU002697 localizada en Pamplona. Asimismo, estas entradas son las que forman mayor número hojas por brote (Tabla 29).

En cuanto al desarrollo vegetativo durante la floración, cabe destacar, las hojas de una entrada de Valencia (BCU001742) y de una colectada en Granada (BCU002976) que presentan mayores valores de longitud y son más numerosas (Tabla 29).

### **1.2.1.3 CARACTERES DE FRUTO Y DE SEMILLA.**

Los caracteres relacionados con el tamaño de fruto y semilla mostraron una variabilidad menor que el resto de caracteres evaluados (Tabla 30).

Los valores máximos para la altura del fruto se desarrollan en unas entradas de Jaén (BCU002380, BCU002980 y BCU002982), así como en la entrada BCU002871 de Cuenca. Ésta última, junto con el resto de entradas conquenses (BCU002694 y BCU002359), forman las cápsulas de mayor tamaño (Tabla 30).

#### IV. RESULTADOS

El número semillas por cápsula muestra escasas diferencias entre entradas. Las semillas de tamaño superior las encontramos en entradas procedentes de Lérida (BCU002989) y Huesca (BCU002994 y BCU002990) pero aparecen diferencias entre los valores de peso de los diferentes años, sin poder discernir si se trata de un efecto ambiental o genotípico (Tabla 30).

**Tabla 30** Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de *C. nevadensis*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).

ENTRADAS	Altura fruto (cm)		Longitud cápsula (cm)		Anchura cápsula (cm)			
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2		
BCU002988	3,48	abc	1,20	ab	0,50	ab		
BCU002989		3,35	a		1,30	b	0,55	ab
BCU002990	2,78	ab	0,99	ab	0,51	abc		
BCU002992	2,33	a	0,83	a	0,59	abc		
BCU002994	2,18	a	0,85	a	0,41	a		
BCU002694	3,20	abc	1,28	ab	0,62	abc		
BCU002871	4,12	c	1,48	b	0,70	bc		
BCU002359	3,76	bc	1,15	ab	0,72	c		
BCU002380		4,67	a		1,10	ab	0,43	a
BCU002980		3,97	a		0,90	a	0,56	ab
BCU002982		4,04	a		1,06	ab	0,57	ab
BCU002976		3,08	a		1,00	a	0,60	b
BCU002979		3,43	a		1,13	ab	0,60	b

ENTRADAS	Longitud semillas (mm)		Peso semillas (mg)		Nº semillas por cápsula			
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2		
BCU002988	3,47	a	7,33	a	11,00	ab		
BCU002989		5,00	d		16,05	d	12,00	a
BCU002990	4,12	bc	14,14	bc	7,00	a		
BCU002992	3,27	a	7,48	a	9,00	ab		
BCU002994	4,40	c	14,84	c	7,00	a		
BCU002694	3,66	ab	16,54	c	9,00	ab		
BCU002871	3,79	ab	8,14	a	12,75	b		
BCU002359	3,81	ab	11,74	b		a		
BCU002380		3,46	ab		7,16	ab	8,00	a
BCU002980		3,80	bc		7,80	b	9,00	a
BCU002982		3,17	a		6,39	a	12,50	a
BCU002976		3,77	bc		6,95	ab	8,00	a
BCU002979		3,94	c		10,55	c	11,60	a

## 1.2.2 C. CARPETANUS

## 1.2.2.1 CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE FLORES.

Para caracteres relacionados con el tamaño de la corola, no existen diferencias significativas entre las entradas de *C. carpetanus* excepto para la longitud del filamento del estambre y del estilo, así como para la altura de la flor desde el suelo. Es destacable la máxima longitud del filamento que presenta la entrada BCU002973, colectada en Robregordo (Madrid), y la mayor longitud del estilo y altura de la flor que desarrollan flores colectadas en Montejo de la sierra (BCU002971) en Madrid (Tabla 31).

**Tabla 31** Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de *C. carpetanus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).

ENTRADAS	Longitud tépalo externo (mm)		Anchura tépalo externo (mm)		Longitud tépalo interno (mm)		Anchura tépalo interno (mm)									
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2								
BCU002696	20,77	a	7,90	a	19,89	a	8,63	a								
BCU002835		22,86	a	11,55	a	22,78	a	12,04	a							
BCU002836		24,18	a	12,19	a	22,26	a	12,55	a							
BCU002837		25,02	a	11,44	a	23,70	a	11,38	a							
BCU002971	24,55	a	24,19	a	10,23	a	9,70	a	24,09	b	25,50	a	10,39	a	10,40	a
BCU002973		24,33	a	9,29	a	23,80	a	9,25	a							

ENTRADAS	Longitud antera (mm)		Longitud filamento (mm)		Longitud estilo (mm)							
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2						
BCU002696	9,01	a	4,53	a	31	a						
BCU002835		8,66	a	4,61	ab	16,88	a					
BCU002836		9,97	a	3,71	a	16,74	a					
BCU002837		8,67	a	4,27	a	14,41	a					
BCU002971	10,70	a	10,33	a	6,08	a	4,79	ab	24,71	a	23,84	b
BCU002973		11,33	a	7,33	b	15,61	a					

ENTRADAS	Nº de flores por brote		Altura flor (mm)					
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2				
BCU002696	1	a	59	a				
BCU002835		1	a	60,99	ab			
BCU002836		1	a	47,7	a			
BCU002837		1	a	51,48	a			
BCU002971	1	a	1	a	51,25	a	70,13	b
BCU002973		1	a	49,43	a			

## IV. RESULTADOS

### 1.2.2.2 CARACTERES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO.

En esta especie, se observan diferencias significativas entre entradas para todos los caracteres vegetativos observados en la última etapa del desarrollo. Las entradas procedentes de Somosierra (BCU002971, BCU002972 y BCU002973) tienen un menor desarrollo en longitud de las hojas, pero la anchura de las mismas está entre las máximas observadas. Éstas también desarrollan mayor número de hojas en el brote (Tabla 32).

Se observa escasa variación entre entradas de los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo cuantificado durante la floración, y el número de brotes por cormo. No obstante, cabe desatacar el mayor número de hojas en floración mostrado por la entrada BCU002973 y un número brotes por cormo ligeramente superior observado en la entrada BCU002837 (Ávila) (Tabla 32).

**Tabla 32** Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de *C. carpetanus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).

ENTRADAS	Longitud máxima hoja (cm)		Anchura hoja (mm)				Nº brotes por cormo		Nº hojas brote principal	
			Año 1		Año 2					
BCU002696	11,57	bc	1,41	cd	1,32	ab	1	a	2,50	a
BCU002835	15,02	d	0,95	a	1,77	bcd	1	a	2,84	abc
BCU002836	13,68	cd	1,21	bc	2,01	cd	1	a	3,11	abcd
BCU002837	14,09	d	1,21	bc	1,57	bc	1,22	b	3,26	abcd
BCU002838	15,40	d	1,02	ab	1,63	bcd	1	a	2,63	ab
BCU002971	9,94	ab	1,49	d	1,93	cd	1	a	3,46	cd
BCU002972	10,94	ab	1,23	bc	1,74	bcd	1	a	3,31	bcd
BCU002973	9,90	ab	1,61	d	2,07	d	1	a	3,81	d
BCU002974	9,03	a	1,27	c	1,10	a	1,33	b	3,08	abcd

ENTRADAS	Longitud hojas en floración (cm)		Nº hojas en floración					
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2				
BCU002696	2,83	a	3	a				
BCU002835		7,05	a	3,50	ab			
BCU002836		6,77	a	3	a			
BCU002837		5,08	a	3,40	ab			
BCU002971	6,90	b	5,88	a	3,5	a	3	a
BCU002973		5,91	a	4	c			

### 1.2.2.3 CARACTERES DE FRUTO Y DE SEMILLA.

Los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla muestran una escasa variabilidad entre las entradas evaluadas un mismo año. Sin embargo, existen diferencias importantes entre los valores obtenidos en los dos años analizados. Dado que

difieren las entradas ensayadas en cada año, no podemos esclarecer si se trata de un efecto ambiental o genotípico (Tabla 33).

**Tabla 33 1.2.3 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de *C. carpetanus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).**

ENTRADAS	Altura fruto (cm)		Longitud cápsula (cm)		Anchura cápsula (cm)		Nº semillas por cápsula		
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	
BCU002696	2,10	b	0,56	a	0,42	b	10	b	
BCU002836	2	a	0,90	b	0,40	a	9	a	
BCU002971		2,64	a	1,05	a	0,59	a	16,61	a
BCU002972		2,57	a	1,15	a	0,66	a	16,27	a
BCU002973		3,07	a	1,12	a	0,54	a	20,75	a

**Tabla 33. Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de *C. carpetanus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).**

ENTRADAS	Longitud semillas (mm)		Peso semillas (mg)		
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	
BCU002696	2,81	a	7,50	a	
BCU002835	2,69	a	6,50	a	
BCU002836	2,78	a	7,91	a	
BCU002971		2,52	a	4,13	a
BCU002972		2,98	b	4,38	a

### 1.2.3 *C. VERNUS*

#### 1.2.3.1 CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE FLORES

La especie *C. vernus* presentó grandes dificultades en la consecución de material para trabajar, y además tuvo mala adaptación a las condiciones de ensayo, por ello sólo se pudieron analizar adecuadamente dos entradas (Tabla 34 ).

**Tabla 34 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de *C. vernus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).**

ENTRADAS	Longitud tépalo ext. (mm)	Anchura tépalo ext. (mm)	Longitud tépalo int. (mm)	Anchura tépalo int. (mm)	Longitud estilo (mm)					
	BCU001822	16,52	a	8,03	a	15,41	a	7,13	a	24,50
BCU002998	27,37	a	12,88	a	23,60	a	11,20	a	27,33	a

ENTRADAS	Longitud antera (mm)	Longitud filamento (mm)	Altura flor (mm)	Nº de flores por brote				
	BCU001822	8,14	a	5,74	a	55,5	a	1
BCU002998	9,74	a	5,83	a	75,33	b	1	a

#### IV. RESULTADOS

Los caracteres relacionados con la morfología floral en las dos entradas que forman flor no presentan diferencias significativas, con la excepción del carácter altura de la flor medida desde el suelo. La entrada BCU002998 es la que forma flores con mayor altura (Tabla 34 ).

##### 1.2.3.2 CARACTERES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO.

Los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo muestran escasa variabilidad, con la excepción del carácter anchura de la hoja. La entrada que forma las flores más grandes (BCU002998) también es la que tiene un desarrollo vegetativo mayor durante la floración y al final de su ciclo (Tabla 35 ).

*Tabla 35 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de C. vernus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ). Valores indicados con \* indican plantas que sufrieron un problema de cultivo al final del ciclo y no se ha tenido en cuenta en el análisis de medias.*

ENTRADAS	Longitud máxima hoja (cm)	Anchura hoja (mm)	Nº brotes por cormo	Nº hojas brote principal
BCU001822	8,93 *	3,02 *	1 *	3 *
BCU002998	27,65 a	5,81 b	1,78 a	3,67 a
BCU003018	27,32 a	2,93 a	1,60 a	3 a

ENTRADAS	Longitud hojas en floración (cm)	Nº hojas en floración
BCU001822	3,25 a	3 a
BCU002998	4,60 a	3 a

##### 1.2.3.3 CARACTERES DE FRUTO Y DE SEMILLA.

Los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla evaluados en las diferentes entradas de *C. vernus*, presentan variabilidad, con la excepción de los caracteres altura del fruto medido desde el suelo y anchura de la cápsula. La entrada que desarrolla cápsulas de tamaño algo mayor, con un mayor número de semillas por fruto, y con semillas de más peso es la BCU003018 (Tabla 36.1 y Tabla 36.2).

*Tabla 36 .1. Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de C. vernus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ). Continua.*

ENTRADAS	Altura fruto (cm)	Longitud cápsula (cm)	Anchura cápsula (cm)	Nº semillas por cápsula
BCU003198	4,25 a	0,75 a	0,45 a	8,50 a
BCU003018	3,40 a	1,50 b	0,58 a	19,50 b

**Tabla 36.2. Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de *C. vernus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).**

ENTRADAS	Longitud semillas (mm)	Peso semillas (mg)
BCU002998	3,1 c	8,28 b
BCU003198	2,11 a	6,20 a
BCU003018	2,56 b	9,45 c

#### 1.2.4 C. SEROTINUS

##### 1.2.4.1 CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE FLORES.

Los caracteres relacionados con la morfología floral entre las diferentes entradas de la especie *C. serotinus* muestran diferencias significativas entre entradas con la excepción de la longitud del estilo. El número de flores por brote tampoco muestra variación intraespecífica (Tabla 37).

**Tabla 37 .1 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de *C. serotinus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ). Continua.**

ENTRADAS	Longitud tépalo ext. (mm)		Anchura tépalo ext. (mm)		Longitud tépalo int. (mm)		Anchura tépalo int. (mm)		Longitud estilo (mm)
	Año 1	Año 2							
BCU002741	27,62 abc	36,29 ef	10,73 bc		29,49 abc		11 b		31,50 a
BCU003172		38,23 f	11,54 bc		37,92 d		11,51 b		34,34 a
BCU003173		34,64 cdef	9,43 abc		33,19 cd		9,43 ab		31,02 a
BCU003174		32,56 bcde	10,66 bc		31,01 abcd		10,98 b		33,52 a
BCU003180		29,54 abc	10,78 bc		29,05 abc		10,96 b		31,91 a
BCU003181		31,55 bcd	10,97 bc		30,78 abcd		10,78 b		32,17 a
BCU003175		25,66 a	7,61 a		25,25 ab		7,41 a		30,34 a
BCU002743	32,79 bc	32,75 cde	10,11 abc		31,50 bcd		9,92 ab		33,22 a
BCU002775	32,17 abc	30,15 abcd	9,48 abc		29,70 abc		9,37 ab		31,80 a
BCU002742	25,23 a	27,11 ab	8,93 ab		25,98 abc		9,64 ab		29,82 a
BCU002550	28,36 abc	31,49 bcde	11,61 bc		28,16 abc		11,71 b		32,82 a
BCU002618	26,68 ab	32,21 bcde	11,68 bc		29,19 abc		11,71 b		29,74 a
BCU002619	29,39 abc		11,81 bc		28,21 abc		11,69 b		32,74 a
BCU002367	34,43 c		11,72 bc		32,74 cd		12,28 b		32,20 a
BCU001655	26,47 ab		10,05 abc		23,98 a		9,28 ab		35,86 a
BCU001657	31,31 abc	30,35 abcd	12,09 c		31,25 abcd		12,11 b		33,98 a
BCU002978		35,49 def	10,38 bc		37,14 d		10,85 b		34,71 a

Una entrada de León (BCU003172), una de Granada (BCU002978) y una de Ciudad Real (BCU002367) forman las flores de corola más grande. Las flores de corola más pequeña se presentan en la entrada de Albacete (BCU002742). Los tépalos más anchos aparecen en flores de Jaén (BCU001657) (Tabla 37.1).

#### IV. RESULTADOS

La entrada BCU002550 colectada en Albacete forma las flores con la máxima altura desde el suelo, así como las flores con la máxima longitud de anteras. Las flores que presentan una longitud de estambre máxima pertenecen a la entrada BCU002618 de Valencia (Tabla 37.1 y Tabla 37.2).

**Tabla 37.2. Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de *C. serotinus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).**

ENTRADAS	Longitud antera (mm)		Longitud filamento (mm)		Altura flor (mm)		Nº de flores por brote	
	Año 1	Año 2						
BCU002741	10,16 a	10,86 ab	6,86 abcd		93,50 ab		1,23 a	
BCU003172		12,02 bcd	7,17 abcd		62,56 a		1,25 a	
BCU003173		10,03 ab	6,24 abcd		66,84 a		1,5 a	
BCU003174		12,42 bcd	7,46 bcd		71,16 a		1,43 a	
BCU003180		14,42 de	4,62 a		49,50 a		1,25 a	
BCU003181		13,06 cd	6,68 abcd		59,73 a		1,11 a	
BCU003175		8,87 a	5,92 abcd		58,50 a		1,5 a	
BCU002743	14,11 ab	12,32 bcd	6,58 abcd		69,86 a		1 a	
BCU002775	12,44 ab	11,47 bc	5,06 ab		59,69 a		1,64 a	
BCU002742	13,17 ab	13,65 cd	6,28 abcd		67,82 a		1 a	
BCU002550	14,07 ab	16,73 e	5,06 ab		105 b		1,27 a	
BCU002618	13,79 ab	14,02 d	8,50 d		93,69 ab		1,20 a	
BCU002619	15,28 b		6,48 abcd		72,50 a		1 a	
BCU002367	13,28 ab		7,69 bcd		66 a		1,33 a	
BCU001655	13,74 ab		7,99 cd		58,87 a		1 a	
BCU001657	16,86 b	12,25 bcd	7,57 bcd		65,83 a		1,50 a	
BCU002978		10,89 abc	5,80 abc		63,49 a		1,22 a	

#### 1.2.4.2 CARACTERES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO.

Los caracteres relativos al crecimiento vegetativo al final del ciclo presentan gran variabilidad entre entradas (Tabla 38 ).

La longitud máxima de hoja al final del ciclo se observa en la entrada BCU002367 de Ciudad Real, y la hoja más ancha la presenta la entrada BCU001657 de Jaén. La entrada que desarrolla mayor número brotes y mayor número hojas en el brote principal procede de Cuenca (BCU002775), que al mismo tiempo presenta un tamaño de hoja más pequeño (Tabla 38 ).

El desarrollo vegetativo durante la floración es muy desigual entre las entradas de *C. serotinus*, ya que existen un número elevado de plantas que no desarrollan las hojas al mismo tiempo que la flor, apareciendo días después de la floración. Por eso sólo pudimos evaluar 5 entradas a lo largo de dos años. Es de destacar la entrada de La Coruña (BCU002741) que desarrolla la máxima longitud de hojas durante la floración (Tabla 38 ).

**Tabla 38 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de *C. serotinus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).**

ENTRADAS	Longitud máxima hoja (cm)		Anchura hoja (mm)		Nº brotes por cormo		Nº hojas brote principal	
	Año 1	Año 2						
BCU002741		24,58 defg	2,29 bcde		1,10 ab		4,10 bcd	
BCU003174		11,62 a	2,58 def		1,20 ab		4,50 bcd	
BCU003181		10,66 a	2,36 de		1,11 ab		3,67 abc	
BCU002743	15,10 b	20,69 bcd	1,87 abc		1 a		4,40 bcd	
BCU002775	13,67 ab	18,52 b	1,56 a		2,70 d		5 d	
BCU002742	11,33 a	12,09 a	1,91 abcd		1,10 ab		4 bcd	
BCU002550	13,45 ab	22,66 cdefg	1,83 ab		1,60 abc		3,35 ab	
BCU002618	13 ab	20,27 bc	1,67 a		2 bcd		4,79 cd	
BCU002619	11,46 a	25,93 fg	2,16 bcde		1,80 abc		4,50 bcd	
BCU002367	15,03 b	26,33 g	1,56 a		2 bcd		3,46 ab	
BCU002685	11,17 a	24,99 efg	2,33 cde		2 bcd		3,55 ab	
BCU002686	9,50 a	24,04 cdefg	1,88 abc		1,86 abcd		3,78 abcd	
BCU001657	15,22 b	21,46 bcde	2,95 f		2,40 cd		3,75 abc	
BCU002959		24,33 defg	2,03 abcd		1 a		2,75 a	
BCU002978	12,70 ab	22,14 bcdef	1,97 abcd		1,60 abc		4,80 cd	

ENTRADAS	Longitud hojas en floración (cm)		Nº de hojas en floración
	Año 1	Año 2	
BCU002741	4,05 a	10 b	4 a
BCU002775		1,15 a	4 a
BCU002742	2 a		5 a
BCU002618		1 a	4 a
BCU002978		1 a	4 a

#### 1.2.4.3 CARACTERES DE FRUTO Y DE SEMILLA.

Existe variación para todos los caracteres evaluados con la excepción de la anchura de la cápsula (Tabla 39). La entrada BCU002550 de Albacete desarrolla la altura máxima de fruto, la máxima longitud de cápsula, el mayor número de semillas por fruto y de mayor longitud. El máximo número semillas formado por cápsula lo presenta la entrada leonesa BCU003181. Como entrada que presenta valores muy bajos de todos los caracteres evaluados podíamos destacar la entrada de procedente de Burgos BCU003175 (Tabla 39).

## IV. RESULTADOS

**Tabla 39 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de *C. serotinus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).**

ENTRADAS	Altura fruto (cm)		Longitud cápsula (cm)		Anchura cápsula (cm)		Nº semillas por cápsula	
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2
BCU002741		4,70 ab		1,10 ab		0,55 a		17,50 ab
BCU003172		3,76 ab		1,36 abc		0,56 a		16,63 ab
BCU003173		3,74 ab		1,13 ab		0,59 a		12,43 ab
BCU003174		3,61 a		1,39 abc		0,54 a		13,40 ab
BCU003178		5,54 ab		1,50 bc		0,56 a		10,22 a
BCU003179		3,82 ab		1,22 abc		0,60 a		15,56 ab
BCU003180		5,04 ab		1,46 bc		0,58 a		12,54 ab
BCU003181		4 ab		1,43 bc		0,59 a		20,6 b
BCU003175		3,68 ab		0,96 a		0,58 a		9 a
BCU002775	2,83 a		1,25 a		0,47 ab		14,22 a	
BCU002743	5,09 a		1,30 a		0,64 c		14,55 a	
BCU002550		6,15 b		1,60 c		0,63 a		17,67 ab
BCU002742		3,85 ab		1,45 bc		0,55 a		8,67 a
BCU002618		5,10 ab		1,55 bc		0,65 a		12,50 ab
BCU002367	4,74 a		1,45 a		0,6 bc		12 a	
BCU002978	3,98 a		1,32 a		0,54 bc		12,71 a	
BCU002959	4,10 a		1,40 a		0,49 ab		12,70 a	

ENTRADAS	Longitud semillas (mm)		Peso semillas (mg)	
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2
BCU002741		2,01 a		3,60 a
BCU003172		2,64 b		6,10 cd
BCU003173		2,20 a		5,96 cd
BCU003174		2,93 cd		4,37 ab
BCU003178		2,77 bc		6,88 d
BCU003179		2,84 bc		5,90 cd
BCU003180		2,78 bc		6,13 cd
BCU003181		2,84 bc		6,82 d
BCU003175		2,91 bcd		3,66 a
BCU002775	3,22 bc		4,62 a	
BCU002743	3,59 d		8,76 d	
BCU002550		3,71 e		5,61 bcd
BCU002742		3,55 e		5,20 bc
BCU002618		3,14 d		5,77 bcd
BCU002367	2,50 a		6,94 c	
BCU002685		2,96 cd		5,16 bc
BCU001657	2,58 a		5,47 b	
BCU002978	3,51 cd		9,09 d	
BCU002959	3,11 b		4,33 abcd	

### 1.2.5 C. CLUSII

#### 1.2.5.1 CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE FLORES.

La especie *C. clusii* muestra variabilidad únicamente para los caracteres relacionados con el tamaño del tépalo externo y en la longitud del tépalo interno. Las flores procedentes de la entrada BCU002963, localizada en Huelva, desarrollan flores con tamaño algo mayor que las del resto de entradas (Tabla 40).

*Tabla 40 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de C. clusii. Con asterisco se han señalado los valores de las entradas en las que sólo se ha podido evaluar una flor. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).*

ENTRADAS	Longitud tépalo ext. (mm)		Anchura tépalo ext. (mm)		Longitud tépalo int. (mm)		Anchura tépalo int. (mm)		Longitud estilo (mm)	
BCU002960	36,92	ab	11,84	a	33,12	ab	11,30	a	34,67	a
BCU002963	44,71	b	13,73	bc	42,11	b	13,06	a	38,61	a
BCU002965	36,20	ab	14,42	c	31,91	a	13,52	a	31,87	a
BCU002964	35,03	*	8,83	*	31,53	*	8,18	*	37,78	*
BCU002966	33,71	a	10,84	a	28,91	a	10,65	a	28,28	a

ENTRADAS	Longitud antera (mm)		Longitud filamento (mm)		Altura flor (mm)		Nº de flores por brote	
BCU002960	10,58	a	7,90	a	82,65	a	1	a
BCU002963	12,56	a	7,05	a	101,85	a	1	a
BCU002964	9,75	*	5,95	*	84,36	*	1	a
BCU002965	11,31	a	5,89	a	96,97	a	1	a
BCU002966	10,38	a	6,60	a	75,86	a	1	a

#### 1.2.5.2 CARACTERES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO.

Los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo muestran escasa variabilidad. Los caracteres longitud de la hoja al final del desarrollo vegetativo, número de hojas en el brote principal y los relacionados con el desarrollo vegetativo en la floración, son los que presentan cierta variabilidad entre entradas (Tabla 41).

La entrada procedente de Huelva (BCU002962) es la que desarrolla una mayor longitud de hoja al final del ciclo y el menor número de hojas en el brote principal. La entrada que da lugar a las flores más grandes (BCU002963) es también la que presenta un mayor desarrollo en longitud de las hojas durante la floración. No obstante, desarrolla el menor número de hojas observado en la floración (Tabla 41).

## IV. RESULTADOS

**Tabla 41** Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de *C. clusii*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).

ENTRADAS	Longitud máxima hoja (cm)		Anchura hoja (mm)		Nº brotes por cormo		Nº hojas brote principal	
BCU002960	21,65	ab	1,44	a	1,00	a	3,00	ab
BCU002961	22,44	b	1,54	a	1,00	a	3,42	b
BCU002962	32,90	c	1,28	a	1,00	a	2,00	a
BCU002963	18,36	ab	1,34	a	1,00	a	3,37	b
BCU002964	27,18	c	1,63	a	1,00	a	2,84	ab
BCU002966	19,11	ab	1,52	a	1,13	a	3,93	b
BCU002967	17,02	a	1,52	a	1,00	a	3,05	ab

ENTRADAS	Longitud hojas en floración (cm)		Nº hojas en floración	
BCU002960	6,88	ab	4,00	ab
BCU002963	9,35	b	3,50	a
BCU002965	6,33	ab	4,00	ab
BCU002966	5,50	a	4,50	b

### 1.2.5.3 CARACTERES DE FRUTO Y DE SEMILLA.

Los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla evaluados en las diferentes entradas de *C. clusii*, presentan variabilidad, con la excepción de los caracteres relacionados con el tamaño del fruto (Tabla 42).

La entrada que desarrolla la altura del fruto algo mayor es la BCU002962, localizada en Huelva, que también desarrolla la longitud de hoja mayor al final del desarrollo. Esta entrada y la también onubense BCU002963 (que muestra las flores de mayor tamaño), dan lugar a los mayores números de semillas por fruto (Tabla 42).

Las semillas de mayor longitud las produce la entrada de Cádiz (BCU002966) y las de mayor peso la onubense BCU002962 (Tabla 42).

**Tabla 42 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de *C. clusii*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).**

ENTRADAS	Altura fruto (cm)	Longitud cápsula (cm)	Anchura cápsula (cm)	Nº semillas por cápsula
BCU002960	2,22 ab	1,07 a	0,46 a	22 abc
BCU002961	2,14 a	1,13 a	0,4 a	13 a
BCU002962	3,18 b	1,24 a	0,45 a	26 bc
BCU002963	2,66 ab	1,32 a	0,48 a	28 c
BCU002964	2,26 ab	1,24 a	0,49 a	24 abc
BCU002966	2,19 a	1,28 a	0,43 a	17 ab
BCU002967	2,65 ab	1,11 a	0,44 a	24 bc

ENTRADAS	Longitud semillas (mm)	Peso semillas (mg)
BCU002960	2,34 ab	2 a
BCU002961	2,41 ab	1,93 a
BCU002962	2,36 ab	3,8 c
BCU002963	2,55 bc	3 b
BCU002964	2,19 a	3 bc
BCU002966	2,73 c	2,9 b
BCU002967	2,29 ab	1,66 a

### 1.2.6 *C. NUDIFLORUS*

#### 1.2.6.1 CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE FLORES.

La evaluación de los caracteres relacionados con la morfología floral en la especie otoñal *C. nudiflorus* sólo se ha podido realizar en 4 entradas, debido a su mala adaptación a las condiciones de cultivo del ensayo. El resto de entradas desarrollaron una sola flor, por lo que no se pudieron incluir esas poblaciones en el análisis de medias.

Las entradas comparadas muestran variabilidad para los caracteres longitud del tépalo externo, anchura del tépalo interno, longitud del filamento de la antera, longitud del estilo y la altura de la flor. Las flores de mayor tamaño de tépalos y estilo se observan en la entrada colectada en Huesca (BCU002557), si bien, la longitud de la antera y el filamento es superior en las entradas procedentes de La Rioja (BCU003123 y BCU002777) y Burgos (BCU003176). Asimismo, estas entradas de La Rioja y Burgos, presentan mayor altura de flor (Tabla 43).

El número de flores por brote no presenta variación significativa entre entradas, se forma una única flor por brote.

#### IV. RESULTADOS

*Tabla 43 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de C. nudiflorus. Con asterisco se han señalado los valores de las entradas en las que sólo se ha podido evaluar una flor. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).*

ENTRADAS	Longitud tépalo externo (mm)		Anchura tépalo externo (mm)		Longitud tépalo interno (mm)		Anchura tépalo interno (mm)	
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2
BCU002556	34,60 *		13,26 *		33,24 *		14,55 *	
BCU002557	36,57	34,95 b	14,38	12,64 a	36	33,80 a	13,46	13,58 b
BCU002558	37,78 *		13,33 *		37,77 *		15,24 *	
BCU002738	27,11 *		8,05 *		27,11 *		9,11 *	
BCU002776	26,31 *		11,02 *		24,97 *		12,01 *	
BCU002777	28,90 *	26,75 a	10,68 *	9,50 a	26,39 *	24,80 a	9,62 *	8,35 a
BCU003123		35,74 b		10,20 a		32,61 a		9,04 a
BCU003176		29,04 ab		10,44 a		29,48 a		10,13 ab

ENTRADAS	Longitud antera (mm)		Longitud filamento (mm)		Longitud estilo (mm)	
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2
BCU002556	11,67 *		6,98 *		36,19 *	
BCU002557	11,5	10,6 a	5,0	3,34 a	20,32	37,9 b
BCU002558	12,1 *		7 *		27,9 *	
BCU002738	11,2 *		2,96 *		26,62 *	
BCU002776	11,36 *		9,15 *		31,28 *	
BCU002777	14,95 *	13,25 a	7,27 *	6,95 ab	30,33 *	28,4 a
BCU003123		13,96 a		12,4 c		32,49 ab
BCU003176		11,63 a		8,73 b		33,08 ab

ENTRADAS	Altura flor (mm)		Nº de flores por brote	
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2
BCU002556	70,00 *		1 *	
BCU002557	74,00	76 a	1	1 a
BCU002558	73,00 *		1 *	.
BCU002738	70,00 *		1 *	
BCU002776	72,00 *		1 *	
BCU002777	75,00 *	72,5 a	1 *	1 a
BCU003123		107,67 b		1 a
BCU003176		89,60 ab		1 a

**1.2.6.2 CARACTERES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO.**

Los caracteres observados al final del crecimiento vegetativo muestran diferencias significativas entre entradas, a excepción del número brotes por cormo, que toma el valor de uno en todas las entradas ensayadas (Tabla 44).

*Tabla 44 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de C. nudiflorus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).*

ENTRADAS	Longitud máxima hoja (cm)		Anchura hoja (mm)	Nº brotes por cormo	Nº hojas brote principal
	Año 1	Año 2			
BCU002556	11,80 b	7,90 a	2,44 bcd	1 a	2,67 abc
BCU002557	11,40 b	3,60 *	2,32 abcd	1,07 a	3,21 abc
BCU002558		6,85 a	2,75 d	1 a	2,60 abc
BCU002559	8,33 a		2,45 bcd	1 a	3 abc
BCU002944	10,53 ab	8,78 ab	2,76 d	1 a	3,63 c
BCU003001		7,24 a	2,33 abcd	1 a	2,50 abc
BCU003003		9,26 ab	1,83 a	1 a	2,89 abc
BCU003005		8,45 ab	2,05 abc	1 a	2 a
BCU003006		6,44 a	1,95 ab	1 a	2,80 abc
BCU003007		7,09 a	2,60 cd	1 a	3,13 abc
BCU002738	8,85 ab		2,45 bcd	1 a	2 a
BCU002777		9,73 ab	2,27 abcd	1 a	2,33 ab
BCU003123		6,88 a	2,20 abcd	1 a	3,13 abc
BCU003176		11,28 b	2,38 abcd	1 a	3,30 bc

Las entradas que alcanzan una mayor longitud de hoja al final de su ciclo son la BCU002556 colectada en Huesca y la BCU003176 localizada en Burgos. Las hojas de mayor anchura fueron al mismo tiempo las que desarrollaron menor longitud y mayor número hojas en el brote principal (BCU002944 y BCU002558 de Huesca) (Tabla 44 ).

**1.2.6.3 CARACTERES DE FRUTO Y DE SEMILLA.**

Los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y semilla presentan escasas diferencias entre entradas evaluadas el mismo año (Tabla 45). No obstante, aparecen diferencias entre los genotipos evaluados en años distintos para tamaño y peso de la semilla que no podemos saber si se trata de un efecto ambiental o genotípico.

## IV. RESULTADOS

**Tabla 45 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de *C. nudiflorus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).**

ENTRADAS	Altura fruto (cm)		Longitud cápsula (cm)		Anchura cápsula (cm)		Nº semillas por cápsula		
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	
BCU002739	2,91	a	1,13	ab	0,52	a	11,67	a	
BCU002737	3,06	a	0,83	a	0,67	ab	15	a	
BCU002944	2,80	a	1,25	b	0,78	b	7,33	a	
BCU003123		4	a	0,90	a	0,57	a	12	a
BCU003176		3,9	a	1,25	a	0,50	a	14,28	a

ENTRADAS	Longitud semillas (mm)		Peso semillas (mg)		
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2	
BCU002737	3,73	b	10,67	a	
BCU002739	3,09	a	8,78	a	
BCU002944	3,68	b	10	a	
BCU003123		2,78	a	4,98	a
BCU003176		2,90	a	5,36	a

### 1.2.7 *C. CAMBESSEDESII*

#### 1.2.7.1 CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE FLORES.

Para la mayoría de los caracteres estudiados relacionados con la morfología floral no existe variación entre las diferentes entradas de *C. cambessedesii* ensayadas que han florecido. Únicamente la longitud del filamento y de la antera presenta diferencias significativas. La entrada BCU001685 presenta la antera de mayor longitud, mientras que la longitud del filamento es superior en la entrada BCU003130 (Tabla 46).

**Tabla 46 Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de *C. cambessedesii*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).**

ENTRADAS	Longitud tépalo externo (mm)	Anchura tépalo externo (mm)	Longitud tépalo interno (mm)	Anchura tépalo interno (mm)	Longitud estilo (mm)
BCU001685	14,97	a	6,47	a	13,85
BCU003130	16,63	a	6,88	a	15,01

ENTRADAS	Longitud antera (mm)	Longitud filamento (mm)	Nº de flores por brote	Altura flor (mm)	
BCU001685	7,16	b	5,19	a	1,43
BCU003130	6,22	a	6,85	b	1,2

**1.2.7.2 CARACTERES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO.**

En cuanto a los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo, es de destacar el menor tamaño de la hoja de la entrada BCU003130, no detectándose diferencias significativas entre entradas para el resto de caracteres (Tabla 47).

*Tabla 47 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de C. cambessedesii. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).*

ENTRADAS	Longitud máxima hoja (cm)	Anchura hoja (mm)	Nº brotes por cormo	Nº hojas brote principal
BCU001685	21,99 b	1,9 a	1,5 a	3,38 a
BCU003130	13,71 a	1,75 a	1,14 a	4 a
BCU001682	23 b	2,59 b	1 a	4 a
BCU001683	18,67 b	1,98 a	1,25 a	3,38 a

ENTRADAS	Longitud hojas en floración (cm)	Nº hojas en floración
BCU001685	7,65 a	3,75 a
BCU003130	5,65 a	3,33 a

**1.2.7.3 CARACTERES DE FRUTO Y DE SEMILLA.**

De las dos únicas entradas que se han podido analizar para caracteres relacionados con fruto y semilla, se observa que la BCU001683 tiene una cápsula de mayor tamaño, con semillas de mayor peso y está situada a una altura del suelo ligeramente inferior. No obstante, no existen diferencias significativas en cuanto al número semillas por cápsula y la longitud de las semillas (Tabla 48 ).

*Tabla 48 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de C. cambessedesii. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).*

ENTRADAS	Altura fruto (cm)	Longitud cápsula (cm)	Anchura cápsula (cm)	Nº semillas por cápsula
BCU001685	2,95 b	0,88 a	0,47 a	16,88 a
BCU001683	1,83 a	1,24 b	0,74 b	17,5 a

ENTRADAS	Longitud semillas (mm)		Peso semillas (mg)	
	Año 2		Año 2	
BCU001685	2,87 a	2,59 a	2,59 a	2,59 a
BCU001683	2,77 a	6,16 c	6,16 c	6,16 c
BCU003130	2,86 a	3,29 b	3,29 b	3,29 b

## IV. RESULTADOS

### 1.3 VARIACIÓN ENTRE ESPECIES DE *CROCUS*

#### 1.3.1 CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE FLORES.

Las especies españolas de *Crocus* presentan diferencias en el tamaño de los distintos verticilos florales (Tabla 49).

*C. clusii*, *C. serotinus* y *C. nudiflorus*, de floración otoñal, son las especies cuyos verticilos florales son de mayor tamaño. *C. cambessedesii*, especie de floración otoñal, también presenta una importante altura de flor como el resto de flores otoñales, pero desarrolla las flores con menor tamaño de corola, estilo y estambres de todas las especies españolas (Tabla 49).

**Tabla 49** Valores medios para los caracteres relacionados con la morfología floral de las diferentes especies de *Crocus* silvestres españoles. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).

ESPECIES	Longitud tépalo ext. (mm)		Anchura tépalo ext. (mm)		Longitud tépalo int. (mm)		Anchura tépalo int. (mm)		Longitud estilo (mm)	
<i>C. nevadensis</i>	24,21	b	6,59	a	22,64	b	7,32	a	21,68	b
<i>C. carpetanus</i>	24,11	b	10,84	bc	23,61	b	11,21	bc	17,49	a
<i>C. vernus</i>	21,94	ab	10,52	bc	19,51	ab	9,07	ab	25,75	bc
<i>C. serotinus</i>	32	c	10,52	bc	31,48	c	10,56	bc	32,2	d
<i>C. clusii</i>	37,88	d	12,71	c	34,01	c	12,13	c	33,36	d
<i>C. nudiflorus</i>	31,83	c	10,95	bc	30,47	c	10,31	bc	30,78	cd
<i>C. cambessedesii</i>	15,80	a	6,67	a	14,43	a	7,07	a	16,75	a

ESPECIE	Longitud antera (mm)		Longitud filamento (mm)		Nº de flores por brote		Altura flor (mm)	
<i>C. nevadensis</i>	9,62	b	5,1	a	1,31	b	45,93	a
<i>C. carpetanus</i>	9,79	b	4,94	a	1	a	57,63	ab
<i>C. vernus</i>	9,03	ab	5,87	ab	1,13	ab	63,17	abc
<i>C. serotinus</i>	12,36	c	6,26	ab	1,31	b	72,53	bc
<i>C. clusii</i>	11,21	bc	6,86	ab	1	a	84,76	c
<i>C. nudiflorus</i>	12,51	c	7,85	b	1	ab	86,44	c
<i>C. cambessedesii</i>	6,68	a	6,02	ab	1,13	ab	79	bc

Las especies primaverales desarrollan flores de tamaño medio de corola, estambres y estilos, no obstante, la altura de la flor es menor que en las especies otoñales. El número de flores por brote no presenta diferencias importantes entre especies y está entre 1 y 2 flores por brote (Tabla 49).

### 1.3.2 CARACTERES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO

Los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo al final del ciclo también muestran diferencias entre especies (Tabla 50).

Las especies otoñales cuyas hojas emergen al mismo tiempo que la flor (*C. clusii*, *C. serotinus* y *C. cambessedesii*) muestran una longitud de las mismas superior al de las especies primaverales *C. carpetanus* y *C. nevadensis*. *C. nudiflorus*, especie de floración otoñal que muestra histerantia, presenta el mínimo crecimiento en longitud, y *C. vernus*, especie de floración primaveral, muestra el máximo crecimiento observado de todas las especies españolas (Tabla 50). Ahora bien, hay que señalar que en el caso de *C. vernus* las entradas ensayadas son mayoritariamente procedentes de vivero.

La especie que muestra el menor desarrollo vegetativo es *C. carpetanus*, especie de floración primaveral (Tabla 50).

**Tabla 50 Valores medios para los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de las diferentes especies de *Crocus silvestres* españoles. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0,05$ ).**

ESPECIES	Longitud máxima hoja (cm)		Anchura hoja (mm)		Nº brotes por cormo		Nº hojas brote principal	
<i>C. nevadensis</i>	14,07	b	1,59	a	1,09	a	3,68	b
<i>C. carpetanus</i>	10,86	a	1,47	a	1,06	a	2,85	a
<i>C. vernus</i>	27,4	d	3,92	c	1,69	b	3,33	ab
<i>C. serotinus</i>	20,69	c	2,05	b	1,63	b	3,98	b
<i>C. clusii</i>	23,38	cd	1,46	a	1	a	2,86	a
<i>C. nudiflorus</i>	8,17	a	2,33	b	1	a	2,79	a
<i>C. cambessedesii</i>	19,38	c	2,03	b	1,22	ab	3,63	ab

ESPECIES	Longitud de las hojas en floración (cm)		Nº hojas en floración	
<i>C. nevadensis</i>	5,24	bc	5,07	d
<i>C. carpetanus</i>	6,13	c	3,38	b
<i>C. vernus</i>	4,57	bc	3,25	b
<i>C. serotinus</i>	2,69	ab	4,18	c
<i>C. clusii</i>	7,01	c	4	bc
<i>C. nudiflorus</i>	0	a	0	a
<i>C. cambessedesii</i>	6,65	c	3,54	bc

*C. vernus* es la especie que muestra el mayor desarrollo vegetativo, y en segundo lugar se encuentra la especie otoñal, *C. serotinus* (Tabla 50). El desarrollo foliar durante la floración es muy variable entre las especies. *C. nudiflorus* es una especie que posee histerantia, por lo que la longitud de las hojas durante la floración es nula. *C. serotinus* no

## IV. RESULTADOS

presenta histerantia, pero en ocasiones sufre un pequeño retraso de la salida de la hoja respecto de la floración, por esto se explica la corta longitud que desarrollan las hojas durante los primeros días de ese periodo. *C. cambessedesii* y *C. clusii* son las especies que presentan la mayor longitud de las hojas en la floración. Las especies de floración primaveral poseen una longitud de la hoja similar en el momento de la floración. El número hojas en floración es máxima en *C. nevadensis* y en *C. serotinus* (Tabla 50).

### 1.3.3 CARACTERES DE FRUTO Y DE SEMILLA.

Los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla presentan variabilidad entre las diferentes especies de *Crocus* (Tabla 51).

**Tabla 51 Valores medios para los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla de las diferentes especies de *Crocus silvestres españoles*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas entradas ( $p < 0.05$ ).**

ESPECIES	Altura fruto (cm)		Longitud cápsula (cm)		Anchura cápsula (cm)		Nº semillas por cápsula	
<i>C. nevadensis</i>	3,75	bc	1,08	ab	0,55	b	10,18	a
<i>C. carpetanus</i>	2,76	ab	1,1	ab	0,60	b	17,88	bc
<i>C. vernus</i>	3,83	bc	1,12	ab	0,52	ab	13,75	ab
<i>C. serotinus</i>	4,39	c	1,33	b	0,58	b	13,43	ab
<i>C. clusii</i>	2,47	a	1,19	ab	0,45	a	21,87	c
<i>C. nudiflorus</i>	3,95	bc	1,07	ab	0,54	ab	13,14	ab
<i>C. cambessedesii</i>	2,39	a	1,06	a	0,61	b	17,19	bc

ESPECIES	Longitud semillas (mm)		Peso semillas (mg)	
<i>C. nevadensis</i>	3,85	c	9,15	d
<i>C. carpetanus</i>	2,75	ab	4,26	ab
<i>C. vernus</i>	2,59	ab	7,97	cd
<i>C. serotinus</i>	2,93	b	5,63	bc
<i>C. clusii</i>	2,41	a	2,61	a
<i>C. nudiflorus</i>	2,84	ab	5,17	abc
<i>C. cambessedesii</i>	2,87	ab	2,94	ab

La especie de floración otoñal *C. serotinus* desarrolla los frutos que alcanzaron mayor altura desde el suelo. El número semillas por cápsula es superior en la especie *C. clusii*, aunque el tamaño de su cápsula y la altura que alcanza ésta desde el suelo es de las menores que se han observado. La especie *C. nevadensis* desarrolla las semillas de tamaño y peso muy superior al resto de especies (Tabla 51).

## 1.4 CORRELACIONES

### 1.4.1 CORRELACIONES ENTRE CARACTERES A NIVEL DE ESPECIE

#### 1.4.1.1 CORRELACIONES ENTRE CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE FLORES.

En este análisis, se observa correlación positiva y significativa de los caracteres relacionados con el tamaño del tépalo externo e interno, sobre todo entre la longitud de los tépalos interno y externo (Tabla 52).

**Tabla 52** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con la morfología floral a nivel de especie. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa

	Longitud tépalo int.	Anchura tépalo int.	Longitud antera	Altura flor	Longitud estilo
Longitud tépalo ext.	0,988**	ns	0,847*	ns	0,875**
Anchura tépalo ext.	ns	0,941**	ns	ns	ns
Longitud tépalo int.	1	0,756*	0,894**	ns	0,851*
Longitud antera	-	ns	1	ns	0,825*
Longitud filamento	ns	ns	ns	0,782*	ns

Las especies con mayor longitud de tépalos (*C. clusii*, *C. nudiflorus* y *C. serotinus*) son también las que mayor longitud de estilo y estambre desarrollan (Tabla 49).

Es de destacar la inexistencia de relación entre la altura de la flor y el tamaño de los verticilos florales, con la excepción de la longitud del filamento (Tabla 52). Esto es debido a que hay una especie, *C. cambessedesii*, que aunque muestra una altura de flor importante, el tamaño de su corola es de las más pequeñas (Tabla 49).

#### 1.4.1.2 CORRELACIONES ENTRE CARACTERES RELACIONADOS CON EL CRECIMIENTO VEGETATIVO

En el análisis de correlaciones entre los caracteres evaluados al final del crecimiento vegetativo, se observa que las especies que forman mayor número de brotes, en general son las que desarrollan mayor anchura de la hoja (*C. vernus* y *C. serotinus*) (Tabla 53 y Tabla 50).

**Tabla 53** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados el crecimiento vegetativo a nivel de especie. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa

	Nº brotes por cormo
Anchura hoja	0,742*

## IV. RESULTADOS

En el análisis de correlaciones entre estos caracteres y los relacionados con la morfología floral observamos que existe correlación negativa entre la longitud del filamento y el número de hojas en floración (Tabla 54). La especie *C. nudiflorus* desarrolla la mayor longitud de filamento del estambre no presentan hojas durante la floración. El filamento de estambre de *C. nevadensis*, se encuentra entre los de menor longitud, y desarrolla el máximo número de hojas durante la floración (Tabla 49 y Tabla 50).

**Tabla 54** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo y los caracteres relacionados con la morfología floral a nivel de especie. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.

	Nº hoja en floración
Longitud filamento	-0,845*

### 1.4.1.3 CORRELACIONES ENTRE CARACTERES RELACIONADOS CON EL FRUTO Y LA SEMILLA

El análisis de correlaciones entre los diferentes caracteres evaluados sobre el fruto y la semilla desvelan que las especies con menor número semillas por cápsula desarrollan semillas de mayor tamaño y peso y también frutos de mayor altura (Tabla 55). Así, *C. clusii*, con las semillas más pequeñas, y la menor altura de fruto, desarrolla el mayor número de semillas por cápsula. *C. nevadensis* con las semillas más grandes, presenta un bajo número de semillas por cápsula, pero la altura del fruto es intermedia (Tabla 51)

**Tabla 55** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de las semillas a nivel de especie. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa

	Altura fruto	Longitud semillas	Peso semillas
Nº semillas por cápsula	-0,811*	-0,747*	-0,862*

Todos los caracteres analizados sobre el fruto y la semilla muestran correlación con algún otro carácter relacionado con la morfología floral o el desarrollo vegetativo durante la floración (Tabla 56). Se observa que las especies que muestran una longitud de hojas mayor durante la floración son las que en la fructificación el fruto alcanza menor altura, como sucede en la especie *C. clusii* y *C. cambessedesii*. Las especies que producen semillas de mayor longitud dan lugar a flores que con tépalo externo menos ancho, como sucede con *C. nevadensis* (Tabla 50 y Tabla 51).

**Tabla 56** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de la semilla y los caracteres relacionados con la morfología floral y el crecimiento vegetativo durante la floración a nivel de especie. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.

	Anchura tépalo ext.	Longitud hojas floración
Altura fruto	ns	-0,788*
Longitud semilla	-0,762*	ns

#### 1.4.1.3.1.1 Otras correlaciones de interés

Las especies con mayor número de hojas en el brote principal, son las que presentan un mayor número de flores/brote (Tabla 57). Esta relación se observa bien en las especies *C. nevadensis* y *C. serotinus*, que son las especies que desarrollan el mayor número de flores y hojas por brote (Tabla 49y Tabla 50).

**Tabla 57** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo y los relacionados con la morfología floral a nivel de especie \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.

	Nº hojas brote principal
Nº flores por brote	0,94**

## 1.4.2 CORRELACIONES ENTRE CARACTERES A NIVEL DE ENTRADA DE LAS ESPECIES DE *CROCUS SILVESTRES*.

El análisis de correlaciones entre caracteres a nivel de entrada dentro de cada especie de *Crocus*, sólo ha podido calcularse en especies de las que se ha podido caracterizar un número suficiente de entradas: *C. nevadensis*, *C. carpetanus*, *C. serotinus* y *C. clusii*.

### 1.4.2.1 *C. NEVADENSIS*

#### 1.4.2.1.1 Caracteres relacionados con la morfología y producción de flores

Del análisis de correlaciones de los caracteres relacionados con la morfología floral se observa una relación entre la longitud del tépalo interno y externo, así como la relación entre la anchura del tépalo interno y externo. Las flores de las entradas BCU001742 y BCU002982, colectadas en Valencia y Jaén respectivamente, desarrollan las flores con los tépalos internos y externos de mayor longitud y de mayor anchura (Tabla 58 ).

A partir del análisis, también se observa que son las entradas con flores que tienen los filamentos de estambre más largos, las que forman flores con los tépalos internos y externos de mayor longitud (Tabla 58).

## IV. RESULTADOS

**Tabla 58** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con la morfología floral a nivel de entradas de la especie *C. nevadensis*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.

	Longitud tépalo int,	Anchura tépalo ext,	Longitud filamento	Longitud estilo	Altura flor
Longitud tépalo ext,	0,988**	ns	0,898**	0,644*	0,795**
Anchura tépalo ext,	ns	1	ns	ns	0,786*
Longitud tépalo int,	1	ns	0,877**	0,718**	0,798**
Anchura tépalo int,	ns	0,890**	ns	ns	0,763**
Longitud antera	ns	ns	ns	0,840**	ns

La longitud del estilo muestra una correlación significativa, a nivel de entrada, con los caracteres longitud del tépalo y longitud de antera (Tabla 58). Las entradas BCU001742 (Valencia) y BCU002982 (Jaén) y BCU002694 (Cuenca) son las que muestran los valores máximos de estos tres caracteres (apartado 1.2.1.2).

La altura de la flor desde el suelo muestra correlaciones significativas con todos los caracteres relacionados con el tamaño de los tépalos (Tabla 58). Las entradas con flores que desarrollan tépalos de mayor tamaño son también las que desarrollan la altura de flor más elevada (apartado 1.2.1.2).

### 1.4.2.1.2 Caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo

En este análisis de correlaciones entre caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo, a nivel de entrada, se observa que las entradas que desarrollan mayor número de brotes por cormo, como las colectadas en la provincia de Cuenca (BCU002871, BCU002694 y BCU002359), y Pamplona (BCU002697), presentan los valores máximos de hojas en el brote principal, al mismo tiempo que sus hojas alcanzan los mínimos de longitud al final de su ciclo (Tabla 59 y Tabla 29).

**Tabla 59** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo a nivel de entradas de la especie *C. nevadensis*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.

	Nº de brotes por cormo
Longitud máxima hoja	-0,644**
Anchura hoja	0,580**
Nº de hojas brote principal	0,711**

### 1.4.2.1.3 Caracteres relacionados con el fruto y de la semilla

En el análisis de correlaciones que se lleva a cabo en el segundo año, entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla, se observa una correlación elevada y positiva del peso de semillas con la longitud de cápsula y de la semilla (Tabla 60). Se observa que la entrada BCU002989 colectada en Lérida y la BCU002979 recogida en Granada desarrollan las cápsulas de mayor longitud como también, las semillas de máximo peso y longitud (Tabla 30).

**Tabla 60** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla a nivel de entradas de la especie *C. nevadensis*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.

	Peso semillas
Longitud cápsula	0,833 *
Longitud semilla	0,952 **

#### 1.4.2.1.3.1 Otras correlaciones de interés

Tiene interés destacar que el carácter longitud de hoja en floración correlaciona positivamente con varios caracteres relacionados con la longitud de los verticilos florales (Tabla 61).

**Tabla 61** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo y los relacionados con la morfología floral a nivel de entradas de la especie *C. nevadensis*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.

	Longitud máxima hoja	Anchura de hoja	Nº hojas brote principal	Longitud hojas en floración	Nº de brotes por cormo
Longitud tépalo ext,	ns	ns	ns	0,884**	ns
Anchura tépalo ext,	-0,698*	ns	ns	ns	ns
Longitud tépalo int,	ns	ns	ns	0,898**	ns
Longitud estilo	-0,672*	ns	ns	ns	ns
Longitud filamento	ns	ns	-0,735*	0,708*	ns
Altura de la flor	ns	ns	ns	0,722**	ns
Nº flores por brote	-0,609*	0,708**	0,719**	ns	0,847**

Esta relación se observa en las entradas BCU001742 (Valencia) y BCU002990 (Huesca) que desarrollan una longitud de hoja en floración superior y al mismo tiempo sus flores

## IV. RESULTADOS

contiene los tépalos, el filamento más largo y la altura de flor más destacable (Tabla 28 y Tabla 29). Sin embargo, las entradas que presentan una longitud máxima de la hoja al final del desarrollo poseen estilos cortos, los tépalos menos anchos, y un menor número de flores por brote (Tabla 61). Las entradas colectadas en Huesca (BCU002994 y BCU002992) desarrollan una longitud de hoja superior y también valores bajos para la anchura de tépalo externo, longitud de estilo y el número de flores por brote (Tabla 28 y Tabla 29). En general, las entradas con mayor número de hojas en el brote principal, son las que presentan un mayor número de flores/brote (Tabla 61). Esta relación se observa bien en las entradas conquenses BCU002359, BCU002694 y BCU002871 (Tabla 28 y Tabla 29). En el análisis de correlaciones entre los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo y los relacionados con el fruto y la semilla, se observa que la anchura de la hoja muestra una correlación significativa y negativa con la longitud de la cápsula (Tabla 62). Las entradas colectadas en Jaén BCU002380 y BCU002980, y la granadina BCU002976 muestran una anchura de hoja importante, mientras que la longitud de la cápsula toma los valores de menor relevancia (Tabla 29 y Tabla 30).

*Tabla 62 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla y los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo a nivel de entradas de la especie C. nevadensis. \* Significación al nivel del 5%.*

	Anchura de hoja
Longitud cápsula	-0,832*

### 1.4.2.2 C. CARPETANUS

#### 1.4.2.2.1 Correlaciones a nivel de entrada de los caracteres relacionados con la morfología y producción de flores

En el análisis de correlaciones a nivel de entrada entre los caracteres relacionados con la morfología floral se observa una única correlación significativa y elevada entre el carácter altura de la flor desde el suelo y longitud del estilo (Tabla 63). La entrada BCU002971 de Montejo de la Sierra (Madrid) y la BCU002835 del Puerto de la Peña Negra (Ávila) son las que presentan una longitud de estilo mayor y presentan una altura de flor desde el suelo superior al resto de entradas (Tabla 31). Es necesario recordar la escasa variación para caracteres relacionados con la morfología floral en esta especie.

*Tabla 63 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con la morfología floral a nivel de entradas de la especie C. carpetanus. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa*

	Altura de flor
Longitud estilo	0,917*

#### 1.4.2.2.2 *Correlaciones a nivel de entrada de los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo*

No se observan correlaciones significativas a nivel de entrada entre los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo.

#### 1.4.2.2.3 *Correlaciones a nivel de entrada de los caracteres relacionados con tamaño del fruto y las semillas*

Este análisis no tiene sentido realizarlo por la escasa variación observada en las entradas evaluadas en un mismo año.

#### 1.4.2.3 C. SEROTINUS

##### 1.4.2.3.1 *Correlaciones a nivel de entrada de los caracteres relacionados con la morfología y producción de flores*

En el análisis de correlaciones de los caracteres relacionados con la morfología floral se observa que existe una correlación entre la longitud y anchura de los tépalos internos y externos, indicándonos una similitud entre estos dos verticilos, pero las entradas con mayor corola no presentan necesariamente mayor tamaño de todos los restantes verticilos. Únicamente existe una correlación significativa, pero no elevada, entre la anchura de los tépalos y la longitud de la antera o la altura de la flor (0). Como ejemplo, se pueden citar las entradas BCU002550 (Albacete) y BCU002618 (Valencia) con mayor anchura de tépalo que, a su vez, desarrollan una mayor altura de flor y una antera más larga (Tabla 37).

*Tabla 64 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con la morfología floral a nivel de entradas de la especie C. serotinus. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa.*

	Anchura tépalo ext.	Longitud tépalo int.	Anchura tépalo int.	Longitud antera	Altura flor
Longitud tépalo ext.	0,591*	0,949**	0,592*	ns	ns
Anchura tépalo ext.	1	ns	0,958**	0,609*	0,608*
Longitud tépalo int.		1	ns	ns	ns
Anchura tépalo int.			1	0,610*	0,609*
Longitud antera				1	0,534*
Altura flor					1

## IV. RESULTADOS

### 1.4.2.3.2 Correlaciones a nivel de entrada de los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo

En el análisis de correlaciones de los caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo dentro de la especie *C. serotinus* no se observan correlaciones significativas, como tampoco entre estos caracteres y los relacionados con la morfología floral.

### 1.4.2.3.3 Correlaciones a nivel de entrada de los caracteres relacionados con el tamaño del fruto y de las semillas

En el análisis de correlaciones de los caracteres relacionados con el fruto y la semilla se observa que existe una correlación entre el tamaño de la cápsula y el de las semillas (Tabla 65). Las entradas con cápsulas de mayor longitud contienen semillas con mayor peso y longitud. Son de destacar las cápsulas formadas en flores de la entrada BCU002550, procedentes de Albacete (Tabla 39) que son las que alcanzan la mayor longitud y también la mayor longitud de semilla observada.

Tabla 65 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla a nivel de entradas de la especie *C. serotinus*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa

	Altura de fruto	Longitud semillas	Peso semillas
Longitud cápsula	0,597*	0,629*	0,599*

#### 1.4.2.3.3.1 Otras correlaciones de interés

El análisis de correlaciones entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla y los relacionados con la morfología floral muestra que las entradas que desarrollan flores de mayor altura también dan lugar a frutos de mayor altura desde el suelo (0), como ejemplo la entrada de Albacete (BCU002550) (Tabla 37 y Tabla 39). Además, aquellas entradas con tépalos más estrechos presentan, en general, cápsulas más cortas. Asimismo, las entradas con flores cuya corola es más grande en longitud o anchura, dan cápsulas con mayor número de semillas (0).

Es necesario señalar una correlación muy elevada entre la longitud de la cápsula y de la antera (0). Podemos destacar las entradas BCU002550 de Albacete y BCU002618 de Valencia con las anteras y cápsulas de mayor tamaño. Asimismo, la entrada leonesa BCU003172, de corola grande, muestra una de las mayores producciones de semilla, mientras que la entrada leonesa BCU003175, con la corola de menor tamaño, ha dado el menor número de semillas por cápsula (Tabla 37 y Tabla 39).

**Tabla 66** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla y los relacionados con la morfología floral a nivel de entradas de la especie *C. serotinus*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.

	Longitud tépalo ext.	Anchura tépalo ext.	Anchura tépalo int.	Longitud antera	Altura de la flor
Altura de fruto	ns	ns	ns	0,741*	0,770**
Longitud cápsula	ns	0,633*	0,641*	0,945**	ns
Nº de semillas por cápsula	0,660*	0,727*	0,642*	ns	ns
Longitud semillas	ns	ns	ns	0,695*	ns

#### 1.4.2.4 C. CLUSII

##### 1.4.2.4.1 Correlaciones a nivel de entrada de los caracteres relacionados con la morfología y producción de flores

Existe una baja variabilidad entre entradas y únicamente aparece una correlación entre la longitud de los tépalos interno y externo (Tabla 67). Así, la entrada BCU002963 es la que presenta mayor longitud de tépalos internos y externos, y la BCU002966 aquella con los dos tipos de verticilos más cortos (Tabla 40).

**Tabla 67** Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla y los relacionados con el crecimiento vegetativo a nivel de entradas de la especie *C. serotinus*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa.

	Longitud tépalo externo
Longitud tépalo interno	0,996*

##### 1.4.2.4.2 Correlaciones a nivel de entrada de los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo

El análisis de correlaciones realizado entre los diferentes caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo muestra la existencia de correlación significativa y negativa entre el carácter longitud máxima de la hoja al final del desarrollo vegetativo y el número de hojas que forma el brote principal (Tabla 68). Las entradas BCU002962 (localizada en Huelva) y BCU002964 (colectada en Cádiz) muestran una longitud de hoja mayor al final del desarrollo vegetativo, como también, el menor número de hojas en el brote principal (Tabla 41).

## IV. RESULTADOS

Tabla 68 Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla a nivel de entradas de la especie *C. clusii*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa

	Nº de hojas en el brote principal
Longitud máxima de hoja	-0,768*

### 1.4.2.4.3 Correlaciones a nivel de entrada de los caracteres relacionados con el fruto y la semilla

El análisis de correlaciones a nivel de entrada de la especie *C. clusii* entre los caracteres relacionados con el fruto y la semilla no muestra valores significativos, como tampoco con los relacionados con el crecimiento vegetativo y la morfología floral.

### 1.4.3 CORRELACIONES A NIVEL DE PLANTA DE LOS CARACTERES EVALUADOS EN LAS ESPECIES DE *CROCUS SILVESTRES ESPAÑOLAS*.

#### 1.4.3.1 *C. NEVADENSIS*

El análisis de correlaciones a nivel de planta dentro de entrada, nos indica que aquellos factores ambientales o genéticos que incrementan el tamaño de un verticilo van a influir en el aumento de tamaño de los restantes, si bien esta relación es mucho más fuerte entre los dos verticilos de tépalos. Es decir, el tamaño de tépalos internos y externos está fuertemente correlacionado (Tabla 69 ).

Los caracteres relacionados con del desarrollo vegetativo evaluados durante la floración (longitud de hoja y número de hojas en la floración) no presentan correlaciones significativas con el resto de caracteres relacionados con la morfología floral. Para este grupo de caracteres evaluados al final del ciclo vegetativo observamos que aquellos factores que influyen en un cierto sentido, es decir aumentando o disminuyendo un cierto carácter, no tienen, en general, efectos similares en los restantes. No aparecen correlaciones de relevancia entre los mismos (Tabla 70).

Tabla 69 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de *C. nevadensis*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa

	Anchura tépalo ext.	Longitud tépalo int.	Anchura tépalo int.	Longitud antera	Longitud filamento	Longitud estilo	Altura flor
Longitud tépalo ext.	0,462*	0,950**	0,478*	0,530**	0,718**	0,531**	0,768**
Anchura tépalo ext.	1	0,412*	0,847**	0,518**	ns	0,389*	0,503**
Longitud tépalo int.		1	0,493**	0,489*	0,626**	0,530**	0,686**
Anchura tépalo int.			1	ns	ns	ns	0,581**
Longitud antera				1	ns	0,711**	ns
Longitud filamento					1	0,506**	ns
Longitud estilo						1	0,403*
Altura flor							1

Tabla 70 Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados al final del ciclo vegetativo de *C. nevadensis*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa

	Nº de brotes por cormo	Nº hojas brote principal	Nº flores por brote
Longitud máxima hoja	-0,271**	-0,173*	-0,412**
Anchura hoja	ns	0,354**	0,358**
Nº de brotes por cormo	1	0,191*	ns
Nº hojas brote principal		1	ns

El análisis de las correlaciones entre los caracteres relacionados con el fruto no muestra correlaciones significativas entre plantas.

#### 1.4.3.2 C. CARPETANUS

En relación a los caracteres evaluados en la floración, vemos como en *C. nevadensis*, que aquellos factores que incrementan el tamaño de un verticilo van a influir en el aumento de tamaño de los restantes, si bien esta relación es mucho más fuerte entre los dos verticilos de tépalos. Es decir, el tamaño de tépalos internos y externos está fuertemente correlacionado. Es más débil la correlación entre longitud y anchura de un mismo verticilo de tépalos, o la relación del tamaño de la corola con los restantes verticilos florales (Tabla 71).

## IV. RESULTADOS

**Tabla 71** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de *C. carpetanus*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa

	Anchura tépalo ext.	Longitud tépalo int.	Anchura tépalo int.	Longitud filamento	Altura la flor
Longitud tépalo externo	0,558*	0,892**	ns	ns	0,585*
Anchura tépalo externo	1	0,547*	0,912**	ns	ns
Longitud tépalo interno		1	0,601**	0,539*	0,606**

El análisis de correlaciones, a nivel de planta, entre los caracteres evaluados al final del ciclo vegetativo, observamos una elevada y significativa correlación entre los caracteres longitud y anchura de la hoja (Tabla 72).

**Tabla 72** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados al final del ciclo vegetativo de *C. nevadensis*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa

	Longitud máxima hoja
Anchura hoja	0,753*

El análisis de correlaciones entre los caracteres del tamaño del fruto y de la semilla no muestra correlaciones destacables entre estos caracteres, salvo que los factores que influyen en el aumento en el tamaño de las cápsulas también dan lugar a cápsulas más largas (Tabla 73).

**Tabla 73** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto de *C. carpetanus*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa

	Anchura de cápsula
Altura de fruto	0,346*
Longitud de cápsula	0,490**

### 1.4.3.3 C. VERNUS

En el análisis de las correlaciones entre los caracteres evaluados en la floración, se observa que el efecto de un factor sobre el tamaño de un verticilo floral está muy relacionado con el que provoca en todos los restantes verticilos florales (Tabla 74). Únicamente la variación en la longitud de los tépalos no va a tener una relación con la variación en la longitud del filamento de la antera. Asimismo, la longitud de las hojas en la floración va a estar también relacionada con el tamaño de los verticilos de tépalos. Los cormos que desarrollan hojas de mayor longitud en la floración presentan los tépalos más grandes en sus flores (Tabla 74).

El número de flores por brote, el número de hojas en floración y la altura de la flor desde el suelo no guardan ninguna relación con el tamaño de los verticilos florales (Tabla 74 ).

**Tabla 74** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de *C. vernus*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa

	Anchura tépalos ext.	Longitud tépalos int.	Anchura tépalos int.	Longitud antera	Longitud filamento	Longitud estilo	Longitud hojas en floración
Longitud tépalos ext.	0,949*	0,983**	0,947*	0,899*	ns	0,927*	0,966**
Anchura tépalos ext.	1	0,990**	0,999**	0,970**	0,907*	0,964**	0,946*
Longitud tépalos int.		1	0,988**	0,953*	ns	0,961**	0,961**
Anchura tépalos int.			1	0,957*	0,886*	0,949*	0,952*
Longitud antera				1	0,980**	0,993**	ns
Longitud filamento					1	0,970**	ns

No existen correlaciones significativas entre los caracteres de desarrollo vegetativo y los relacionados con el tamaño del fruto.

#### 1.4.3.4 C. SEROTINUS

En el análisis de correlaciones entre los caracteres evaluados en la floración, se observa de nuevo que los cormos que presentan una mayor longitud o anchura del verticilo externo de tépalos, también presentan mayores valores de estos parámetros para el verticilo interno. Sin embargo, la correlación entre longitud y anchura de los tépalos de un mismo verticilo es más débil. Asimismo, el tamaño del estilo está correlacionado, aunque débilmente, con el tamaño de tépalos y antera. Sin embargo, la longitud de la antera sólo muestra correlación con la anchura de los tépalos, y no existe correlación entre el tamaño del filamento y de la antera. (Tabla 75 ).

El carácter longitud de hoja en floración muestra correlaciones significativas positivas y elevadas con diferentes caracteres relacionados con la morfología floral. Las flores que desarrollan mayor longitud de hoja en la floración alcanzan mayor altura desde el suelo, presentan tépalos de mayor longitud, y anteras más cortas. Ningún carácter presenta correlaciones con el número de hojas en floración (Tabla 75 ).

## IV. RESULTADOS

**Tabla 75** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de *C. serotinus*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa

	Anchura tépalo ext.	Longitud tépalo int.	Anchura tépalo int.	Longitud antera	Longitud filamento	Longitud estilo	Longitud hoja en floración
Longitud tépalo ext.	0,527**	0,891**	0,520**	ns	0,365**	0,341**	0,840*
Anchura tépalo ext.	1	0,469**	0,929**	0,491**	0,306**	0,354**	ns
Longitud tépalo int.		1	0,458**	ns	0,291*	0,360**	0,781*
Anchura tépalo int.			1	0,487**	0,349**	0,364**	ns
Longitud antera				1	ns	0,336**	-0,917**
Altura de flor	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,862**

En el análisis de correlaciones de los caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo dentro de la especie *C. serotinus* no es de destacar ninguna correlación (Tabla 76).

**Tabla 76** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados al final del ciclo vegetativo de *C. serotinus*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa

Nº brotes por cormo	
Longitud máxima hoja	0,262**

En cuanto a los caracteres relacionados con el tamaño del fruto, sólo es de destacar una correlación débil entre el número de semillas y el tamaño de la cápsula (Tabla 77).

**Tabla 77** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto de *C. serotinus*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa

Nº semillas por cápsula	
Longitud cápsula	0,338**
Anchura cápsula	0,498**

### 1.4.3.5C. CLUSII

En el análisis de correlaciones entre los caracteres evaluados en la floración, se observa que aquellas plantas que presentan una mayor longitud o anchura del verticilo externo de tépalos, también presentan mayores valores de estos parámetros para el verticilo interno. Sin embargo, no existe correlación entre longitud y anchura de los tépalos de un mismo verticilo. Asimismo, se repite la relación entre el efecto de un factor

a nivel de planta sobre la anchura de los tépalos y la longitud del filamento del estambre. El número de hojas durante la floración es mayor en cormos con tépalos más largos (Tabla 78).

**Tabla 78** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de *C. clusii*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa

	Longitud tépalo int.	Anchura tépalo int.	Longitud filamento	Nº hojas en floración
Longitud tépalo ext.	0,984**	ns	ns	0,692*
Anchura tépalo ext.	ns	0,888**	0,631*	ns
Longitud tépalo int.	1	ns	ns	0,617*
Anchura tépalo int.		1	0,758*	ns

En relación a los caracteres relacionados con el tamaño del fruto, en esta especie también se observa que las plantas con mayores cápsulas tienen un mayor número de semillas. Asimismo, las cápsulas más largas tienen también mayor pedicelo (Tabla 79).

**Tabla 79** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto de *C. clusii*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1%. ns: no significativa

	Longitud de cápsula	Nº semillas por cápsula
Altura de fruto	0,444*	0,493*
Longitud cápsula	1	0,606**
Anchura cápsula	ns	0,613**

No existen correlaciones significativas a nivel de planta entre los caracteres de desarrollo vegetativo.

#### 1.4.3.6 C. NUDIFLORUS

El análisis de correlaciones entre los caracteres relacionados con la morfología floral dentro de la especie *C. nudiflorus* revela de nuevo una estrecha correlación entre la longitud del verticilo externo e interno de tépalos, así como entre la anchura del verticilo interno y el externo. Sin embargo, la correlación entre la anchura y longitud de un mismo verticilo es más débil. Asimismo, las plantas con flores de corola más grande presentan los estilos más largos. Sin embargo, no tienen por qué desarrollar los estambres más largos, ni ser las flores que alcanzan mayor longitud desde el suelo. El número de flores por brote no está relacionado con el tamaño de los verticilos florales (Tabla 80).

#### IV. RESULTADOS

**Tabla 80** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de *C. nudiflorus*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa

	Anchura tépalo ext.	Longitud tépalo int.	Anchura tépalo int.	Longitud estilo
<b>Longitud tépalo ext.</b>	0,656**	0,975**	0,524*	0,614*
<b>Anchura tépalo ext.</b>	1	0,737**	0,921**	0,735**
<b>Longitud tépalo int.</b>		1	0,708**	0,707**
<b>Anchura tépalo int.</b>			1	0,735**

Los caracteres relacionados con del desarrollo vegetativo evaluados durante la floración (longitud de hoja y número de hojas en la floración), al igual que sucede en otras especies, no presentan correlaciones significativas con el resto de caracteres relacionados con la morfología floral (Tabla 80 ).

El análisis de correlaciones entre los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo no muestra correlaciones significativas entre sí. Tampoco se observan correlaciones significativas entre los caracteres relacionados con el fruto no muestra correlaciones significativas entre sí.

#### 1.4.3.7C. CAMBESSEDESII

El análisis de correlaciones entre los caracteres relacionados con la morfología floral dentro de la especie *C. cambessedesii* muestra que los cormos cuyas flores tienen tépalos más largos no van a ser, necesariamente, los que presenten mayor longitud de estilos o de estambres, pues no aparece una correlación significativa con el resto de verticilos florales (Tabla 81). Sí que existe correlación entre la longitud de los tépalos de los verticilos externo e interno, siendo sólo significativa la correlación entre la longitud y la anchura de los tépalos en el verticilo externo. Asimismo, se observa que las flores con mayor longitud de filamento del estambre son las que desarrollan menor longitud de antera.

**Tabla 81** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres evaluados en la floración de *C. cambessedesii*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa

	Anchura tépalo ext.	Longitud tépalo int.	Anchura tépalo int.	Longitud filamento
<b>Longitud tépalo ext.</b>	0,707*	0,871**	ns	ns
<b>Anchura tépalo ext.</b>	1	ns	0,968**	ns
<b>Longitud tépalo int.</b>		1	ns	ns
<b>Anchura tépalo int.</b>			1	ns
<b>Longitud antera</b>	ns	ns	ns	-0,746*

El análisis de correlaciones de los caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de *C. cambessedesii* no muestra correlaciones significativas que puedan ser destacables.

El análisis de correlaciones de los caracteres relacionados con el fruto de *C. cambessedesii* que los frutos con menor tamaño de cápsula son los que desarrollan mayor altura. Asimismo, los frutos que forman las cápsulas de mayor longitud presentan las cápsulas de mayor anchura. Las cápsulas de mayor tamaño no siempre tienen mayor número semillas (Tabla 82).

**Tabla 82** Coeficientes de correlación lineal de Pearson a nivel de planta entre los caracteres relacionados con el tamaño del fruto de *C. cambessedesii*. \* Significación al nivel del 5%. \*\* Significación al nivel del 1% . ns: no significativa

	Altura fruto	Longitud cápsula	Anchura cápsula
Altura fruto	1	-0,684*	-0,698*
Longitud cápsula		1	0,708**
Anchura cápsula			1

## 2 VARIABILIDAD PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS CUALITATIVOS EN LAS DISTINTAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS*.

### 2.1 CARACTERES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA FLORAL.

#### 2.1.1 FORMA DEL TÉPALO EXTERNO E INTERNO

La variabilidad entre especies para el carácter forma del tépalo es elevada, al igual que aquella entre plantas dentro de especie. Se han observado cinco formas de tépalo diferentes, y cada especie muestra, al menos, dos tipos diferentes de tépalo. La forma más frecuente en ambos tépalos es la elíptica, si bien, en el tépalo externo la forma oblanceolada es también muy frecuente. La forma elíptica más ancha es más común en el tépalo interno (Figura 85 y 86).

La forma de tépalo lineal es la menos abundante, y solo se presenta en tres especies. *C. serotinus* es la especie que muestra mayor variación en la forma del tépalo observándose todas las formas posibles y *C. vernus* es la especie que refleja menor variabilidad para este carácter (Figura 85).

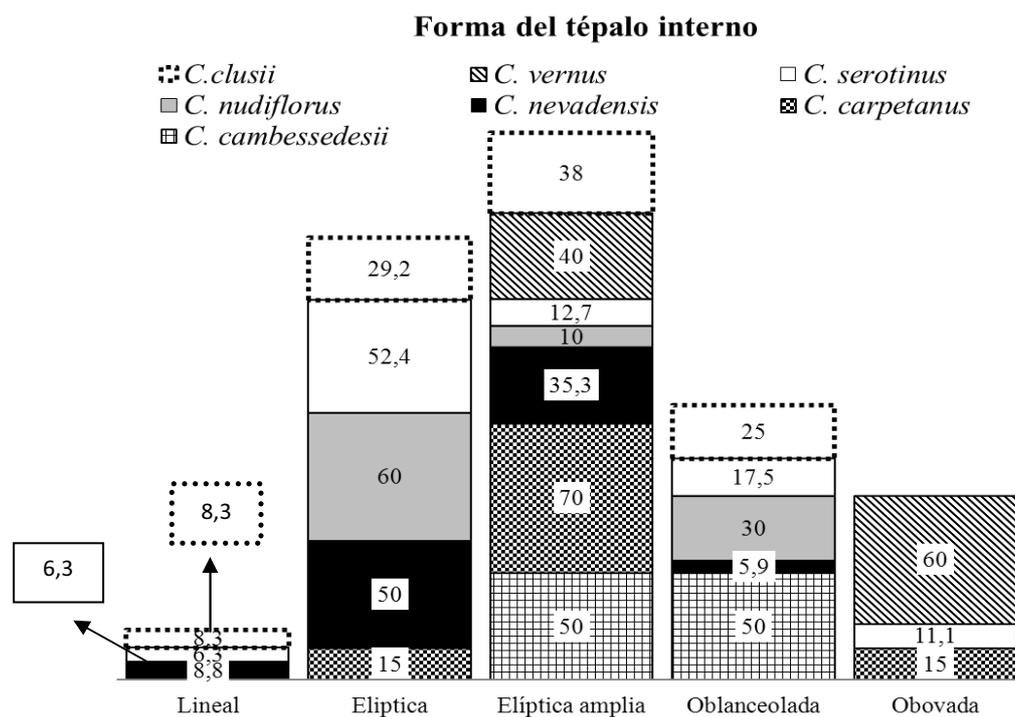
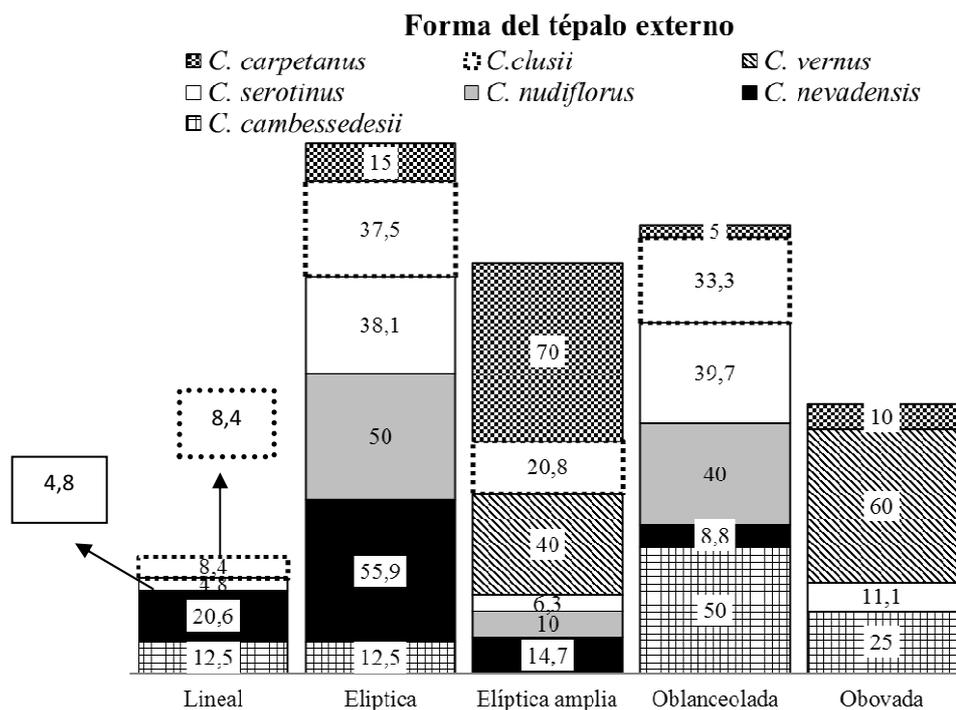


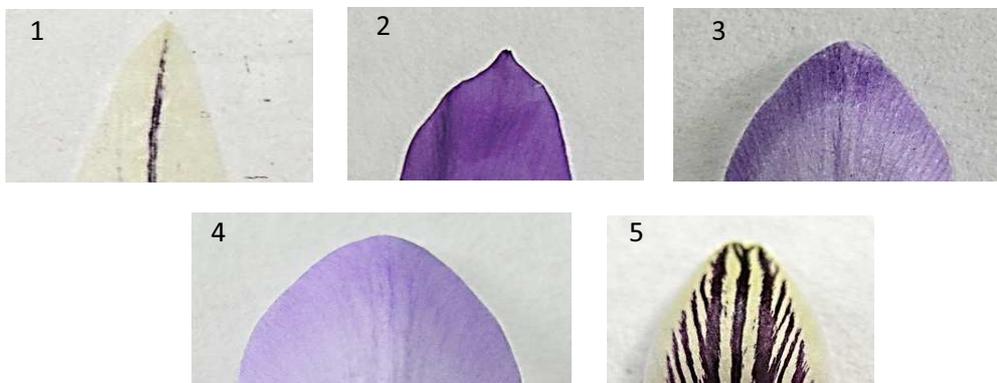
Figura 85 Forma del tépalo interno en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.



**Figura 86** Variabilidad observada en la forma del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Lineal: *C. nevadensis* (BCU002994); 2. Elíptica: *C. nudiflorus* (BCU003176); 3. Elíptica amplia: *C. carpetanus* (BCU002837); 4. Oblanceolada: *C. serotinus* (BCU001657); 5. Obovada: *C. vernus* (BCU002998).

### 2.1.2 ÁPICE DEL TÉPALO

Existe una gran variación para el ápice de los tépalos en las especies de *Crocus* estudiadas, y también entre plantas de la misma especie. Se observan cinco tipos de ápices diferentes. De todos ellos, la forma obtusa es la más frecuente en el tépalo externo y la redondeada en el tépalo interno, observándose esta forma en las siete especies. En ambos tépalos, la forma acuminada es la menos frecuente (Figura 88 y Figura 87).



**Figura 87** Variabilidad observada en el ápice del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Agudo: *C. nevadensis* (BCU002994); 2. Acuminado: *C. nudiflorus* (BCU003176); 3. Obtuso: *C. carpetanus* (BCU002837); 4. Redondeado: *C. carpetanus* (BCU002971); 5. Emarginado: *C. cambessedesii* (BCU001685).

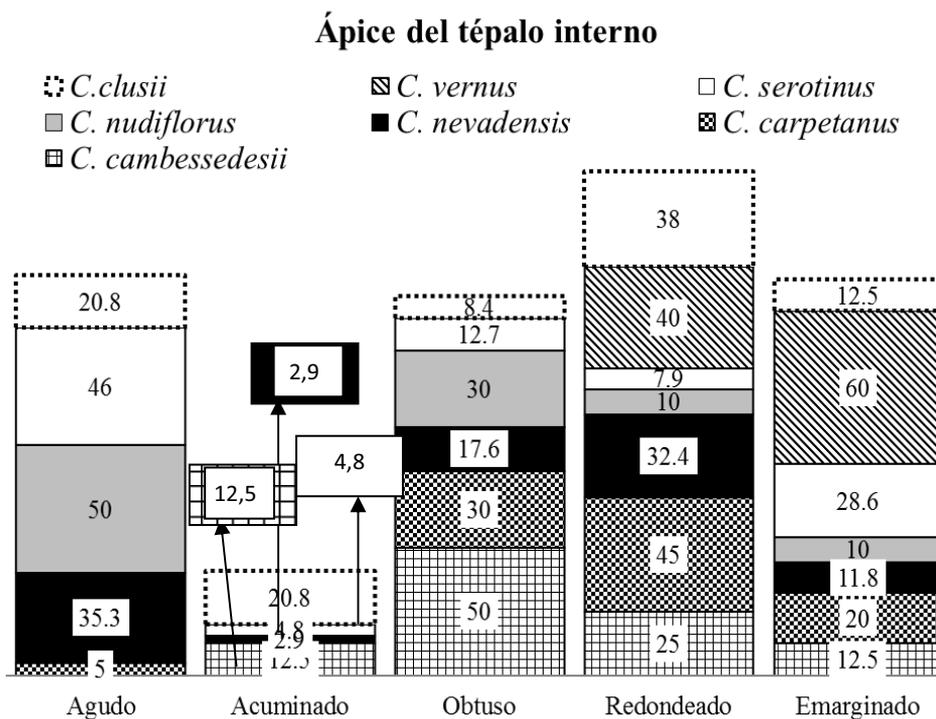
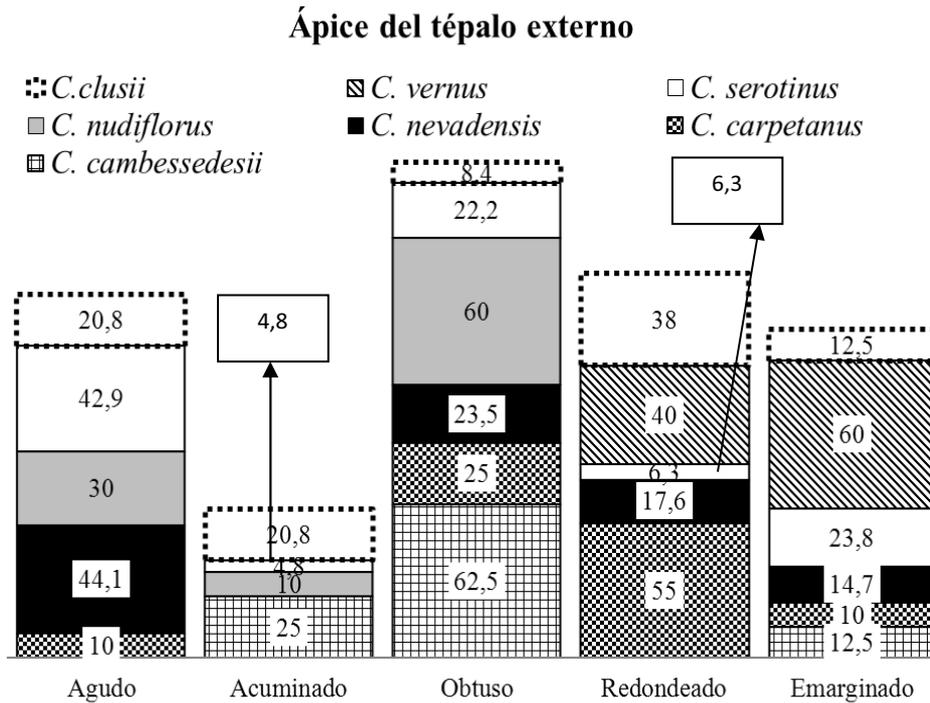


Figura 88 *Ápice del tépalo externo e interno en las diferentes especies españolas de Crocus. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.*

Todas las especies presentan como mínimo dos tipos diferentes de ápices, siendo *C. vernus* la especie que menor variabilidad presenta. La especie que más diversidad muestra es *C. serotinus* que produce flores con todos los tipos de ápices observados (Figura 88).

### 2.1.3 PATRÓN DE FONDO DE LOS TÉPALOS

El patrón de fondo que más frecuentemente se observa es el uniforme, mostrado por el 100% de las plantas de *C. cambessedesii*, *C. nudiflorus* y *C. vernus* (Figura 89).

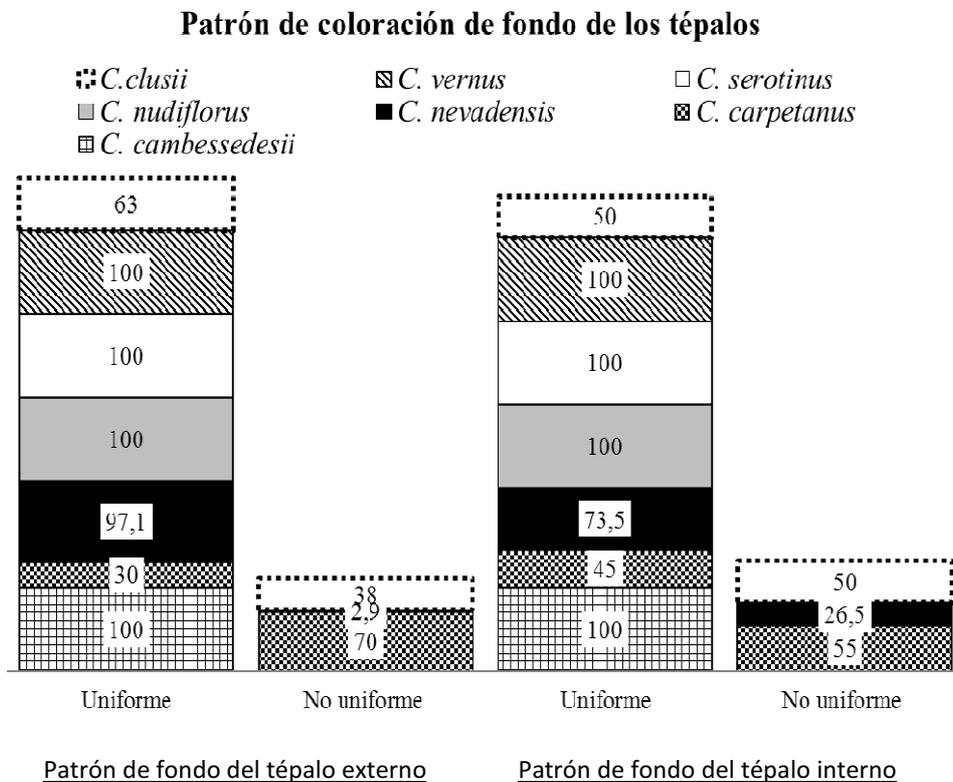


Figura 89 Patrón de fondo de los tépalos en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

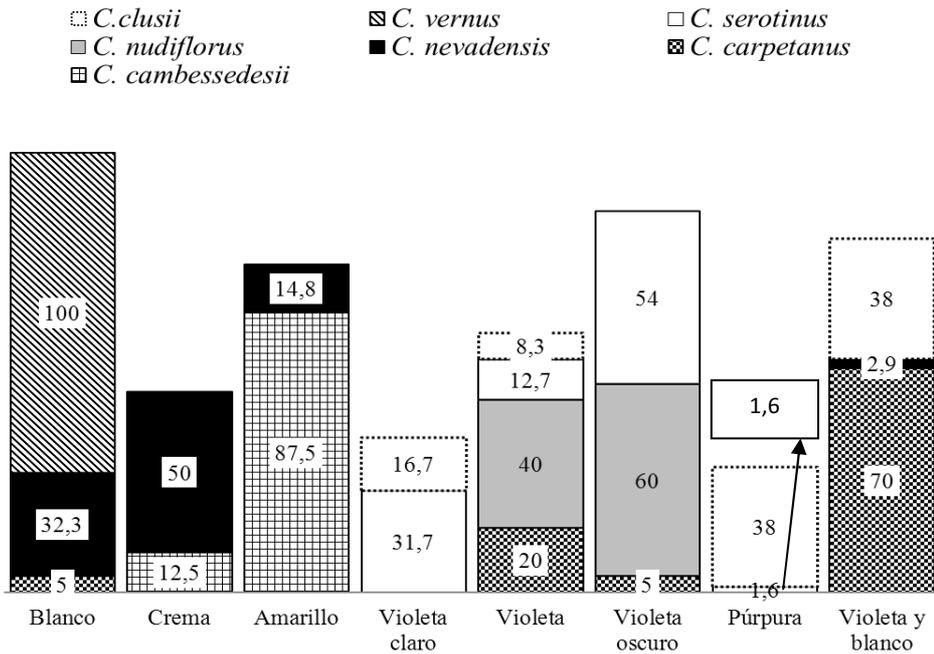
*C. carpetanus*, *C. nevadensis* y *C. clusii* muestran variabilidad para este patrón de fondo, siendo *C. carpetanus* la especie que muestra un mayor porcentaje de plantas cuyo patrón de coloración de fondo de tépalos no es uniforme (Figura 89).

### 2.1.4 COLOR GENERAL DEL TÉPALO

El color general del tépalo muestra hasta cinco colores diferentes para una misma especie. El color más comúnmente observado es el blanco, siendo notablemente frecuente en el tépalo interno. El color púrpura es el minoritario en ambos tépalos (Figura 90).

## IV. RESULTADOS

### Color general del tépalo externo



### Color general del tépalo interno

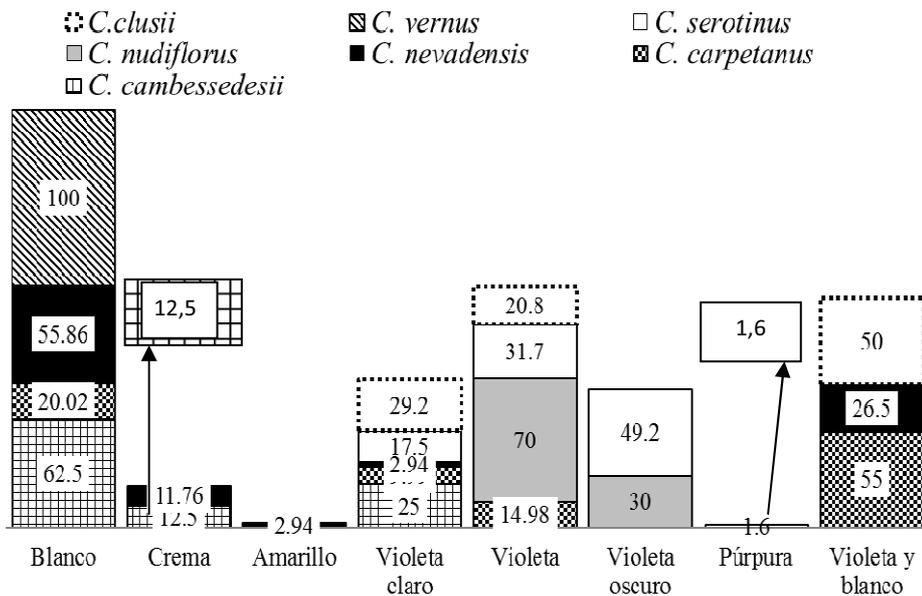
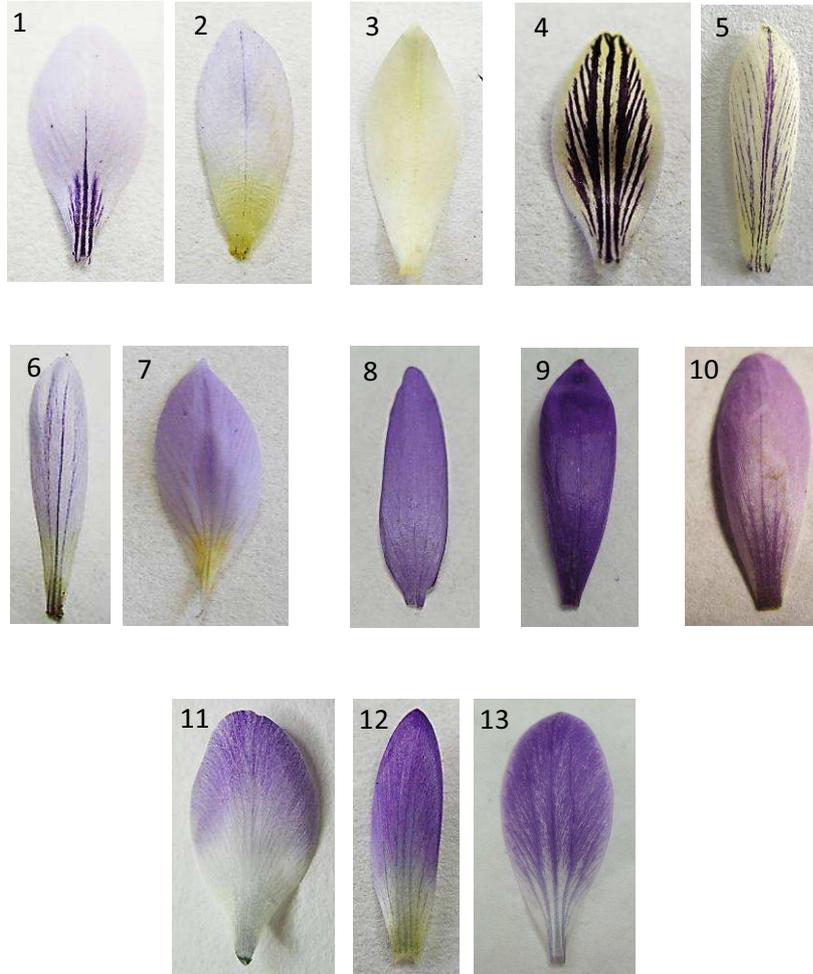


Figura 90 Color general del tépalo externo e interno en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

*C. carpetanus* y *C. nevadensis*, especies que florecen en primavera, son las especies en las que se observa una mayor variabilidad de color en sus tépalos, desde blancos a violetas. Sin embargo, la especie *C. vernus*, también primaveral, presenta siempre color blanco en ambos tépalos, siendo la especie que desarrolla menor variabilidad para este carácter (Figura 90 y Figura 91).

Las especies de floración otoñal *C. serotinus* y *C. nudiflorus* muestran siempre colores violeta o púrpura en sus tépalos. *C. cambessedesii*, que florece también en otoño, siempre tiene colores amarillos o cremas en sus tépalos. Es de destacar la elevada cantidad de tépalos de color no uniforme observada en *C. carpetanus*. Esta especie, junto con *C. clusii* y *C. nevadensis* pueden presentar tépalos con los colores violeta en el ápice y blanco en la base (Figura 90 y Figura 91).

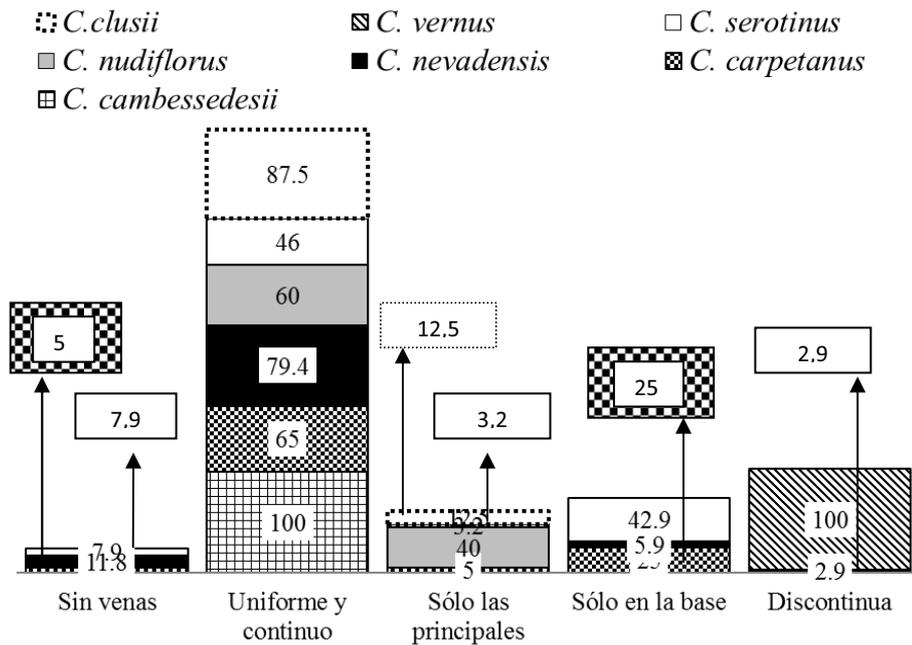


**Figura 91** Variabilidad observada en el color general del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1 y 2. Blanco: 1. *C. cambessedesii* (BCU001685), 2. *C. nevadensis* (BCU002694); 3. Crema: *C. nevadensis* (BCU002697); 4 y 5. Amarillo: 4. *C. cambessedesii* (BCU001685), 5. *C. nevadensis* (BCU002694); 6 y 7. Violeta claro: *C. serotinus* (BCU002618 y BCU002775); 8. Violeta: *C. serotinus* (BCU001657); 9. Violeta oscuro: *C. nudiflorus* (BCU003176); 10. Púrpura: *C. serotinus* (BCU001657); 11-13. Ápice violeta y base blanca: 11 y 12. *C. carpetanus* (BCU002837); 13. *C. clusii* (BCU002965).

### 2.1.5 PATRÓN DE VENACIÓN

Las especies de *Crocus* presentan variabilidad en este carácter. El patrón más observado en ambos tépalos es el uniforme y continuo. No obstante, en el tépalo interno, es también frecuente el patrón de venación sólo en la base (Figura 92).

**Patrón de venación del tépalo externo**



**Patrón de venación del tépalo interno**

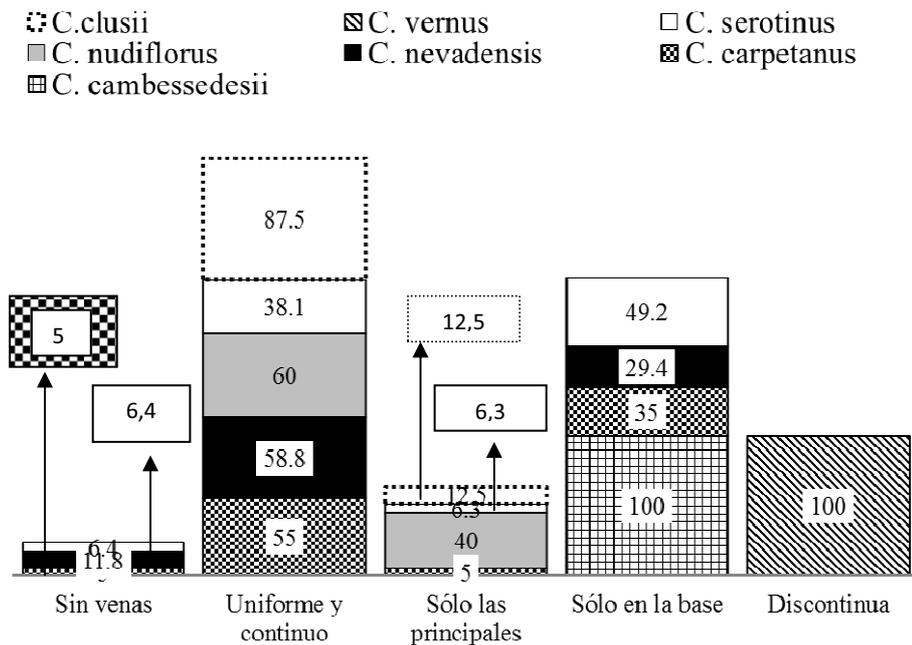


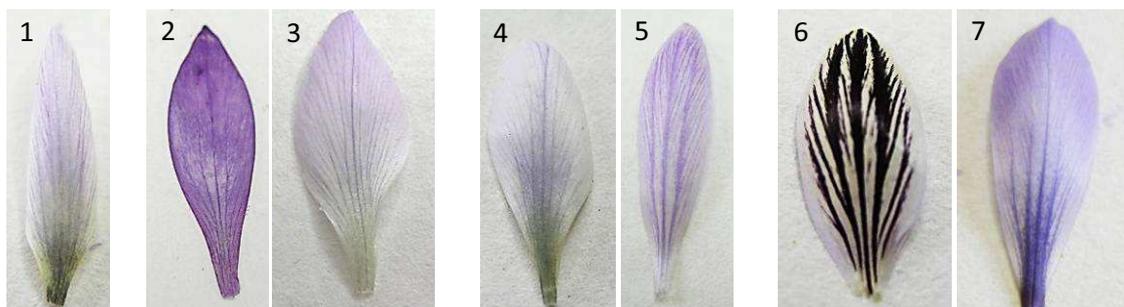
Figura 92 Patrón de venación de los tépalos en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

Las especies *C. vernus* y *C. cambessedesii* no muestran variabilidad para este carácter. En *C. vernus* el patrón es siempre discontinuo, con independencia de que el tépalo sea externo o interno. En *C. cambessedesii* depende del tépalo. En el externo, siempre es uniforme y continuo y en el interno sólo se observa venación en la base. *C. nevadensis*, *C.*

*serotinus* y *C. carpetanus*, son las especies en las que se observa la mayor variabilidad, presentando cuatro tipos de patrones de venación en sus tépalos. Es de destacar, que el patrón de venación discontinuo sólo está presente en los tépalos de *C. vernus* y en los tépalos externos de un bajo porcentaje de plantas de *C. nevadensis* (Figura 92 y Figura 93).



**Figura 93** Variabilidad observada en el patrón de venación del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-4. Sin venas: 1. *C. carpetanus* (BCU002837); 2. *C. nevadensis* (BCU002697); 3. *C. nudiflorus* (BCU003176); 4. *C. serotinus* (BCU003174); 5- 8. Uniforme y continua: 5. *C. carpetanus* (BCU002837); 6. *C. nevadensis* (BCU002689); 7 y 8. *C. serotinus* (BCU002775); 9-11. Sólo las venas de la base: 9. *C. cambessedesii* (BCU001685); 10. *C. carpetanus* (BCU002837); 11. *C. nevadensis* (BCU002980); 12-13. Sólo las venas principales: 12. *C. carpetanus* (BCU002837); 13. *C. serotinus* (BCU002775); 14-15. Venación discontinua: 14. *C. nevadensis* (BCU002694); 15. *C. vernus* (BCU002998).



**Figura 94** Variabilidad observada en el tipo de venación del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Mal definida: *C. carpetanus* (BCU002837); 2 y 3. Bien definida: 2. *C. nudiflorus* (BCU003176); 3. *C. carpetanus* (BCU002837); 4 y 5. Plumosa: 4. *C. carpetanus* (BCU002835); 5. *C. serotinus* (BCU002367); 6 y 7. Plumosa con mancha: 6. *C. cambessedesii* (BCU001685); 7. *C. serotinus* (BCU001657).

## IV. RESULTADOS

### 2.1.6 TIPO DE VENACIÓN

El tipo de venación muestra variabilidad entre especies y dentro de algunas de ellas y, en ocasiones sucede que los tépalos externos e internos presentan distinto tipo de venación (Figura 95 y Figura 94).

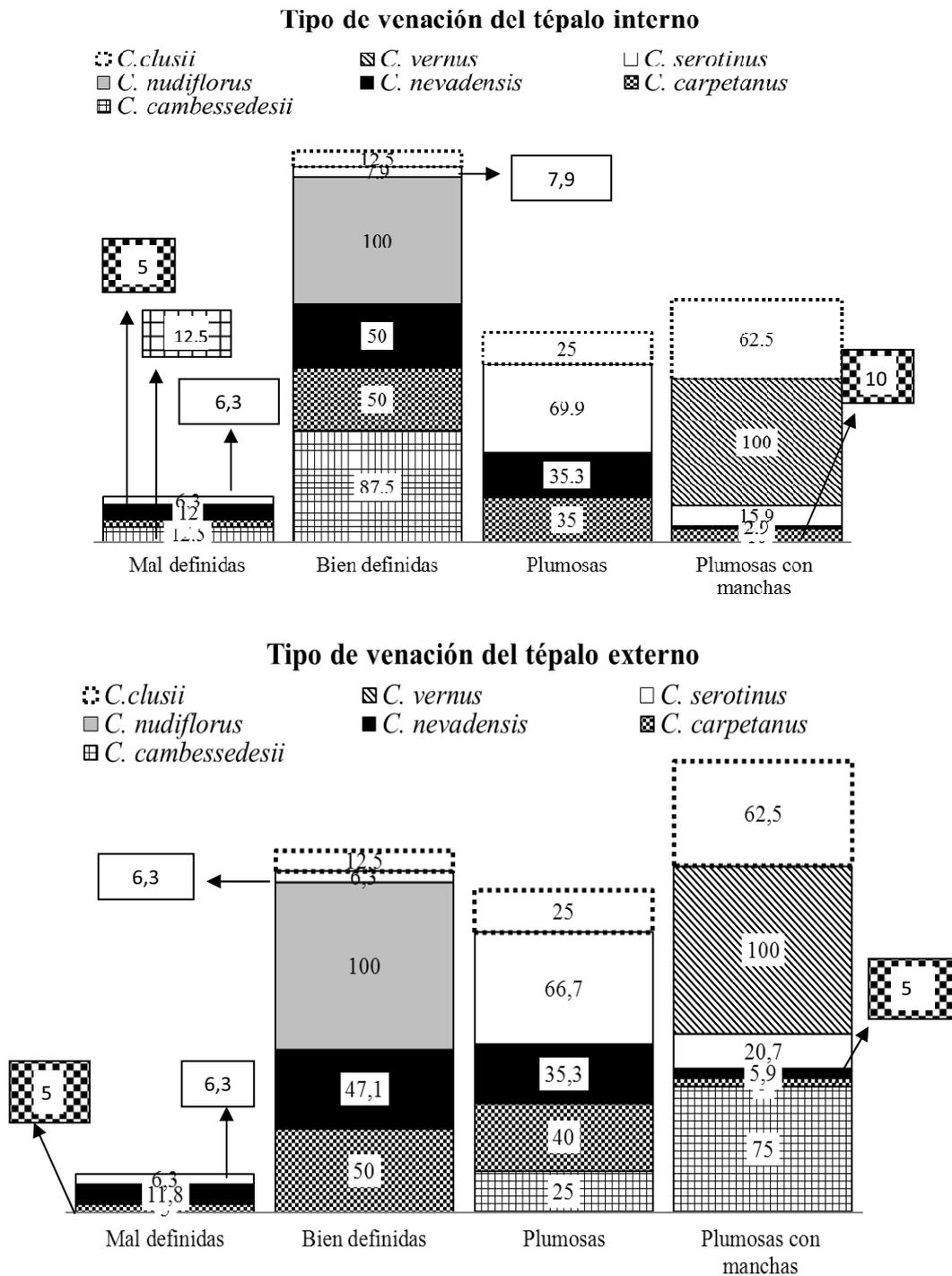


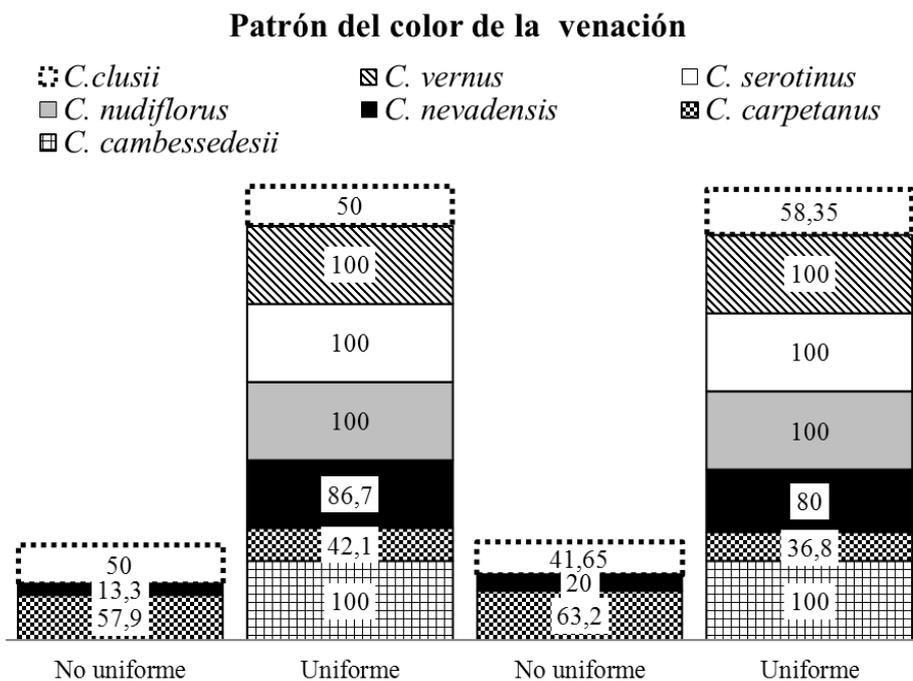
Figura 95 Tipo de venación del tépalo en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

En general, las flores presentan venación bien definida en sus tépalos externo e interno. Ahora bien, en el tépalo externo es frecuente que esta venación continua llegue a tomar un aspecto plumoso, y puede que se llegue a formar una mancha (Figura 95).

*C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. serotinus* presentan tépalos con los cuatro tipos de venación diferentes. *C. nudiflorus* y *C. vernus* muestran un solo tipo de venación en todos sus tépalos. En *C. cambessedesii* es especialmente característica la diferencia de venación entre los tépalos externos e internos. Los primeros muestran una venación que es claramente plumosa que se puede observar en todo el tépalo, y los últimos una venación sólo observable en la base y no siempre bien definida (Figura 95 y Figura 94).

**2.1.7 PATRÓN DE COLOR DE VENACIÓN**

El patrón del color de la venación en las siete especies de *Crocus* es generalmente uniforme, pero en ocasiones se observan patrones no uniformes en las especies *C. carpetanus*, *C. clusii* y *C. nevadensis* (Figura 96).



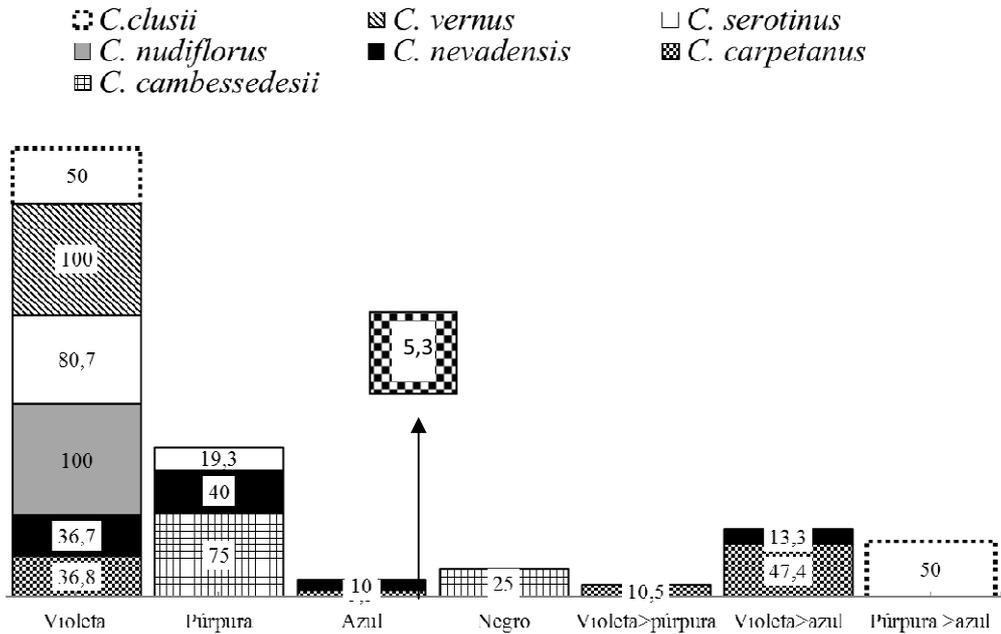
Patrón de color de la venación del tépalo externo    Patrón de color de la venación del tépalo interno

**Figura 96** Patrón del color de la venación del tépalo en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

**2.1.8 COLOR DE LA VENACIÓN**

El color más predominante en ambos tépalos es el violeta, y el menos observado es el azul. El color negro es exclusivo de los tépalos externos de algunas flores de *C. cambessedesii* (Figura 97).

**Color de venación del tépalo externo**



**Color de venación del tépalo interno**

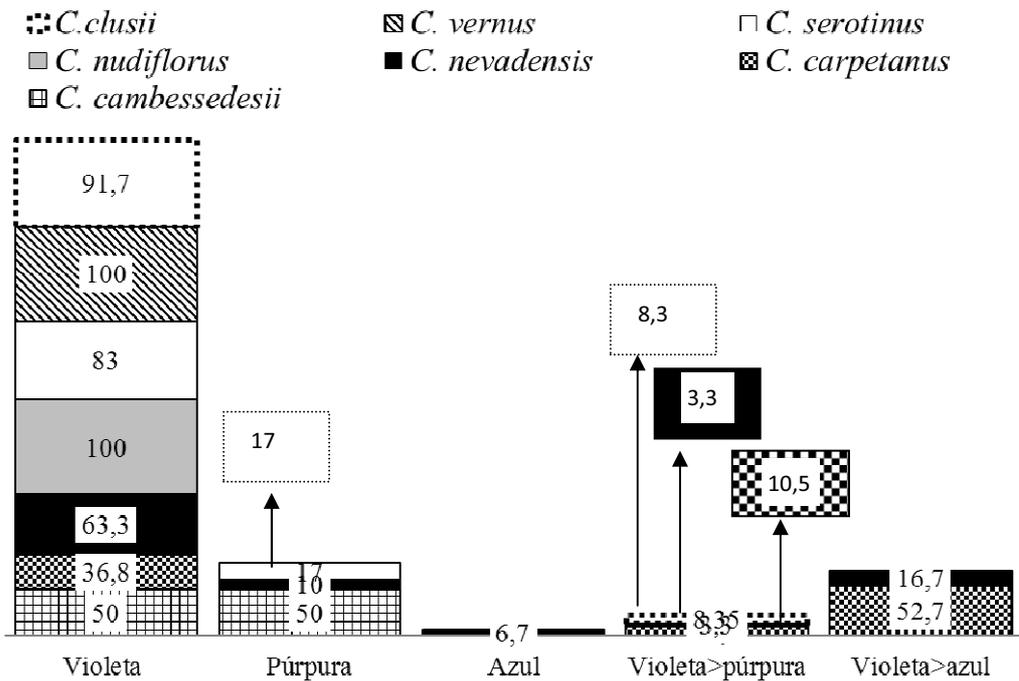
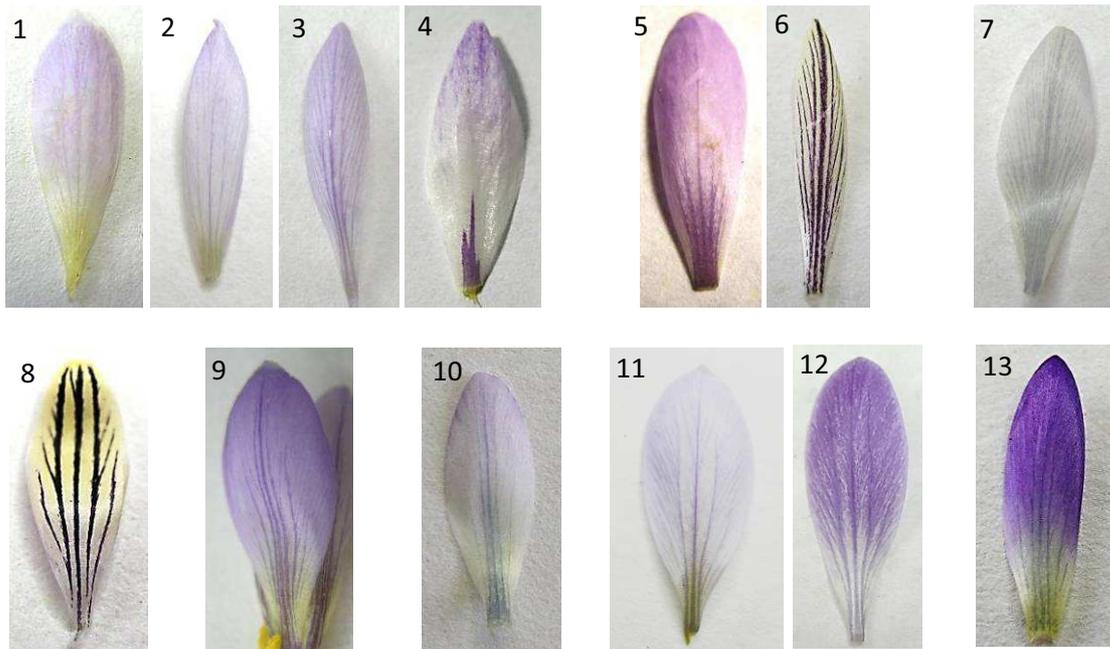
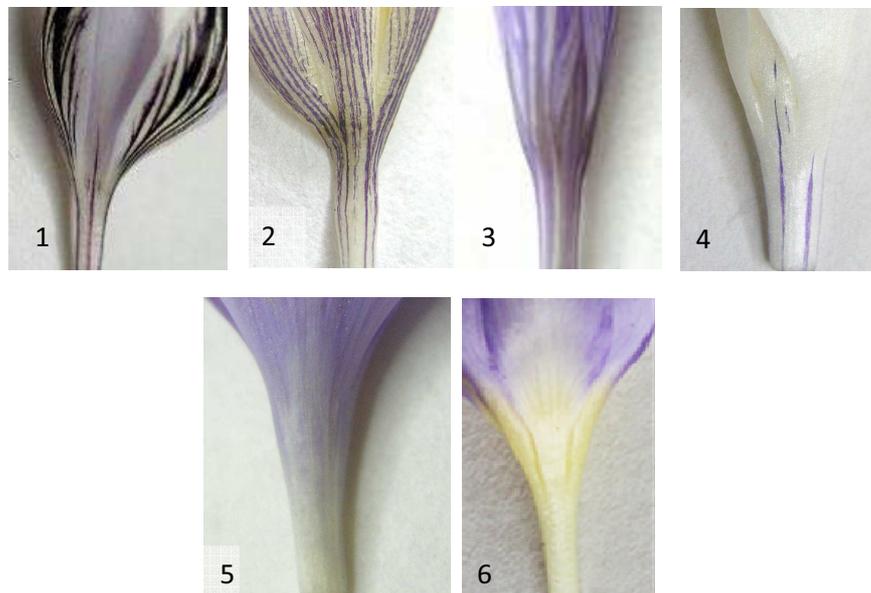


Figura 97 Color de venación del tépalo en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

Hay que señalar que existe una elevada variabilidad intraespecífica en las especies *C. carpetanus* y *C. nevadensis* que, entre otros colores, muestran de forma exclusiva el color azul y las coloraciones no uniformes de violeta en el ápice y el azul en la base del tépalo. *C. clusii*, también muestra en algunas flores coloraciones no uniformes en el tépalo que van de púrpura a azul (Figura 97 y Figura 98).



**Figura 98** Variabilidad observada en el color de la venación del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-4. Violeta: 1, 2 y 3 *C. serotinus* (BCU002619, BCU002550 y BCU002775); 4. *C. vernus* (BCU001822); 5 y 6. Púrpura: 5. *C. serotinus* (BCU001657); 6. *C. nevadensis* (BCU002689); 7. Azul: *C. nevadensis* (BCU002982); 8. Negra: *C. cambessedesii* (BCU001685); 9. Ápice violeta y base púrpura: *C. carpetanus* (BCU002973); 10. Ápice violeta y base azul: *C. carpetanus* (BCU002838); 11 y 12. Ápice púrpura y base azul: *C. clusii* (BCU002963, BCU002965); 13. Ápice violeta y base azul: *C. carpetanus* (BCU002837).

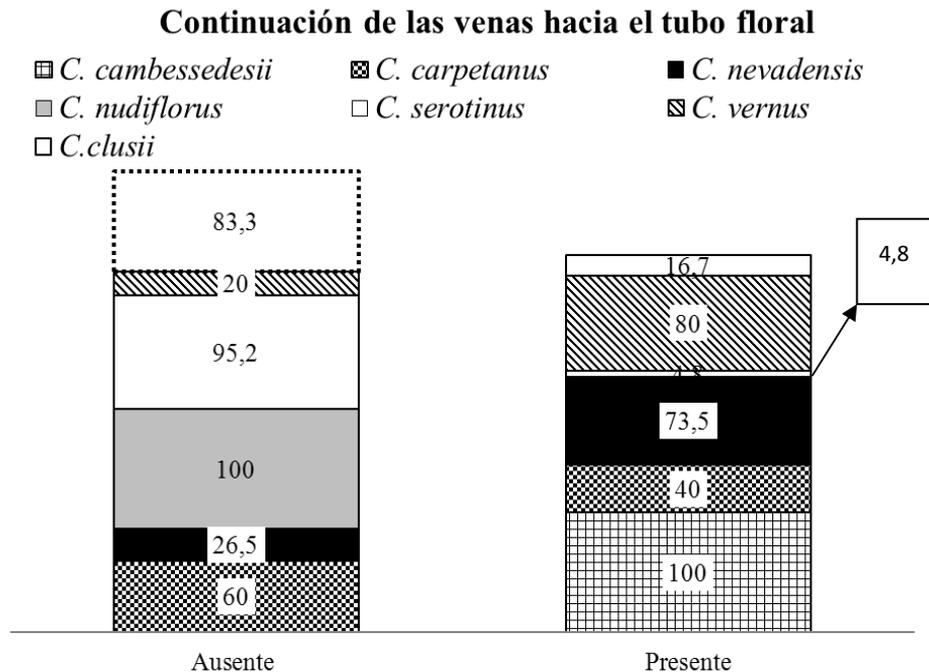


**Figura 99** Variabilidad observada en la continuación de las venas hacia el tubo floral en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-4 Presente: 1. *C. cambessedesii* (BCU001685), 2. *C. nevadensis* (BCU002695); 3. *C. clusii* (BCU002963); 4. *C. vernus* (BCU002998); 5 y 6. Ausente: 5. *C. nudiflorus* (BCU002557); 6. *C. carpetanus* (BCU002696).

## IV. RESULTADOS

### 2.1.9 CONTINUACIÓN DE LAS VENAS HACIA EL TUBO FLORAL

La continuación de las venas de los tépalos hacia el tubo floral se presenta de forma constante en *C. cambessedesii*, y con mucha frecuencia en *C. nevadensis* y *C. vernus*. Por el contrario, en *C. nudiflorus* no se observa nunca esta continuidad y es muy infrecuente en *C. serotinus* y *C. clusii* (Figura 100 y Figura 99).

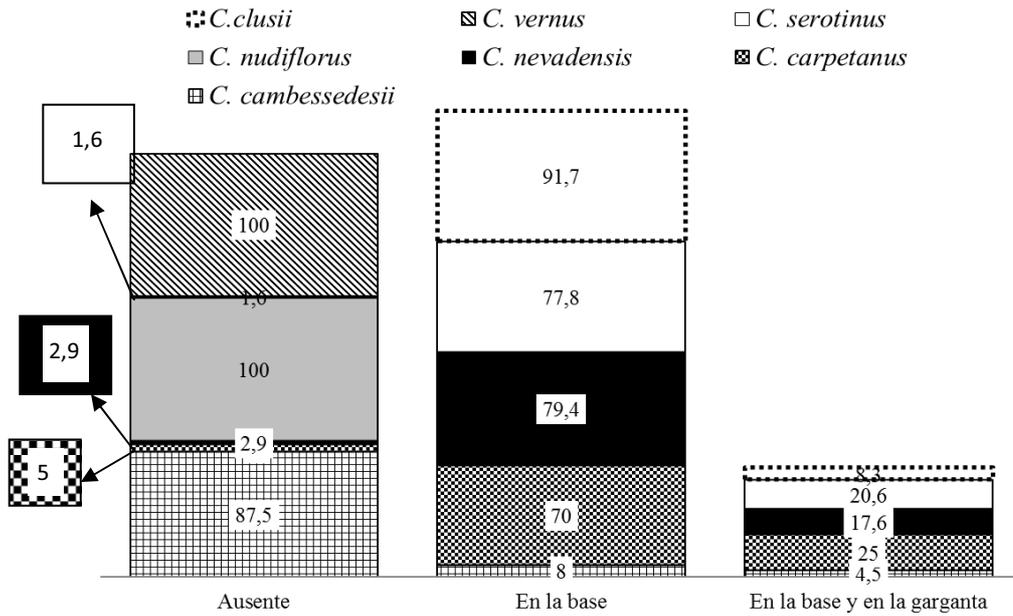


**Figura 100** Continuación de las venas hacia el tubo floral en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. Localización de las manchas del tépalo

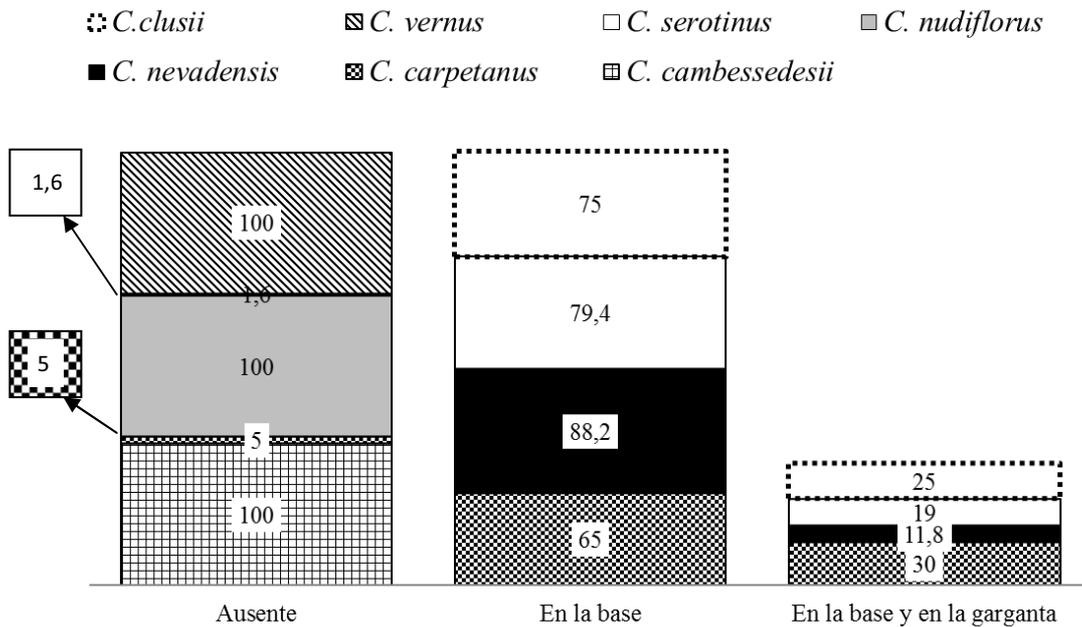
### 2.1.10 LOCALIZACIÓN DE LAS MANCHAS DEL TÉPALO

El carácter localización de la mancha de los tépalos es muy variable entre especies y también dentro de especies. Ninguna de las especies muestra una total uniformidad en este carácter, al menos tres especies desarrollan flores sin mancha, con mancha en la base y con mancha en la base y en la garganta. En la mayoría de las flores observadas la mancha no se extiende hacia la garganta. No obstante, la variabilidad entre el tépalo externo y el interno es muy pequeña (Figura 101 y Figura 102).

**Localización de la mancha del tépalo externo**

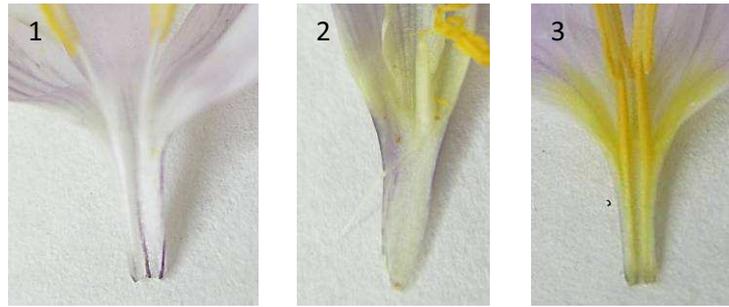


**Localización de la mancha del tépalo interno**



**Figura 101** Localización de la mancha del tépalo en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

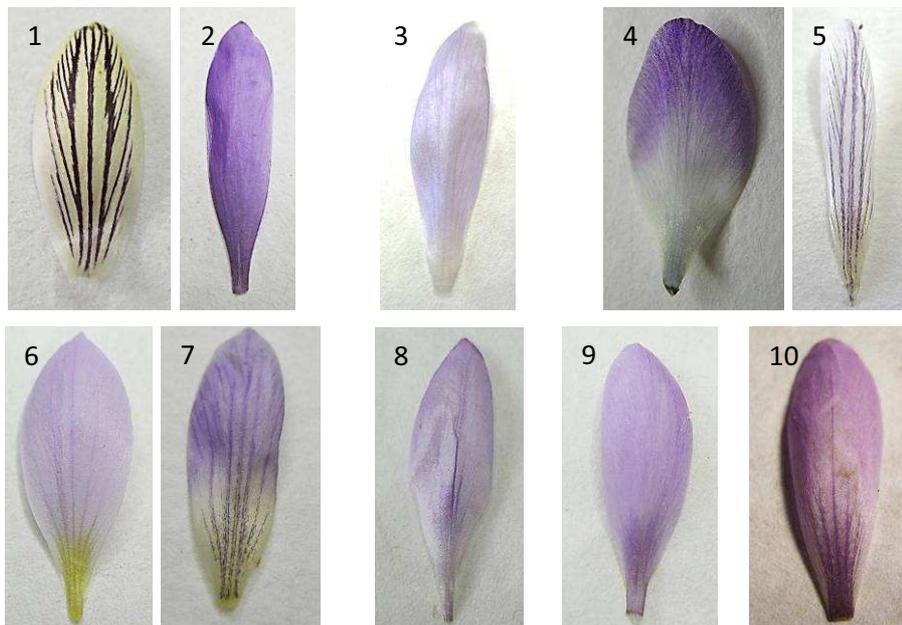
## IV. RESULTADOS



**Figura 102** Variabilidad observada en la localización de la mancha del tépalo en las especies estudiadas de *Crocus*. 1. Ausente: *C. cambessedesii* (BCU001685); 2. En la base: *C. carpetanus* (BCU002973); 3. En la base y en la garganta: *C. serotinus* (BCU002618).

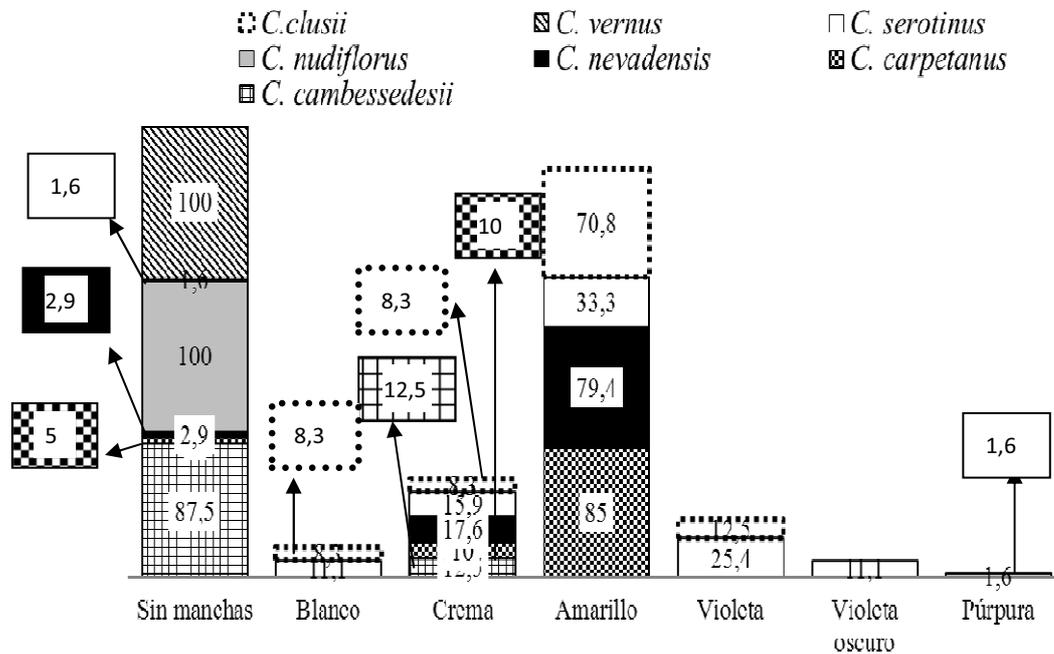
### 2.1.11 COLOR DE LAS MANCHAS DEL TÉPALO

El color de la mancha del tépalo es variable entre especies y también dentro de la mayoría. Así, *C. nevadensis* y *C. carpetanus* presentan manchas color crema o amarillo pero no tonos violeta o púrpura. Sin embargo, *C. serotinus* o *C. clusii* presentan una gran variabilidad mostrando colores que van desde el blanco o el crema hasta violeta o púrpura, si bien el más frecuente es el amarillo, tanto en el tépalo externo como en el interno (Figura 104 y Figura 103).



**Figura 103** Variabilidad observada en el color de la mancha de la base del tépalo en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-2. Ausente: 1. *C. cambessedesii* (BCU001685); 2. *C. nudiflorus* (BCU003176); 3. Blanco: *C. serotinus* (BCU002978); 4 y 5. Crema: 4. *C. carpetanus* (BCU002837); 5. *C. nevadensis* (BCU002979); 6 y 7. Amarilla: 6. *C. serotinus* (BCU002618); 7. *C. nevadensis* (BCU002380); 8. Violeta: *C. serotinus* (BCU001657); 9. Violeta oscuro: *C. serotinus* (BCU002741); 10. Púrpura: *C. serotinus* (BCU001657).

**Color de la mancha del tépalo externo**



**Color de la mancha del tépalo interno**

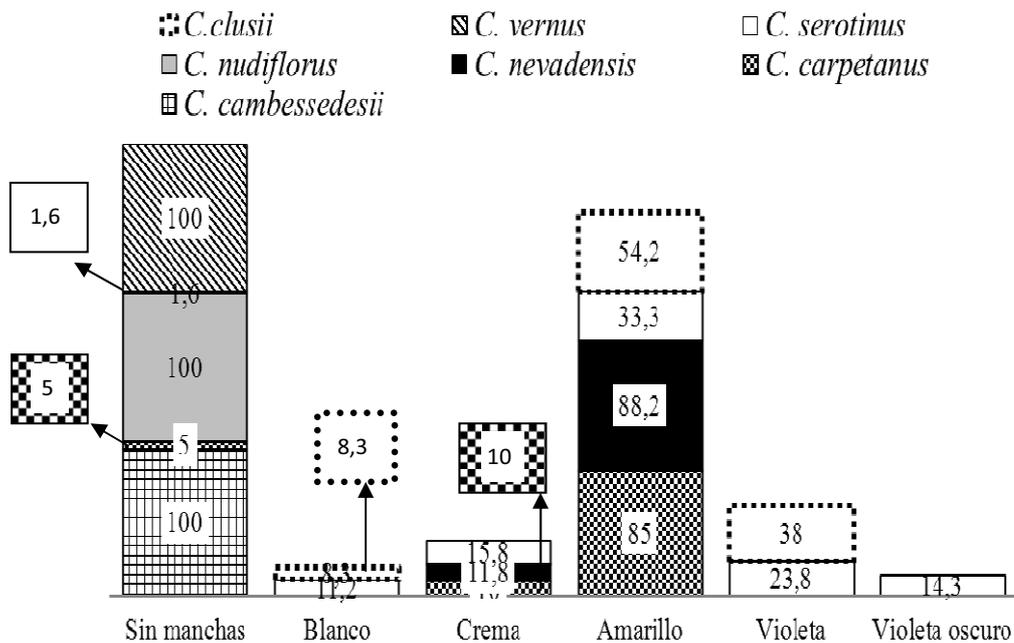


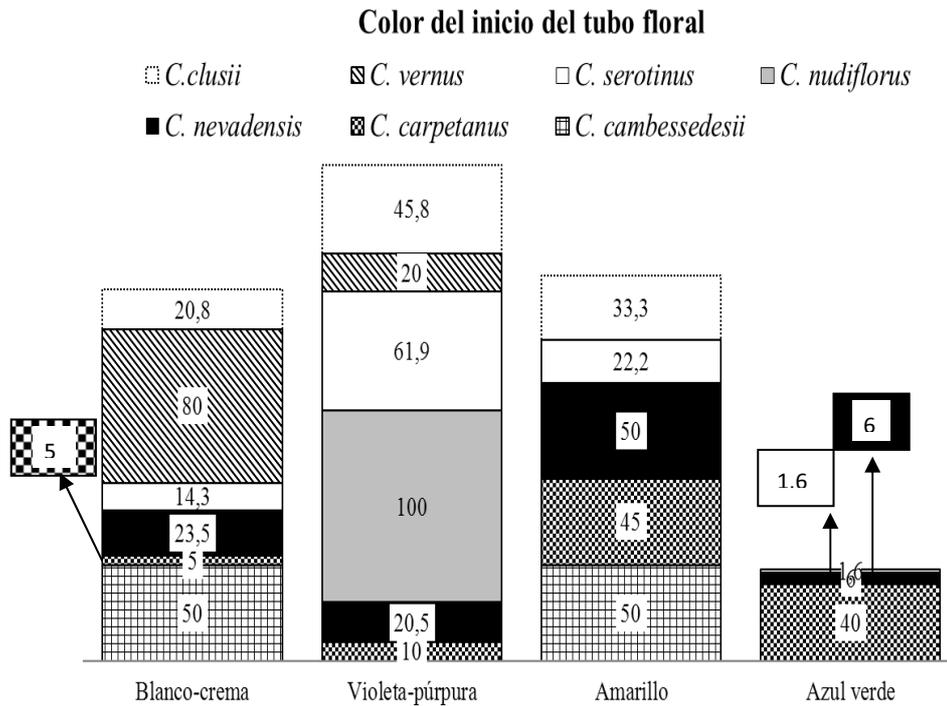
Figura 104 Color de la mancha del tépalo externo e interno. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

**2.1.12 COLOR DEL INICIO DEL TUBO FLORAL**

Con la excepción de *C. nudiflorus* cuyas flores siempre presentan un inicio del tubo floral de color violeta-púrpura, el resto de especies muestra variación intraespecífica para este carácter (Figura 105). Es un carácter muy variable en las especies *C. nevadensis*, *C.*

## IV. RESULTADOS

*carpetanus* y *C. serotinus*, cuyas flores pueden mostrar cualquiera de los niveles de este carácter: blanco-crema, violeta-púrpura, amarillo, azul-verde (Figura 106).



**Figura 105** Color del inicio del tubo floral en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.



**Figura 106** Variabilidad observada el color del inicio del tubo floral en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-2. Blanco-crema: 1. *C. vernus* (BCU002998); 2. *C. nevadensis* (BCU002982); 3-5. Amarillo: 3. *C. nevadensis* (BCU002979); 4. *C. carpetanus* (BCU002836); 5. *C. serotinus* (BCU002618); 6-9. Violeta-púrpura: 6. *C. serotinus* (BCU002619); 7. *C. carpetanus* (BCU002837); 8. *C. vernus* (BCU001822); 9. *C. nudiflorus* (BCU003176); 10. Azul-verde: *C. carpetanus* (BCU002835).

2.1.13 COLOR DE LA GARGANTA FLORAL

El color de la garganta floral puede ser blanco-crema o amarillo. El color más frecuente en las especies otoñales es el blanco-crema, mientras que el amarillo es el color que se observa en todas las gargantas florales de las especies primaverales, con la excepción de *C. vernus*, que muestra una frecuencia baja de flores con la garganta amarilla (Figura 107 y Figura 108 ).

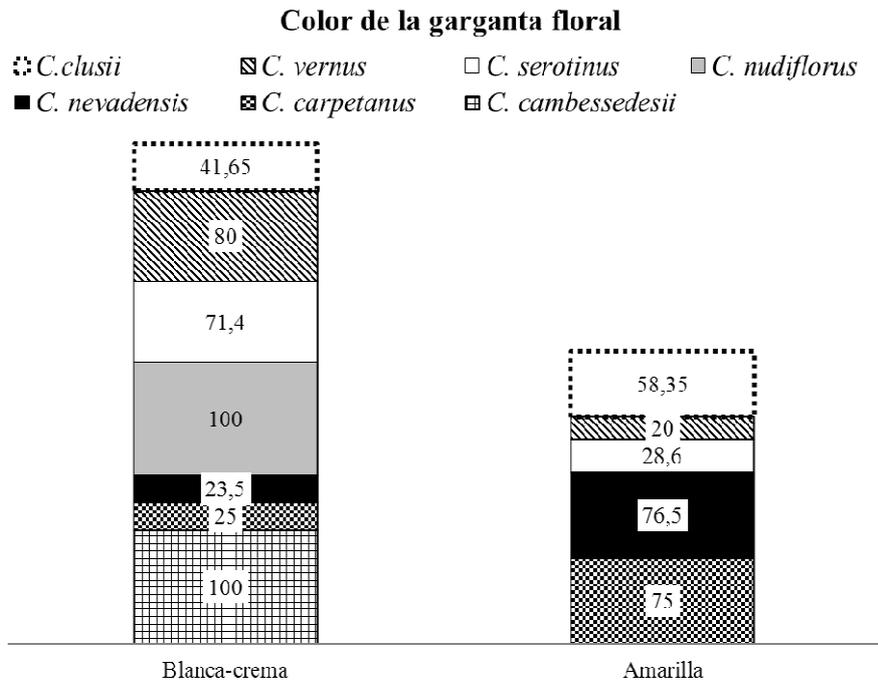


Figura 107 Color de la garganta floral en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

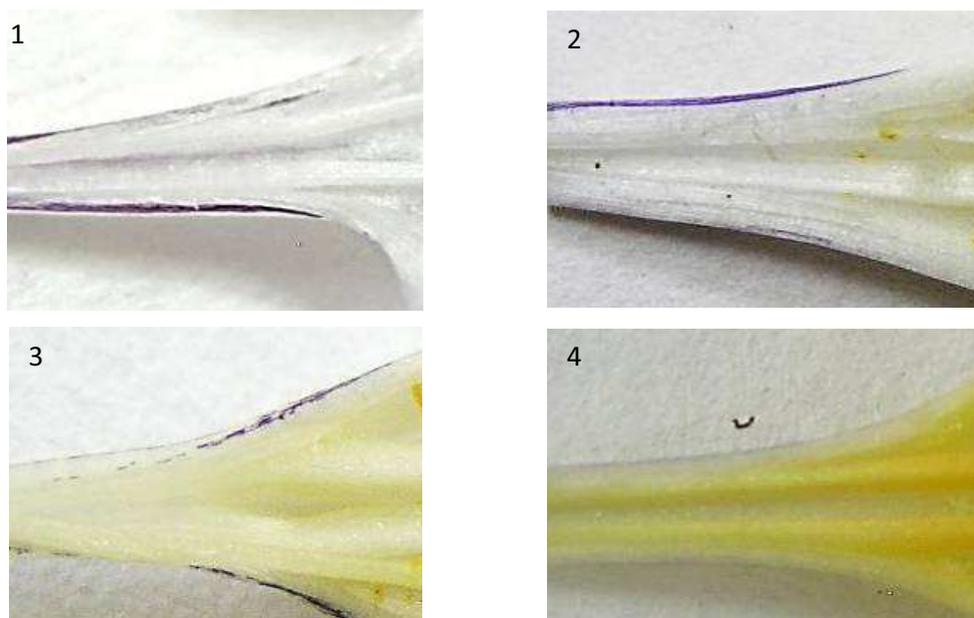
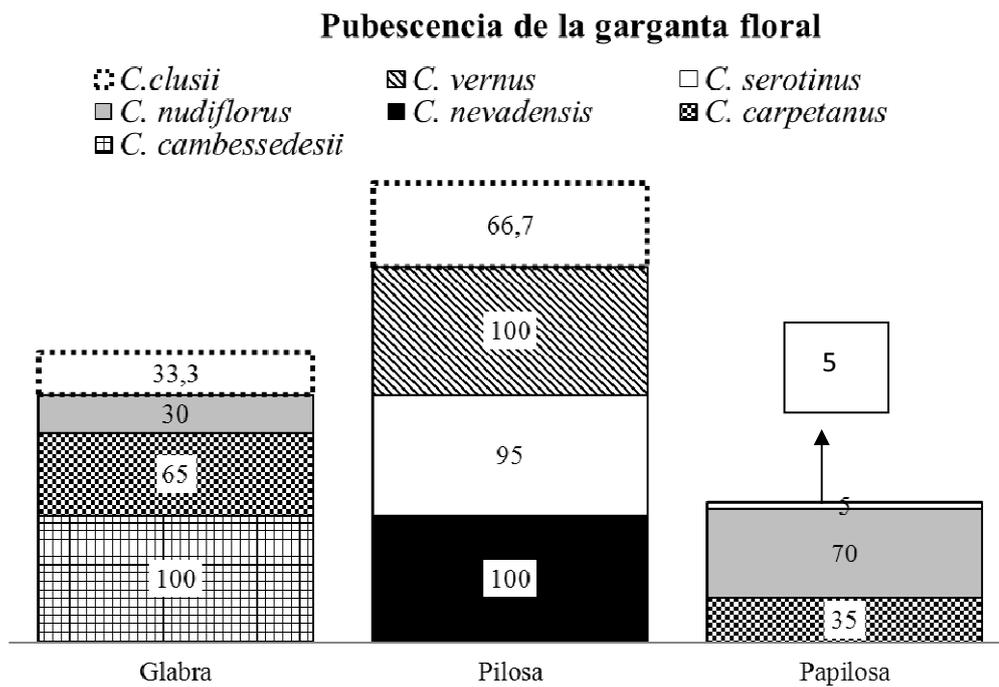


Figura 108 Variabilidad observada en el color de la garganta floral en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1 y 2. Blanca: 1. *C. cambessedesii* (BCU001685); 2. *C. vernus* (BCU002998); 3 y 4. Amarilla: 3. *C. nevadensis* (BCU002698); 4. *C. serotinus* (BCU002550).

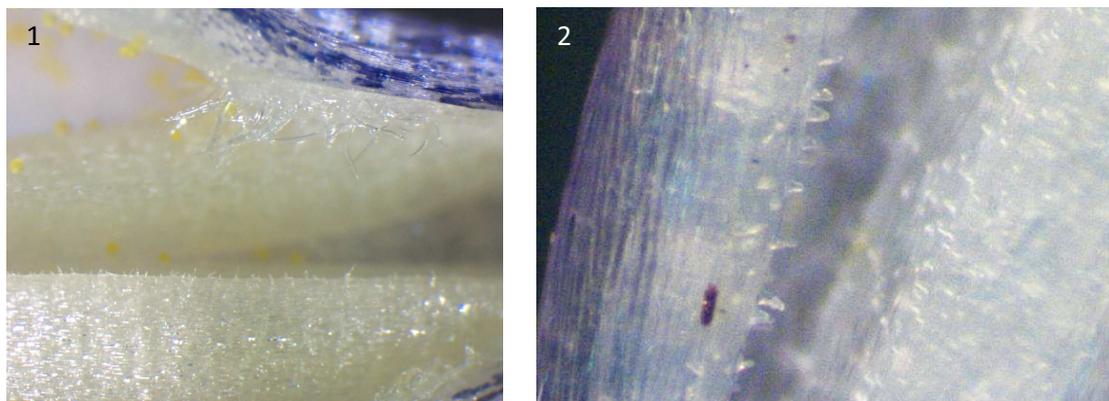
## IV. RESULTADOS

### 2.1.14 PUBESCENCIA DE LA GARGANTA FLORAL

La garganta floral puede ser glabra o presentar pelos o papilas (Figura 109). En algunas especies la aparición de pelos en su garganta es un carácter uniforme, como es el caso de *C. vernus* o *C. nevadensis*. En *C. serotinus* o *C. clusii* aunque muy frecuente, no siempre se observa una garganta pilosa, sino con pequeñas papilas en el caso de *C. serotinus* o glabra en el caso de *C. clusii*. En *C. cambessedesii*, sin embargo, es constante el hecho de que la garganta sea glabra. En las especies *C. carpetanus* o *C. nudiflorus* las flores pueden tener la garganta glabra o con pequeñas papilas (Figura 110).



**Figura 109** Pubescencia de la garganta floral en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.



**Figura 110** Variabilidad observada en la presencia de pubescencia en la garganta floral en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Pilosa: *C. nevadensis* (BCU002380); 2. Papilosa: *C. serotinus* (BCU002550).

2.1.15 COLORACIÓN DEL FILAMENTO DEL ESTAMBRE

El filamento del estambre puede ser blanco, amarillo claro o amarillo-naranja (Figura 112). El color blanco es el más frecuente y se observa de forma constante en las flores de *C. vernus*, *C. nudiflorus* y *C. cambessedesii*. En las especies de floración primaveral *C. nevadensis* y *C. carpetanus*, el filamento puede ser blanco o amarillo claro. Las especies otoñales *C. serotinus* y *C. clusii*, presentan filamentos que varían entre amarillo claro y naranja (Figura 111).

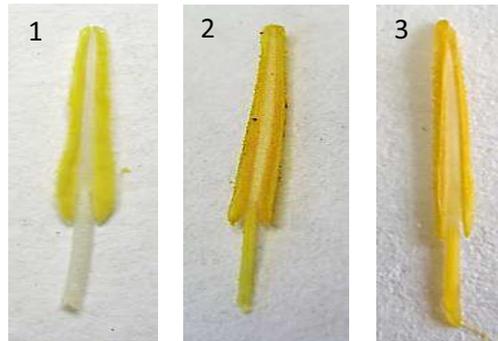


Figura 111 Variabilidad observada en el color del filamento del estambre en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Blanco: *C. nevadensis* (BCU002982); 2. Amarillo claro: *C. serotinus* (BCU002775); 3. Amarillo-naranja: *C. serotinus* (BCU002618).

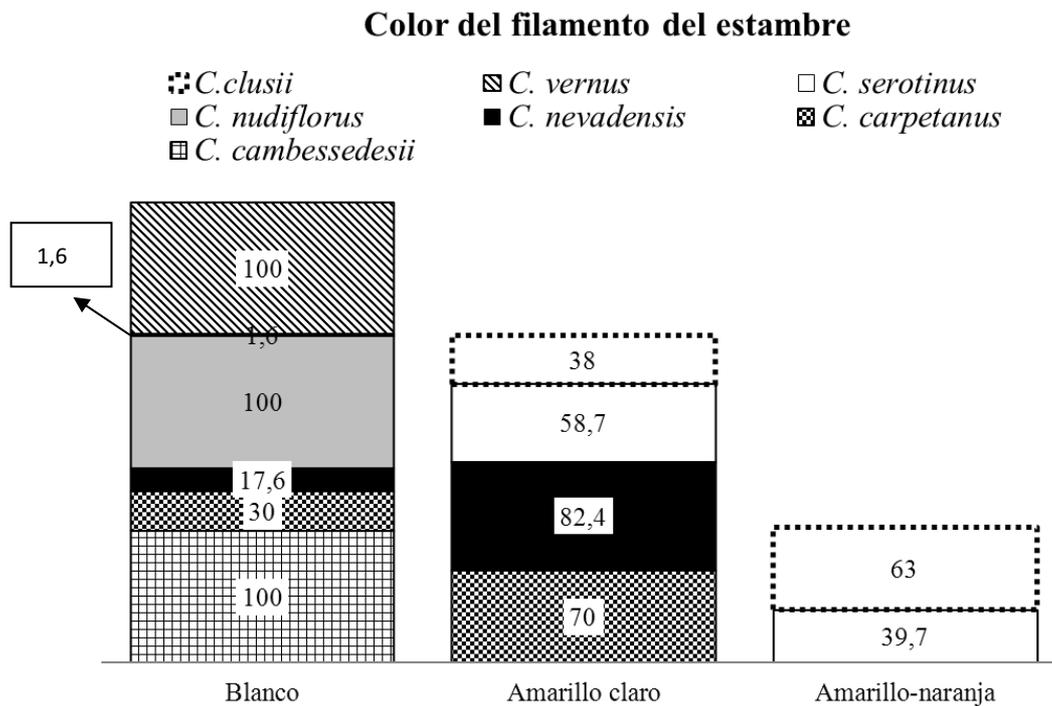
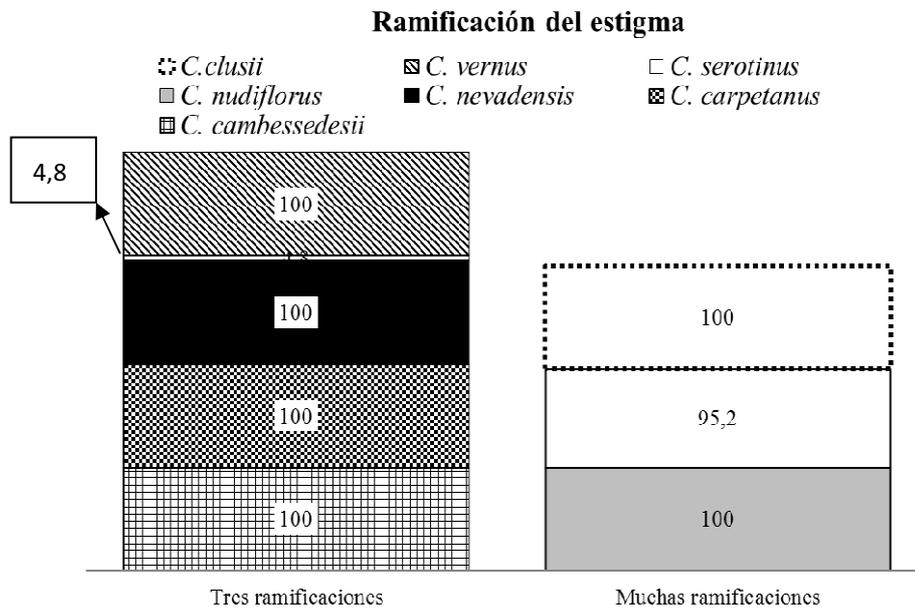


Figura 112 Color del filamento del estambre en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

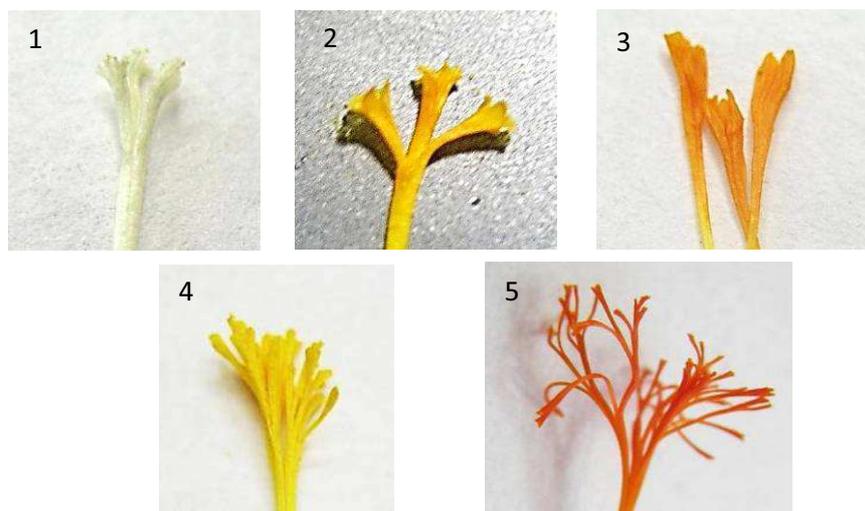
## IV. RESULTADOS

### 2.1.16 GRADO DE RAMIFICACIÓN DEL ESTIGMA

El carácter relativo a la ramificación del estigma es constante dentro de casi todas las especies, con la excepción de *C. serotinus* (Figura 113). Así, las especies de floración primaveral (*C. carpetanus*, *C. nevadensis* y *C. vernus*) dan lugar a flores con estigmas que siempre se dividen en tres ramificaciones, algo expandidas y escaroladas en el ápice. También *C. cambessedesii*, de floración otoñal, desarrolla estigmas con sólo tres ramificaciones, pero más acentuadas que las que muestran el resto de especies primaverales. Sin embargo, las especies de floración otoñal, *C. nudiflorus*, *C. clusii* y la gran mayoría de plantas de *C. serotinus* (95%), muestran un estilo con numerosas ramificaciones (Figura 113 y Figura 114).



**Figura 113** Ramificación del estigma en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.



**Figura 114** Variabilidad observada en el grado de ramificación del estigma en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-3. Tres ramificaciones: 1. *C. carpetanus* (BCU002835); 2. *C. vernus* (BCU001822); 3. *C. cambessedesii* (BCU001685); 4 y 5. Muchas ramificaciones: 4. *C. nudiflorus* (BCU003176); 5. *C. serotinus* (BCU001657).

**2.1.17 COLORACIÓN DEL ESTIGMA**

Las diferencias existentes entre especies, en relación al color del estigma, pueden ser útiles como apoyo para diferenciar especies, dada la uniformidad de este carácter para algunas de ellas (Figura 115).

Las especies primaverales, *C. nevadensis* y *C. carpetanus* muestran siempre los estigmas de color blanco o crema y *C. cambessedesii* siempre de color naranja. El resto de especies presenta variación entre los colores amarillo y naranja, siendo más frecuente el amarillo en *C. nudiflorus* y el naranja en las restantes (Figura 115 y Figura 116).

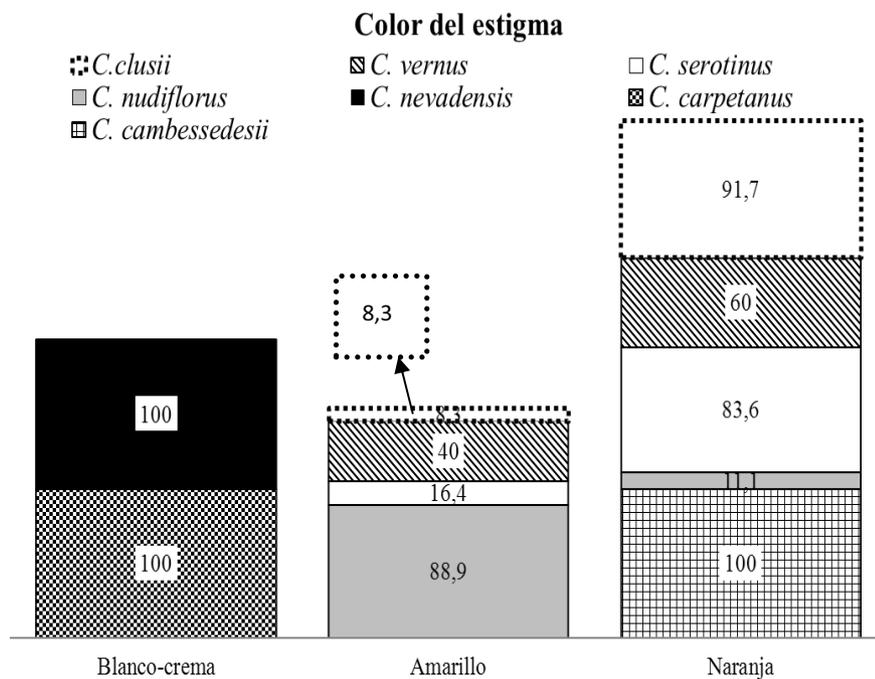


Figura 115 Color del estigma en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.



Figura 116 Variabilidad observada en la coloración del estigma en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Blanco-crema: *C. nevadensis* (BCU002359); 2. Amarillo: *C. serotinus* (BCU002978); 3. Naranja: *C. vernus* (BCU002998).

**2.1.18 FRAGANCIA DE LA FLOR**

En general, todas las especies presentan al menos un 87% de flores con fragancia, a excepción de *C. nudiflorus*, que muestra una frecuencia del 50%.

## IV. RESULTADOS

### 2.1.19 HOJAS EN EL PERIODO FLORAL

Todas las especies desarrollan las hojas antes, durante o días después de la floración, con la excepción de *C. nudiflorus*, que presenta histerantia. Las hojas de *C. nudiflorus* aparecen semanas después de la floración, cuando ha pasado el frío invernal en su medio natural, o cuando se suben las temperaturas en ambientes controlados.

### 2.1.20 GUÍA DE IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *CROCUS* EN BASE A LAS CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON LA MORFOLOGÍA FLORAL

En la tabla siguiente se presenta una clave de identificación de las diferentes especies según sus características relacionadas con la flor (Figura 117).

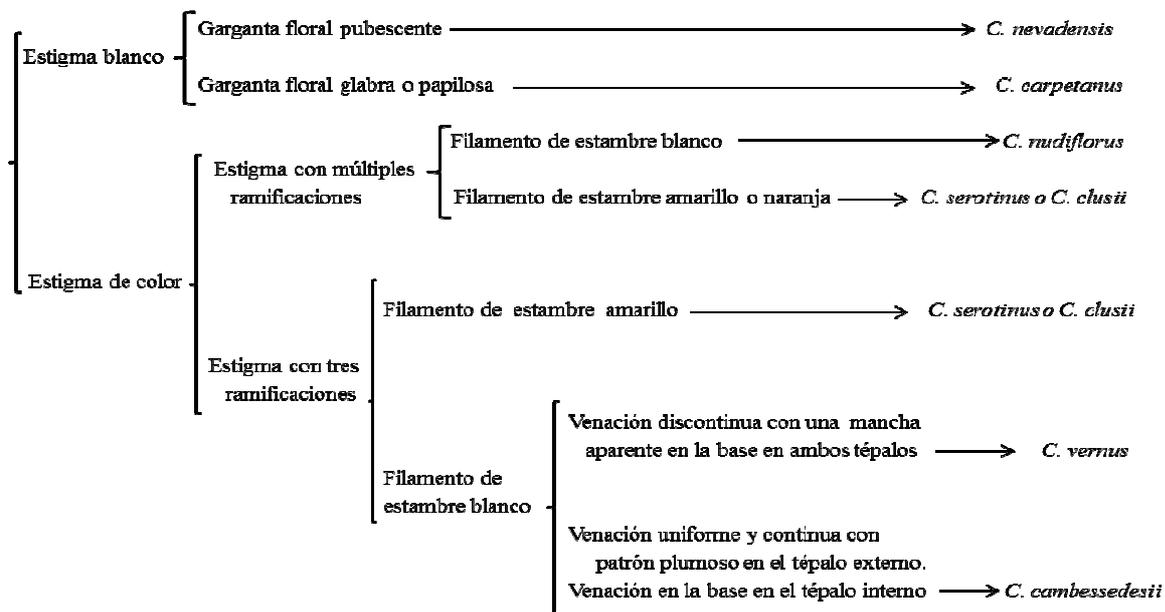


Figura 117 Diferenciación entre especies españolas de *Crocus* en base a la morfología floral

En general, podemos decir que existe una elevada variabilidad morfológica y la presencia de mucha variación intraespecífica para caracteres relacionados con la forma, color y venación de los tépalos, si bien para algunas especies como *C. vernus* y *C. cambessedesii*, el tipo y patrón de venación es específico. Otros caracteres como patrón de coloración del fondo del tépalo, color de la garganta floral, o continuación de las venas hacia el tubo floral, muestran una menor variación y son uniformes para algunas especies. Finalmente, hay que señalar que para poder diferenciar especies, son de gran interés, por la uniformidad que presentan y la variación entre especies los siguientes caracteres: pubescencia de la garganta floral, color del filamento del estambre, grado de ramificación y color del estigma. Es necesario indicar la dificultad de separar por las características morfológicas de sus flores, las especies *C. serotinus* y *C. clusii*.

2.2 CARACTERES RELACIONADOS CON LA BRÁCTEA Y LA BRACTÉOLA

2.2.1 TEXTURA DE LA BRÁCTEA

Todas las flores observadas de las especies de *Crocus* presentan brácteas. Su textura es siempre flácida en *C. cambessedesii*, *C. clusii*, y *C. serotinus*. En las restantes especies, si bien al menos el 60% de las flores observadas dentro de cada especie presentan textura flácida de la bráctea, aparece un cierto porcentaje de plantas con bráctea rígida (Figura 118).

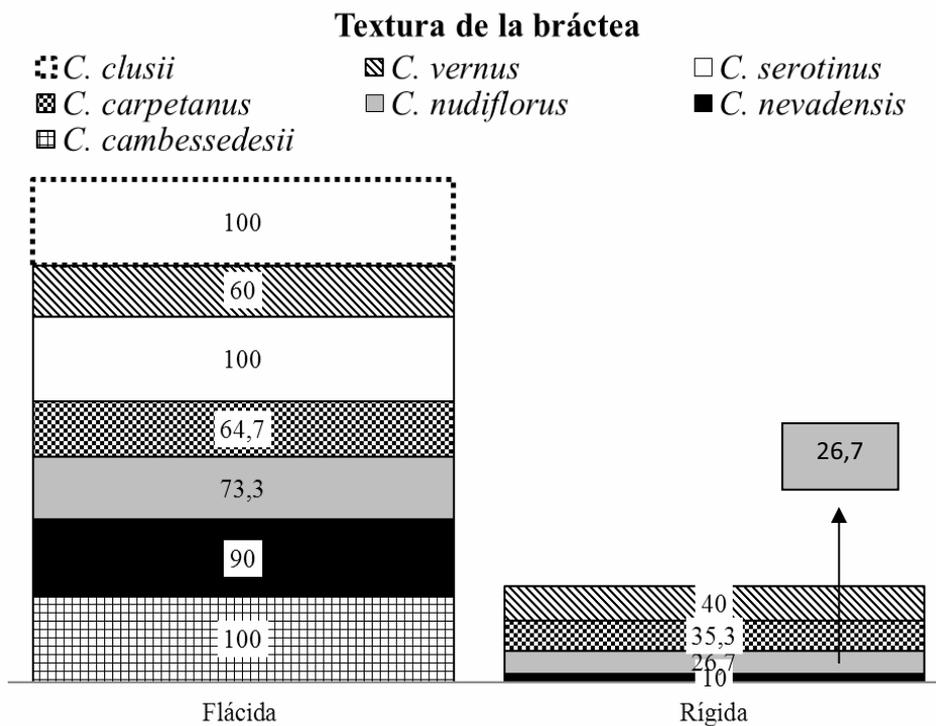
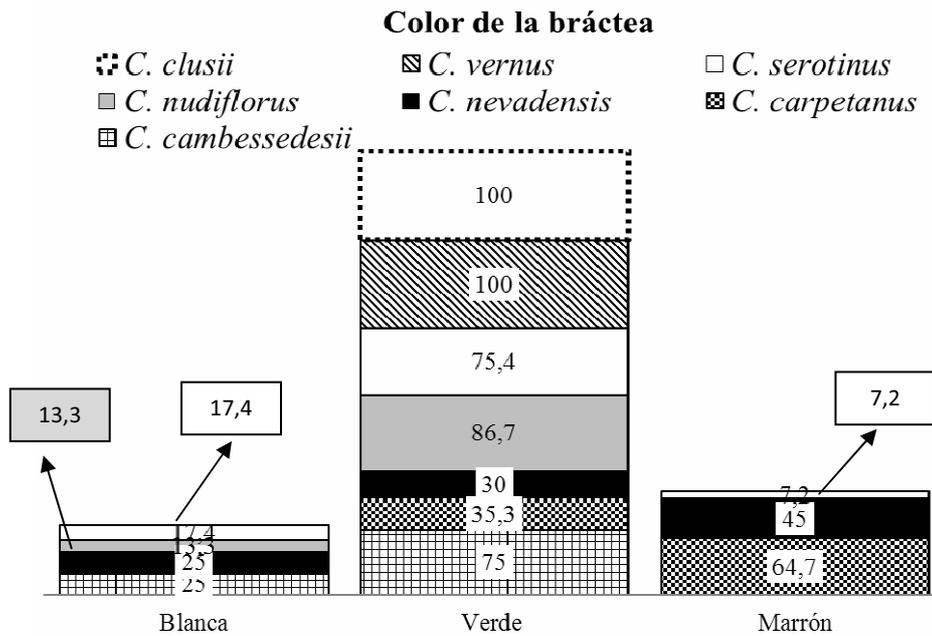


Figura 118 Textura de la bráctea en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

2.2.2 COLOR DE LA BRÁCTEA

Se observan tres colores diferentes de la bráctea: blanco, verde y marrón (Figura 119). El color verde es el más frecuente y es el que aparece invariablemente en *C. clusii* y *C. vernus*. En las restantes especies existe variación intraespecífica, pudiendo presentarse hasta tres colores distintos dentro de una misma especie, como ocurre con *C. nevadensis* (Figura 120).

#### IV. RESULTADOS



**Figura 119** Color de la bráctea en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.



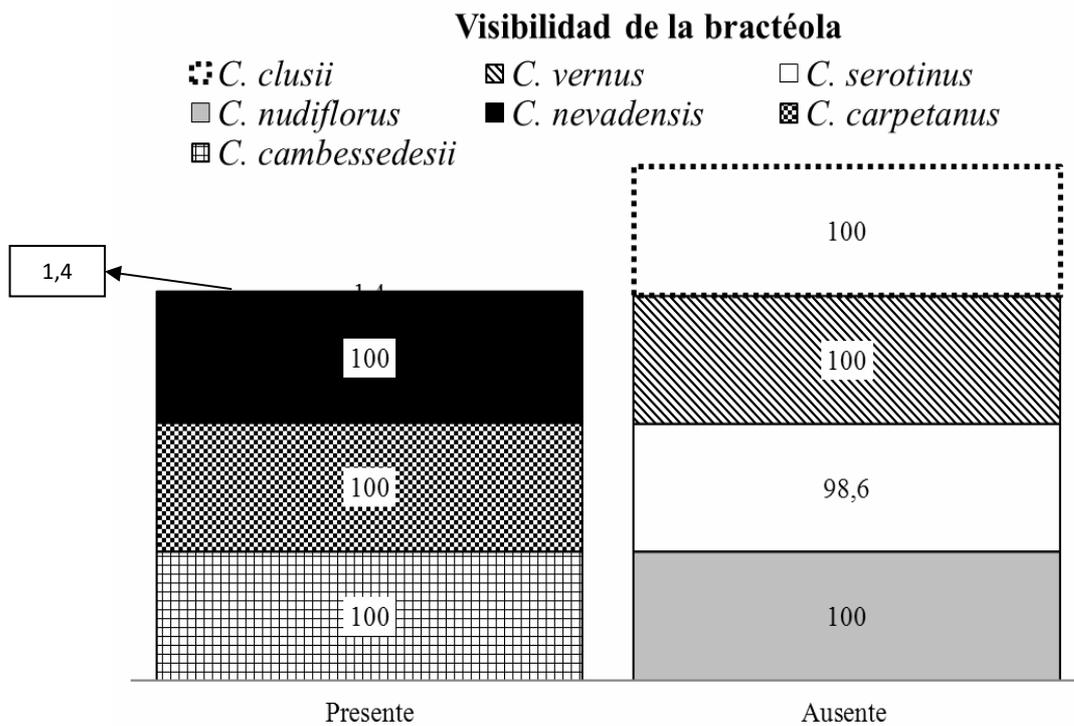
**Figura 120** Variabilidad observada en el color de la bráctea floral el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1 y 2. Blanca: 1. *C. nudiflorus* (BCU002776); 2. *C. nevadensis* (BCU002990); 3. Verde: *C. serotinus* (BCU002619); 4. Marrón: *C. nevadensis* (BCU002694).



**Figura 121** Variabilidad observada en la presencia de la bractéola en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1 y 2. Presente: 1. *C. carpetanus* (BCU002836), 2. *C. nevadensis* (BCU002976); 3 y 4. Ausente: 3. *C. vernus* (BCU002998), 4. *C. serotinus* (BCU003181).

**2.2.3 VISIBILIDAD DE LA BRACTÉOLA**

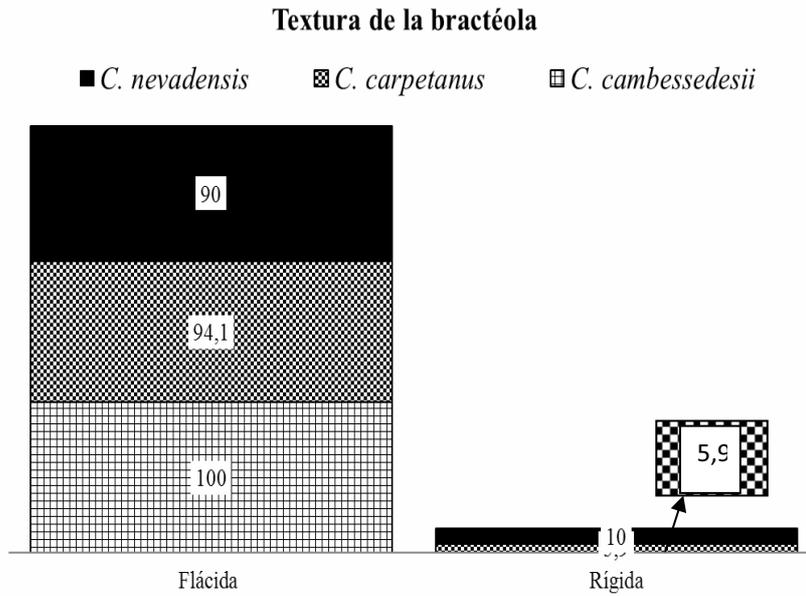
El carácter relativo a la presencia o ausencia de la bractéola varía entre especies pero es casi invariable dentro de cada especie (Figura 122). Así *C. cambessedesii*, *C. carpetanus* y *C. nevadensis* presentan bractéola, mientras que *C. clusii*, *C. nudiflorus* y *C. vernus* no la presentan. En la especie *C. serotinus*, se ha observado un 1,4% de flores con bractéola (Figura 121).



**Figura 122** Visibilidad de la bractéola en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

**2.2.4 TEXTURA DE LA BRACTÉOLA**

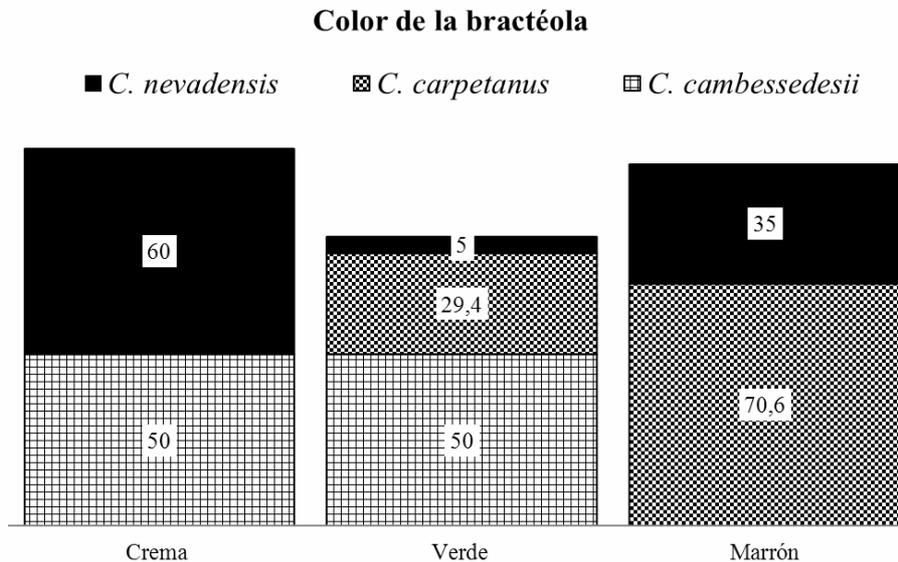
La mayor parte de las bractéolas presentan una textura flácida, pero un bajo porcentaje de plantas de las especies *C. nevadensis* y *C. carpetanus* mostraron una bractéola rígida (Figura 123).



**Figura 123** Textura de la bractéola en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

### 2.2.5 COLOR DE LA BRACTÉOLA

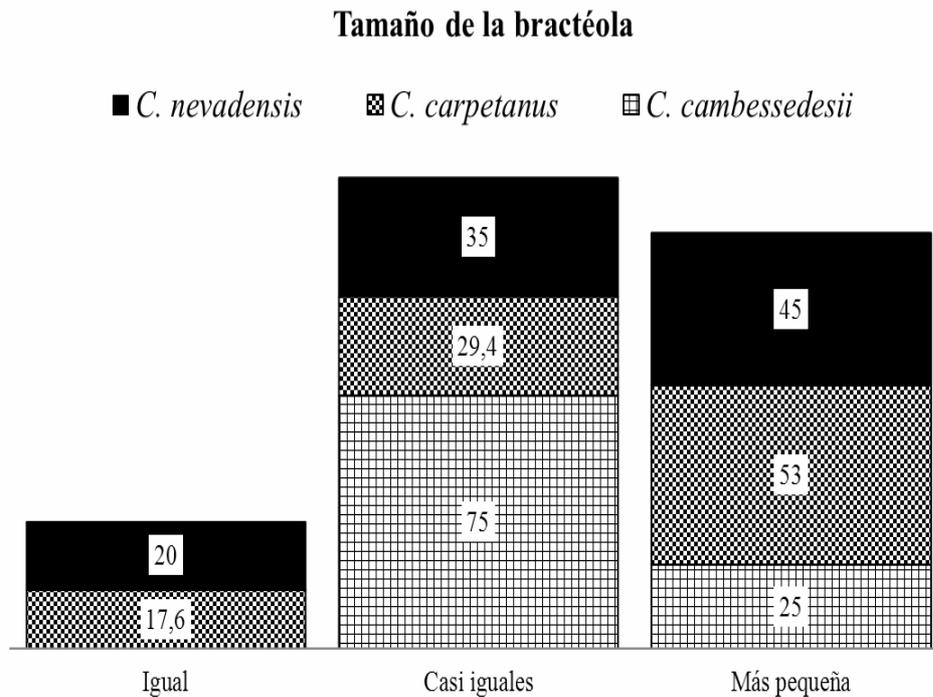
La bractéola presenta los mismos colores que la bráctea. Puede ser crema, verde o marrón y todas las especies muestran al menos dos colores diferentes de bractéola, excepto *C. serotinus* que presenta siempre bractéolas de color verde (Figura 124). *C. nevadensis* puede presentar hasta tres colores diferentes, como ocurría con la bráctea.



**Figura 124** Color de la bractéola en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

### 2.2.6 TAMAÑO DE LA BRACTÉOLA RESPECTO LA BRÁCTEA

El tamaño de la bractéola es variable dentro de las especies que la presentan invariablemente pudiendo ser de menor tamaño, igual o casi igual que la bráctea (Figura 125). El caso menos observado es cuando la bractéola y bráctea muestran una misma longitud. En la especie *C. serotinus*, en que las bractéolas aparecen con muy baja frecuencia, éstas son de menor tamaño que las brácteas (Figura 126).



**Figura 125** Tamaño de la bractéola respecto la bráctea en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.



**Figura 126** Variabilidad observada en el tamaño de la bractéola en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Iguales: *C. carpetanus* (BCU002987); 2 y 3. Casi iguales: *C. nevadensis* (BCU002694, BCU002976); 4. Más pequeña que la bráctea: *C. carpetanus* (BCU002987).

No es posible separar las seis especies en base a estos caracteres. No obstante, se pueden realizar dos grandes grupos: 1. Especies que presentan bractéola: *C.*

## IV. RESULTADOS

*cambessedesii*, *C. nevadensis*, *C. carpetanus* y en ocasiones *C. serotinus*; y 2. Especies que no la desarrollan: *C. nudiflorus* y *C. vernus*, *C. clusii* y *C. serotinus*.

### 2.3 CARACTERES CUALITATIVOS RELACIONADOS CON EL FRUTO

#### 2.3.1 FORMA DE LA CÁPSULA

De las tres formas posibles, oblonga, elipsoide y fusiforme, la forma elipsoide es la más frecuentemente observada en las especies de *Crocus* españolas, y la que aparece de forma invariable en *C. cambessedesii* (Figura 127). No obstante, existe variabilidad dentro de las restantes especies que muestran, al menos, dos formas de cápsula diferentes. Las especies *C. serotinus* y *C. carpetanus* muestran cápsulas de las tres formas posibles (Figura 128).

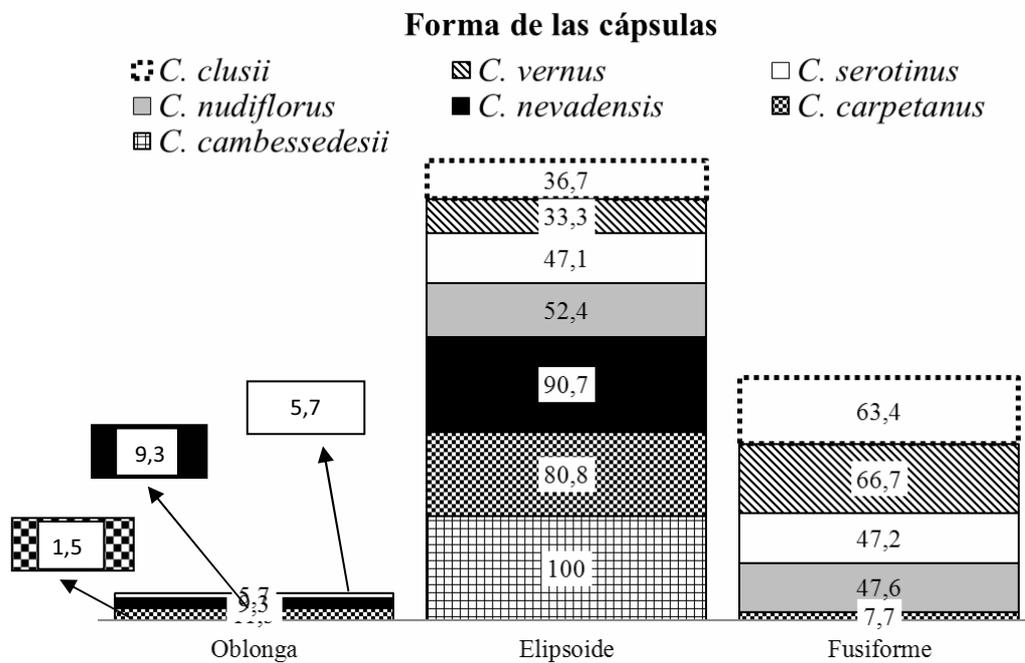
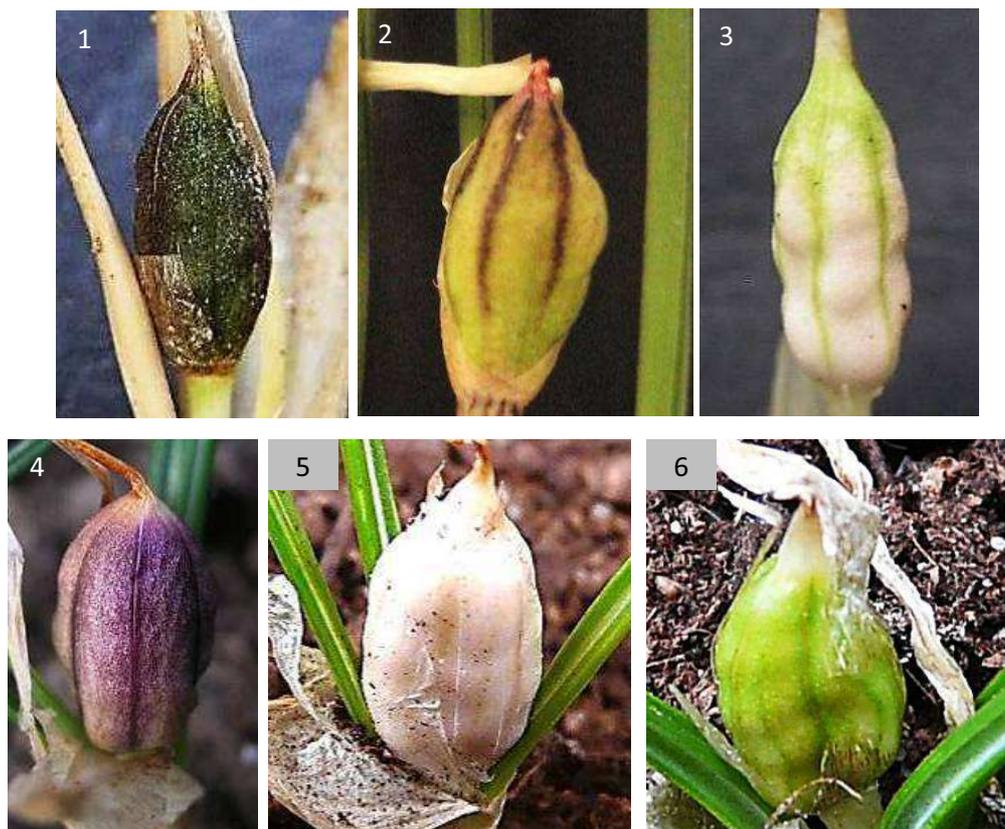


Figura 127 Forma de las cápsulas en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.



**Figura 128** Variabilidad observada en la forma de la cápsula en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1 y 2. Oblonga: 1. *C. carpetanus* (BCU002987), 2. *C. serotinus* (BCU003177); 3 y 4. Elipsoide: 3. *C. nudiflorus* (BCU002944), 4. *C. serotinus* (BCU002775); 5 y 6. Fusiforme: 5. *C. carpetanus* (BCU002987), 6. *C. serotinus* (BCU003174).

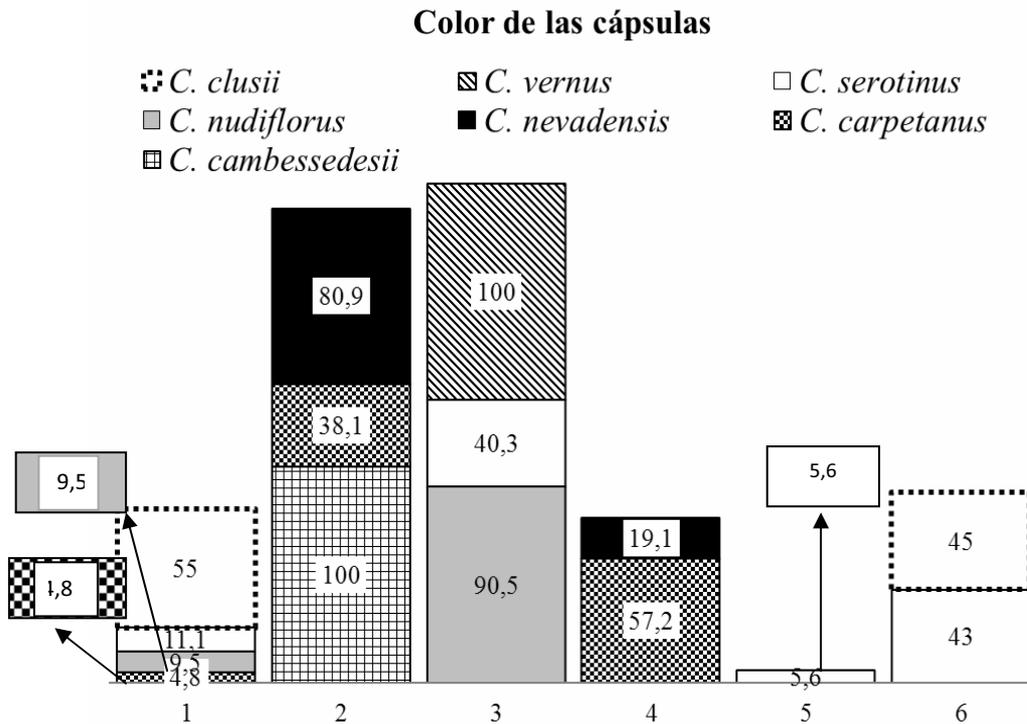


**Figura 129** Variabilidad observada en el color de la cápsula en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Verde uniformemente coloreado: *C. carpetanus* (BCU002987); 2. Verde con rayas moradas: *C. nevadensis* (BCU002871); 3. Amarillas con rayas verdes: *C. vernus* (BCU002998); 4. Morada con rayas moradas oscuras: *C. carpetanus* (BCU002987); 5. Amarilla: *C. nudiflorus* (BCU003123); 6. Verde claro con rayas verde: 6. *C. serotinus* (BCU002775).

## IV. RESULTADOS

### 2.3.2 COLOR DE LA CÁPSULA

Es posible identificar hasta 6 patrones de coloración distintos: cápsula verde uniformemente coloreada, verde con rayas moradas, amarilla con rayas verdes, morada clara con rayas moradas oscuras, amarilla, y verde claro con rayas verde oscuro (Figura 130). Con la excepción de *C. cambessedesii* y *C. vernus*, las especies muestran variabilidad en el color de sus cápsulas, pudiendo presentar 2, 3 y hasta 4 coloraciones diferentes como ocurre en *C. serotinus* (Figura 129).



**Figura 130** Color de la cápsula en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter. Clave: 1. Verde uniformemente coloreado; 2. Verde con rayas moradas; 3. Amarillas con rayas verdes; 4. Morada clara con rayas moradas oscuras; 5. Amarilla; 6. Verde claro con rayas verde oscuro.

## 2.4 CARACTERES CUALITATIVOS RELACIONADOS CON LA SEMILLA

### 2.4.1 FORMA DE LA SEMILLA

La forma de la semilla es uniforme dentro de cada especie pero varía entre especies, pudiendo darse 3 formas distintas especies (Figura 132). La forma globosa es típica de la especie primaveral *C. vernus*, mientras que la forma elíptica es exclusiva de *C. serotinus* y *C. clusii* de floración otoñal temprana (Figura 131). Las restantes 4 especies presentan forma subglobosa.

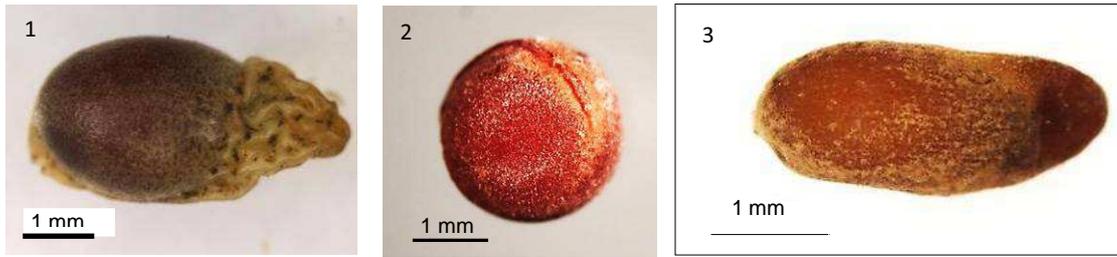


Figura 131 Variabilidad observada en la forma de la semilla en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Subglobosa: *C. carpetanus* (BCU002987); 2. Globosa: *C. vernus* (BCU003198); 3. Elipsoide: *C. serotinus* (BCU002872).

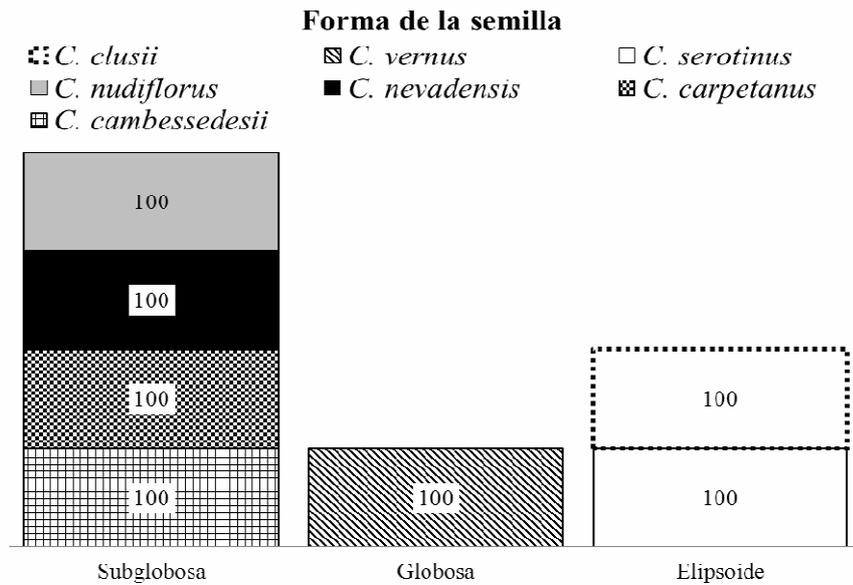


Figura 132 Forma de la semilla en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

#### 2.4.2 SUPERFICIE DE LA SEMILLA

Todas las especies muestran semillas con una superficie más o menos rugosa con la excepción de *C. carpetanus* que muestra siempre semillas con superficie lisa (Figura 134). Ahora bien, mientras en *C. clusii*, *C. nudiflorus*, *C. serotinus* y *C. vernus*, siempre se observa una superficie muy rugosa, en las especies *C. cambessedesii* y *C. nevadensis*, lo mas frecuente es una superficie con menor rugosidad (Figura 133).

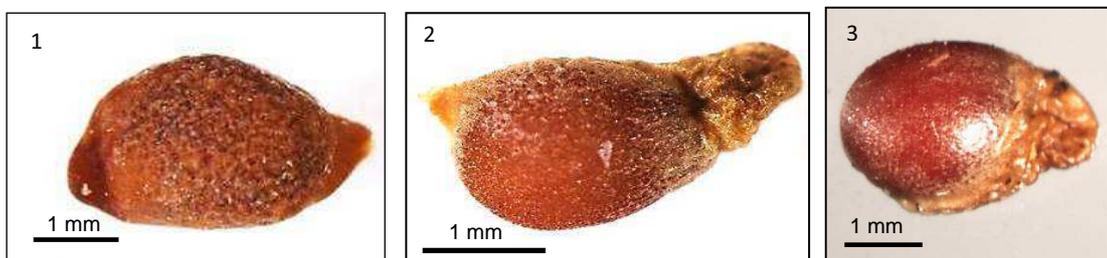


Figura 133 Variabilidad observada en la superficie de las semillas en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Muy rugosa: *C. serotinus* (BCU002775); 2. Algo rugosa: *C. cambessedesii* (BCU001685); 3. Lisa: *C. carpetanus* (BCU002971).

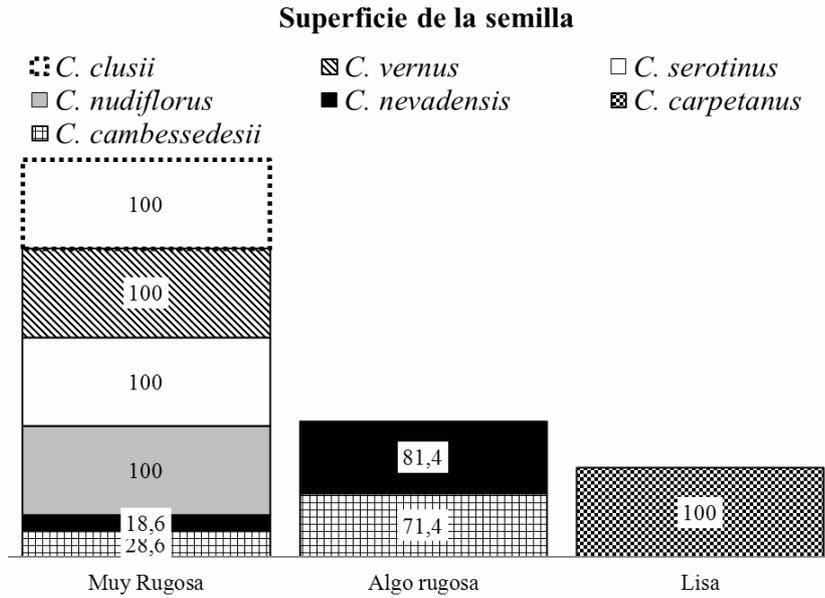


Figura 134 Superficie de la semilla en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

### 2.4.3 COLOR DE LA SUPERFICIE

El color de la superficie de la semilla en las especies de *Crocus* españolas es variable entre especies, pero también dentro de cada especie pueden aparecer dos o tres tonalidades diferentes (Figura 135).

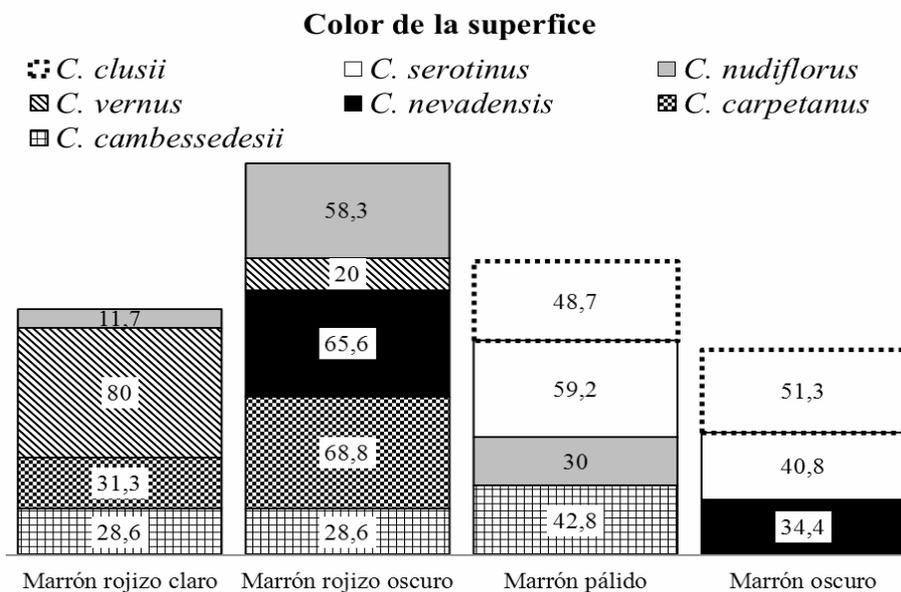
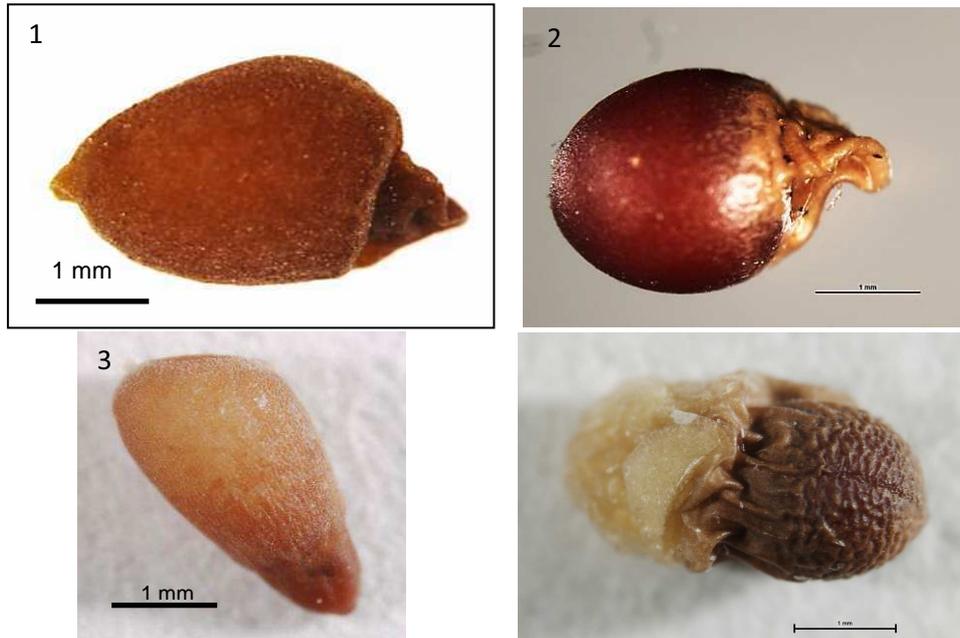


Figura 135 Color de la superficie de la semilla en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

No obstante, podemos generalizar el hecho de que las semillas de *C. carpetanus* y *C. vernus* muestran siempre colores rojizos, mientras que *C. serotinus* y *C. clusii* nunca

muestra este tipo de colores. *C. nevadensis* es la especie que muestra las tonalidades más oscuras (Figura 136).



**Figura 136** Variabilidad observada en el color de la semilla en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Marrón rojizo claro: *C. nudiflorus* (BCU002944); 2. Marrón rojizo oscuro: *C. carpetanus* (BCU002987); 3. Marrón pálido: *C. serotinus* (BCU002775); 4. Marrón oscuro: *C. nevadensis* (BCU002871).

#### 2.4.4 DESARROLLO DE LA CARÚNCULA

El desarrollo de la carúncula en las semillas de *Crocus* varía desde poco desarrollada hasta muy prominente, y puede ser invariable para todas las semillas de la misma especie, o presentar un cierto grado de variación en su desarrollo (Figura 138). Así, las semillas de *C. vernus* siempre muestran una carúncula poco desarrollada, mientras que *C. nevadensis* o *C. carpetanus*, también de floración primaveral, muestran siempre un gran desarrollo de la carúncula. Las especies otoñales *C. clusii*, *C. nudiflorus*, o *C. serotinus*, muestran una carúncula poco o algo desarrollada pero nunca muy prominente, mientras que *C. cambessedesii*, también otoñal muestra frecuentemente una carúncula prominente (Figura 137).



**Figura 137** Variabilidad observada en el desarrollo de la carúncula de las semillas en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Poco desarrollada: *C. vernus* (BCU003198); 2. Prominente: *C. nudiflorus* (BCU002944); 3. Muy prominente: *C. carpetanus* (BCU002987).

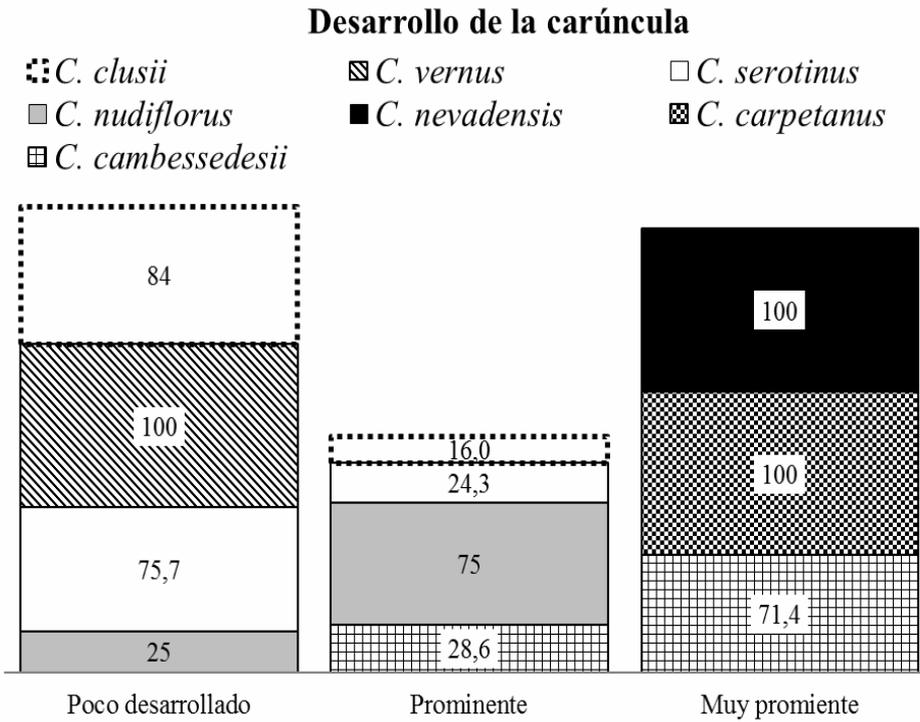


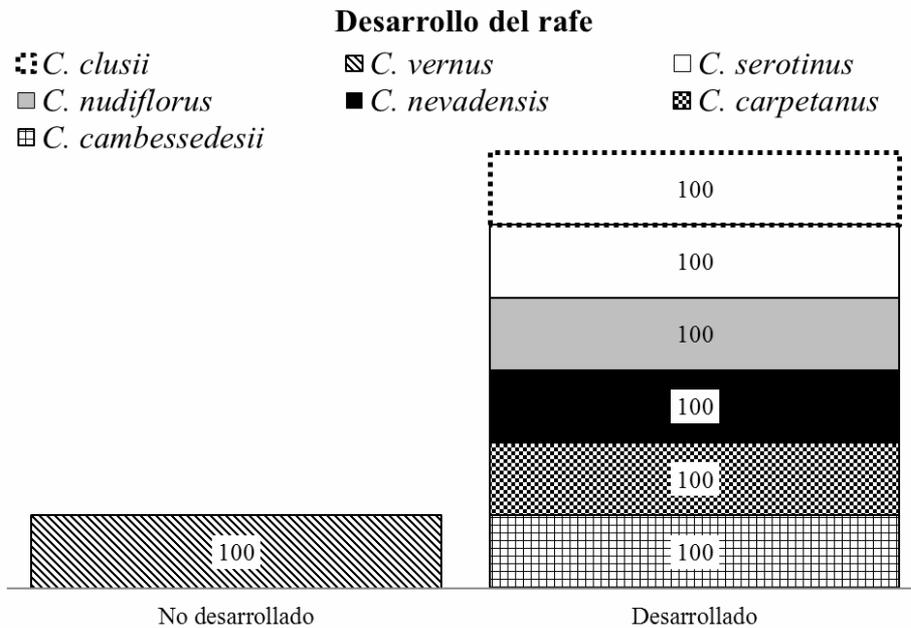
Figura 138 Desarrollo de la carúncula de la semilla en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

#### 2.4.5 DESARROLLO DEL RAFE

Con la excepción de *C. vernus* en que el rafe no está bien desarrollado, todas las semillas *Crocus* españoles muestran desarrollo del rafe de forma invariable (Figura 140).



Figura 139 Variabilidad observada en el desarrollo del rafe en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. No desarrollado: *C. vernus* (BCU003198); 2 y 3. Desarrollado: 2. *C. carpetanus* (BCU002971); 3. *C. cambessedesii* (BCU001685).

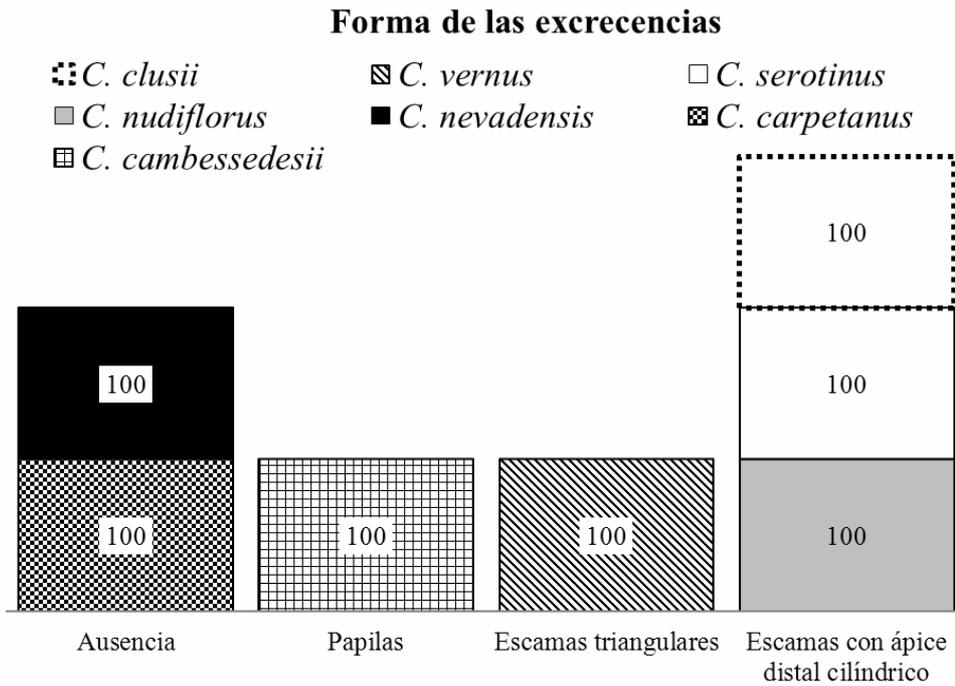


**Figura 140** Desarrollo del rafe de la semilla en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

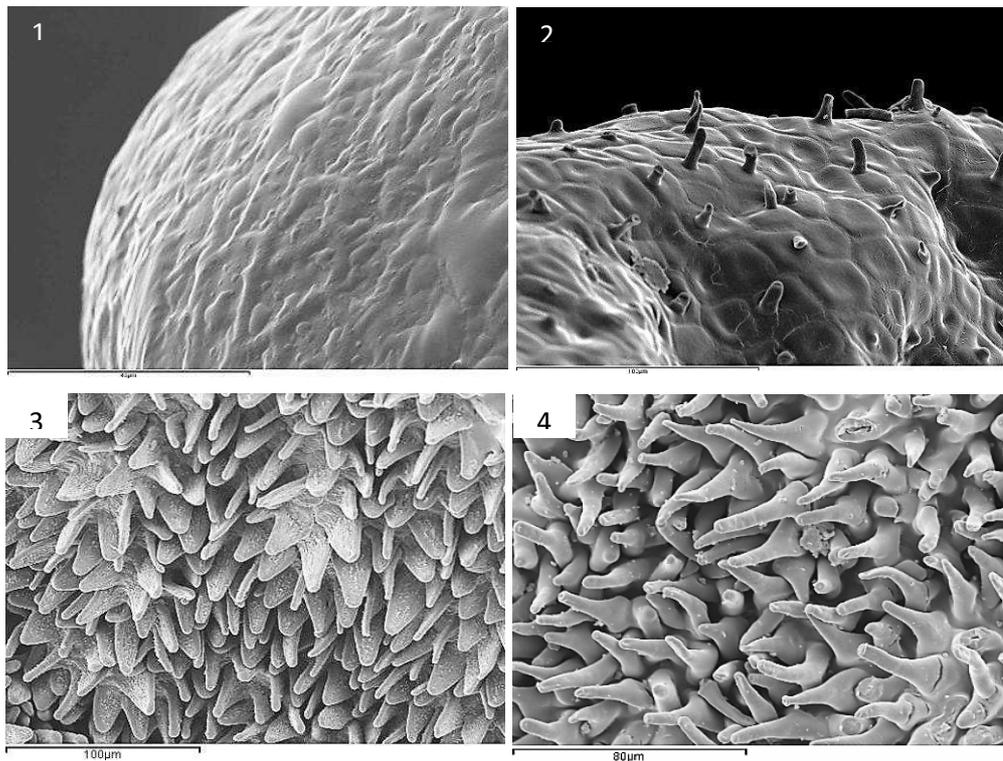
#### 2.4.6 FORMA DE LAS EXCRECENCIAS Y LA PRESENCIA DE CERA

Mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido se ha observado la morfología y el aspecto en detalle de la cubierta seminal de todas las especies de *Crocus* españoles. En base a esta información, se determinan dos descriptores de interés: la forma de las excrecencias presentes en la cubierta de la semilla y la presencia aparente o no de ceras. En el último apartado, se realiza de forma detallada, la caracterización de la cubierta de la semilla de cada una de las especies.

La forma de las excrecencias presentes en la superficie de la semilla varía entre las especies españolas de *Crocus* (Figura 141). Las especies primaverales *C. nevadensis* y *C. carpetanus* muestran una superficie lisa y sin formaciones escumiformes. *C. cambessedesii* desarrolla estructuras papilosas dispersas en la cubierta, mientras que *C. vernus*, *C. clusii*, *C. serotinus* y *C. nudiflorus* contienen escamas de diferentes formas (Figura 142).

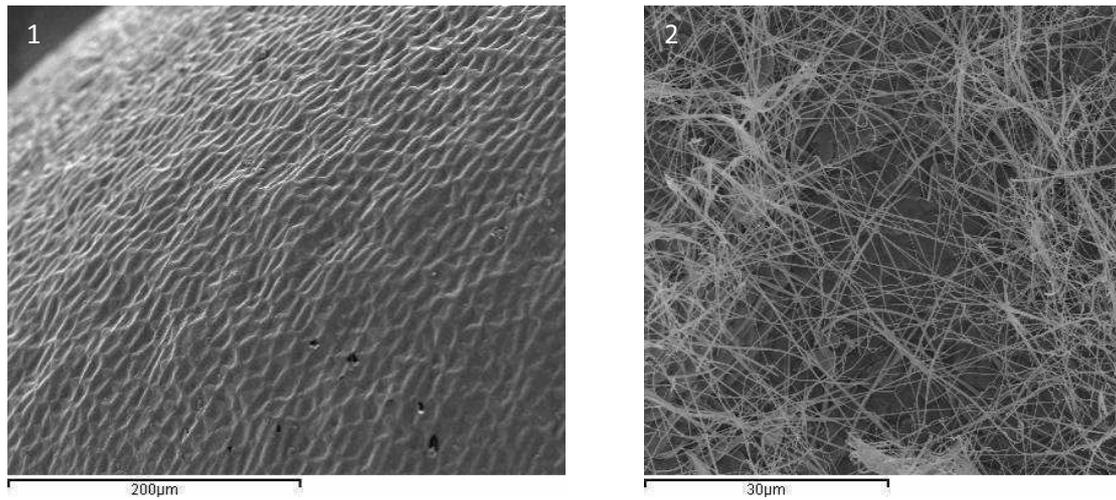


**Figura 141** Forma de las excrecencias en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.



**Figura 142** Variabilidad observada en la forma de las excrecencias en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Ausencia de estructuras: *C. carpetanus* (BCU002987); 2. Papilas: *C. cambessedesii* (BCU001685); 3. Escamas triangulares: *C. vernus* (BCU003198); 4. Escamas con ápice distal cilíndrico: *C. nudiflorus* (BCU003176).

La especie *C. nevadensis* es la única que presenta un entramado denso de fibras ceras (Figura 143).



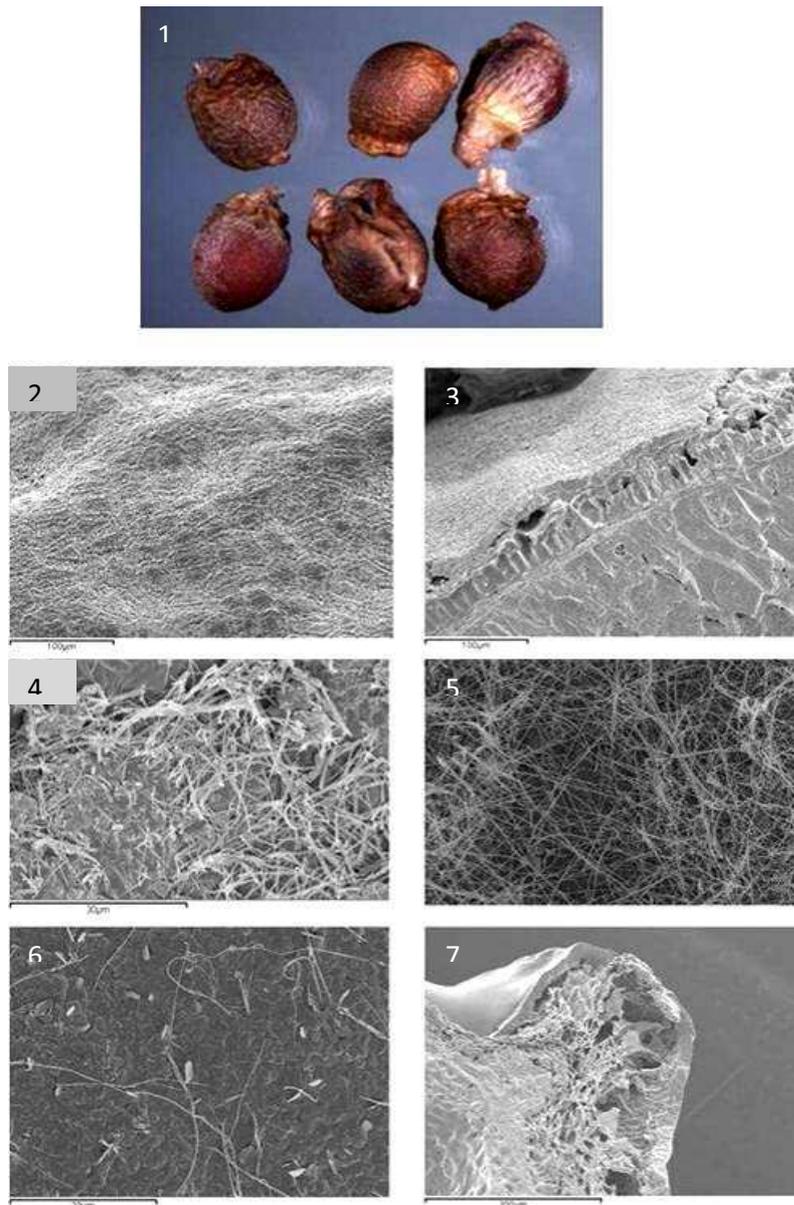
**Figura 143** Variabilidad observada en la presencia de ceras en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. No aparentes: *C. carpetanus* (BCU002987); 2. Muy aparentes: *C. nevadensis* (BCU002981).

#### **2.4.7 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LA SUPERFICIE DE LAS SEMILLAS ESPAÑOLAS DE *CROCUS***

En este apartado se muestra un estudio detallado de la superficie de la semilla de cada especie. En la especie *C. nevadensis* se han estudiado entradas procedentes de Jaén y de Cuenca, y presentan una morfología común (Figura 144). Con microscopía electrónica se aprecia en todas las entradas un entramado de fibras ceras más o menos concentrado según la zona de superficie y que es la característica típica de esta especie y que no observamos en las restantes. Este aspecto regularmente reticulado de la superficie es la característica diferencial de estos materiales.

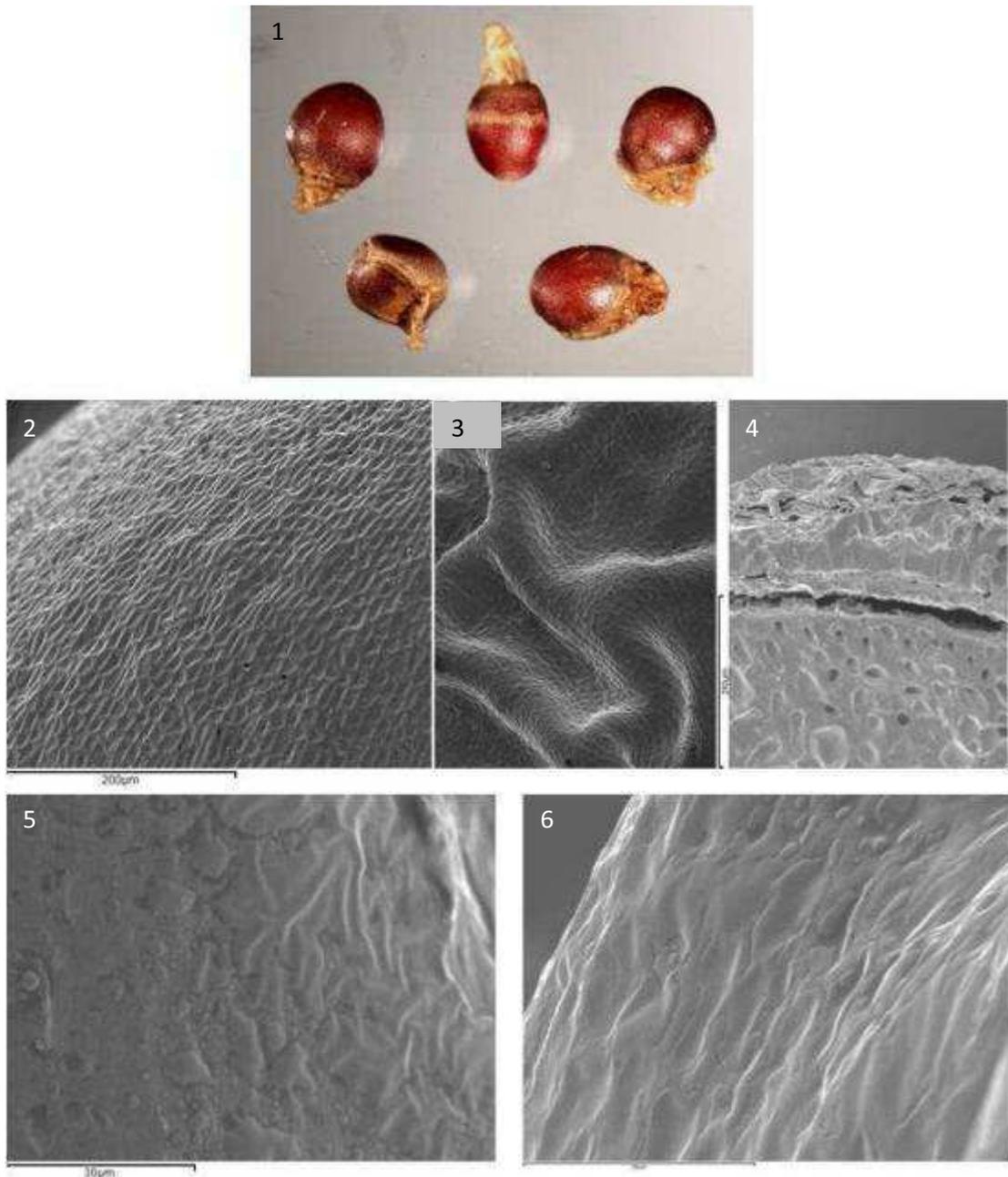
## IV. RESULTADOS

---



**Figura 144** Semillas de *C. nevadensis*. 1. Morfología observada a lupa (BCU002969). 2 y 3. Aspecto exterior y sección transversal de la cubierta observado a microscopio de barrido (BCU002969). 4 y 5. Entramado de fibras céreas en dos diferentes entradas (BCU002969, BCU002981). 6. Entramado de fibras céreas con baja densidad en otra zona de la cubierta (BCU002981). 7. Aspecto en la zona del funículo (BCU002981).

En la especie *C. carpetanus*, las semillas tienen la superficie de apariencia lisa a simple vista, pero cuando se observa a microscopio electrónico de barrido se aprecia que está finamente reticulada y no presenta fibras céreas (Figura 145).

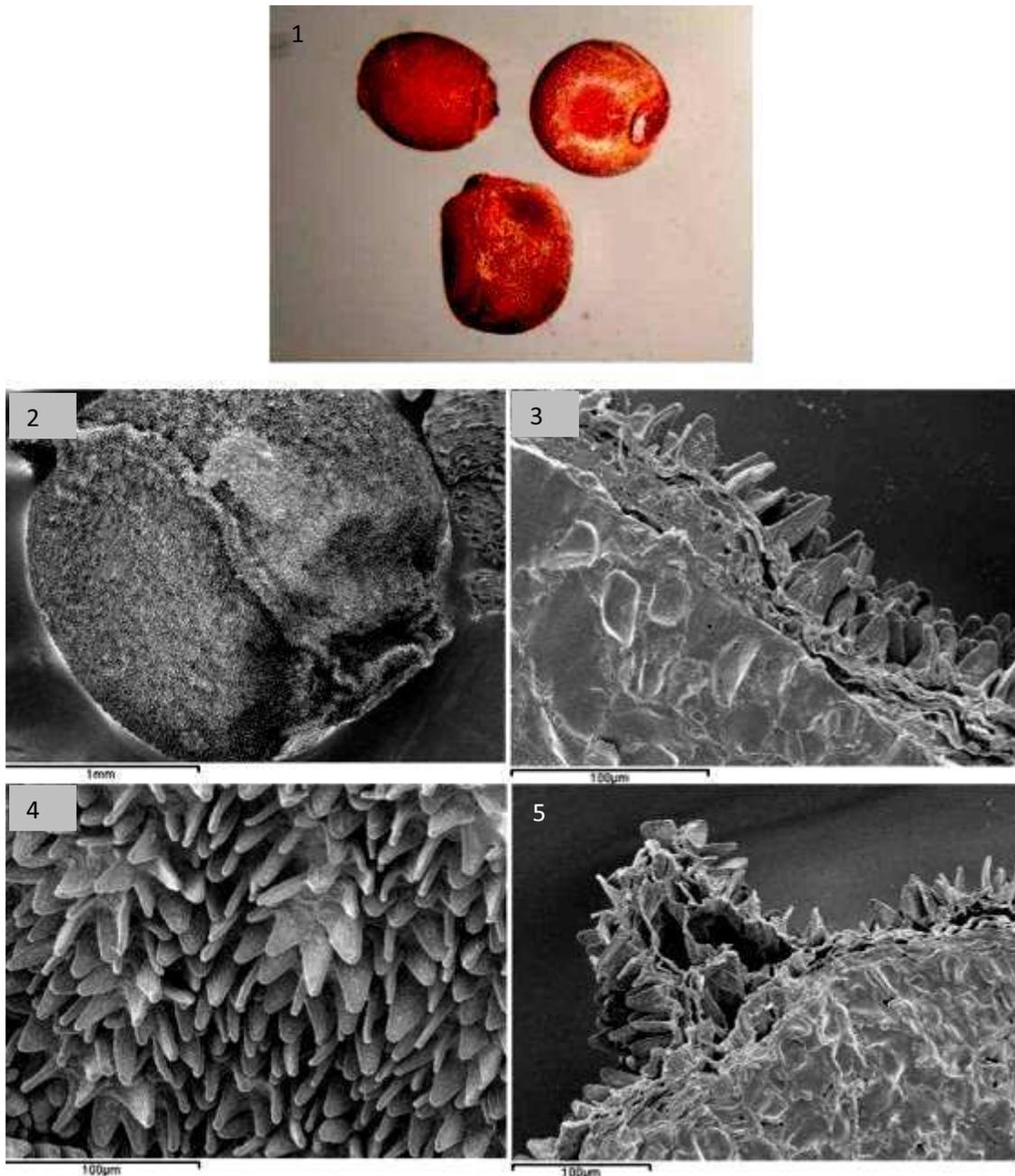


**Figura 145** Semillas de *C. carpetanus*. 1. Morfología observada a lupa. 2, 3 y 4. Aspecto exterior y sección transversal de la cubierta observada a microscopio de barrido. 5. Cubierta en la zona del rafe. 6. Cubierta en la zona de la carúncula. Fig. 1-6 de entrada BCU002971.

## IV. RESULTADOS

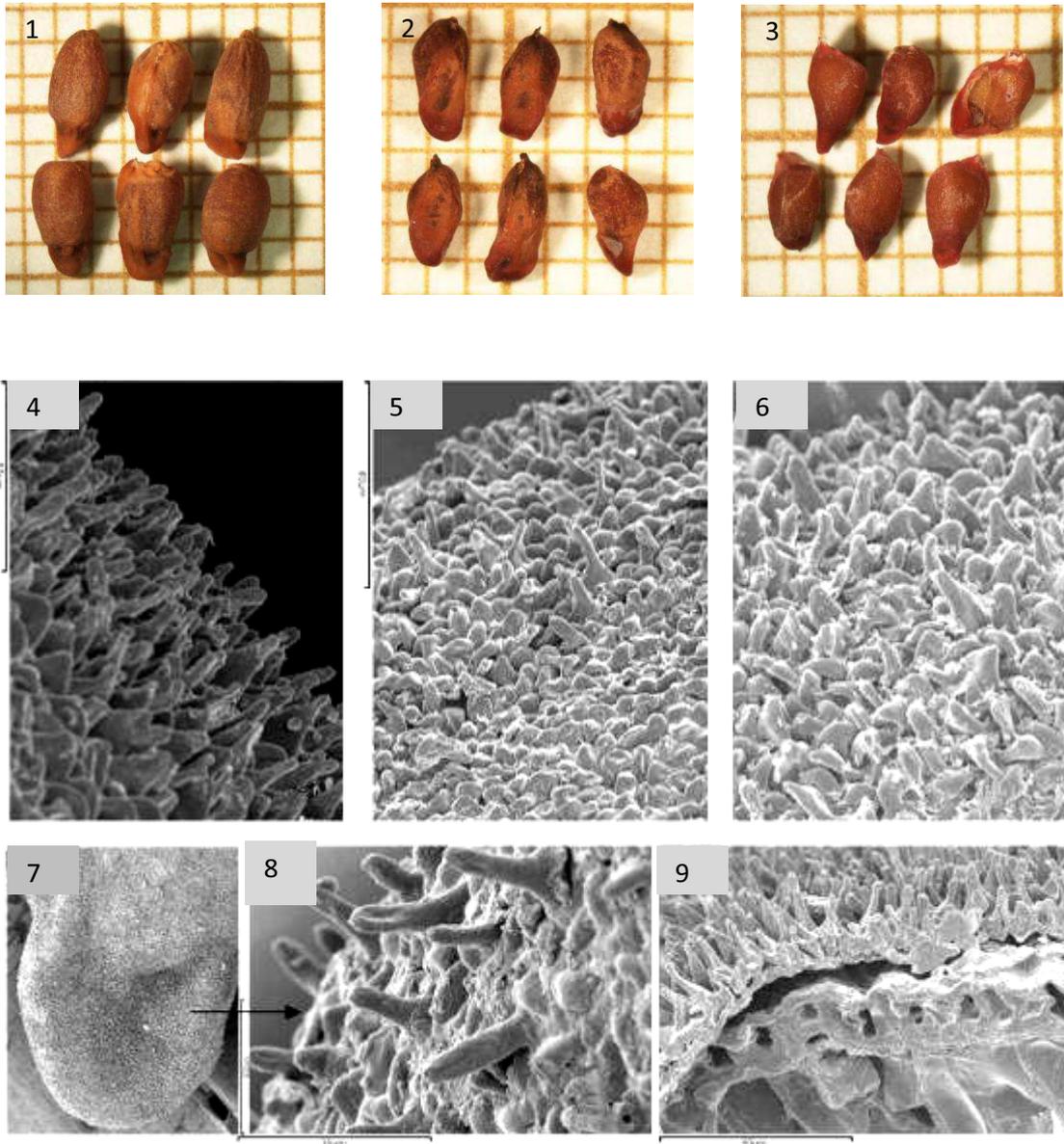
---

En la especie *C. vernus* la superficie de la semilla es algo aterciopelada con rugosidades. A microscopía electrónica de barrido se observan papilas de forma triangular, y comprimidas lateralmente, con disposición bastante densa en toda la superficie tanto de la cubierta como del rafe (Figura 146).



**Figura 146** Semillas de *C. vernus*. 1. Morfología observada a lupa. 2 y 3. Aspecto exterior y sección transversal de la cubierta observado a microscopio de barrido. 4. Papilas en la cubierta. 5. Cubierta en la zona del rafe. Fig. 1-5 de la entrada BCU003198.

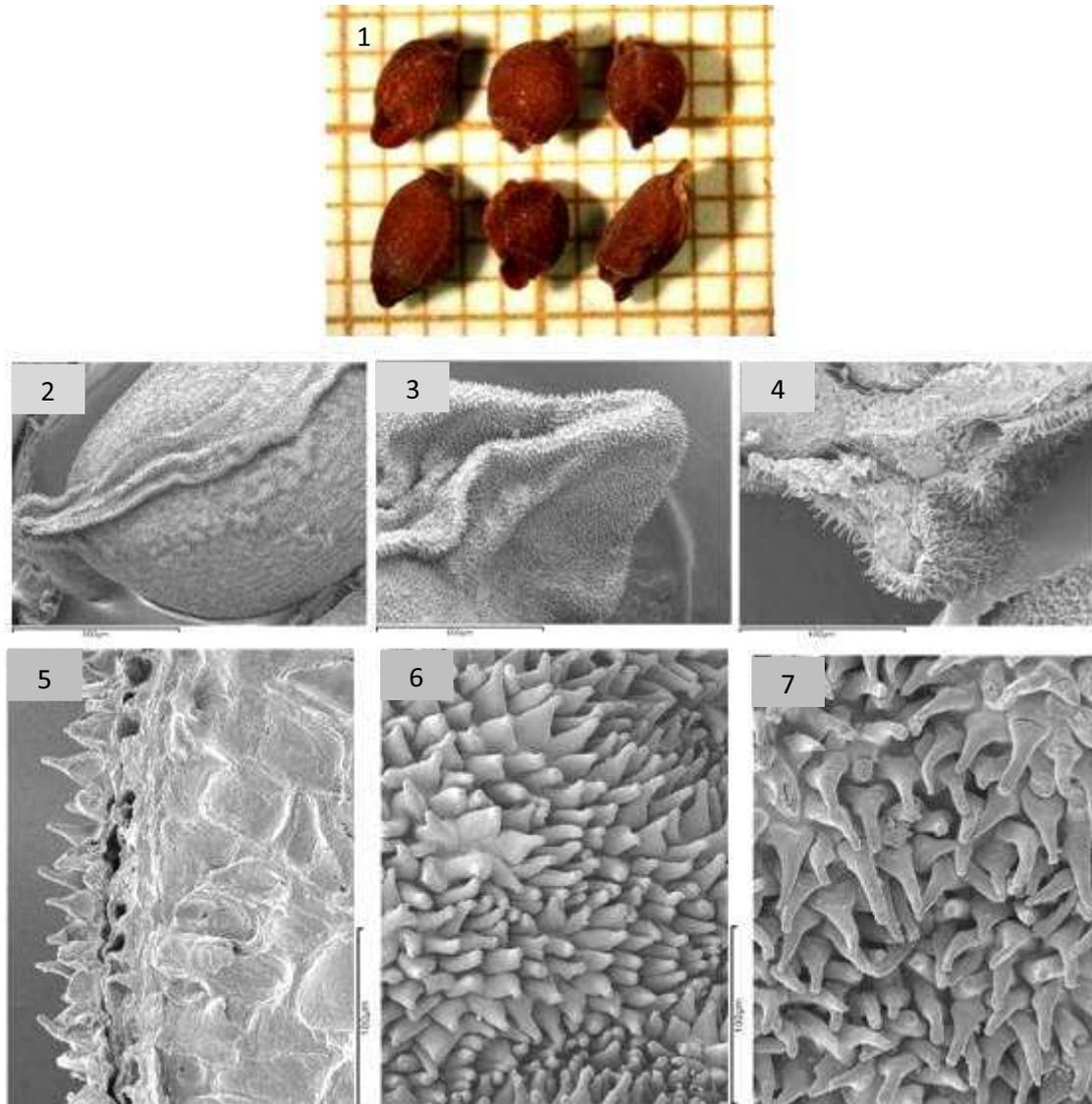
En las 3 especies otoñales de floración temprana, *C. serotinus*, *C. clusii* y *C. nudiflorus*, las papilas son de base triangular pero con un apéndice distal cilíndrico. Las semillas de *C. serotinus* y *C. clusii* muestran una superficie más o menos aterciopelada debido a la presencia de las papilas y la densidad de las mismas disminuye en la zona de la carúncula. No aparecen diferencias claras entre *C. serotinus* y *C. clusii* (Figura 147).



**Figura 147** Semillas de *C. serotinus* y *C. clusii*. 1-3. Morfología observada a lupa: 1. *C. serotinus* (BCU002550); 2 y 3. *C. clusii* (BCU002966, BCU002963). 4-6. Papilas en cubierta: 4. *C. serotinus* (BCU002970); 5 y 6. *C. clusii* (BCU002966, BCU002963). 7. Aspecto exterior de la zona de la carúncula: *C. serotinus* (BCU002970); 8. Papilas en la zona de la carúncula: *C. clusii* (BCU002966); 9. Sección transversal de la cubierta: *C. serotinus* (BCU001657).

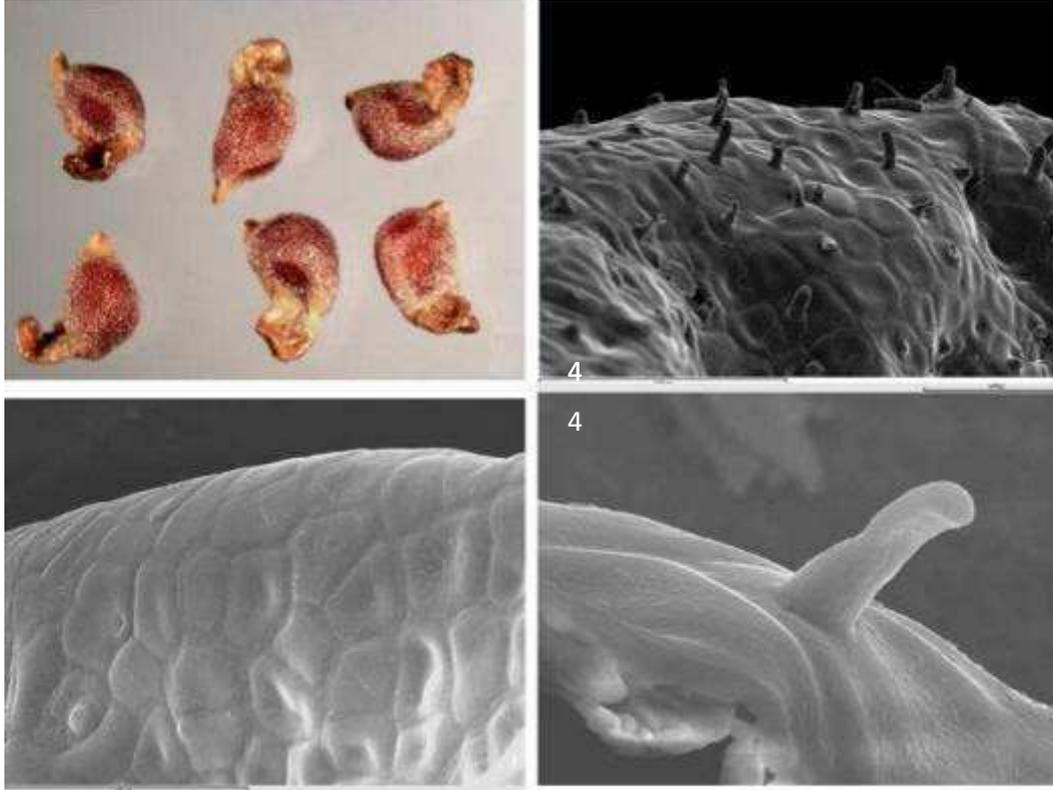
#### IV. RESULTADOS

La cubierta de las semillas de la especie *C. nudiflorus* no presentaron diferencias entre las entradas estudiadas y son también difíciles de diferenciar de la especie *C. serotinus*, ya que muestra un aspecto algo aterciopelado por la presencia de papilas de similar morfología. En la zona de la carúncula no se observa una disminución de la densidad de las papilas (Figura 148 ).



**Figura 148** Semillas de *C. nudiflorus*. 1 Morfología observada a lupa. 2. Aspecto de la cubierta observado a microscopía electrónica de barrido y (3) detalle de la zona de la carúncula y (4) del rafe. 5. Sección transversal de la cubierta. 6 y 7. Papilas en cubierta de dos entradas diferentes de esta especie. Fig. 1-6 de entrada BCU002944 y Fig. 7 de entrada BCU003176.

Las semillas de la única entrada de *C. cambessedesii* considerada para este apartado presentan una superficie de aspecto también algo aterciopelado. Cuando se observa a microscopio electrónico de barrido, muestra una apariencia de retículo con papilas cilíndricas dispuestas de forma poco densa. Este aspecto le diferencia de las demás especies estudiadas (Figura 149).



**Figura 149** Semillas de *C. cambessedesii*. 1. Morfología observada a lupa. 2. Aspecto de la cubierta observado a microscopía electrónica de barrido. 3. Detalle de la zona sin papilas. 4. Detalle de una papila. Fig. 1-4 de entrada BCU001653.

#### 2.4.8 GUÍA DE IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *CROCUS* EN BASE A LA MORFOLOGÍA DE LA SEMILLA

Los caracteres relacionados con la morfología de la semilla que han sido observados en microscopía, podrían utilizarse para separar la mayoría de las especies, tal y como se expone en la siguiente tabla. Tal y como sucedía con los caracteres relacionados con la morfología floral, la bráctea y bractéola, y con los caracteres del fruto, a partir de la morfología de la semilla tampoco es posible separar las especies *C. clusii* y *C. serotinus*.

## IV. RESULTADOS

En la Figura 150, se presenta una posible diferenciación entre especies en base a la semilla.

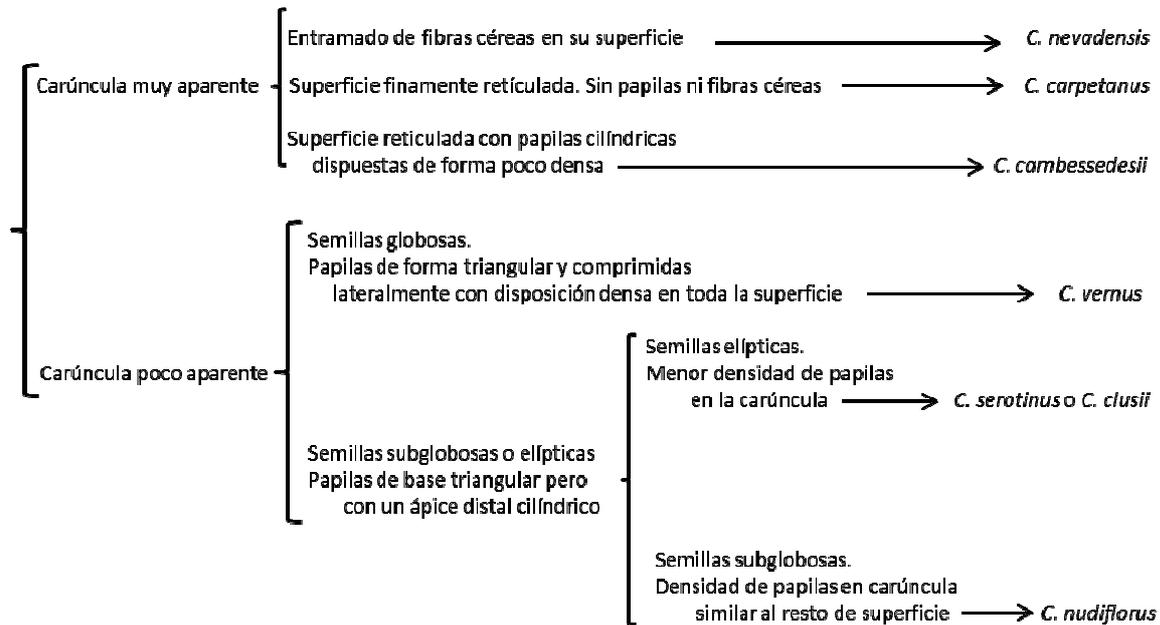


Figura 150 Diferenciación entre especies españolas de *Crocus* en base a la morfología de la semilla y la superficie de su cubierta.

## 2.5 CARACTERES CUALITATIVOS RELACIONADOS CON LA HOJA

La hoja de las especies de *Crocus* no muestra diferencias evidentes en cuanto al color. El descriptor forma de la sección transversal de la hoja es variable entre especies y útil a la hora de diferencias entre algunas de ellas. Para completar la caracterización, se realiza un estudio de la anatomía de las hojas mediante técnicas microscópicas, que permiten la separación entre las especies.

### 2.5.1 FORMA DE LA HOJA

La forma de la hoja es muy variable entre especies, pero la estructura fundamental se conserva entre entradas de la misma especie (Figura 151). La sección transversal cilíndrica se observa únicamente en la especie primaveral *C. carpetanus*. Las especies de alta montaña *C. vernus* y *C. nudiflorus* desarrollan una sección en forma de T (el limbo de la hoja alcanza una anchura superior a la que tiene la quilla). Las especies *C. nevadensis*, *C. serotinus*, *C. clusii* y *C. cambessedesii* desarrollan una sección transversal en forma de doble T, que se observa cuando el limbo tiene una anchura inferior al doble de anchura que tiene la quilla (Figura 152). No obstante, se ha observado cierta variabilidad dentro de la especie *C. serotinus*, aunque la anatomía básica permanece constante.

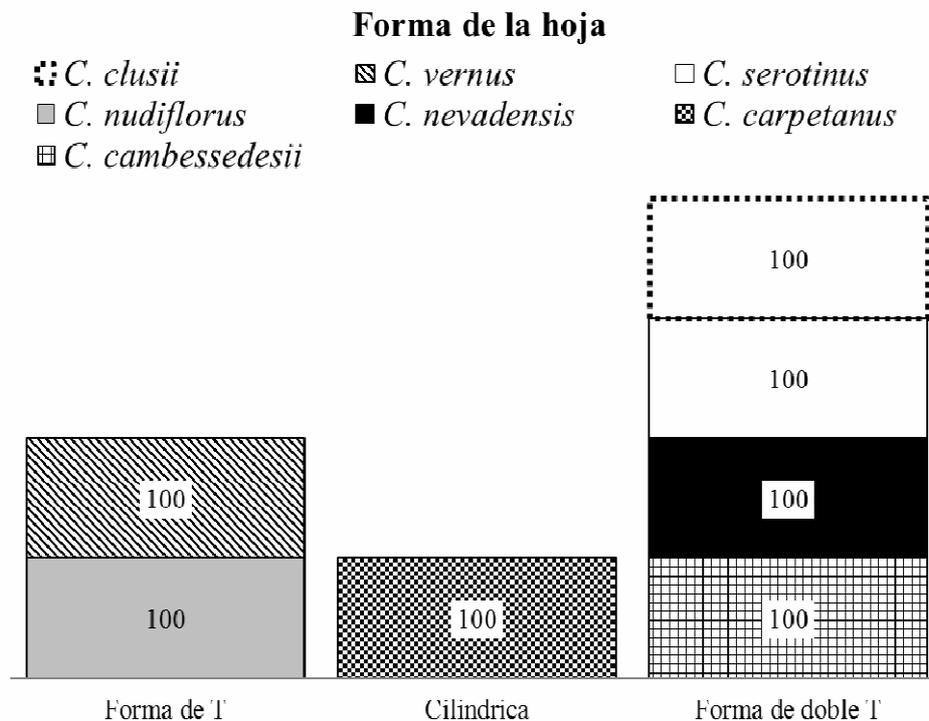
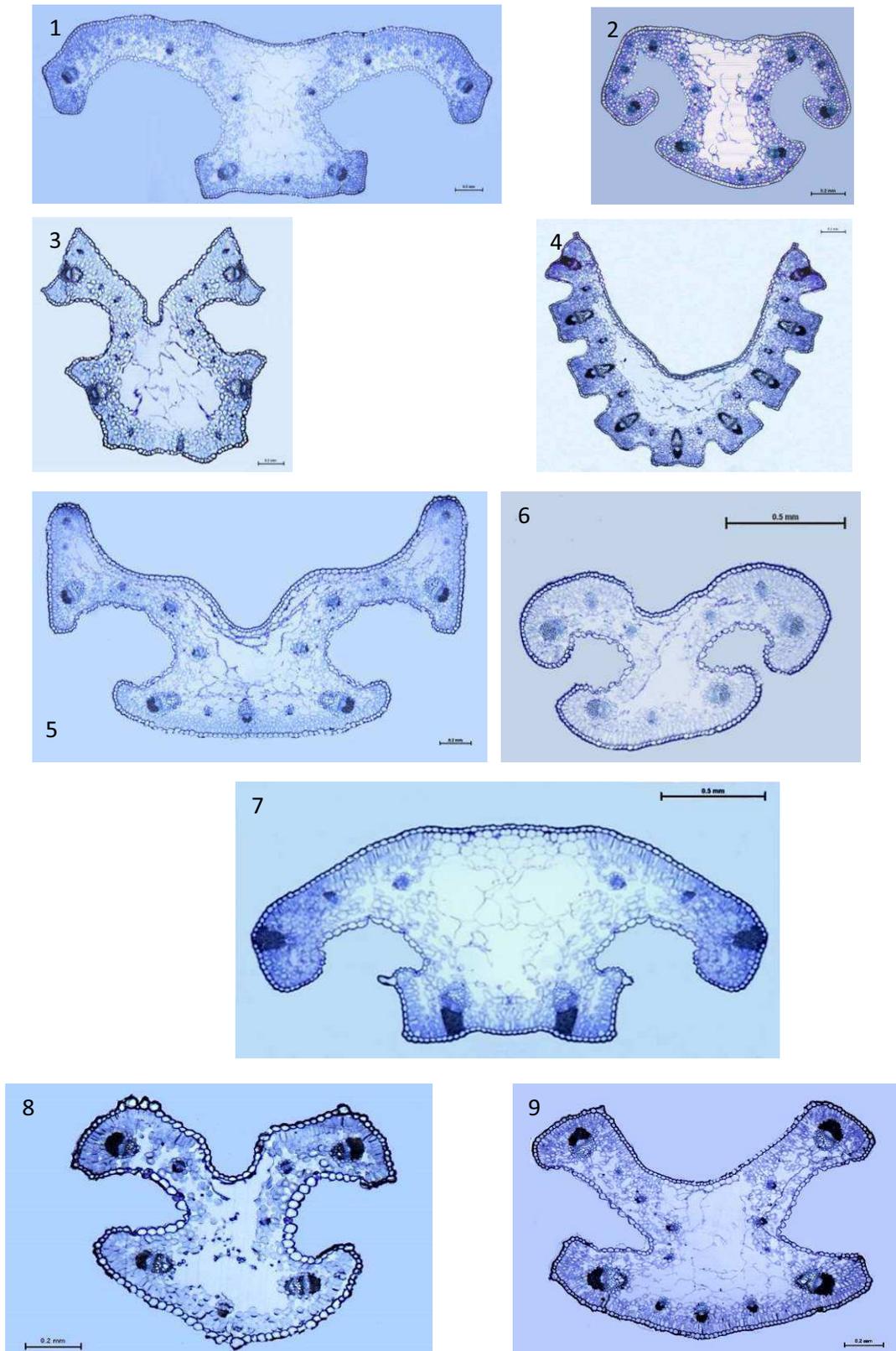


Figura 151 Forma de la sección transversal de la hoja en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

## IV. RESULTADOS



**Figura 152** Variabilidad observada en la sección transversal de la hoja en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-3. Forma de T: 1. *C. nudiflorus* (BCU003176), 2. *C. vernus* (BCU003198), 3. *C. nevadensis* (BCU002359); 4. Forma redondeada: *C. carpetanus* (BCU002835); 5-9. Forma de doble T: 5. *C. cambessedesii* (BCU001680), 6 y 7. *C. serotinus* (BCU002775 y BCU001657); 8-9. *C. clusii* (BCU002960 y BCU002963).

### 2.5.2 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LA ANATOMÍA DE LA HOJA DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE *CROCUS*.

La anatomía de la hoja de *C. nevadensis* se observa en la Figura 153. La sección transversal nos muestra una hoja en forma tipo T, pero con una quilla muy aparente, con crestas poco marcadas, y de mayor tamaño que la parte superior del limbo. Debido al gran tamaño de la quilla en relación con la anchura del limbo de la hoja, ésta es casi cuadrangular. Tiene una anchura de 2mm. La epidermis presenta estomas en el haz y en el envés, tanto en la cavidad anterior a la quilla como entre las crestas de la misma. Se observa parénquima en empalizada en el haz y esponjoso en el envés, así como una amplia zona central de parénquima acuífero. Se observan 14 haces vasculares con 4 de ellos de mayor tamaño en los extremos del haz y del envés.

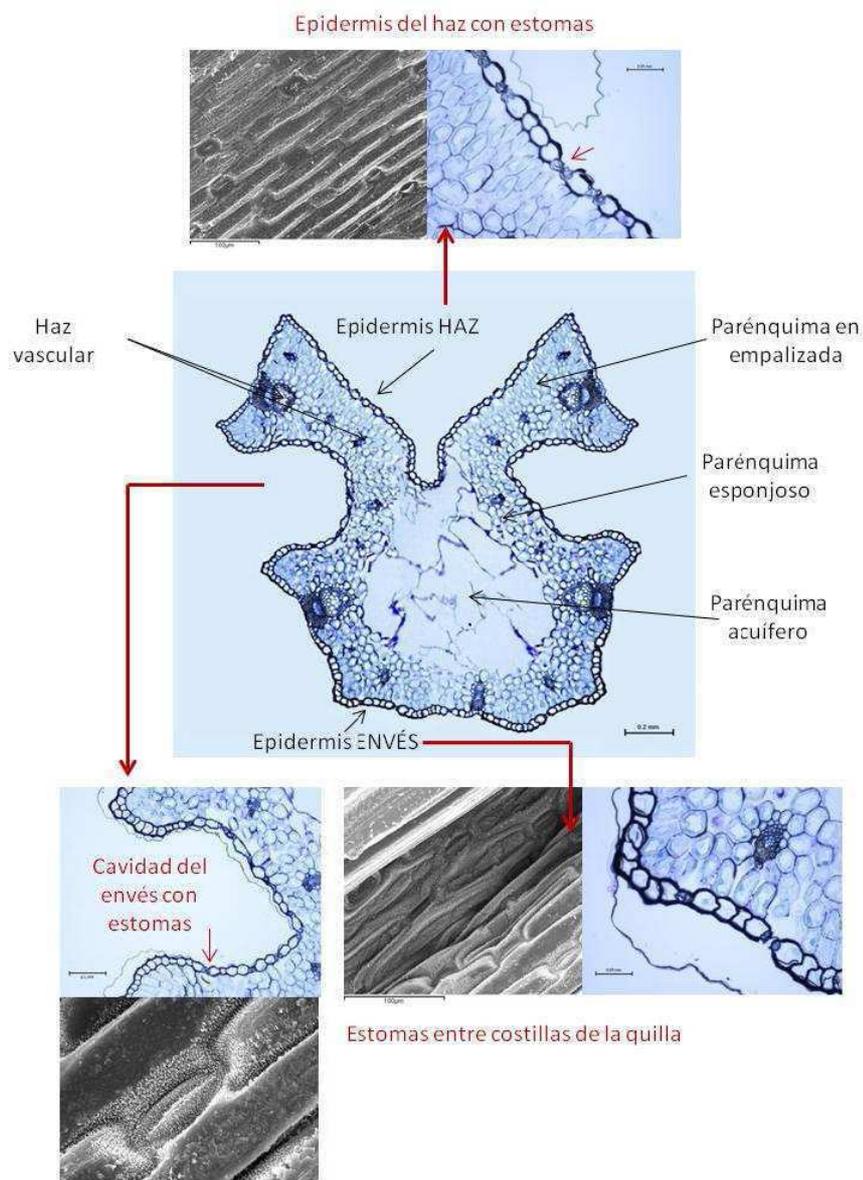


Figura 153 Anatomía de la hoja de *C. nevadensis* (BCU002359).

#### IV. RESULTADOS

La hoja de *C. carpetanus* (Figura 154) es una hoja de tipo semicilíndrico en cuyo envés se aprecian numerosas costillas. La epidermis del haz posee escasos estomas y la del envés presenta estas estructuras en las cavidades que quedan entre las costillas de la hoja. En la parte superior, junto a la epidermis, aparece un parénquima acuífero. El parénquima en empalizada se encuentra en el envés, justo en la parte más externa de la costilla de la hoja. Por encima de éste, se observa el parénquima esponjoso. Posee 9 haces vasculares mayores situados en las costillas de la hoja y 8 haces más pequeños en los espacios entre las costillas. La anatomía de esta hoja es inconfundible con la de las restantes especies.

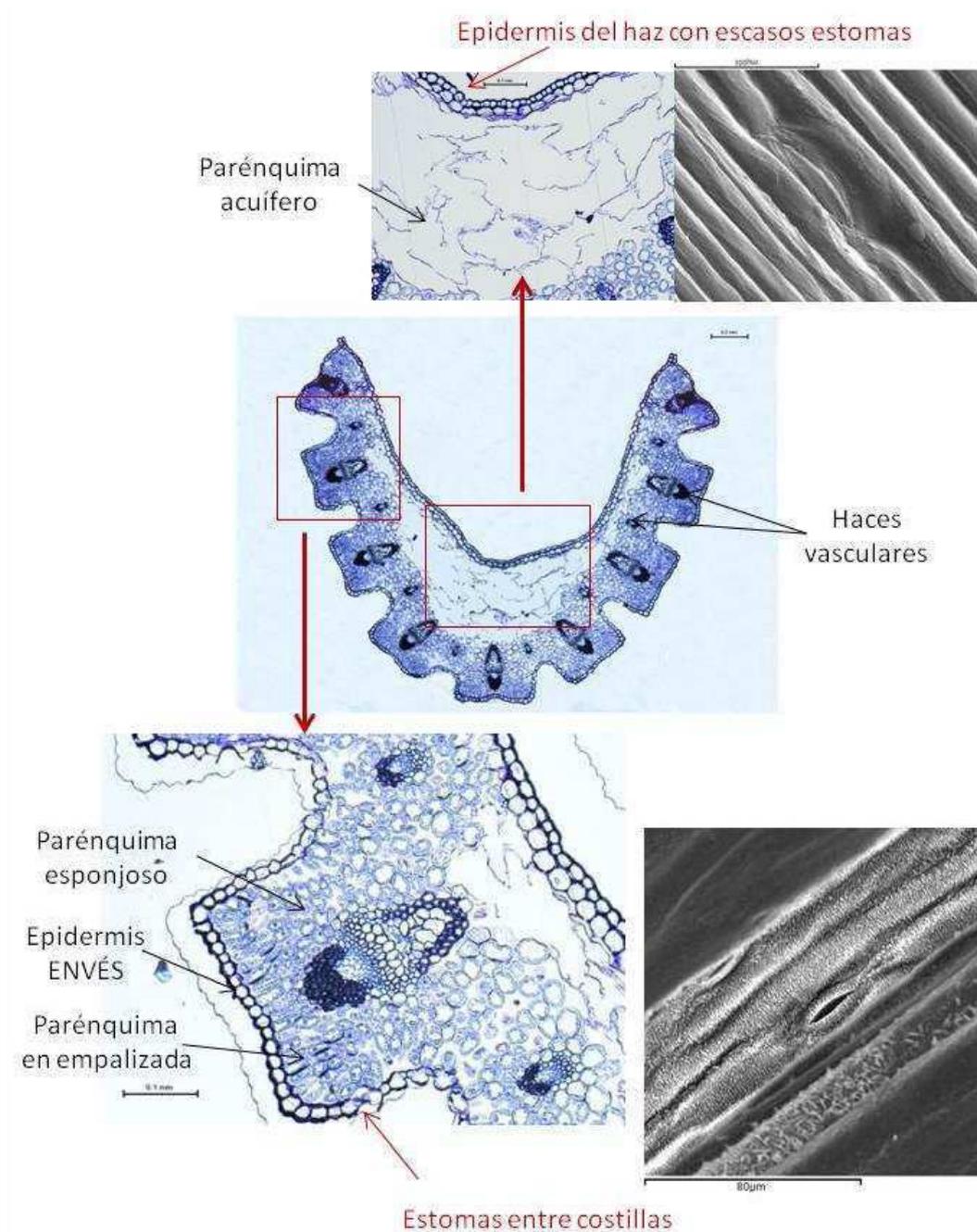


Figura 154 Anatomía de la hoja de *C. carpetanus* (BCU002835).

La hoja de *C. vernus* (Figura 155) muestra la clásica forma de T en sección transversal, con una quilla plana, sin crestas, y de menor anchura que el limbo. Los extremos del limbo se pliegan, sobre sí mismos, dando una mayor protección frente a una posible pérdida excesiva de agua. La epidermis del haz muestra muy escasos estomas y la del envés, a nivel del extremo de la quilla, ninguno. Los estomas se concentran en la cavidad del envés donde son numerosos. La hoja posee parénquima en empalizada hacia el haz, parénquima acuífero en la zona central y parénquima esponjoso hacia el envés. Posee 8 haces vasculares de mayor tamaño y 5 menores.

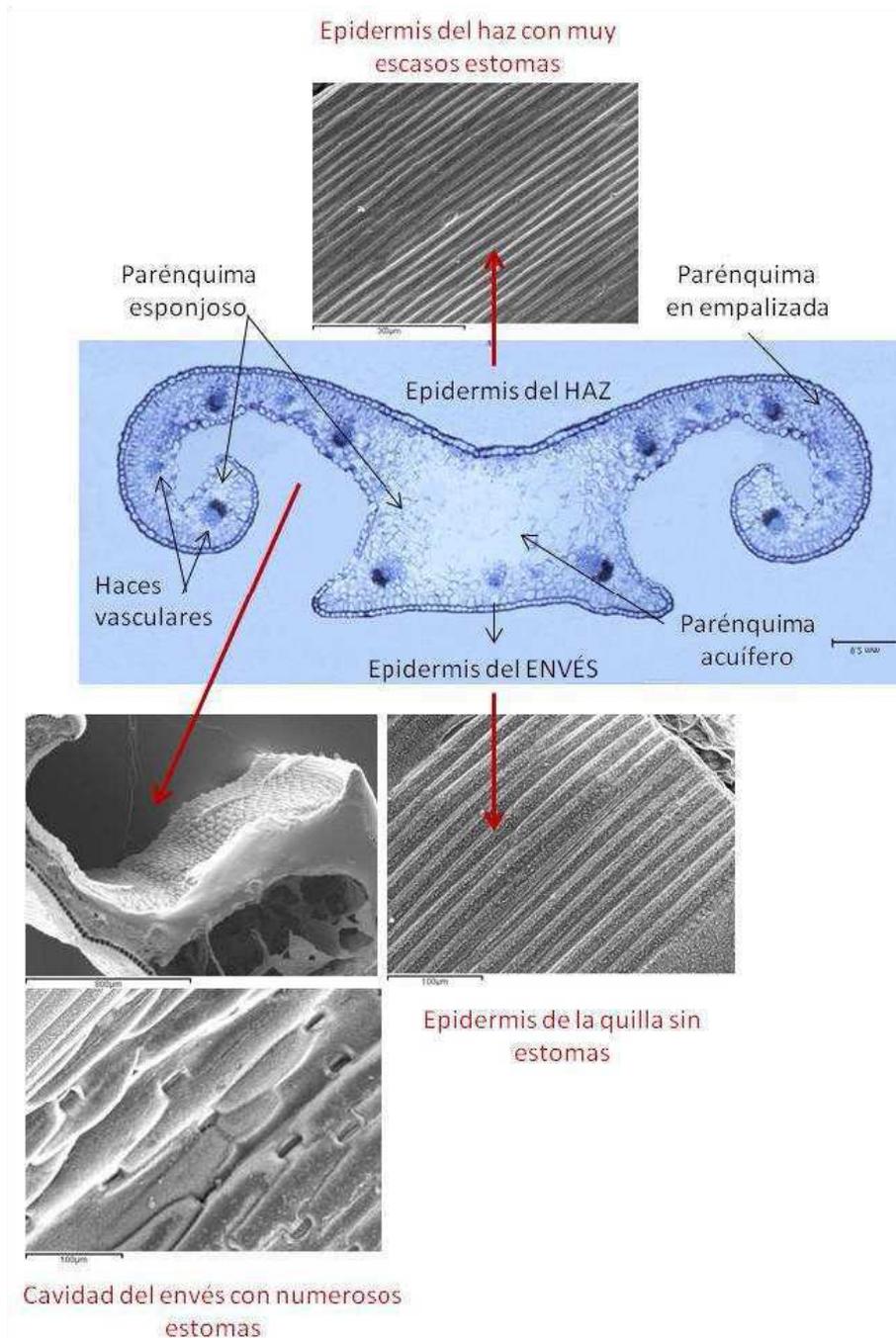


Figura 155 Anatomía de la hoja de *C. vernus* (BCU002935).

#### IV. RESULTADOS

La hoja de *C. serotinus* (idéntica a la de *C. clusii*), que se observa en la Figura 156, muestra en sección transversal forma de T, pero con una anchura del limbo que no supera en mucho a la quilla, la cual no presenta costillas. Los extremos del limbo se hallan ligeramente curvados hacia el envés. No presenta estomas en el haz ni en la zona extrema de la quilla del envés. Estas estructuras se concentran en la cavidad del envés. El parénquima en empalizada se observa tanto en haz como en envés, y por encima de éste aparece el parénquima esponjoso. Como en las restantes especies, aparece una zona central de parénquima acuífero. Posee 9 haces vasculares.

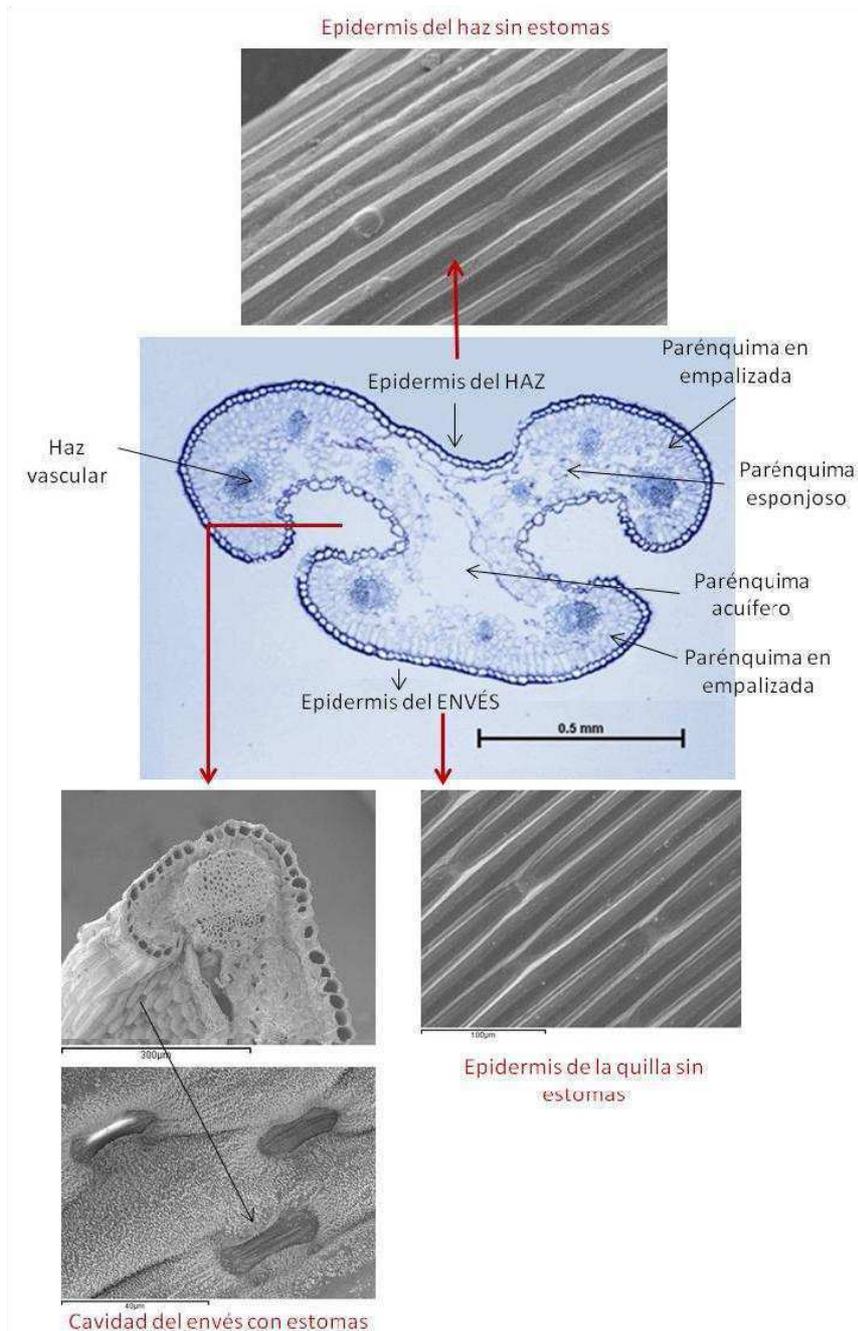


Figura 156 Anatomía de la hoja de *C. serotinus* (BCU002775).

La hoja de *C. nudiflorus* (Figura 157), similar a la de *C. vernus*, muestra la clásica forma de T en sección transversal, y también presenta una quilla plana, sin crestas y de menor anchura que el limbo pero sus extremos no son picudos sino romos. La quilla tiene forma cuadrangular. Los extremos del limbo se pliegan, sobre sí mismos, como en *C. vernus* pero de forma menos acusada. La epidermis del haz no muestra estomas y la del envés, a nivel del extremo de la quilla, tampoco. Los estomas se localizan en la cavidad del envés donde son numerosos. La hoja posee parénquima en empalizada hacia el haz y hacia el envés, parénquima acuífero en la zona central y parénquima esponjoso por debajo del parénquima en empalizada. Posee 4 haces vasculares de mayor tamaño en los extremos del limbo y de la quilla y 9 menores.

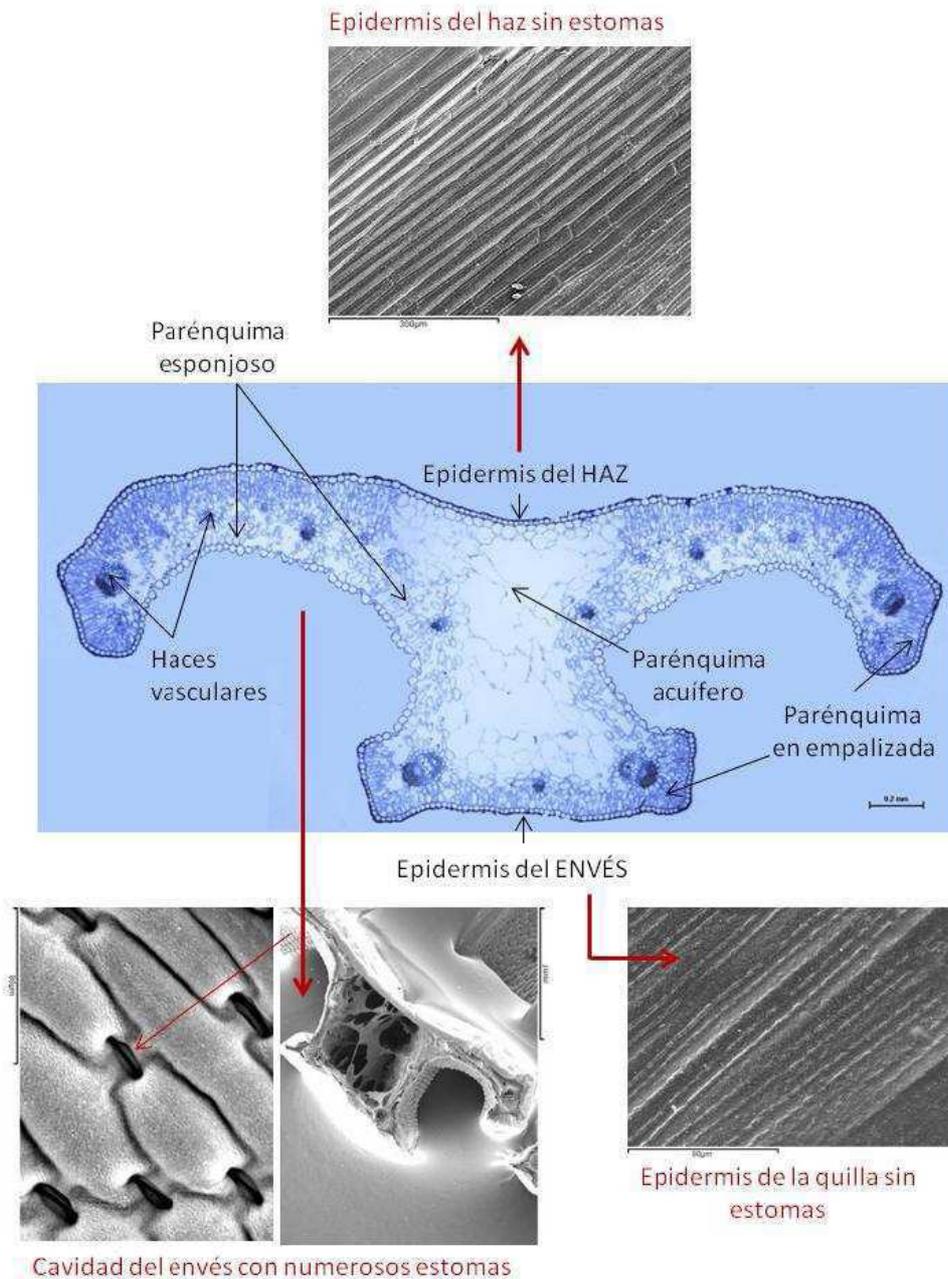


Figura 157 Anatomía de la hoja de *C. nudiflorus* (BCU003176).

#### IV. RESULTADOS

La anatomía de la hoja de *C. cambessedesii* se observa en la Figura 158. La sección transversal nos muestra una hoja en forma de T con una quilla sin crestas pero, debido al gran tamaño de la quilla en relación con la anchura del limbo de la hoja, es casi cuadrangular. El limbo tiene unos 2mm de anchura. No presenta estomas en el haz ni en el envés en la zona más expuesta de la quilla. Estas estructuras sólo se observan en la cavidad del envés anterior a la quilla. Se observa parénquima en empalizada en el haz y en el envés, así como parénquima esponjoso y también presenta una zona central de parénquima acuífero. Se observan 12 haces vasculares con 4 de ellos de mayor tamaño.

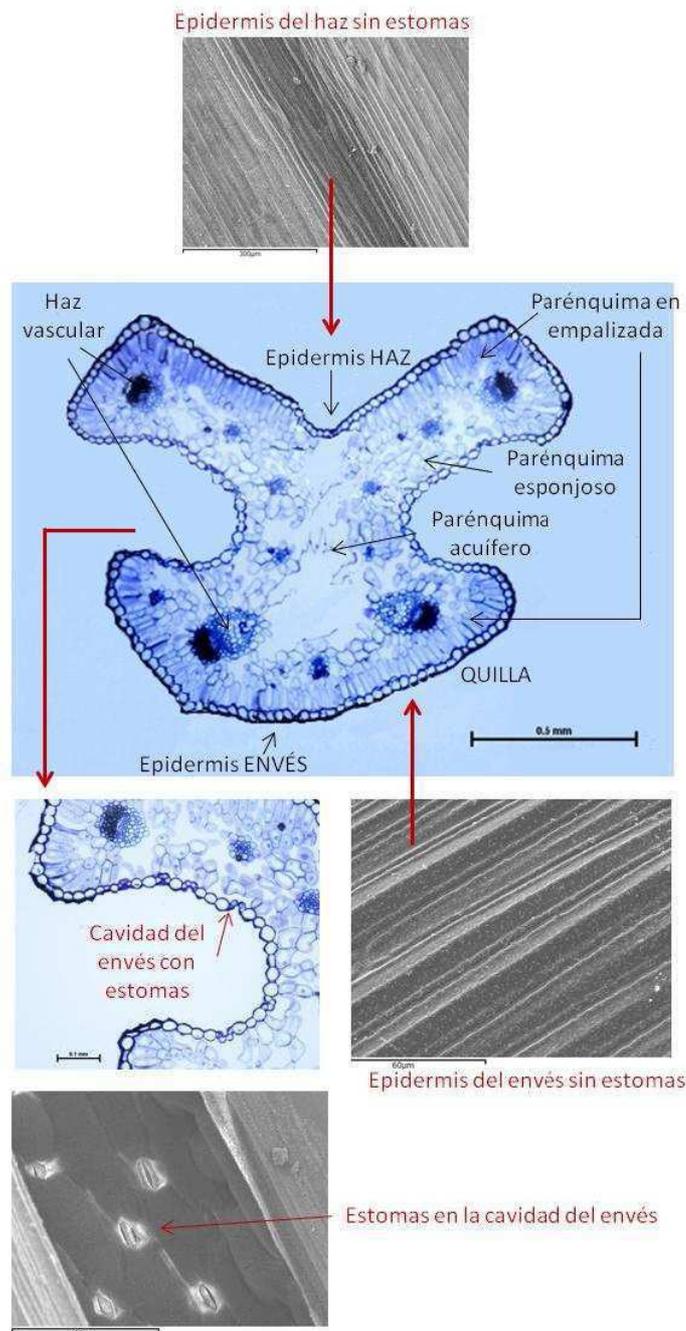


Figura 158 Anatomía de la hoja de *C. cambessedesii* (BCU001685).

### 2.5.3 GUÍA DE IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *CROCUS* EN BASE A LA MORFOLOGÍA DE LA HOJA

Los caracteres relacionados con la hoja tampoco permiten separar las especies *C. serotinus* y *C. clusii* (Figura 159), tal y como se muestra en la siguiente guía de diferenciación:

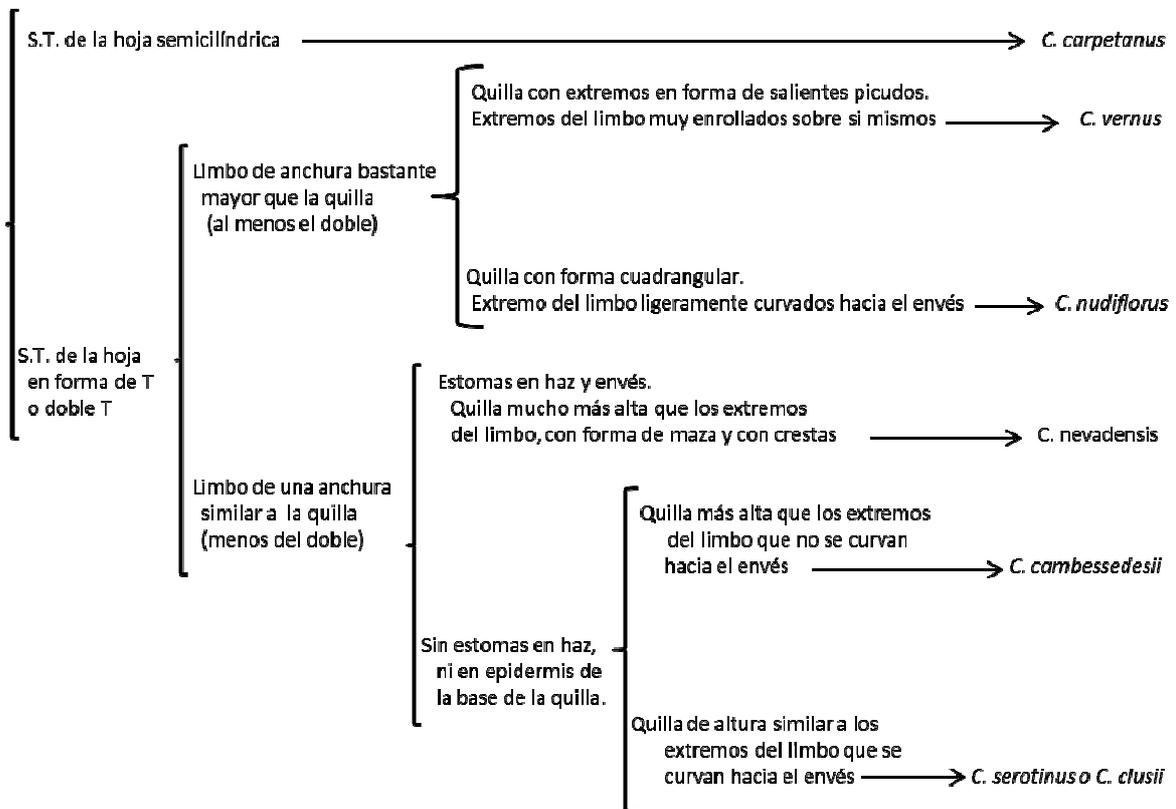


Figura 159 Diferenciación entre especies españolas de *Crocus* en base a la morfología de la hoja. S.T. es sección transversal

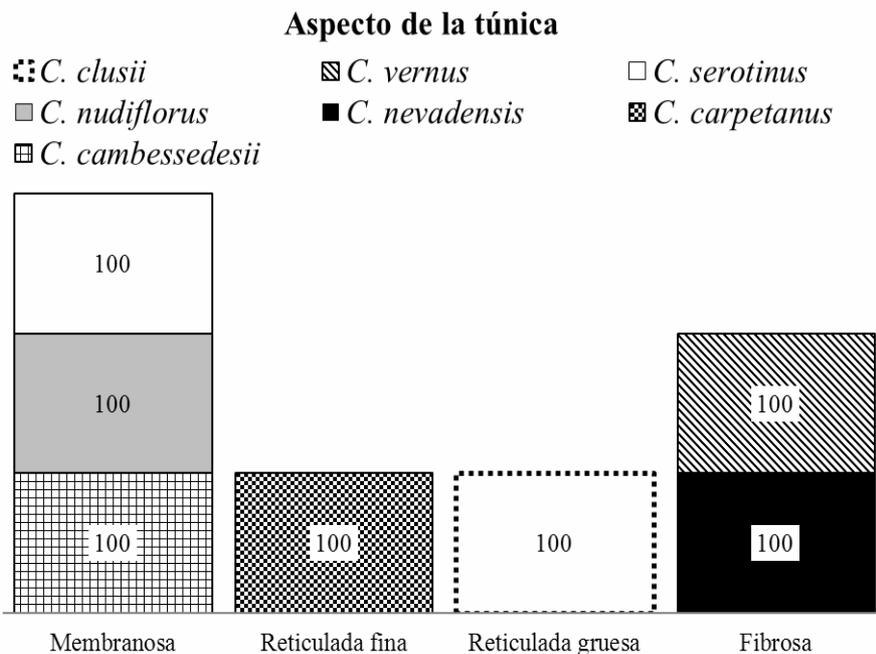
## 2.6 CARACTERES RELACIONADOS CON LA TÚNICA

### 2.6.1 ASPECTO DE LA TÚNICA

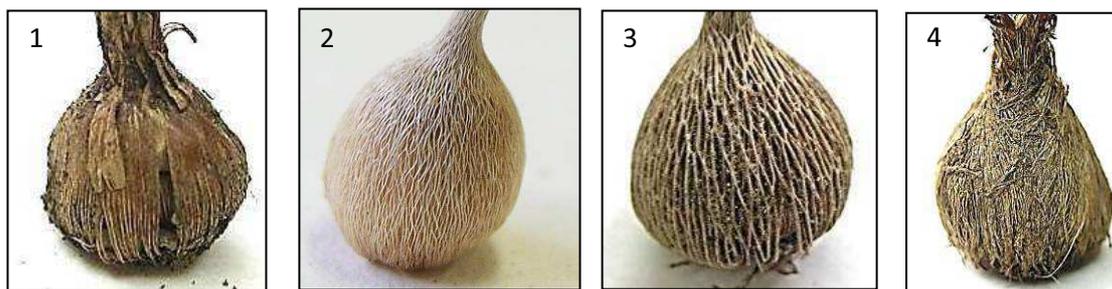
El aspecto de la túnica en las especies de *Crocus* muestra variabilidad interespecífica pero no intraespecífica, por lo que resulta un carácter de interés para la diferenciación entre especies (Figura 160).

Las especies primaverales *C. nevadensis* y *C. vernus* muestran túnicas fibrosas con fibras paralelas en la base que se entrecruzan en la zona del ápice. *C. carpetanus* y *C. clusii* también desarrolla túnicas fibrosas. Sin embargo, éstas forman una retícula en su última capa, de aspecto más fino o más grueso, respectivamente. Las especies *C. nudiflorus*, *C. serotinus* y *C. cambessedesii* presentan túnica membranosa con fibras paralelas en la base (Figura 160 y Figura 161). El aspecto de la túnica es un carácter claramente diferenciador entre las especies *C. clusii* y *C. serotinus*.

## IV. RESULTADOS



**Figura 160** Aspecto de la túnica de los cormos en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.



**Figura 161** Variabilidad observada en el aspecto de la túnica de los cormos en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Membranosas, con fibras paralelas en la base: *C. nudiflorus* (BCU003001); 2. Reticulada fina: *C. carpetanus* (BCU002696); 3. Reticulada gruesa: *C. clusii* (BCU002960); 4. Fibrosa, con fibras paralelas en la base y reticuladas en el ápice: *C. nevadensis* (BCU002994).

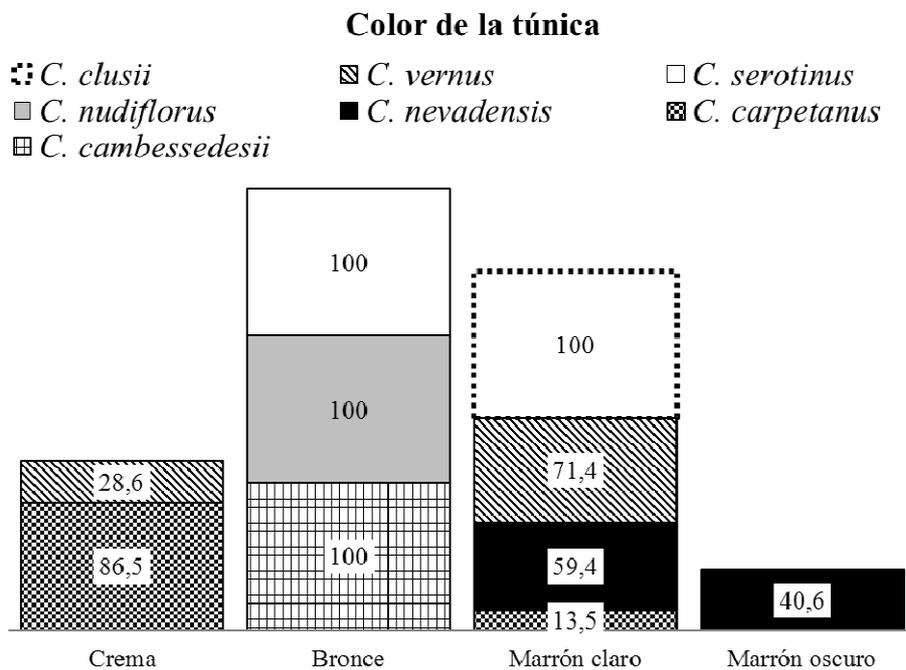


**Figura 162** Variabilidad observada en el color de la túnica de los cormos en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Crema: *C. carpetanus* (BCU002971); 2. Bronce: *C. serotinus* (BCU002778); 3. Marrón claro: *C. nevadensis* (BCU002976); 4. Marrón oscuro: *C. nevadensis* (BCU002993).

**2.6.2 COLOR DE LA TÚNICA**

Las especies otoñales *C. cambessedesii*, *C. nudiflorus* y *C. serotinus* muestran siempre túnicas de color bronceado en todas las entradas observadas (Figura 163). Este color es típico de túnicas con zona membranosa. La especie *C. clusii*, también otoñal, muestra también invariablemente un color marrón claro. Las especies primaverales presentan cierta variación entre el color crema y marrón claro, como es el caso de *C. carpetanus* y *C. vernus*, o bien entre el color marrón claro y más oscuro, como es el caso de *C. nevadensis* (Figura 162).

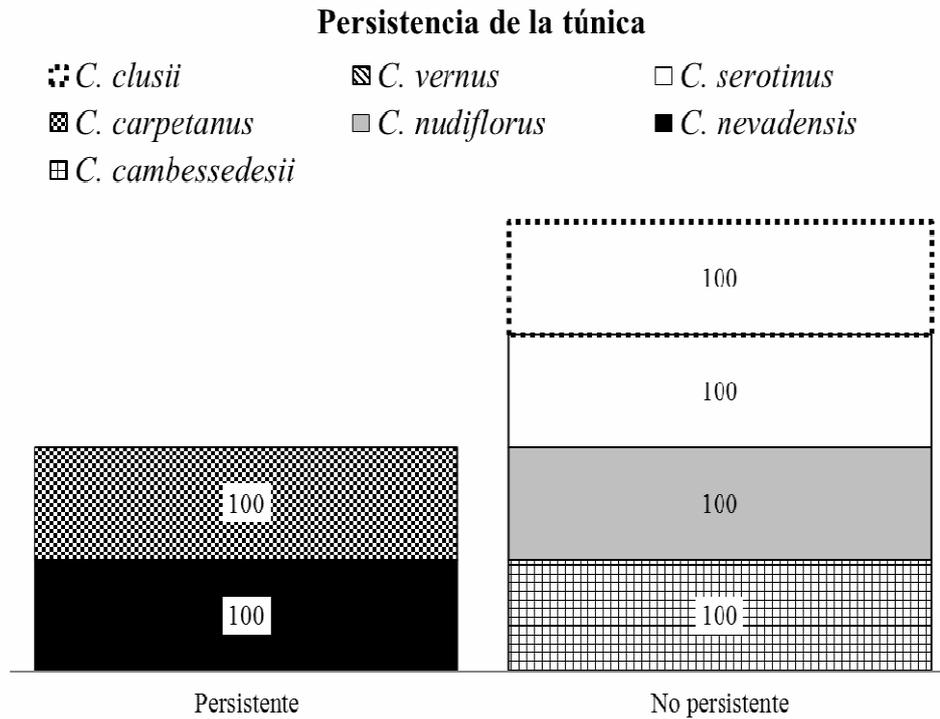
*C. vernus* y *C. carpetanus* desarrollan túnicas fibrosas de colores más claros que los que presenta la especie *C. nevadensis*.



*Figura 163 Color de la túnica de los cormos en las diferentes especies españolas de Crocus. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.*

**2.6.3 PERSISTENCIA DE LA TÚNICA**

La persistencia de la túnica es un carácter que presenta variabilidad entre las especies españolas, siendo uniforme dentro de las mismas (Figura 164).



**Figura 164** Persistencia de la túnica del cormo en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.

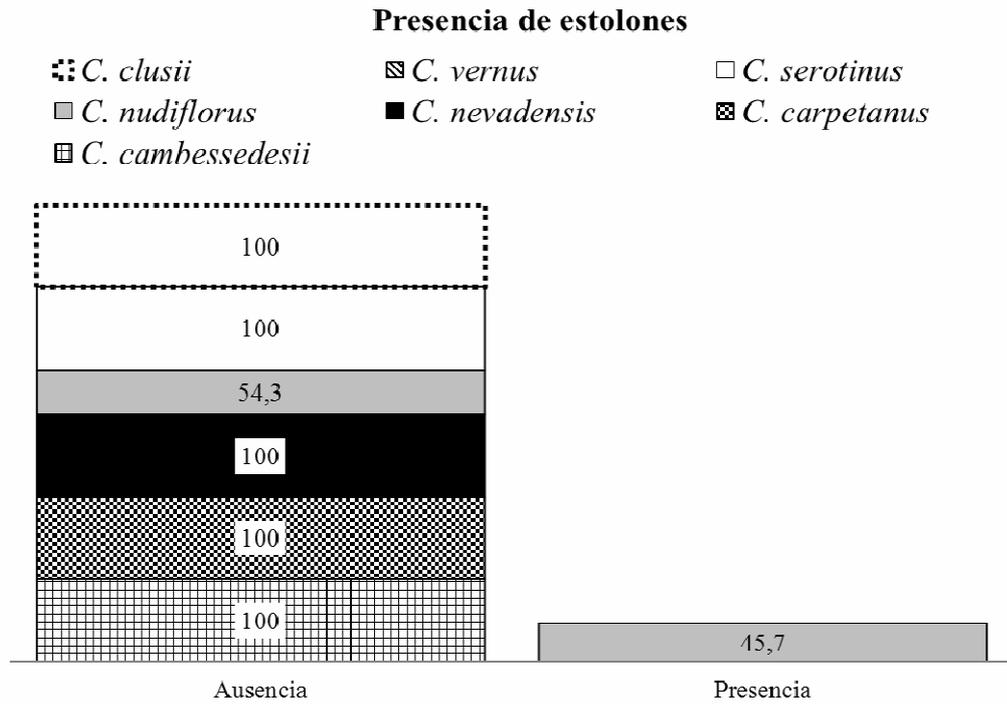
Las especies primaverales, *C. nevadensis* y *C. carpetanus* desarrollan túnicas con mayor número de capas o persistentes a lo largo de los años, lo que no se ha observado en las restantes especies españolas. No obstante, hay que tener en cuenta, que este carácter puede estar sujeto a influencias medioambientales (Figura 165).



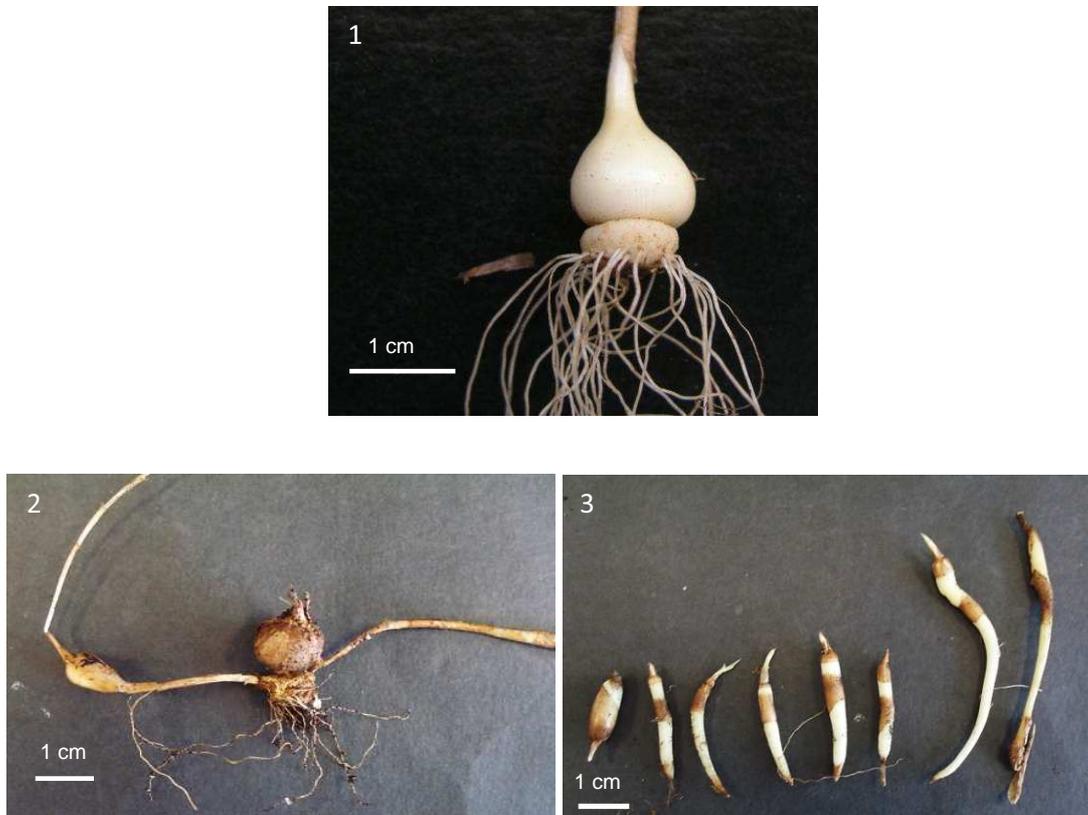
**Figura 165** Variabilidad observada en la persistencia de la túnica de los cormos en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1-3. Persistente: 1. *C. nevadensis* (BCU002693), 2 y 3. *C. carpetanus* (BCU002974); 4. No persistente: *C. serotinus* (BCU001657).

#### 2.6.4 PRESENCIA DE ESTOLONEROS

Los estolones se observan únicamente en la especie *C. nudiflorus* y no siempre, ya que depende del tamaño del cormo inicial (Figura 166 y Figura 167).



**Figura 166** Presencia de estolones en las diferentes especies españolas de *Crocus*. Porcentaje de plantas de cada especie que muestra cada uno de los niveles del carácter.



**Figura 167** Variabilidad observada en la presencia de estolones en el conjunto de especies estudiadas de *Crocus*. 1. Ausentes: *C. serotinus* (BCU002775); 2 y 3. Presentes: 2 y 3. *C. nudiflorus* (BCU002944).

## IV. RESULTADOS

### 2.6.5 GUÍA DE IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *CROCUS* EN BASE A LA MORFOLOGÍA DE LA TÚNICA Y DEL CORMO

Los rasgos observados en las túnicas permiten diferenciar tres grupos de especies. No obstante, dentro de cada grupo, la diferenciación entre especies no es siempre clara, salvo en el grupo de cormos que presentan túnicas reticuladas. Este caso es de especial importancia ya que es factible separar dos especies hasta ahora imposibles de diferenciar: *C. serotinus* y *C. clusii* (Figura 168).

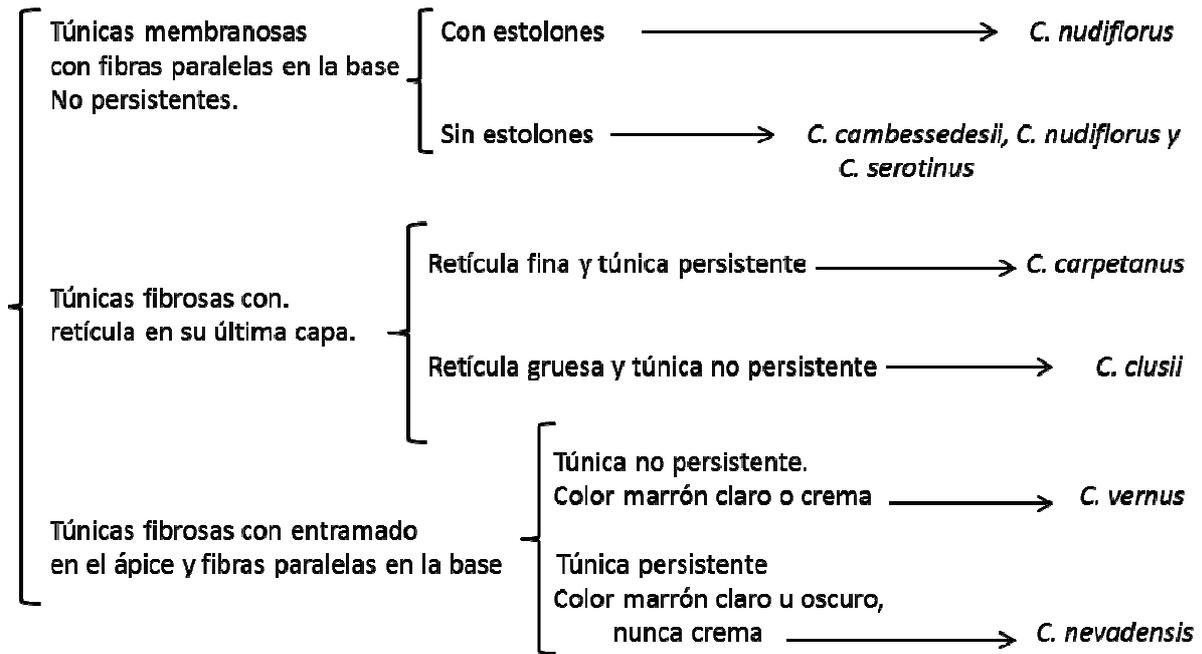


Figura 168 Diferenciación entre especies españolas de *Crocus* en base a la morfología de la túnica.

### 3 AGRUPACIÓN DE LAS ENTRADAS EN FUNCIÓN DE LOS CARACTERES MORFOLÓGICOS ANALIZADOS Y PRINCIPALES CARACTERES IMPLICADOS EN DICHA AGRUPACIÓN

#### 3.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS

Se realizó un análisis de componentes principales para determinar qué factores son los que explican la mayor parte de la variabilidad presente en las 7 especies de *Crocus* silvestres españolas. Teniendo en cuenta los análisis realizados previamente, se han descartado los caracteres uniformes y los altamente correlacionados.

Dentro de los caracteres cuantitativos se seleccionan los siguientes:

- Longitud de tépalo externo
- Anchura de tépalo externo
- Longitud de filamento
- Longitud de antera
- Longitud del estilo
- Altura de flor
- Longitud máxima de hoja
- Anchura máxima de hoja
- Número hojas en brote principal
- Longitud media de semillas
- Peso medio de las semillas

Las tres primeras componentes explicaron un 43%, un 16% y un 10 % de la varianza respectivamente. En total, las tres componentes explicaron un 69% de la variación observada (Tabla 83).

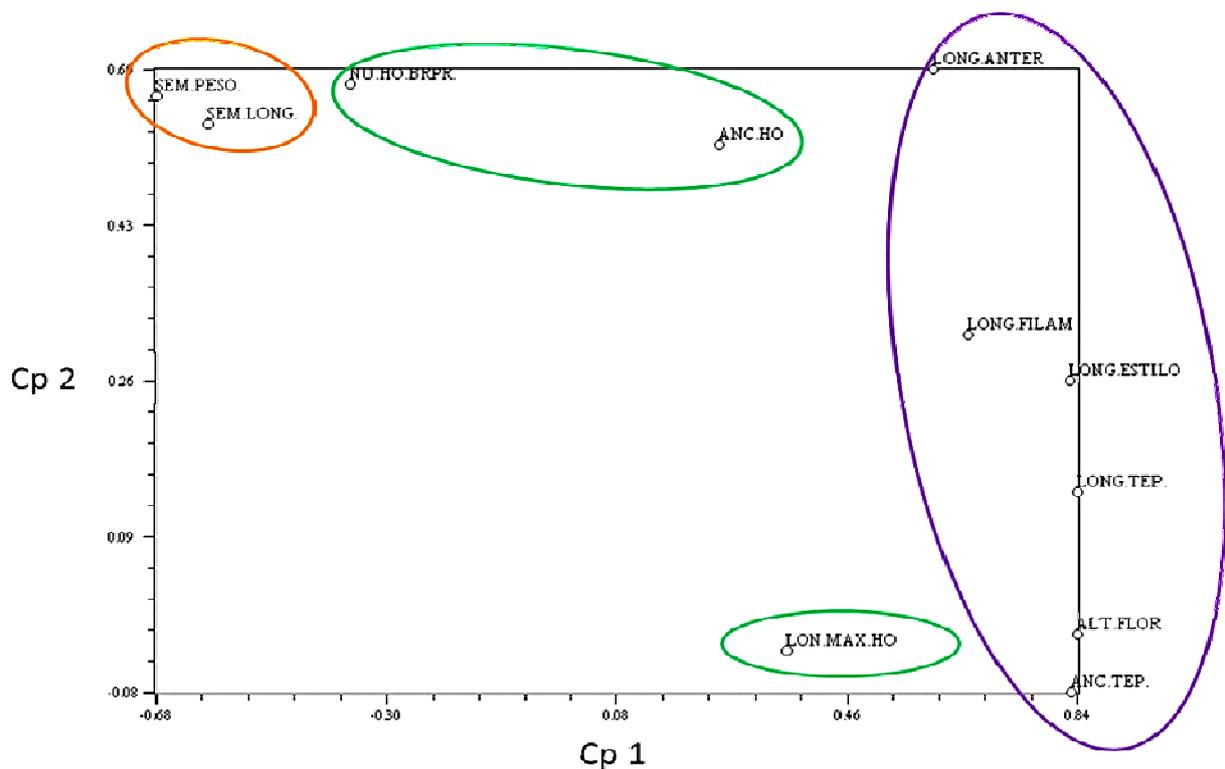
*Tabla 83 Ecuación de cada una de las tres componentes principales, en función de los caracteres considerados para el presente análisis y porcentaje de la varianza total explicada por cada una de ellas.*

CARACTERES CUANTITATIVOS	COMPONENTES PRINCIPALES		
	1	2	3
LONGTUD DEL TÉPALO EXTERNO	0,84	0,14	0,13
ANCHURA DEL TÉPALO EXTERNO	0,83	-0,08	-0,18
LONGITUD DE LA ANTERA	0,59	0,60	0,10
LONGITUD DEL FILAMENTO	0,66	0,31	-0,21
LONGITUD DEL ESTILO	0,82	0,26	0,16
ALTURA DE LA FLOR	0,84	-0,02	0,11
LONGITUD MÁXIMA HOJA	0,36	-0,03	0,57
ANCHURA HOJA	0,24	0,52	-0,62
Nº HOJAS BROTE PRINCIPAL	-0,36	0,59	0,46
LONGITUD SEMILLAS	-0,59	0,54	0,17
PESO SEMILLAS	-0,68	0,57	-0,15
<b>Varianza explicada</b>	<b>42,69%</b>	<b>16,34%</b>	<b>10,09%</b>

## IV. RESULTADOS

### 3.1.1 REPRESENTACIÓN DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS FRENTE A LAS COMPONENTES PRINCIPALES

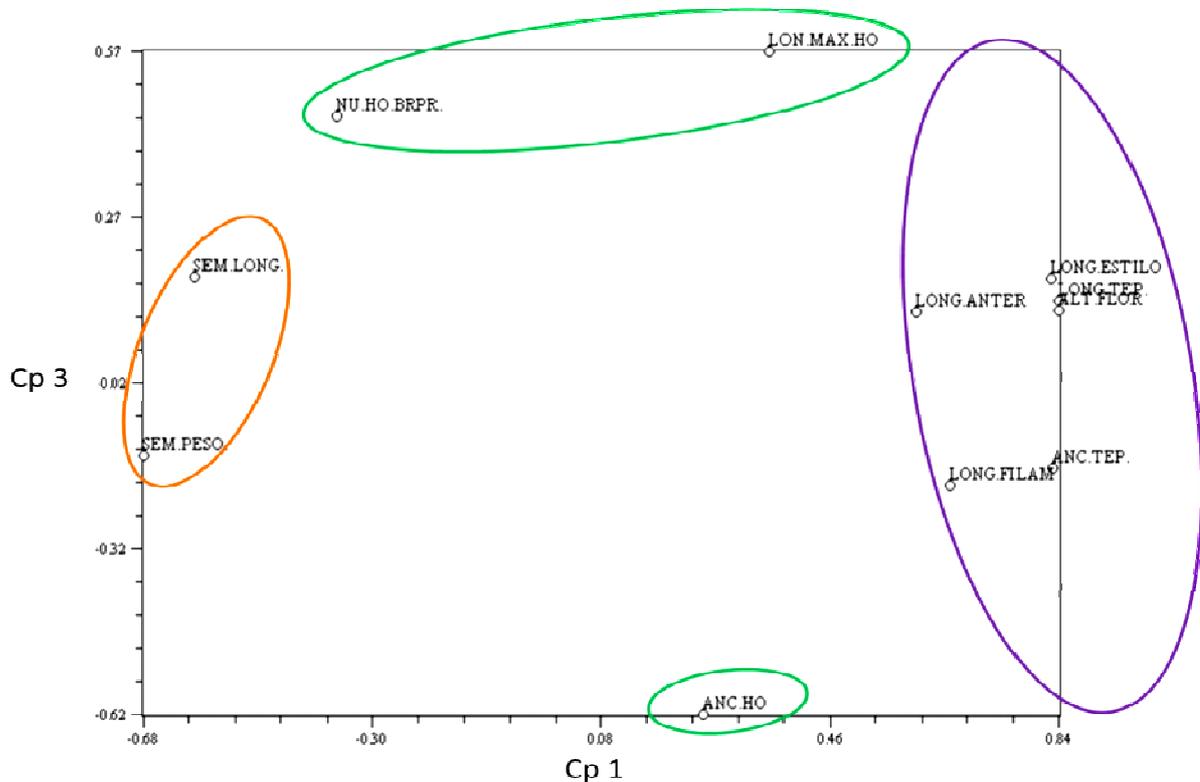
Al proyectar los caracteres en el plano definido por las dos primeras componentes principales (Figura 169.1), se observa que la primera componente principal, que explica el 43% de la variabilidad, está fundamentalmente relacionada con caracteres relativos al tamaño del tépalo externo (0,84), longitud del estilo (0,82) y la altura de la flor (0,84). En menor grado, esta relacionada con la longitud del filamento (0,66), y además presenta una correlación negativa con el peso y longitud de la semilla (-0,59 y -0,68 respectivamente) (Tabla 83).



**Figura 169 .1.** Representación de los coeficientes de los caracteres en los vectores propios que definen las dos primeras componentes principales 1, 2 y 3. En violeta se representan los caracteres relacionados con el tamaño de la flor, en verde los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo y en naranja los relacionados con el tamaño de la semilla. Los caracteres representados son: LONG.TEP. = longitud del tépalo externo, ANC.TEP.= anchura del tépalo externo, LONG. FILAM.= longitud del filamento; LONG. ANTER.= longitud de la antera, LONG.ESTILO = longitud del estilo, ALT.FLOR= altura de la flor desde el suelo, LON.MAX.HO= longitud máxima de la hoja, ANC.HO= anchura de la hoja, NU.HO.BR.PR.= número de hojas en el brote principal, SEM.LONG.= longitud media de la semilla, SEM.PESO= peso medio de la semilla

La segunda componente, que explica el 16% de la variabilidad observada, está correlacionada moderadamente, y de forma positiva, con el carácter número de hojas en el brote principal (0,59), con los relacionados con el tamaño de la semilla (0,54 y 0,57) y con la longitud de la antera (0,6) (Figura 170.1).

La tercera componente, que explica el 10% de la variabilidad, está relacionada con los caracteres relativos al crecimiento vegetativo: de forma negativa con la anchura de la hoja (-0,6) y positiva con la longitud máxima de la hoja al final del ciclo (0,57) (Figura 171.2).



**Figura 169.2.** Representación de los coeficientes de los caracteres en los vectores propios que definen las dos primeras componentes principales 1, 2 y 3. En violeta se representan los caracteres relacionados con el tamaño de la flor, en verde los caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo y en naranja los relacionados con el tamaño de la semilla. Los caracteres representados son: LONG.TEP. = longitud del tépalo externo, ANC.TEP.= anchura del tépalo externo, LONG. FILAM.= longitud del filamento; LONG. ANTER.= longitud de la antera, LONG.ESTILO = longitud del estilo, ALT.FLOR= altura de la flor desde el suelo, LON.MAX.HO= longitud máxima de la hoja, ANC.HO= anchura de la hoja, NU.HO.BR.PR.= número de hojas en el brote principal, SEM.LONG.= longitud media de la semilla, SEM.PESO= peso medio de la semilla

En resumen, la representación de las variables respecto a las componentes principales muestra que la mayor parte de la variación se debe a diferencias en el tamaño del tépalo externo, la longitud del estilo y la altura de la flor (43%). Diferencias en el número de hojas en el brote principal, longitud de antera y el tamaño y peso de la semilla explican el 16% de la variación. Un 10% vendrá fundamentalmente explicado por la longitud máxima de la hoja al final del ciclo y la anchura de la misma.

## IV. RESULTADOS

### 3.1.2 REPRESENTACIÓN DE LAS DIFERENTES ENTRADAS FRENTE A LAS COMPONENTES PRINCIPALES

La primera componente principal, que explica el 43% de la varianza, agrupa las entradas por tamaño de tépalo, estilo, filamento de estambre y altura de flor (Figura 170).

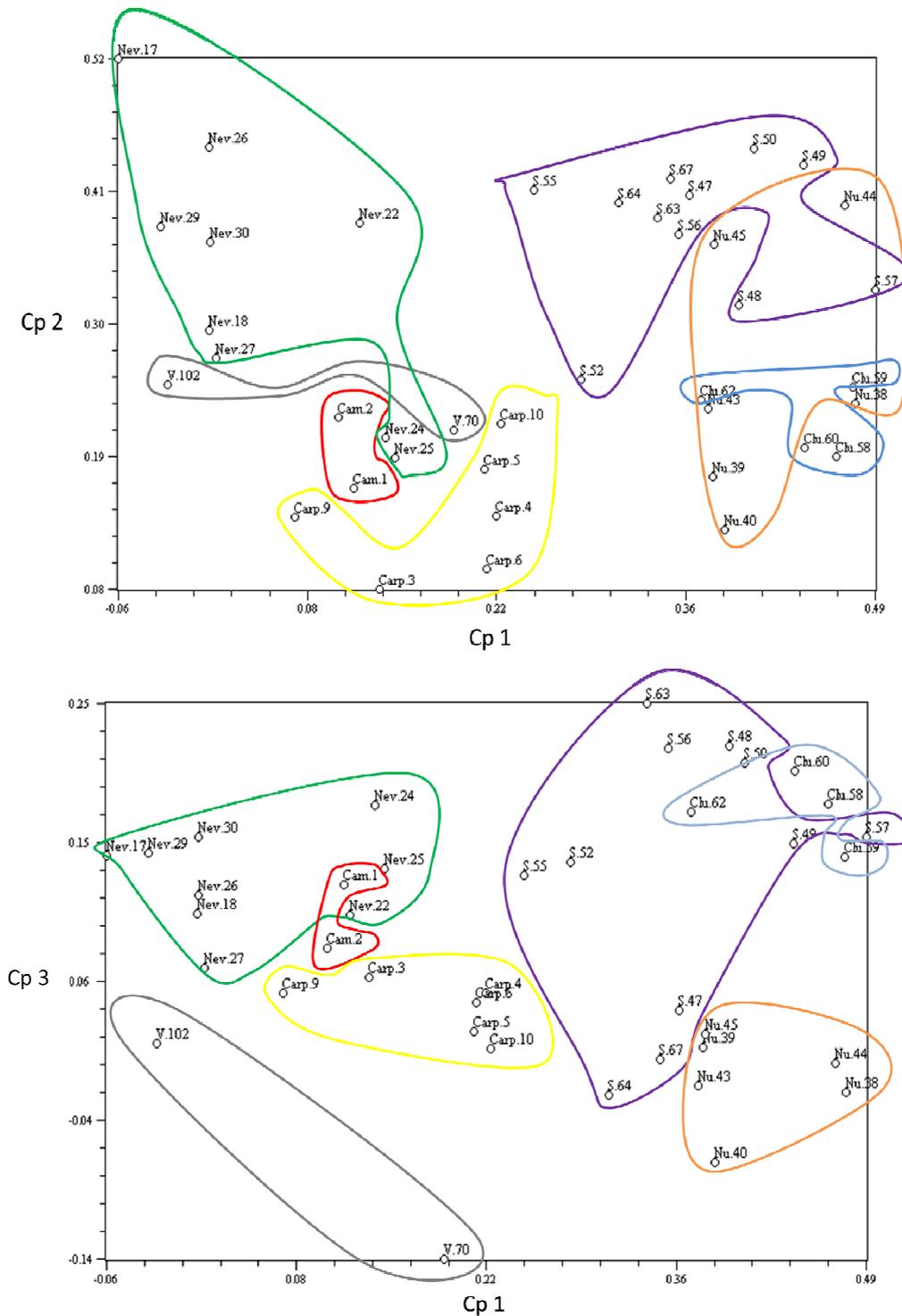


Figura 170 Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: *C. nevadensis*; Amarillo: *C. carpetanus*; Blanco: *C. vernus*; Violeta: *C. serotinus*; Azul: *C. clusii*; Rojo: *C. cambessedesii*, Naranja: *C. nudiflorus*.

Así en un extremo del eje nos encontramos las flores de mayor tamaño desarrolladas por las especies *C. serotinus*, *C. nudiflorus* y *C. clusii*, con una correlación positiva alrededor de 0,35-0,5 con esta componente, mientras que en el otro extremo encontramos las flores más pequeñas de las especies *C. cambessedesii*, *C. nevadensis* y *C. vernus*. *C. carpetanus* se encuentra en posición intermedia (Figura 170). No obstante, hay que señalar una muy baja correlación de las entradas de estas últimas especies con esta componente y una importante dispersión de las entradas de *C. nevadensis* y respecto a esta primera componente.

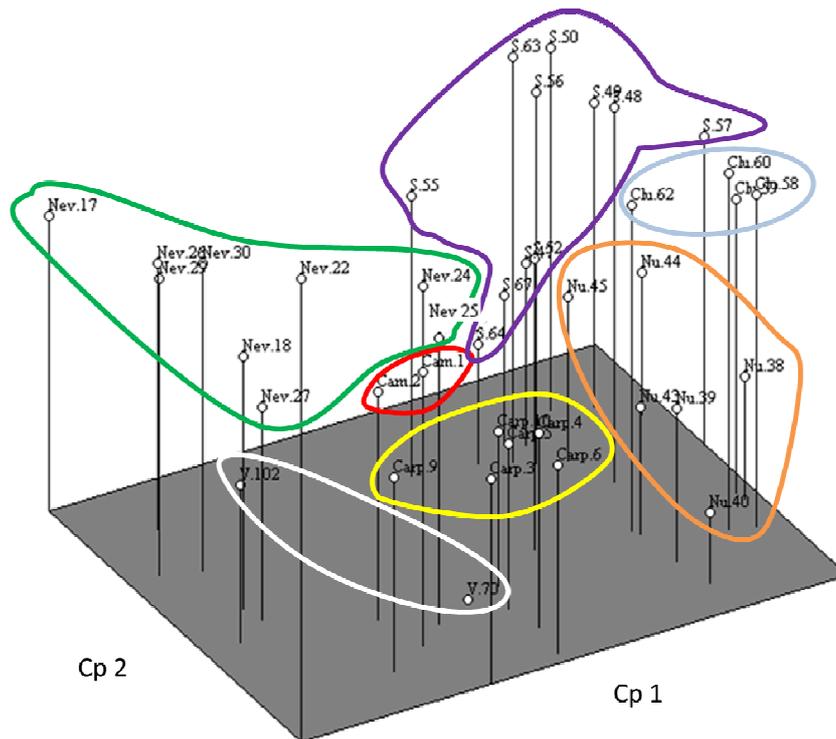
Existe también una gran dispersión en relación a la segunda componente, que explica la variación debida a la longitud de la antera, al número de hojas en el brote principal y al tamaño y peso de las semillas. Hay que destacar una mayor correlación de las entradas de *C. nevadensis* y *C. serotinus* con esta segunda componente. Ahora bien, la especie *C. nevadensis*, muestra bastante dispersión. Así, encontramos entradas como Nev 17 (BCU002359), localizada en Cuenca, que presenta el mayor número de hojas en el brote principal y, en general, una longitud de antera y tamaño y peso de la semilla muy elevado. Asimismo, en las entradas colectadas en Pamplona, Nev 24 (BCU002697) y Nev 25 (BCU002698), observamos valores bastante más bajos de estos caracteres (Figura 170).

En relación a la tercera componente, que explica la variabilidad debida fundamentalmente a caracteres referidos al tamaño y número de hojas, se observa una mayor correlación con las entradas de las especies *C. nevadensis*, *C. serotinus*, *C. clusii* y *C. cambessedesii*. No obstante, la especie *C. serotinus* presenta bastante dispersión en relación a esta componente. Las entradas de *C. clusii* son las que muestran una mayor agrupación en relación a esta componente y son aquellos materiales de hoja más larga y estrecha. Las entradas de *C. nevadensis* también presentan, de forma bastante uniforme, hojas largas y estrechas. *C. cambessedesii* muestra valores intermedios y uniformes, pero existe un número de bajo de entradas (Figura 170 y Figura 171).

Las entradas de *C. nudiflorus*, *C. vernus* y *C. carpetanus*, tiene una correlación baja o incluso negativa con esta tercera componente, y en el caso de *C. nudiflorus* las entradas están dispersas en relación a esta tercera componente. Son especies de hojas más corta y ancha.

Así, podemos concluir que, considerando la agrupación de entradas en función de los caracteres estudiados, que al representar las entradas frente a las tres primeras componentes principales, éstas se agrupan en las 7 especies a las que pertenecen. Los principales caracteres a tener en cuenta para realizar esta agrupación han sido 11: 6 caracteres relacionados con el tamaño de la flor (longitud y anchura del tépalo externo, longitud del estilo, longitud de la antera y filamento, y altura de la flor), 3 relacionados con el desarrollo de la hoja (número de hojas en el brote principal, longitud máxima de las hojas y anchura de las mismas) y 2 relacionados con el tamaño de la semilla (longitud y peso seco de la semilla).

## IV. RESULTADOS



**Figura 171** Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: *C. nevadensis*; Amarillo: *C. carpetanus*; Blanco: *C. vernus*; Violeta: *C. serotinus*; Azul: *C. clusii*; Rojo: *C. cambessedesii*; Naranja: *C. nudiflorus*.

Teniendo en cuenta los resultados de este análisis de componentes principales, y relacionándolo con el análisis de variación a nivel de caracteres morfológicos cuantitativos, podemos ver que las entradas de los 3 grupos constituidos por *C. clusii*, *C. serotinus* y *C. nudiflorus*, de floración otoñal tienen en común que sus verticilos florales son de mayor tamaño. *C. cambessedesii*, especie también de floración otoñal, presenta asimismo una importante altura de flor como el resto de flores otoñales, pero desarrolla las flores con menor tamaño de corola, estilo y estambres. Dentro de este grupo, observamos que *C. serotinus* se separa de las restantes por un mayor número de hojas en el brote y semillas más grandes. Hay también una clara diferencia entre *C. nudiflorus* y *C. clusii* debida fundamentalmente a la tercera componente relacionada positivamente con la longitud máxima de la hoja y negativamente con su anchura. Así, *C. clusii* forma un grupo de entradas que, de forma uniforme tiene hojas más largas y estrechas.

Las entradas de los 3 grupos constituidos por *C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus*, de floración primaveral, presentan verticilos de menor tamaño. *C. nevadensis* se separa de las restantes por su mayor número de hojas por brote, así como por tener semillas de mayor tamaño. También la mayor parte de las entradas de este grupo están correlacionadas positivamente con la tercera componente por sus hojas largas y estrechas. La diferencia entre las entradas de *C. vernus* y *C. carpetanus* se debe, fundamentalmente, a la primera componente relacionada con el tamaño de la flor.

### 3.2 ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES DE LOS CARACTERES CUALITATIVOS

A partir de los caracteres seleccionados teniendo en cuenta los resultados de análisis previos (histogramas, el estadístico  $X_i^2$  (Tabla 84) y un análisis preliminar de coordenadas principales que nos indicaba la correlación de los caracteres con las tres primeras coordenadas (anejo 3) se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales definitivo y un análisis clúster de las entradas.

Tabla 84 Valores  $X_i^2$  para todos los caracteres cualitativos (Continúa en página siguiente)

CARACTERES CUALITATIVOS	$X_i^2$	gl	p-value
Aspecto de la túnica	2016	18	0
Color de la túnica	1304	18	0
Persistencia de la túnica	672	6	0
Forma del cormo	323	24	0
Presencia de estolones	265	6	0
Forma de la hoja	574	12	0
Forma de la semilla	766	12	0
Superficie de la semilla	662	12	0
Presencia de ceras	383	6	0
Forma de las excrecencias	1140	18	0
Color de la superficie	391,69	18	0
Desarrollo de la carúncula	483,64	18	0
Desarrollo del rafe	383	6	0
Forma de las cápsulas	72,19	12	0
Color de las cápsulas	387,69	30	0
Textura de la bráctea	29,83	6	0
Color de las fibras	57,78	12	0
Visibilidad de la bractéola	133,14	6	0
Textura de la bractéola	0,61	2	0,7379
Color de la bractéola	19,17	4	0,007
Tamaño de la bractéola	2,01	4	0,7339
Ápice de tépalo externo	72,49	24	0
Ápice del tépalo interno	60,22	24	0,0001
Forma del tépalo externo	93,21	24	0
Forma del tépalo interno	73,24	24	0
Patrón de fondo del tépalo externo	81,56	6	0
Patrón de fondo del tépalo interno	48,71	6	0
Color general del tépalo externo	376,48	42	0
Color general del tépalo interno	185,09	42	0
Patrón de venación del tépalo externo	183,2	24	0
Patrón de venación del tépalo interno	202,53	24	0
Tipo de venación del tépalo externo	100,83	18	0
Tipo de venación del tépalo interno	106,04	18	0
Patrón del color de la venación del tépalo externo	57,6	6	0
Patrón del color de la venación del tépalo interno	56,93	6	0

#### IV. RESULTADOS

Tabla 84 Valores  $X_i^2$  para todos los caracteres cualitativos (Continuación)

CARACTERES CUALITATIVOS	$X_i^2$	gl	p-value
Color de la venación del tépalo externo	210,5	36	0
Color de la venación del tépalo interno	85,35	24	0
Venación en el tubo floral	74,96	6	0
Localización de la mancha en el tépalo externo	45,68	12	0
Localización de la mancha en el tépalo interno	71,43	12	0
Color de la mancha del tépalo externo	172,16	36	0
Color de la mancha del tépalo interno	191,88	30	0
Color del inicio del tubo floral	92,13	18	0
Color de la garganta floral	44,79	6	0
Pubescencia de la garganta floral	169,49	12	0
Color del filamento del estambre	124,78	12	0
Ramificación del estilo	138,52	6	0
Color del estilo	199,05	12	0
Fragancia de la flor	30,03	6	0
Hojas en floración	150	6	0

Los 23 caracteres seleccionados que se utilizarán en los análisis siguientes son:

- Patrón de fondo del tépalo externo e interno
- Patrón de venación del tépalo externo e interno
- Patrón de color de venación del tépalo externo e interno
- Color de la venación del tépalo externo e interno
- Pubescencia de la garganta floral
- Coloración del filamento del estambre
- Grado de ramificación del estilo
- Coloración del estilo
- Hojas en el periodo floral
- Época de floración
- Textura de la bráctea
- Color de la bráctea
- Visibilidad de la bractéola
- Forma de la cápsula
- Forma de la semilla
- Superficie de la semilla
- Desarrollo de la carúncula
- Desarrollo del rafe

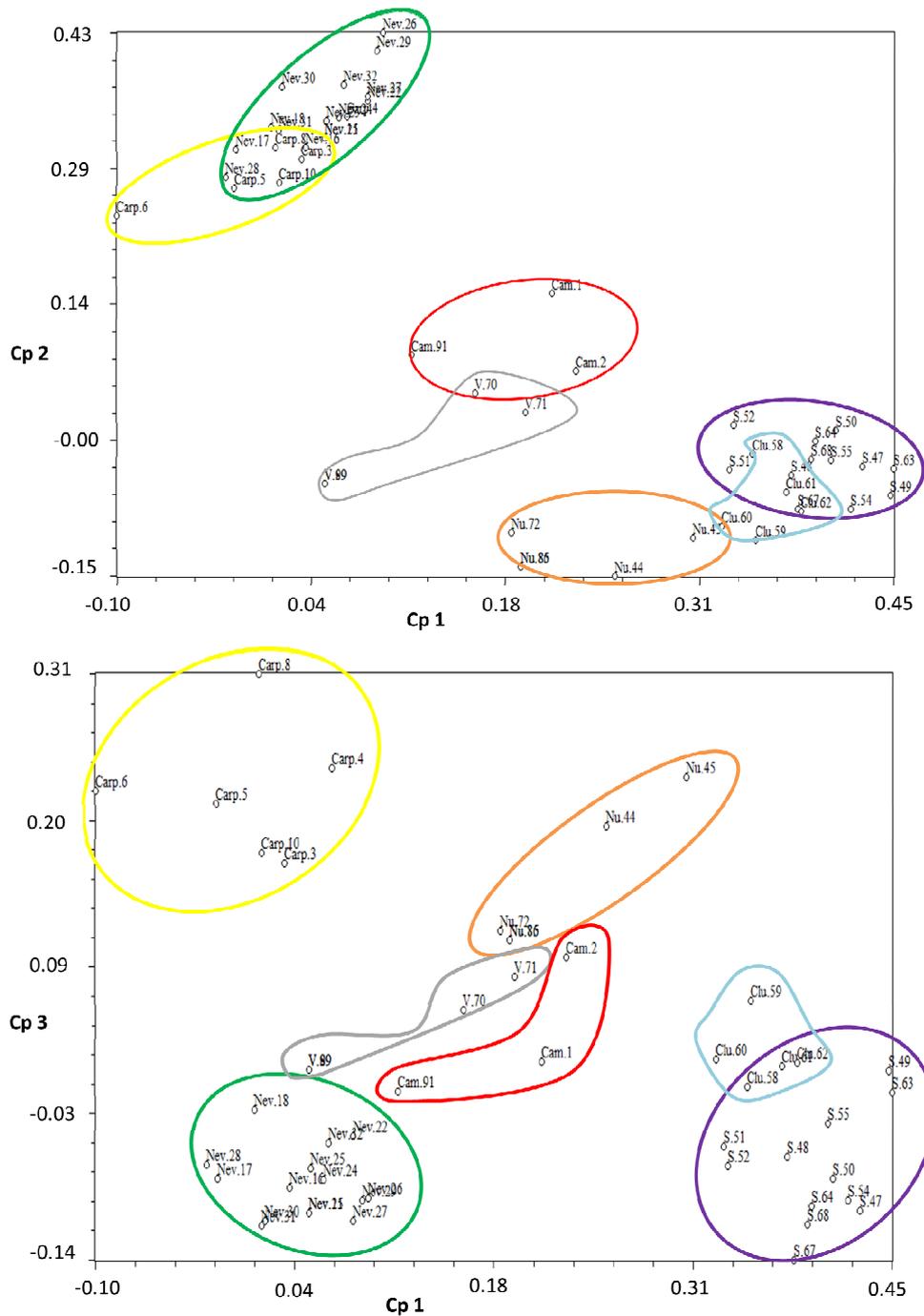
- Forma de excrecencias
- Presencia de cera
- Forma de la hoja
- Aspecto de la túnica
- Persistencia de la túnica

### **3.2.1 REPRESENTACIÓN DE LAS DIFERENTES ENTRADAS FRENTE A LAS COORDENADAS PRINCIPALES**

El análisis de coordenadas principales con los datos cualitativos muestra la agrupación de las entradas en base a estos caracteres. Las tres primeras componentes explicaron un 36,1%, un 26,6% y un 7 % de la varianza respectivamente. En total, las tres componentes explicaron un 69,8% de la variación observada.

Cuando proyectamos las accesiones en relación con las dos primeras componentes principales, que explican aproximadamente el 62,7% de la variabilidad, observamos tres grandes grupos de entradas. Uno formado por las especies de floración otoñal (*C. nudiflorus*, *C. serotinus* y *C. clusii*), un segundo grupo formado por las especies *C. vernus* y *C. cambessedesii*, y un tercer grupo formado por *C. nevadensis* y *C. carpetanus*, de floración primaveral (Figura 172).

## IV. RESULTADOS

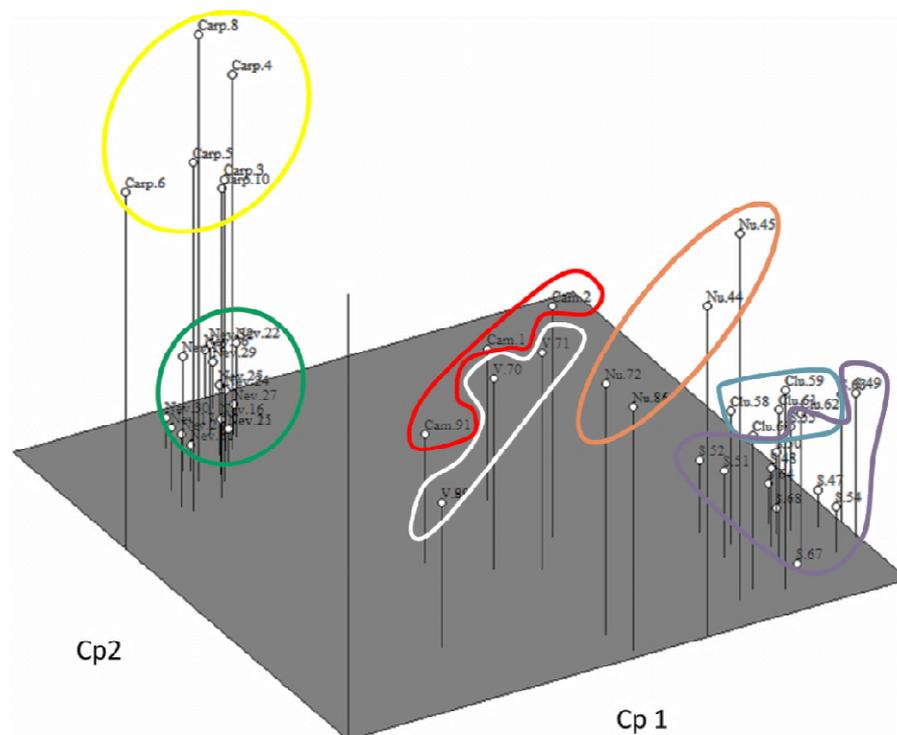


**Figura 172** Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: *C. nevadensis*; Amarillo: *C. carpetanus*; Blanco: *C. vernus*; Violeta: *C. serotinus*; Azul: *C. clusii*; Rojo: *C. cambessedesii*. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 12 en el apartado de Material y Métodos.

Las especies de floración otoñal, *C. serotinus* y *C. clusii* son las que alcanzan una correlación mayor con la primera coordenada y menor con la segunda. Las entradas de estas especies están solapadas en un mismo grupo, sin existir diferencias claras entre ellas considerando los caracteres relacionados con estas coordenadas que son, fundamentalmente estigma de color amarillo-naranja muy ramificado, túnica no persistente, ausencia de bractéola y floración otoñal. De la misma forma, *C. nevadensis* y

*C. carpetanus*, aunque claramente separadas de las restantes forman casi un único grupo. Presentan una correlación baja con la primera coordenada y alta con la segunda, relacionada con la presencia de estigma blanco-crema con tres ramificaciones, carúncula de la semilla prominente, túnica persistente, presencia de bractéola y floración primaveral. Dado que la primera coordenada presenta una correlación negativa con el tipo de túnica reticulado fino, sólo propio de *C. carpetanus*, es posible observar una cierta separación de estas dos especies a lo largo de dicho eje. *C. vernus* y *C. cambessedesii* muestran correlaciones intermedias entre las de los otros dos grupos de especies con ambas coordenadas y constituyen dos grupos separados. Estas especies se caracterizan por desarrollar estilos con tres ramificaciones de color amarillo o naranja (Figura 172).

En la proyección de las entradas en el plano definido por las primera y la tercera componente se observa que esta coordenada permite separar el solape entre *C. nevadensis* y *C. carpetanus*, así como entre *C. serotinus* y *C. clusii*. Esta coordenada está correlacionada con la presencia de tricomas en la garganta floral y con la cubierta de la semilla. Así, *C. carpetanus*, a diferencia de *C. nevadensis*, tiene flores con garganta glabra y semillas de cubierta lisa. Asimismo, *C. serotinus* y *C. clusii* se podrían diferenciar también por la presencia-ausencia de tricomas. *C. serotinus* nunca presenta una garganta glabra y *C. clusii* nunca presenta papilas (Figura 172 y Figura 173).

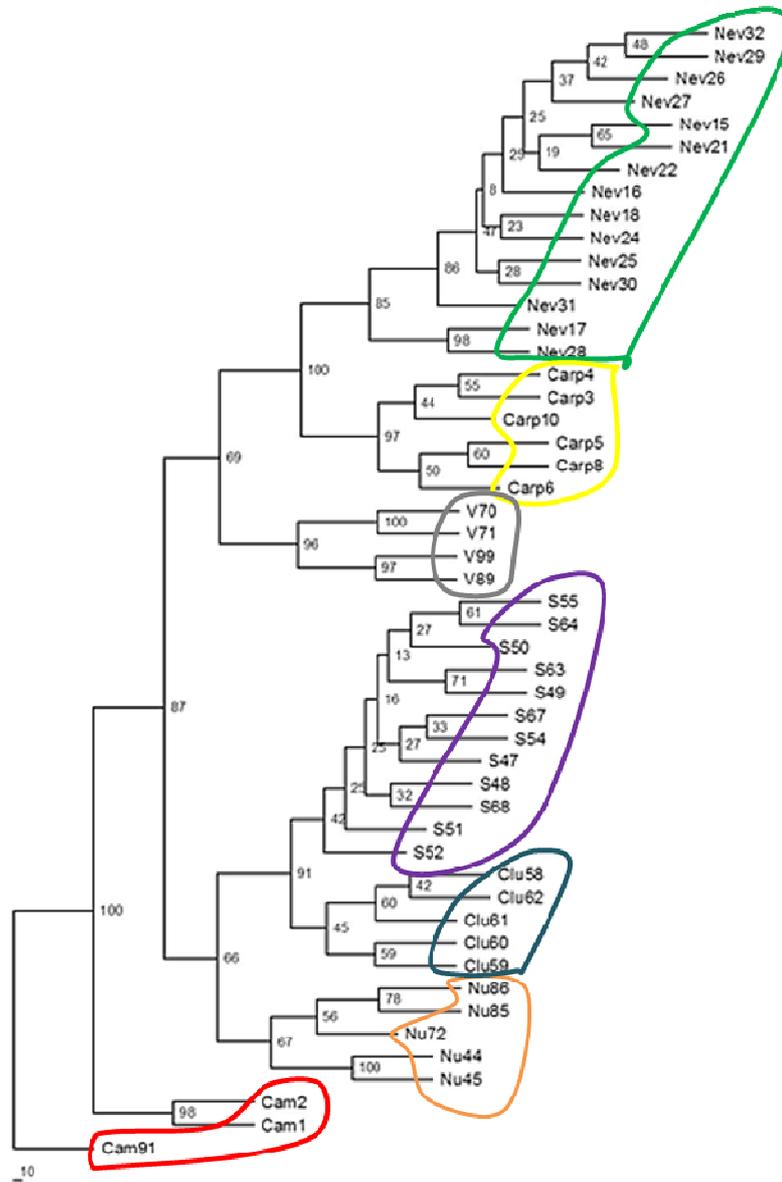


**Figura 173** Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: *C. nevadensis*; Amarillo: *C. carpetanus*; Blanco: *C. vernus*; Violeta: *C. serotinus*; Azul: *C. clusii*; Rojo: *C. cambessedesii*. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 12 en el apartado de Material y Métodos.

## IV. RESULTADOS

### 3.2.1.1 Análisis clúster con los caracteres cualitativos

Para determinar el grado de asociación entre las entradas se realizó un dendrograma a partir de la matriz de distancias formada por los caracteres cualitativos (Figura 174). En este dendrograma se presentan las 50 entradas agrupadas correctamente en las 7 especies analizadas.



**Figura 174** Dendrograma consenso que representa las entradas según el análisis clúster realizado con los caracteres cualitativos, basado en índice de similitud Simple Matching y el método de análisis UPGMA. Se muestra al lado de cada nodo el número de veces que ese nodo se ha representado en 100 árboles calculados con el programa Phylip. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: *C. nevadensis*; Amarillo: *C. carpetanus*; Blanco: *C. vernus*; Violeta: *C. serotinus*; Azul: *C. clusii*; Rojo: *C. cambessedesii*. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 12 en el apartado de Material y Métodos.

Se observa la existencia de tres grandes grupos con una consistencia del nudo de 87%. Un grupo está formado por la especie *C. cambessedesii* (100% de robustez del nudo

que une las entradas), caracterizado por la presencia de una venación plumosa en el tépalo externo de color violeta o púrpura sobre fondo blanco o crema, filamento del estambre blanco, estilo con tres ramificación de color naranja y semillas con apéndices cilíndricos en su superficie. Un segundo grupo está formado por las especies de floración otoñal *C. serotinus*, *C. clusii* y *C. nudiflorus* (66% de consistencia del nudo que las une). Estas especies de floración otoñal presentan estilos generalmente muy ramificados de color naranja o amarillo y semillas con excrecencias de base triangular y ápice distal cilíndrico en su superficie. El tercer grupo está formado por las especies *C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus* (69% de robustez del nudo que une las entradas) (Figura 174), que desarrollan el estigma con tres ramificaciones, son floración primaveral y la hoja visible durante este mismo periodo.

El agrupamiento de las entradas en sus diferentes especies presenta consistencia muy variable 42-100%. Las especies otoñales son las que muestran una menor consistencia en su agrupación. Cabe destacar la estrecha relación entre las especies *C. serotinus* y *C. clusii* (91%), de floración otoñal, con hojas de sección transversal idéntica, estilos muy ramificados y de color naranja o amarillo, con cápsula elongada o fusiforme; y entre *C. nevadensis* y *C. carpetanus* (100%), de floración primaveral, con estilos ramificados en tres de color blanco, bractéola siempre presente y semillas con carúncula muy prominente (Figura 174).

Este análisis clúster de las entradas realizado con los caracteres cualitativos (Figura 174) presenta un elevado y significativo coeficiente de correlación cofenético (0,9), que indica que el método de agrupamiento no ha distorsionado significativamente el resultado.

### 3.3 ANÁLISIS CONJUNTO DE CARACTERES CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS

Se realizó un análisis de coordenadas principales con los datos cualitativos y cuantitativos para poder conocer la agrupación de las entradas en base a estos caracteres. Las tres primeras componentes explicaron un 30,4%, un 11,1% y un 9,6% de la varianza respectivamente. En total, las tres componentes explicaron un 51,22% de la variación observada.

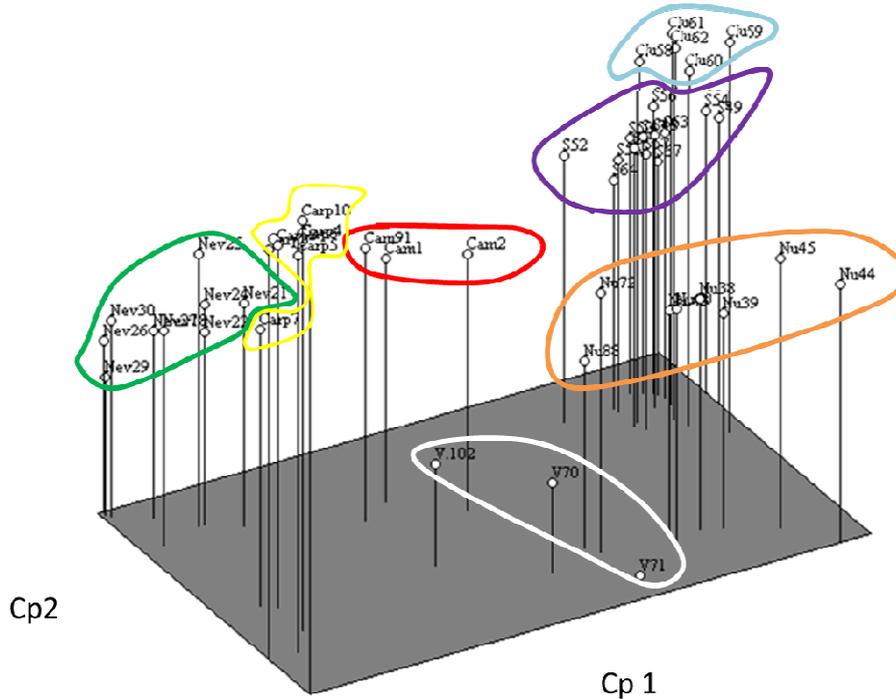
#### 3.3.1 REPRESENTACIÓN DE LAS DIFERENTES ENTRADAS FRENTE A LAS COMPONENTES PRINCIPALES

En la gráfica que representa la proyección de las entradas frente a las tres componentes (51,22% de la variabilidad explicada) se observan claramente los 7 grupos de entradas, fácilmente identificables con las 7 especies, habiéndose conseguido una mayor separación entre especies, y una menor dispersión entre entradas que en análisis anteriores (Figura 175).

Se sigue observando una gran cercanía entre las entradas de *C. nevadensis* y *C. carpetanus*, así como entre aquellas de *C. serotinus* y *C. clusii*, pero en este análisis forman grupos separados. Las entradas de *C. vernus* y *C. nudiflorus* también forman

## IV. RESULTADOS

grupos separados de los restantes y entre sí, pero con una mayor dispersión entre entradas. Las entradas de *C. cambessedesii* están más cercanas a aquellas de *C. carpetanus* pero también constituyen un grupo diferenciado.



**Figura 175** Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: *C. nevadensis*; Amarillo: *C. carpetanus*; Blanco: *C. vernus*; Violeta: *C. serotinus*; Azul: *C. clusii*; Rojo: *C. cambessedesii*. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 12 en el apartado de Material y Métodos.

### 3.4 SELECCIÓN DE UN NÚMERO MÍNIMO DE CARACTERES CUALITATIVOS PARA IDENTIFICAR LAS ESPECIES

Los caracteres cualitativos son los más fáciles y rápidos de evaluar y nos han permitido agrupar correctamente las 50 entradas según su especie. Por cuestiones prácticas de manejo del material vegetal, es útil reducir al mínimo el número necesario de caracteres que posibilitan la diferenciación de las especies. Teniendo en cuenta los resultados de análisis previos realizados con los caracteres cualitativos (correlación del carácter con coordenadas principales y distribuciones de frecuencia) hemos seleccionado 7 caracteres para verificar si es posible conseguir una buena separación entre las especies utilizando estos descriptores que son los siguientes:

- Ramificación del estilo
- Color del estilo
- Aspecto de la túnica
- Sección de la hoja adulta
- Forma de la semilla
- Época de floración
- Desarrollo de la carúncula

Teniendo en cuenta únicamente estos caracteres, se puede elaborar una guía de identificación que permite diferenciar las siete especies (Figura 176).

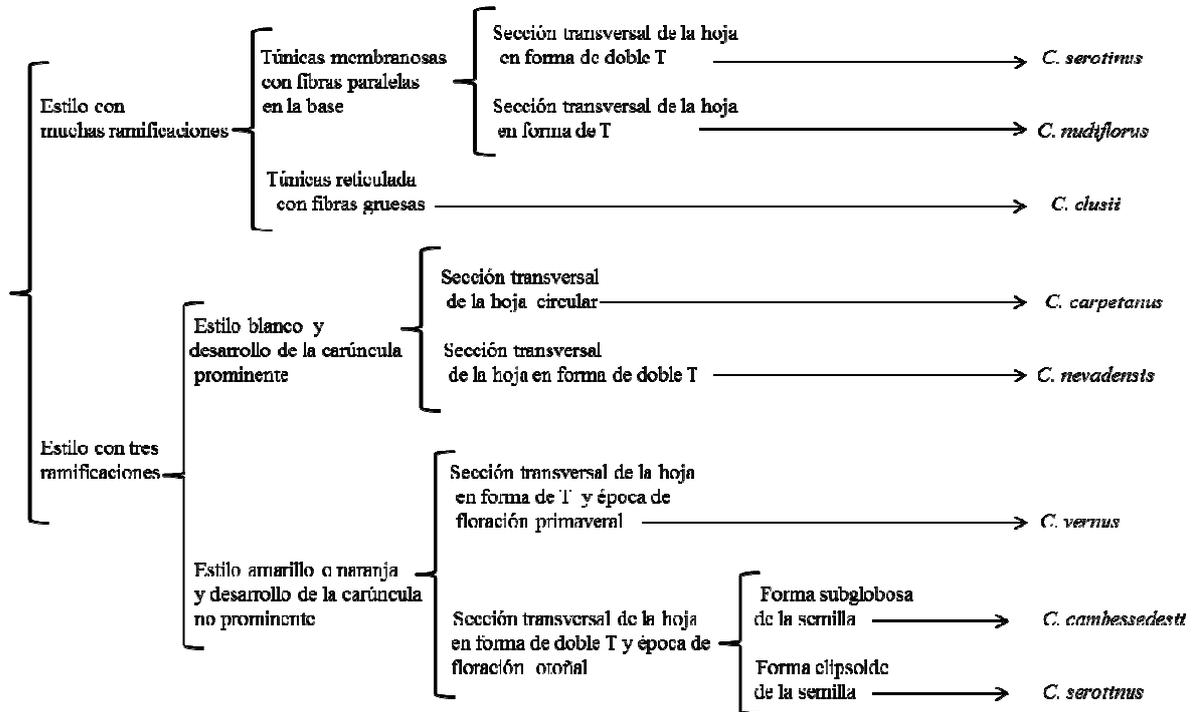


Figura 176 Diferenciación entre especies españolas de *Crocus* en base a los caracteres cualitativos

Tras realizar un análisis clúster, observamos que este número mínimo de caracteres no distorsiona el resultado mostrado en el apartado anterior. Estos caracteres agrupan las entradas de forma correcta en sus diferentes especies con una robustez de nudo entre 41-100%. La robustez de nudo de las especies es similar a la obtenida en la agrupación realizada con los 23 caracteres.

Este análisis clúster de las entradas realizado con los caracteres cualitativos (0) presenta un elevado y significativo coeficiente de correlación cofenético (0,9), que indica que el método de agrupamiento no ha distorsionado significativamente el resultado.

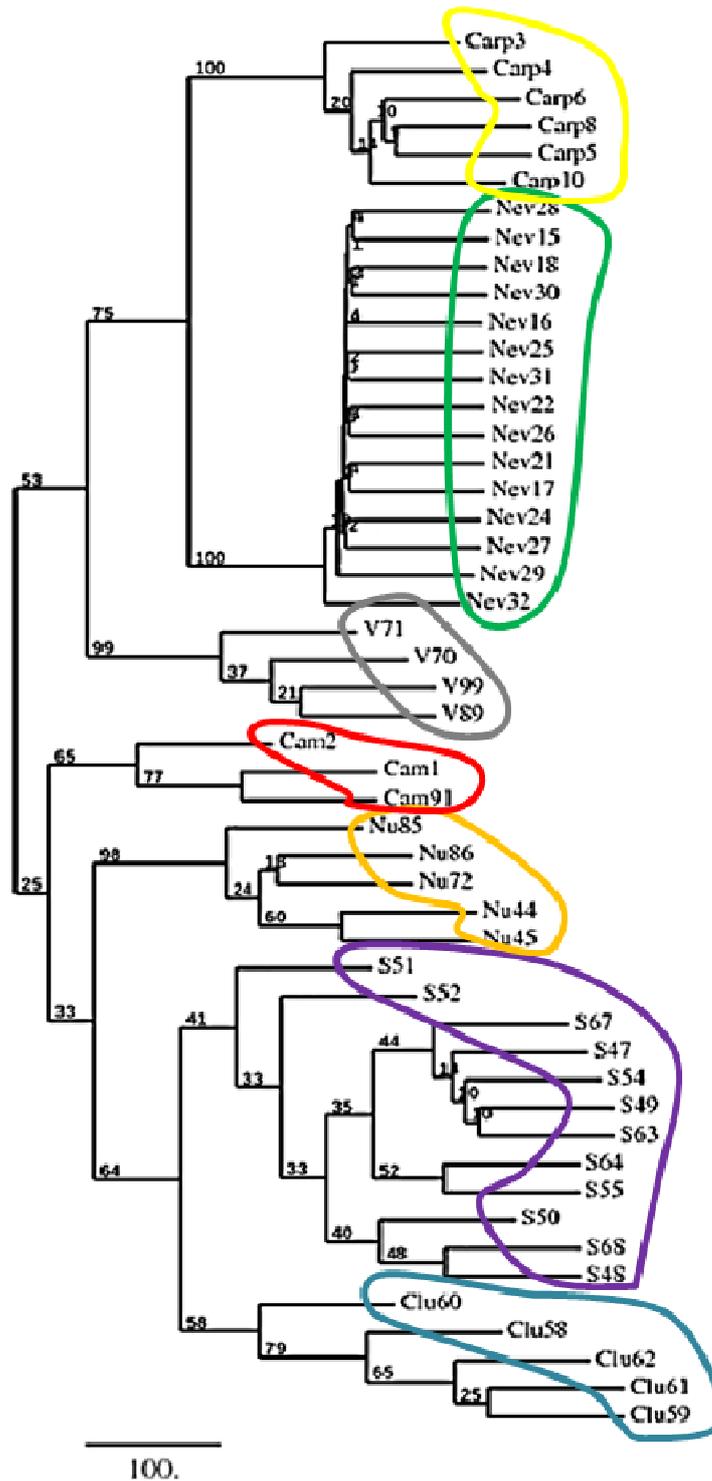


Figura 177. Dendrograma consenso que representa las entradas según el análisis clúster realizado con el mínimo número de caracteres cualitativos, basado en índice de similitud Simple Matching y el método de análisis UPGMA. Se muestra al lado de cada nodo el número de veces que ese nodo se ha representado en 100 árboles calculados con el programa Phylips. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: *C. nevadensis*; Amarillo: *C. carpetanus*; Blanco: *C. vernus*; Violeta: *C. serotinus*; Azul: *C. clusii*; Rojo: *C. cambessedesii*. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 12 en el apartado de Material y Métodos.

### **3. Fenología de las especies silvestres españolas del género *Crocus* spp.**



## 1 COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO EN CULTIVO PROTEGIDO

Se ha realizado un estudio comparativo de la fenología de las especies españolas de *Crocus* sobre una colección protegida bajo un umbráculo, atendiendo a las siguientes fases: salida de la hoja, momento de floración, salida de la cápsula y secado de la planta. En el siguiente apartado, se realiza el mismo experimento pero con las plantas en condiciones controladas.

### 1.1 ESTRUCTURA DE LA VARIACIÓN ENTRE LAS ESPECIES SILVESTRES DE *CROCUS* PARA CARACTERES RELACIONADOS CON LA FENOLOGÍA OBSERVADA EN CULTIVO PROTEGIDO

Para la mayoría de los caracteres relacionados con la fenología, la principal fuente de variación es interespecífica, siendo de destacar la importancia de este tipo de variación para el momento de la floración. Una excepción es el carácter días hasta el secado de la hoja cuya variación es, fundamentalmente, intraespecífica (Tabla 85). De estos caracteres, los días hasta la secado del fruto es el único que presenta uniformidad entre especies.

**Tabla 85 Componentes de la varianza para cada uno de los caracteres relacionados con la fenología. Días contados desde la plantación del cormo en el terreno (1 de agosto del 2011).**

	Varianza entre especies		Varianza entre entradas	
	%	gl	%	gl
Días hasta la brotación	77,70	6	22,30	81
Días hasta la salida de la hoja	65,57	6	34,33	98
Días hasta la floración	96,40	6	3,60	54
Días hasta secado de la hoja	42,94	6	57,06	101

### 1.2 VARIABILIDAD ENTRE LAS ESPECIES SILVESTRES DE *CROCUS* PARA CARACTERES RELACIONADOS CON LA FENOLOGÍA OBSERVADA EN CULTIVO PROTEGIDO

Los resultados indican que en relación con las especies de floración otoñal, no existen diferencias significativas entre *C. cambessedesii*, *C. serotinus*, *C. nudiflorus* (en cormos con tamaño de floración) y *C. clusii* en el momento de inicio de la brotación (Tabla 86), cuando emerge el brote portador de flores envuelto en los catafilos (Figura 178.1). Estos brotes también son portadores de hojas en todas las especies otoñales, salvo en el caso de *C. nudiflorus* que presenta histerantia. En esta especie, aquellos cormos sin capacidad para florecer presentan una brotación retrasada, y simultánea a la salida de su hoja.

#### IV. RESULTADOS

Tabla 86 Período transcurrido desde el 1 de agosto hasta la brotación, la salida de la hoja, la floración, la salida del fruto, la seca de los frutos y la seca de las hojas en las distintas especies silvestres españolas de *Crocus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones ( $p < 0,05$ ). DHB, DHH, DHF y DSH, son días hasta que el 50% de las plantas se encuentran en ese estado fisiológico. DHC y DSC: cuando se inicia la seca en al menos 20-30% de las plantas.

ESPECIE	Días hasta la brotación (DHB)			Días hasta la salida de la hoja (DHH)		
	Valor medio	Máx	Mín	Valor medio	Máx	Mín
<i>C. serotinus</i>	77 a	85	65	92 a	134	71
<i>C. clusii</i>	91 a	100	85	91 a	100	85
<i>C. nudiflorus</i>	89 a	98	81	160 c	225	114
<i>C. cambessedesii</i>	73 a	77	71	74 a	77	71
<i>C. nevadensis</i>	120 b	134	102	120 b	134	102
<i>C. carpetanus</i>	126 b	168	105	127 b	168	105
<i>C. vernus</i>	170 c	222	114	173 c	222	126

ESPECIE	Días hasta la floración (DHF)			Días hasta la salida del fruto (DHC)		
	Valor medio	Máx	Mín	Valor medio	Máx	Mín
<i>C. serotinus</i>	81 a	95	65	224 bc	217	245
<i>C. clusii</i>	105 b	107	102	217 b	217	217
<i>C. nudiflorus</i>	89 a	98	81	190 a	155	224
<i>C. cambessedesii</i>	104 b	130	88	236 bcd	231	242
<i>C. nevadensis</i>	189 c	212	162	243 cd	231	260
<i>C. carpetanus</i>	184 c	189	175	245 cd	231	267
<i>C. vernus</i>	226 d	239	217	250 d	239	258

ESPECIE	Días hasta secado del fruto (DSC)			Días hasta secado de la hoja (DSH)		
	Valor medio	Máx	Mín	Valor medio	Máx	Mín
<i>C. serotinus</i>	290 a	309	281	286 ab	302	260
<i>C. clusii</i>	279 a	283	275	278 a	295	260
<i>C. nudiflorus</i>	291 a	298	284	292 bcd	295	281
<i>C. cambessedesii</i>	285 a	298	280	290 bc	295	288
<i>C. nevadensis</i>	289 a	298	283	298 d	302	288
<i>C. carpetanus</i>	283 a	284	280	295 cd	302	288
<i>C. vernus</i>	289 a	298	282	285 ab	295	267

La apertura de los catafilos y consiguiente salida de la hoja (Figura 178.2), no muestra diferencias significativas entre *C. cambessedesii*, *C. serotinus* y *C. clusii*, si bien existe mucha mayor variabilidad entre entradas para estas dos últimas (Tabla 86). En la especie *C. nudiflorus* se retrasa el inicio de la salida de la hoja hasta enero. La especie *C. serotinus* manifiesta también un retraso en la salida de la hoja respecto la brotación, aunque de menor grado (de hasta 15 días).



**Figura 178** Colección de entradas de *Crocus silvestres* españoles sobre la que se ha realizado el estudio de fenología en cultivo protegido: 1) Cormos brotando; 2) Salida de la hoja; 3) Flor de *C. serotinus* BCU002965; 4) Flor de *C. nevadensis* BCU002359; 5) Fruto de *C. serotinus* BCU003173; 6) Fruto de *C. cambessedesii* BCU001685.

Dentro de las especies de floración primaveral, *C. nevadensis* es la primera en la que se observa la brotación, a finales de noviembre, y no presenta un adelanto significativo en relación con *C. carpetanus* (Tabla 86). En estas especies, se trata de brotes vegetativos en que los catafilos se abrirán rápidamente para dar lugar a la salida de las hojas. Cabe destacar la elevada variabilidad existente en *C. carpetanus* que presenta entradas que brotan desde mediados de noviembre hasta enero, y en *C. vernus* que brota desde la segunda quincena de noviembre hasta marzo. En las especies primaverales, la brotación y la salida de la hoja son simultáneas.

## IV. RESULTADOS

La salida de la flor es anterior en las especies *C. serotinus* (Figura 178.3) y *C. nudiflorus*, que florecen en la segunda mitad de octubre y sin diferencias para valores medios entre ellas. Sin embargo, hay que señalar la existencia de mucha variación dentro de la especie *C. serotinus*, en la que algunas entradas comienzan a florecer a principios de octubre. Medio mes más tarde florece *C. clusii*, mientras que *C. cambessedesii* florece a la primera quincena de noviembre (Tabla 86). Las especies primaverales florecen a partir de febrero, siendo las primeras *C. nevadensis* (Figura 178.4) y *C. carpetanus* en la primera quincena de febrero y la última especie en florecer es *C. vernus*, a mediados de marzo.

La salida del fruto en las especies otoñales se observa primero en *C. nudiflorus* (Figura 179.2), a partir del mes de febrero. En las especies *C. serotinus* y *C. clusii* se inicia en marzo (Figura 178.5). Sin embargo, en *C. cambessedesii* (Figura 178.6 y Figura 179.2) comienza a finales de ese mismo mes, casi simultáneamente con las especies de floración primaveral, en las que se observa el fruto a principios del mes de abril y sin diferencias significativas entre ellas (Tabla 86).

El secado del fruto no muestra diferencias significativas entre las especies. Este periodo de secado sucede desde principios de mayo, hasta la primera quincena de junio en algunas entradas de *C. serotinus* (ver Tabla 86 y Figura 179.1).

En relación con el secado de la hoja, se adelanta de forma significativa la especie de floración otoñal *C. clusii* (Figura 179.2), donde ocurre a principios de mayo. En las especies de floración primaveral *C. nevadensis* y *C. carpetanus* (Figura 179) el secado de la planta se retrasa hasta finales de mayo. No hay grandes diferencias entre el resto de especies, en las que la senescencia llega a mediados del mes de mayo. Cabe destacar la especie de floración primaveral *C. vernus* (Figura 179), que teniendo la salida de hojas más tardía, se encuentra entre las primeras en el secado de las mismas (Tabla 86).

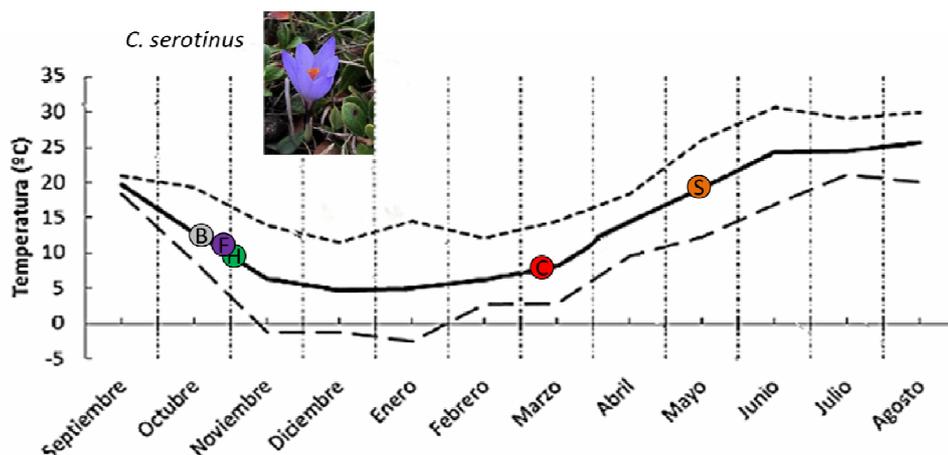


Figura 179.1 Fenología de las especies españolas de *Crocus* de floración otoñal en condiciones de cultivo protegido. (B) Brotación, (H) Salida de la hoja, (F) Floración, (S) Salida del fruto y (S) Secado de la hoja y del fruto.(Continúa).

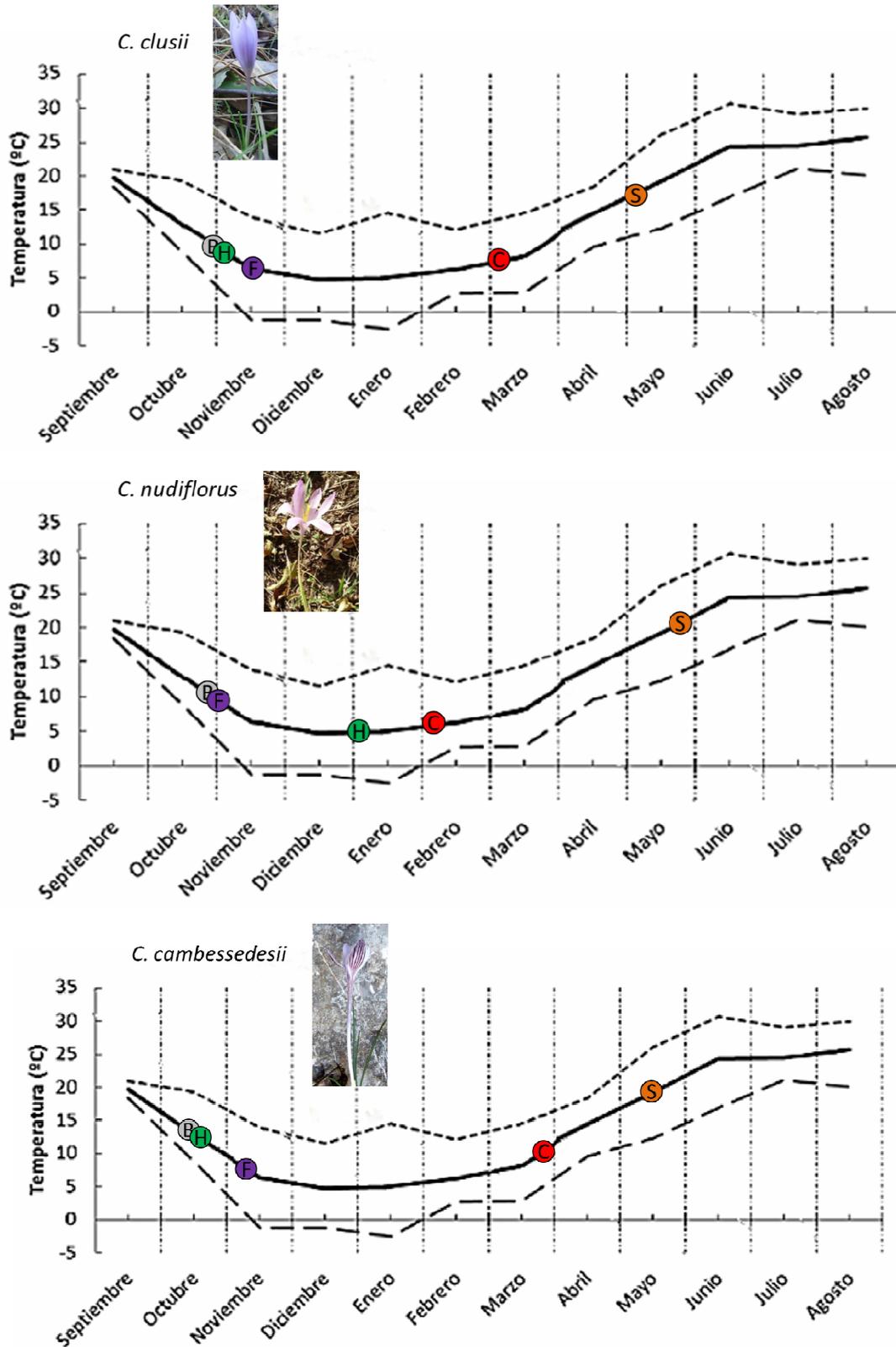


Figura 179.2 Fenología de las especies españolas de *Crocus* de floración otoñal en condiciones de cultivo protegido. (B) Brotación, (H) Salida de la hoja, (F) Floración, (C) Salida del fruto y (S) Secado de la hoja y del fruto (Continúa).

#### IV. RESULTADOS

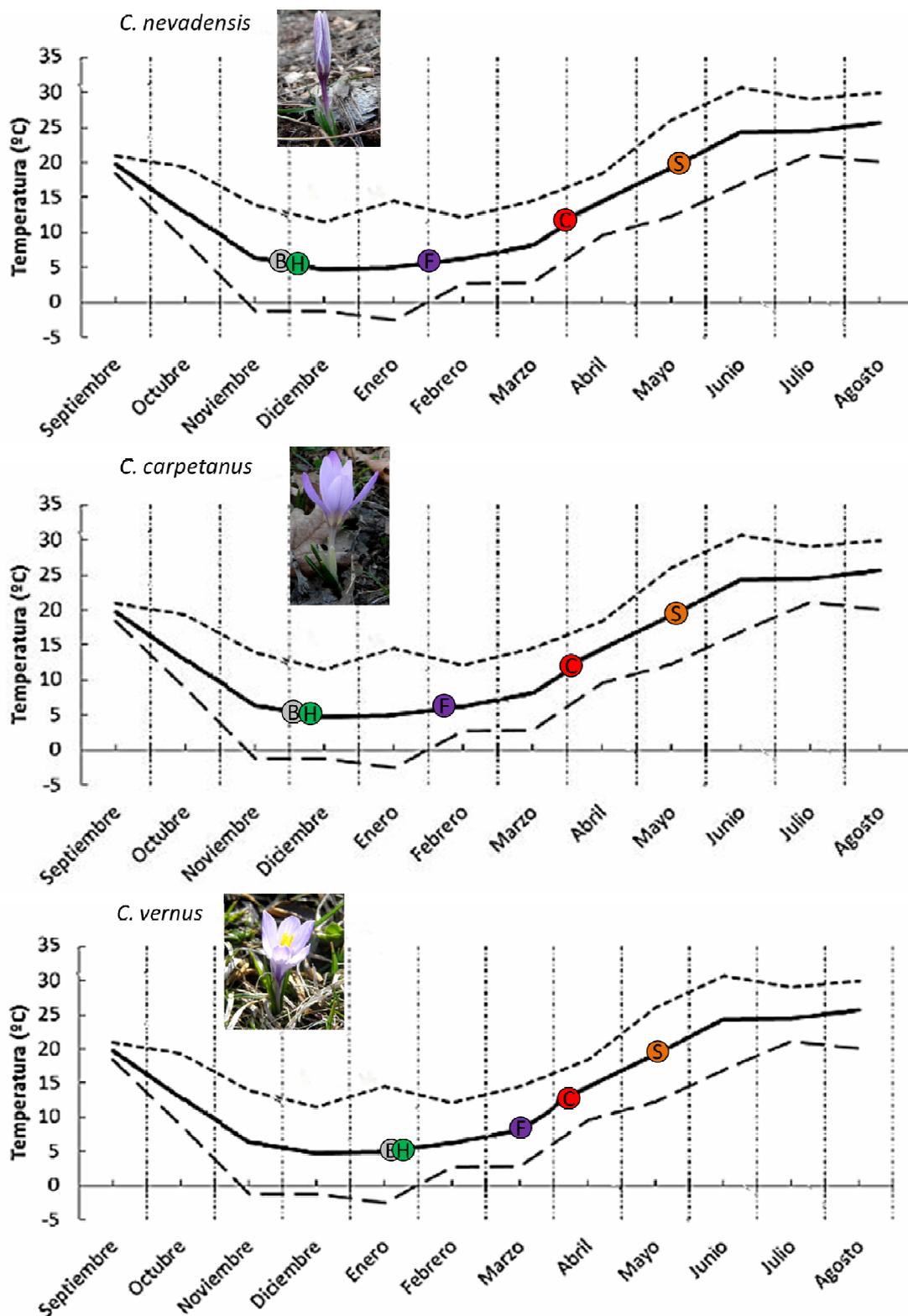


Figura 180. Fenología de las especies españolas de *Crocus* de floración primaveral en condiciones de cultivo protegido. Siendo; **B** Brotación, **H** Salida de la hoja, **F** Floración, **C** Salida del fruto y **S** Secado de la hoja y del fruto.

## 2 COMPORTAMIENTO FENOLÓGICO EN CULTIVO CONTROLADO

En este apartado se presenta el estudio de la fenología de las especies españolas de *Crocus* bajo condiciones controladas, atendiendo a las siguientes fases: salida de la hoja, momento de floración, salida de la cápsula y secado de la planta.

Los datos sobre los que se analizan los siguientes resultados son los obtenidos en un mismo año con las especies de floración primaveral *C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus*, y con material de las especies otoñales *C. serotinus* y *C. nudiflorus*. Todo el material vegetal se ha desarrollado bajo las mismas condiciones de temperatura. La formación de la yema floral es inducida a 23°C durante los tres meses de junio, julio y agosto, para después bajar la temperatura hasta los 17°C a final de septiembre. Se mantuvo esta misma temperatura hasta el final del ciclo vital de las plantas.

Los resultados del ensayo en cámara indican que las especies que florecen en otoño en su ambiente natural, son las que antes brotan (Tabla 87). Estas especies brotan a principios del mes de octubre, mientras que las especies primaverales brotan a mediados de noviembre, a excepción de *C. vernus* la especie más tardía, que emerge a mediados de enero (Figura 182). Estas especies muestran una brotación y salida de la hoja simultánea, lo que no se observa en las especies otoñales ensayadas.

*Tabla 87* Período transcurrido desde el 1 de agosto hasta la brotación, la salida de la hoja, la floración y el secado de las hojas, en las distintas especies silvestres españolas de *Crocus* cultivadas en un ambiente controlado. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones ( $p < 0,05$ ). DHB, DHH, DHF y DSH son días hasta que el 50% de las plantas se encuentran en ese estado fisiológico.

ESPECIE	Días hasta brotación (DHB)			Días hasta la salida de la hoja (DHH)		
	Valor medio	Máx	Mín	Valor medio	Máx	Mín
<i>C. serotinus</i>	54 a	54	54	73 a	78	71
<i>C. nudiflorus</i>	69 b	72	65	123 c	132	106
<i>C. nevadensis</i>	107 c	111	103	107 bc	111	103
<i>C. carpetanus</i>	108 c	111	103	108 b	111	103
<i>C. vernus</i>	152 d	155	149	152 d	155	149

ESPECIE	Días hasta floración (DHF)			Días hasta el secado de la hoja (DHS)		
	Valor medio	Máx	Mín	Valor medio	Máx	Mín
<i>C. serotinus</i>	69 a	71	68	218 a	218	218
<i>C. nudiflorus</i>	78 b	82	75	300 c	308	293
<i>C. nevadensis</i>	139 c	173	169	267 b	297	252
<i>C. carpetanus</i>	170 d	145	131	263 b	272	259
<i>C. vernus</i>	224 e	226	223	298 c	303	293

De manera similar a lo observado con anterioridad en condiciones no controladas (Figura 179.1), la salida de la hoja se retrasa de forma acentuada respecto a la brotación en la especie *C. nudiflorus*, manifestando así su histerantia. La especie *C. serotinus*

## IV. RESULTADOS

muestra también un retraso en la salida de la hoja respecto la brotación, aunque de menor grado (Figura 181).

La salida de la flor es anterior en las especies *C. serotinus* y *C. nudiflorus*, que florecen en la segunda mitad de octubre y sin diferencias importantes (Tabla 87). En cambio, las especies de floración primaveral florecen de forma escalonada y con importantes diferencias. *C. nevadensis* florece desde la segunda quincena de diciembre, la especie *C. carpetanus* florece desde mediados de enero y, finalmente, *C. vernus* desde finales de febrero (Figura 182). Hay que señalar el adelanto de la floración en estas condiciones en relación a lo observado bajo umbráculo, con temperaturas más bajas. La falta de cuajado del fruto en estas condiciones hizo imposible su estudio.

El secado de la hoja se manifiesta primero en la especie *C. serotinus*, a principios de marzo (Tabla 87). En cambio, en el resto de especies no sucede hasta el mes de mayo. Es de destacar el caso de *C. nudiflorus*, que brota a principios de octubre junto con *C. serotinus*, y seca sus hojas a finales de mayo (Figura 181).

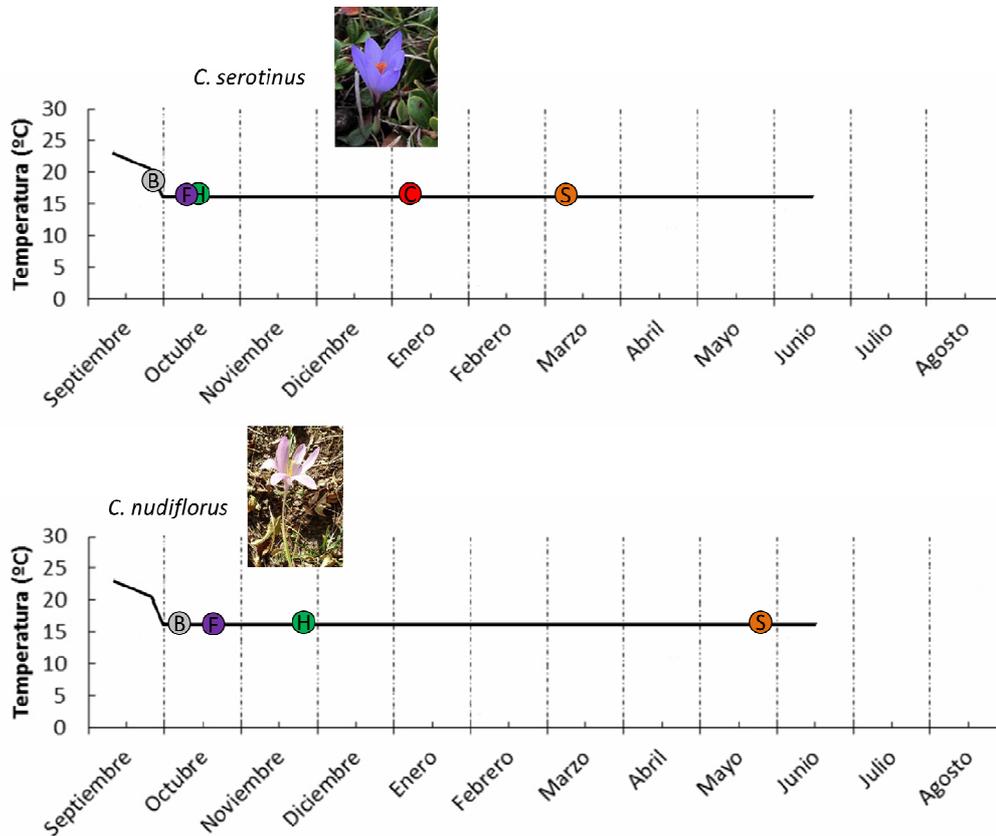


Figura 181 Fenología de las especies españolas de *Crocus* de floración otoñal en condiciones de cámara. Siendo:

ⓑ Brotación, Ⓜ Salida de la hoja, Ⓧ Floración y Ⓨ Secado de la hoja y del fruto.

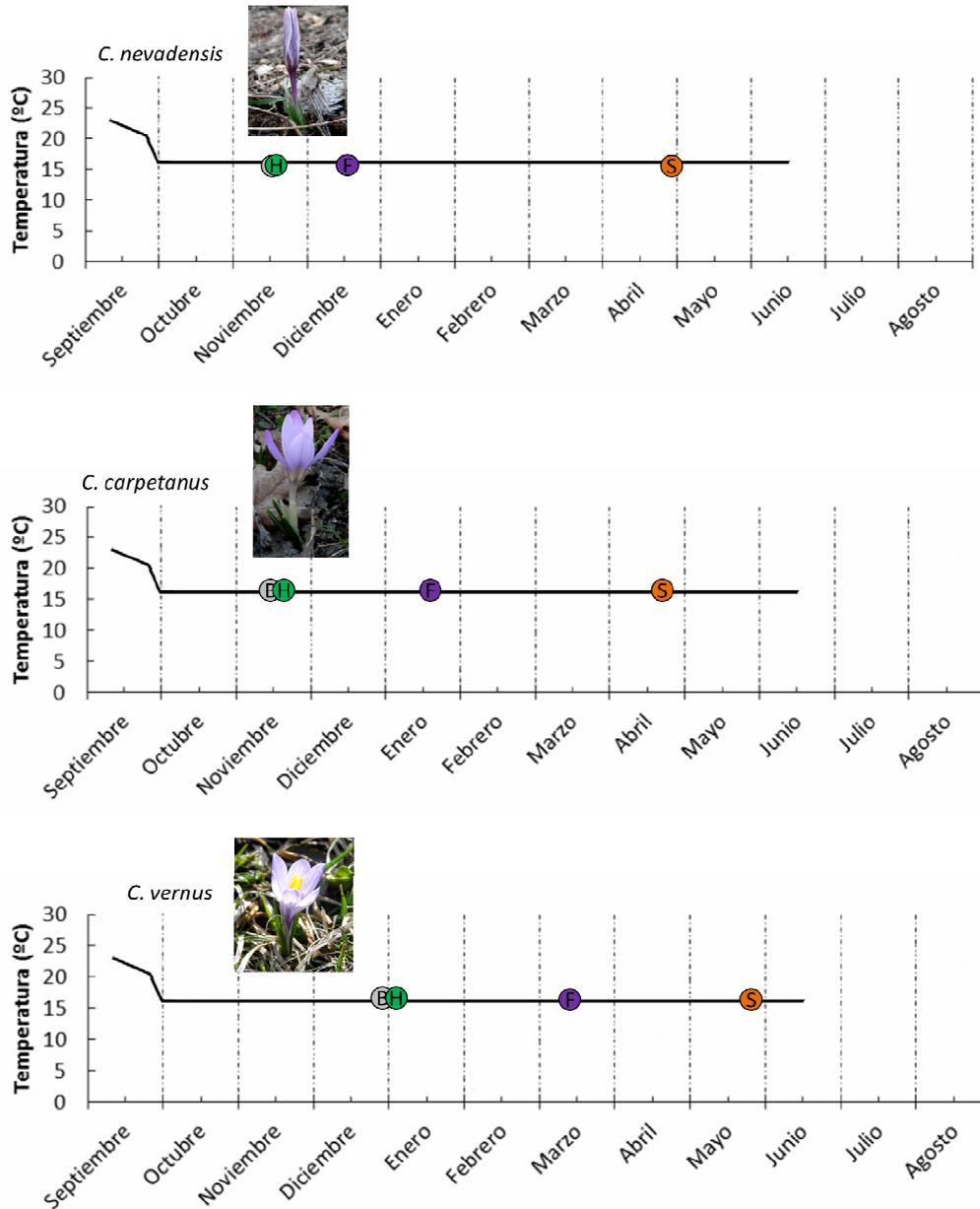


Figura 182 Fenología de las especies españolas de *Crocus* de floración primaveral en condiciones controladas. Siendo:

ⓑ Brotación, Ⓜ Salida de la hoja, Ⓣ Floración y Ⓞ Secado de la hoja y del fruto.

Al comparar los materiales desarrollados en cámara y los que crecen en condiciones de campo bajo techado, se observa que las temperaturas frías propias del invierno producen un retraso generalizado de todas las fases del ciclo vital de las plantas. No obstante, cuando la temperatura de desarrollo se mantiene a 17°C, las especies de floración primaveral también comienzan su desarrollo más tarde que las otoñales pero la diferencia se acorta. Asimismo, en estas mismas condiciones sin frío invernal, la especie *C. nudiflorus* desarrolla las hojas dos meses más tarde de comenzar la brotación, manifestándose así también la histerantia típica de esta especie.

### 3 COMPORTAMIENTO FENOLOGICO EN SU AMBIENTE NATURAL

La fecha de colecta de material vegetal con flores nos puede indicar su periodo de floración en su ambiente natural. En la Tabla 88 se muestra de forma resumida el periodo durante el que se ha observado floración de las distintas especies, el rango de altitud de las localidades de colecta, y el número de localidades colectadas.

Dentro de las especies de floración otoñal, no se observan grandes diferencias en la periodo de floración entre *C. serotinus*, *C. clusii* y *C. nudiflorus*, que comienzan a florecer desde finales de septiembre hasta mediados de octubre. La especie que muestra una floración más tardía que comienza en noviembre es *C. cambessedesii*. En cuanto a las primaverales, la primera en florecer es *C. nevadensis*. Las fechas de floración más tardías corresponden a accesiones de esta especie que se encuentran en localidades con mayor altitud. *C. carpetanus* y *C. vernus* son las que presentan una floración más tardía y, en general, se encuentran a mayores altitudes que *C. nevadensis* (Tabla 88).

Tabla 88 Periodo de floración de las especies en su ambiente natural, información procedente de las colectas.

Especies	Periodo de floración		Nº poblaciones	Elevación (m.s.n.m.)
	Inicio	Final		
<i>C. serotinus</i>	18/sep	28/oct	12	1085-1395
<i>C. clusii</i>	01/oct	03/oct	2	14-88
<i>C. nudiflorus</i>	19/sep	15/oct	7	910-2100
<i>C. cambessedesii</i>	07/nov	09/nov	3	30-170
<i>C. nevadensis</i>	16/feb	04/mar	8	386-1800
<i>C. carpetanus</i>	23/feb	14/mar	3	1100-1779
<i>C. vernus</i>	25/abr	03/may	1	1458-1580

Considerando los tres ambientes estudiados, la especie *C. serotinus* es la primera que florece, si bien no muestran diferencias importantes con *C. nudiflorus* (Tabla 89). *C. cambessedesii* es la especie de floración otoñal más tardía en todos los ambientes estudiados (Tabla 89). Una vez llega la primavera, la primera en florecer es siempre *C. nevadensis*, cuya floración se adelanta de forma importante en el ambiente controlado, en ausencia de frío invernal. La especie *C. carpetanus*, en todos los ambientes observados, florece más tarde que *C. nevadensis*. La última especie en florecer es siempre *C. vernus*.

Tabla 89 Comparación del periodo de floración entre los distintos ambientes de cultivo estudiados.

PERIODO DE FLORACIÓN			
Especies	Ambiente natural	Ambiente protegido	Ambiente controlado
<i>C. serotinus</i>	18/sep-28/oct	05/oct-05/nov	08/oct-11/oct
<i>C. clusii</i>	01/oct-03/oct	11/nov-16/nov	
<i>C. nudiflorus</i>	19/sep-15/oct	21/oct-07/nov	15/oct-22/oct
<i>C. cambessedesii</i>	07/nov-09/nov	28/oct-9/dic	
<i>C. nevadensis</i>	16/feb-04/mar	10/ene-01/mar	10/dic-24/dic
<i>C. carpetanus</i>	23/feb-09/mar	23/ene-06/feb	17/ene-21/ene
<i>C. vernus</i>	25/abr-03/may	06/mar-28/mar	12/mar-15/mar

#### 4 INFLUENCIA DEL PESO DEL CORMO EN LA FENOLOGÍA

En la especie cultivada de este género (*C. sativus*), se ha descrito la influencia del tamaño del cormo en la floración. Con objeto de estudiar el efecto de este factor tamaño en la brotación y floración de las especies silvestres españolas, se ensayaron cormos que variaban en tamaño de la especie *C. serotinus*, y se estudió su brotación y su capacidad de florecer. Se escogió esta especie por ser aquella de la que se podía disponer de una mayor cantidad de materiales de diferente tamaño y peso.

En la siguiente grafica (Figura 183) se muestra un experimento de brotación realizado con cormos de diferentes tamaños. Se observa un orden de brotación, en el que los cormos de mayor peso (1,88 g) brotan al mes y medio después de ser sembrados (principios de octubre), mientras que los cormos de menor tamaño (0,03 g) brotan tres meses después (a mediados de noviembre). Asimismo, estos cormos de menor tamaño presentan una brotación más dilatada en el tiempo (Figura 183 y Tabla 90).

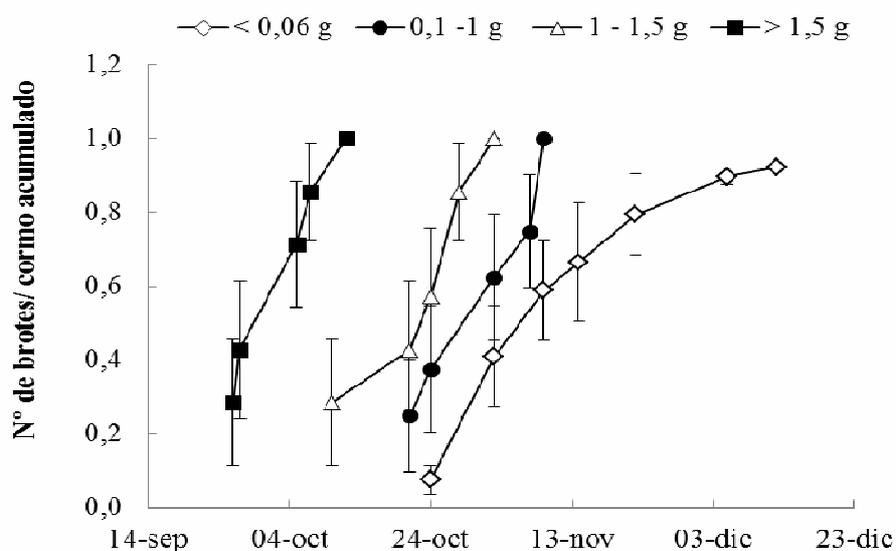


Figura 183 Influencia del peso del los cormos de *C. serotinus* en la brotación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tamaños para alcanzar un 50% de la brotación ( $p < 0,05$ ).

## IV. RESULTADOS

Tabla 90 Influencia del peso del cormo sobre el tiempo requerido para alcanzar el 50% de la brotación. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Tratamientos	Peso de los cormos (g)			Días hasta la brotación		
	Media	Mínimo	Máximo	Media	Mínimo	Máximo
> 1,5 g	1,88 d	1,76	2,08	95 a	87	106
1- 1,5 g	1,23 c	1,02	1,32	113 b	101	124
0,1 - 1 g	0,49 b	0,22	0,77	122 bc	112	131
< 0,06 g	0,03 a	0,017	0,058	132 c	115	164

## 5 INFLUENCIA DEL PESO DEL CORMO EN LA DIFERENCIACIÓN FLORAL

El peso del cormo muestra una gran influencia en la diferenciación floral, desarrollándose flores sólo a partir de un peso de cormo determinado. Este peso mínimo para florecer puede variar algo en función de la especie pero, en general, está próximo a 1g. No obstante, en la Figura 184 podemos observar que la especie *C. nevadensis* requiere un tamaño algo mayor y en *C. vernus* florecen cormos con menor tamaño aunque en baja proporción.

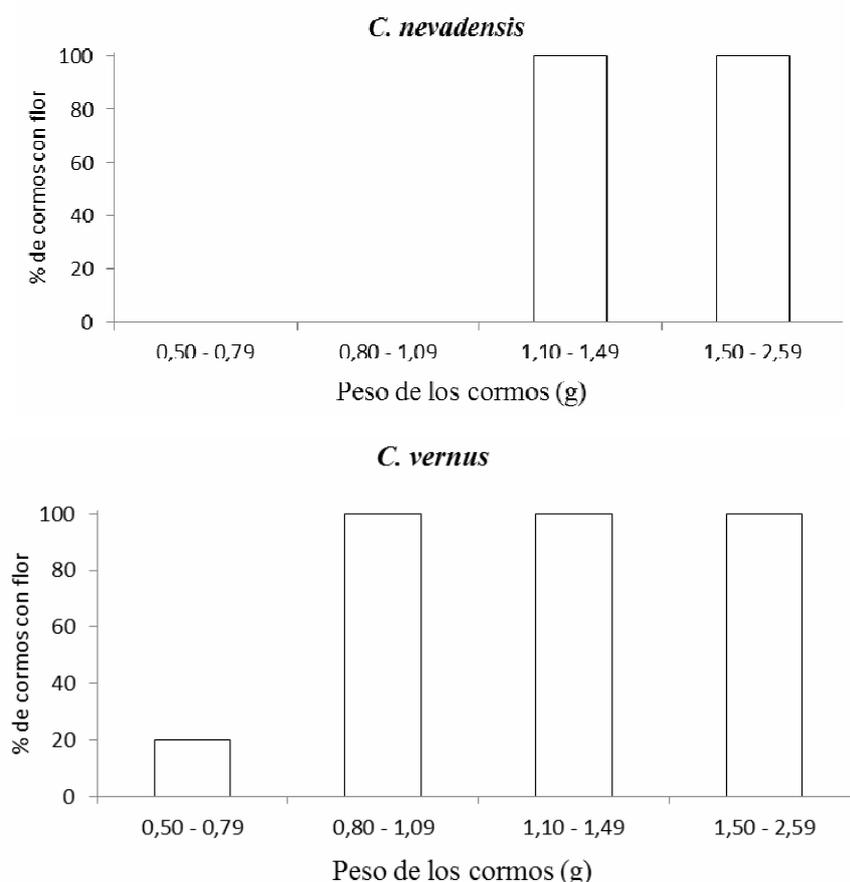
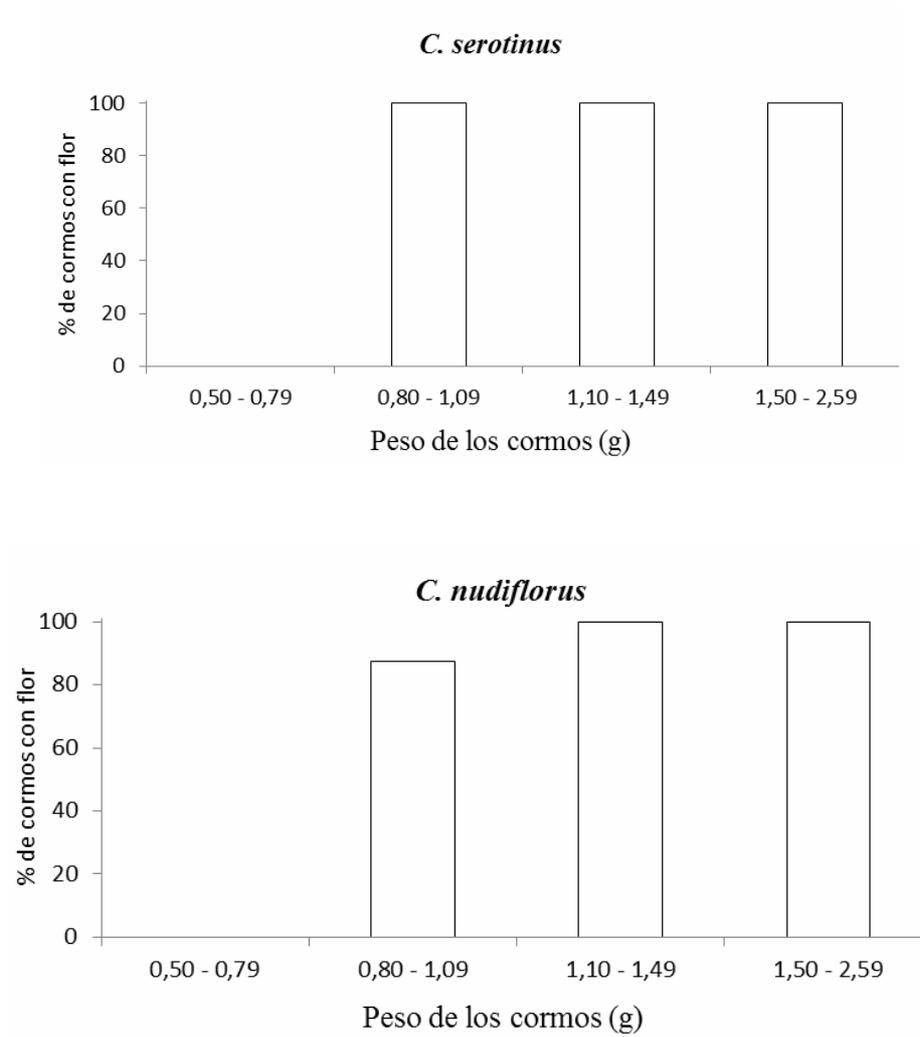


Figura 184 .1. Influencia del peso del cormo en la capacidad de florecer de cormos de las especies *C. nevadensis* y *C. vernus*. Se indica el % de cormos con flor respecto al total de cormos del mismo lote.



**Figura 184.2.** Influencia del peso del cormo en la capacidad de florecer de cormos de las especies *C. serotinus* y *C. nudiflorus*. Se indica el % de cormos con flor respecto el total de cormos del mismo lote.



## **4. Fisiología de las especies silvestres españolas del género *Crocus* spp.**



## 1 FISIOLÓGÍA DE LA FLORACIÓN DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DE *CROCUS*

Se ha estudiado el efecto de la temperatura en la diferenciación floral y en el proceso posterior de floración, en especies de floración otoñal y primaveral.

### 1.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA DIFERENCIACIÓN FLORAL

Las especies de floración otoñal (*C. serotinus* y *C. nudiflorus*) y primaveral (*C. nevadensis* y *C. vernus*) que han sido ensayadas, desarrollan meristemas florales de forma óptima a 23°C de temperatura y durante el verano (Tabla 91). Hay que destacar la coincidencia del periodo de diferenciación floral tanto en especies de primavera como de otoño, si bien el desarrollo del meristemo floral es algo más temprano en especies otoñales. En las cuatro figuras (Figura 185-Figura 188) se observa una secuencia de este desarrollo desde el mes de junio, en que se inicia la incubación a 23°C, hasta el mes de septiembre-octubre.

Los cormos conservados a temperaturas de 10°C no diferencian flores. Sólo *C. nudiflorus* presentan un desarrollo anómalo en un porcentaje bajo de cormos (15,38%, Tabla 91).

A temperaturas de 30°C, sólo *C. serotinus* muestra un comportamiento similar al azafrán, desarrollando flor en una elevada proporción de los cormos. El resto de especies, o bien no desarrollan flor a esta temperatura, o lo hacen en proporciones muy bajas (*C. vernus*). En ocasiones, dan lugar a meristemas florales anómalos (*C. nudiflorus*) (Tabla 91).

**Tabla 91** Influencia de la temperatura de conservación de los cormos durante la época estival, en la diferenciación de meristemas florales. Se muestra el porcentaje de cormos muestreados que presentan meristemas florales en buenas condiciones. \* Presentan desarrollo de meristemas florales anómalos pero en baja proporción.

Temperatura de conservación de los cormos	<i>C. nevadensis</i>	<i>C. vernus</i>	<i>C. serotinus</i>	<i>C. nudiflorus</i>
5°C	0	-	-	-
10°C	0*	0*	0	15,4
23°C	77,8	72,7	100	75
30°C	0	7,6	66,7	0*
35°C	-	-	0	-

*C. NEVADENSIS*

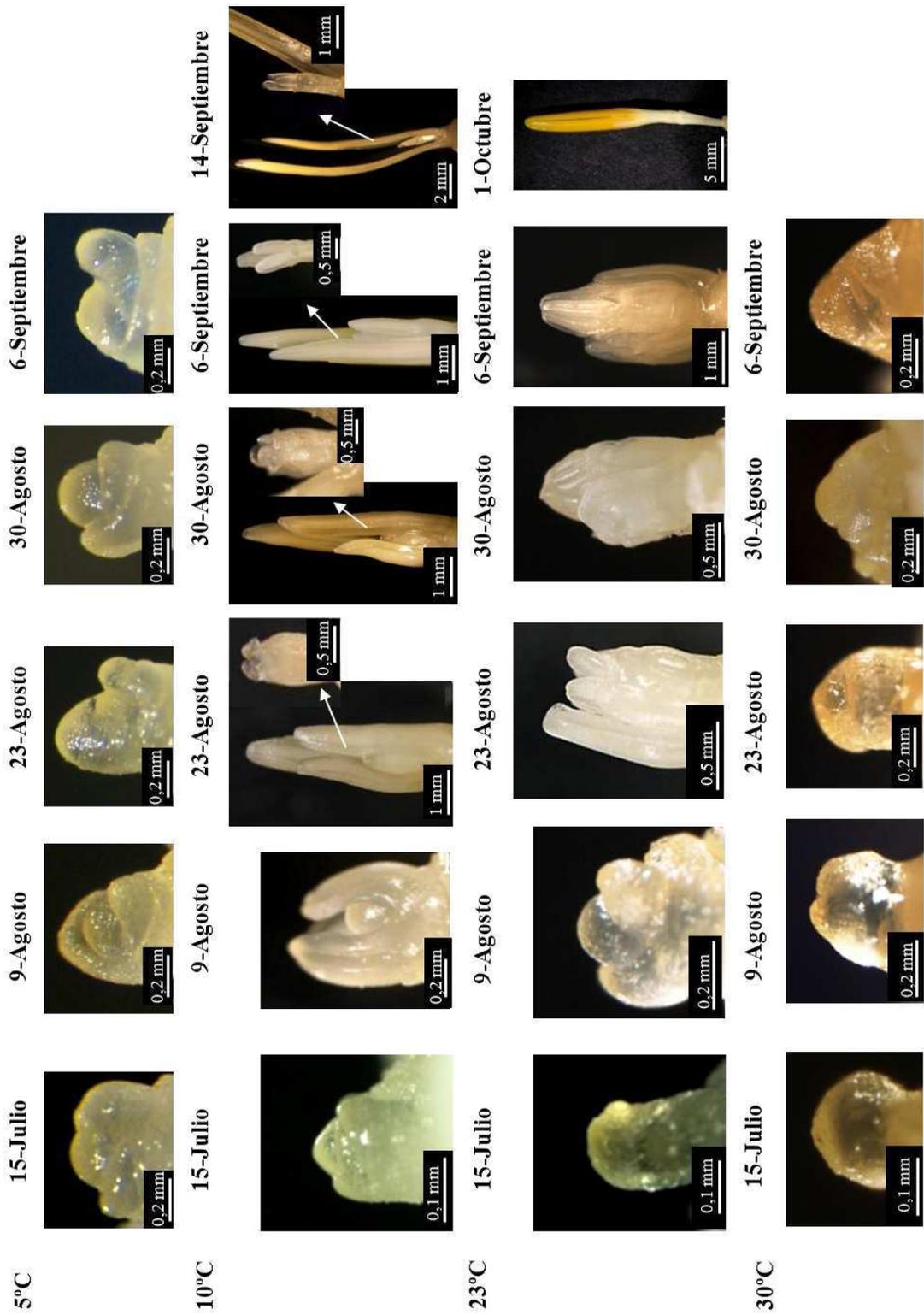


Figura 185 Influencia de la temperatura de conservación de los cormos en la inducción floral de *C. nevadensis*

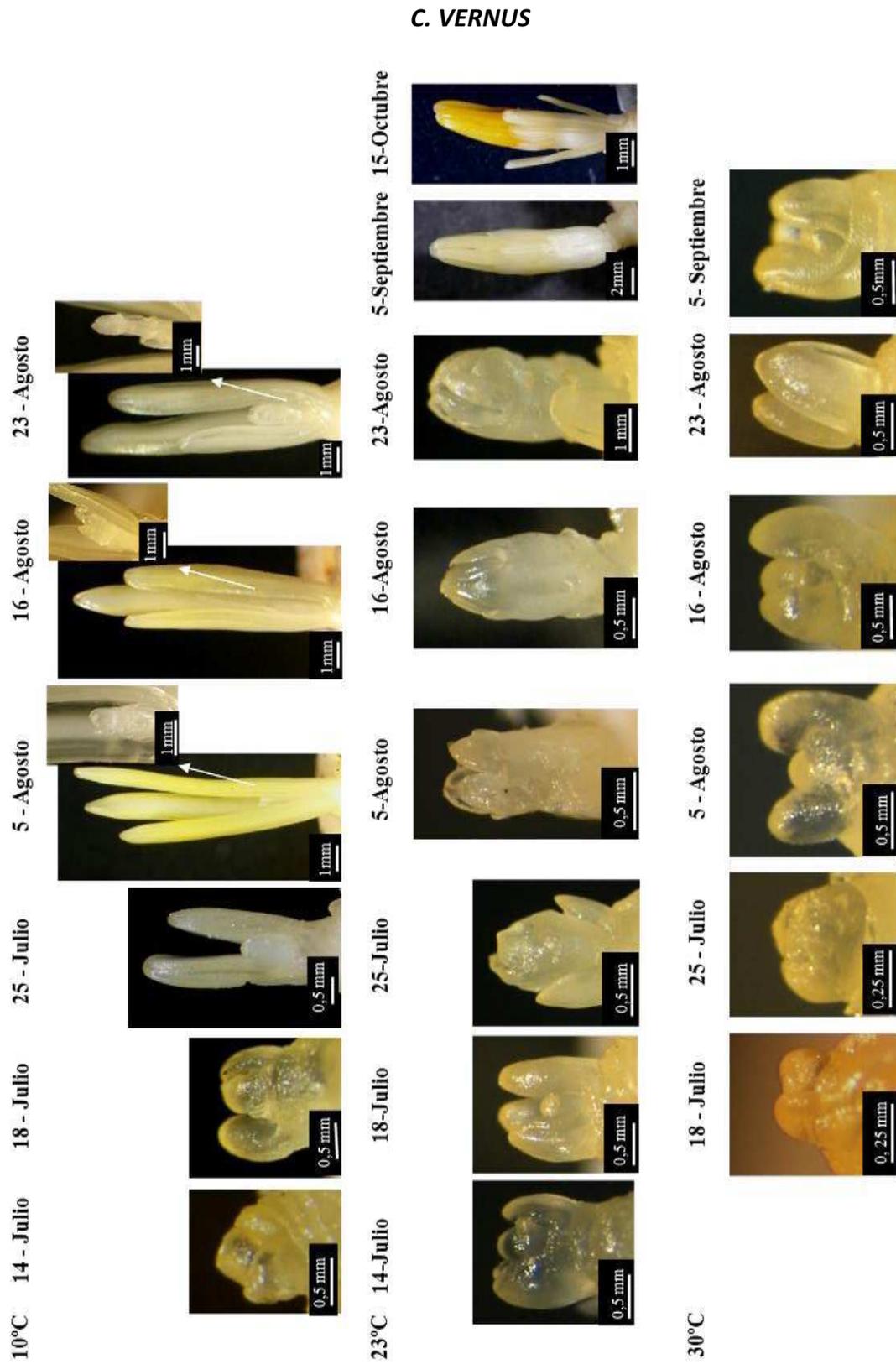


Figura 186 Influencia de la temperatura de conservación de los cormos en la inducción floral de *C. vernus*

*C. SEROTINUS*

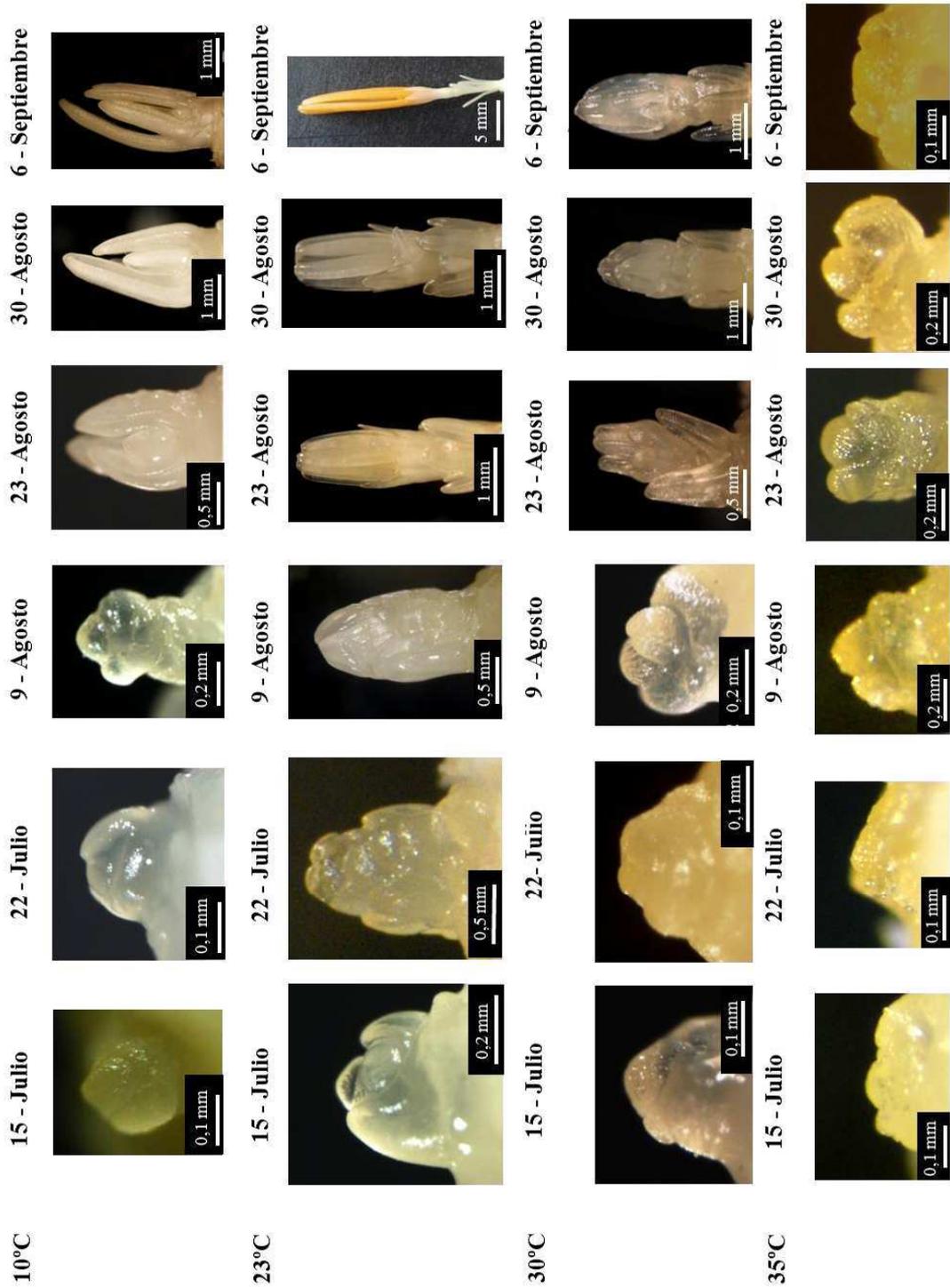


Figura 187 Influencia de la temperatura de conservación de los cormos en la inducción floral de *C. serotinus*

**C. NUDIFLORUS**

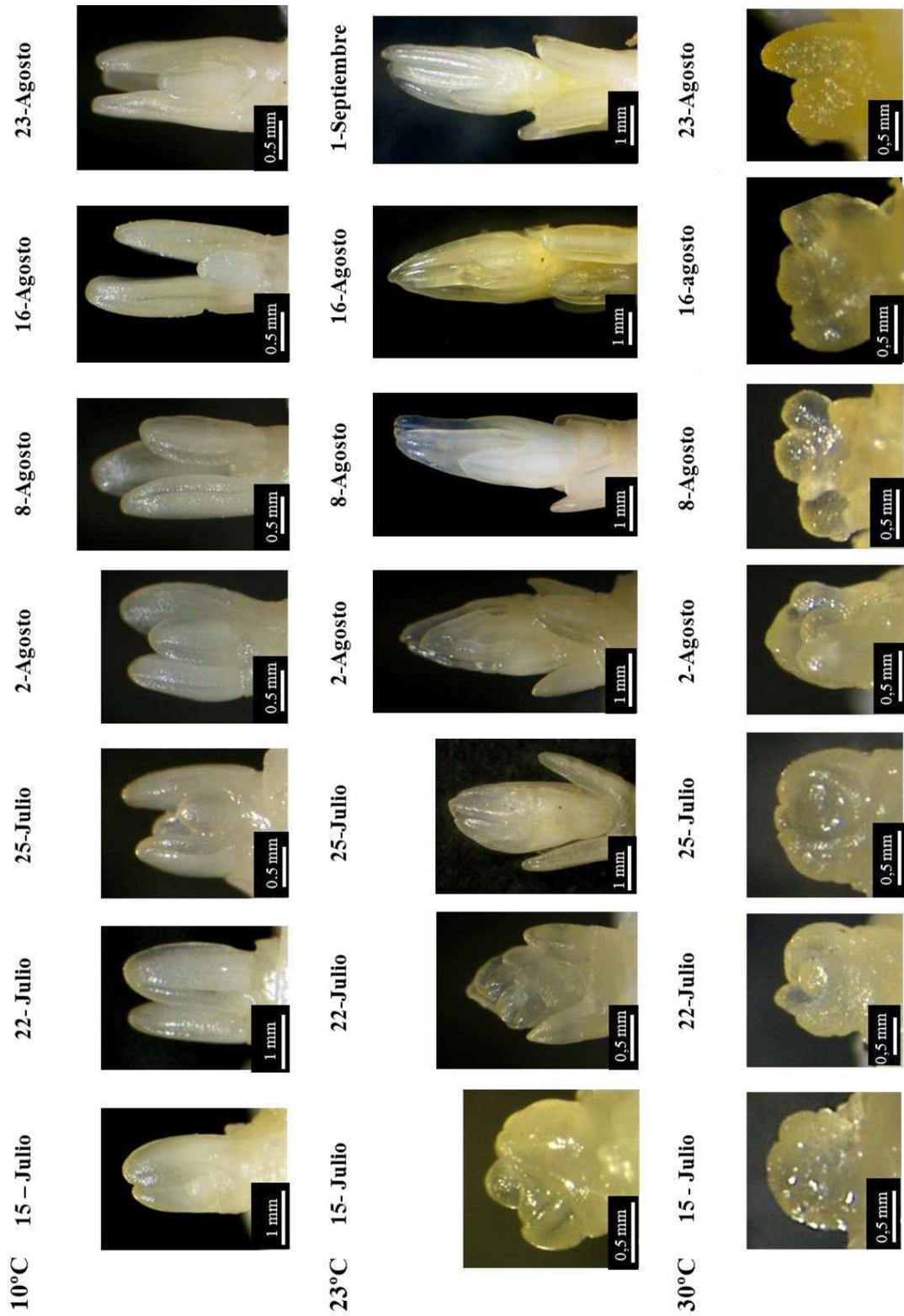


Figura 188 Influencia de la temperatura de conservación de los cormos en la inducción floral de *C. nudiflorus*.

## IV. RESULTADOS

### 1.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA FLORACIÓN Y EN EL TAMAÑO DE LA FLOR EN LAS ESPECIES DE FLORACIÓN PRIMAVERAL.

#### *C. nevadensis*

Una vez formada la yema floral en verano, la temperatura se baja progresivamente hasta alcanzar los 10°C a mediados de noviembre. Si a partir de este momento la temperatura se mantiene en este valor de forma constante, la floración se produce en diciembre, más de dos meses antes que en su hábitat natural (Figura 189).

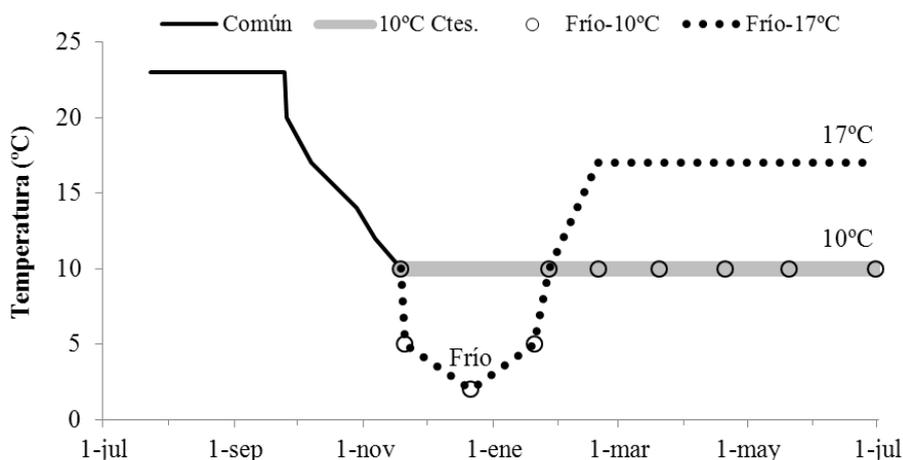


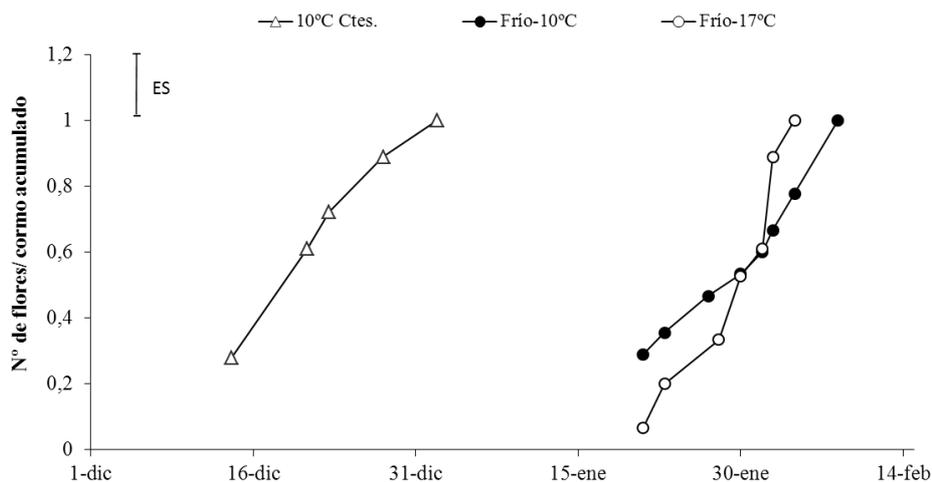
Figura 189 Tratamiento térmico de los ensayos de floración realizados con cormos de *C. nevadensis*.

La aplicación de un período de frío desde finales de noviembre hasta finales de enero tal como se especifica en la Figura 189, provoca un retraso en la floración de 40 días, si bien el número de flores por cormo no varía (Tabla 92 y Figura 190). Sin embargo, el período de floración se acorta a la mitad.

Tabla 92 Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de *C. nevadensis* en el periodo de floración, en el periodo transcurrido desde el 1 de agosto hasta que el 50% de las plantas florecen y en el número de flores por cormo. Se muestran los valores medios. Datos conjuntos de los años 2009 y 2010. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

	Periodo de floración (días)	Días hasta floración	Nº de flores por cormo
10°C constantes	18 b	143 a	1 a
Frío-10°C	7 a	182 b	1 a
Frío-17°C	4 a	182 b	1 a

Un ascenso de la temperatura a finales de enero de 10°C a 17°C, tras el período de frío, no provoca cambios significativos en la floración ( $p\text{-value} > 0,05$ ) (Tabla 92 y Figura 190).



**Figura 190** Influencia de la temperatura en la floración de *C. nevadensis*. △10°C desde mediados de noviembre; ○ 5-2°C desde mediados de noviembre hasta finales de enero en que se sube la temperatura a 17°C. ● 5-2°C desde noviembre hasta finales de enero en que se sube la temperatura a 10°C. ES: error estándar.

Los cormos que florecen 10°C, procedentes del tratamiento con frío (2º-5°C), dan lugar a flores de mayor tamaño (101 mm con frío frente 88 mm sin frío), siendo similar la vida media. No obstante, no se observan diferencias de tamaño entre las flores producidas por cormos sometidos a un tratamiento de 10°C constantes y las que proceden de cormos sometidos a un tratamiento frío y que florecen a 17°C. La vida media de la flor es significativamente menor en cormos que florecen a 17°C. (Tabla 93 y Figura 191).

**Tabla 93** Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de *C. nevadensis* en la vida media y la longitud máxima de las flores producidas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). Datos del año 2010.

	Longitud media (mm)	Vida media(días)
10°C constantes	88,2 a	8 b
Con frío - 10°C	101,2 b	8 b
Con frío - 17°C	85,3 a	5 a

En la Figura 191 siguiente se ilustran la influencia del tratamiento previo de frío en el retraso de la floración.

**CROCUS NEVADENSIS**

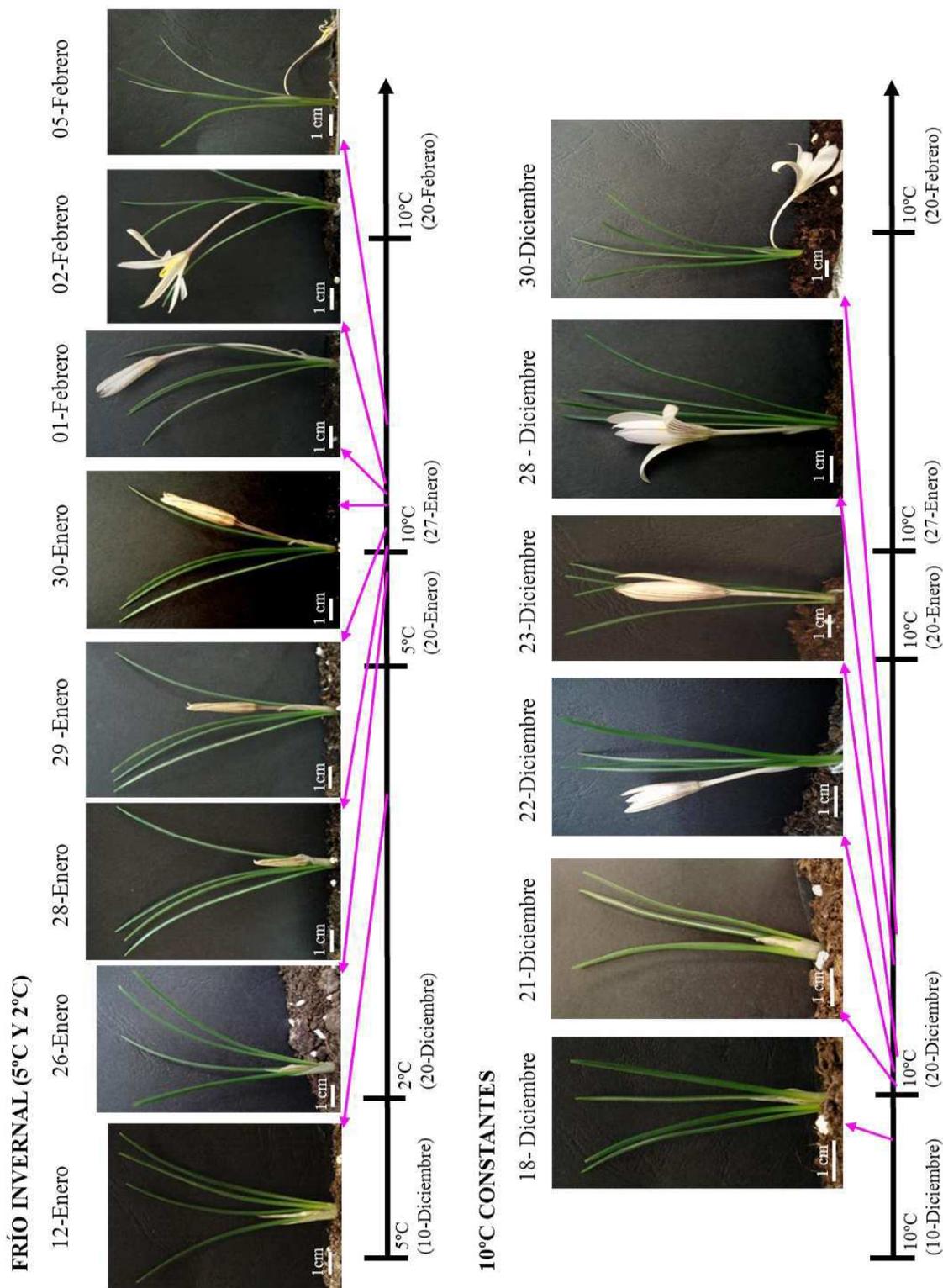
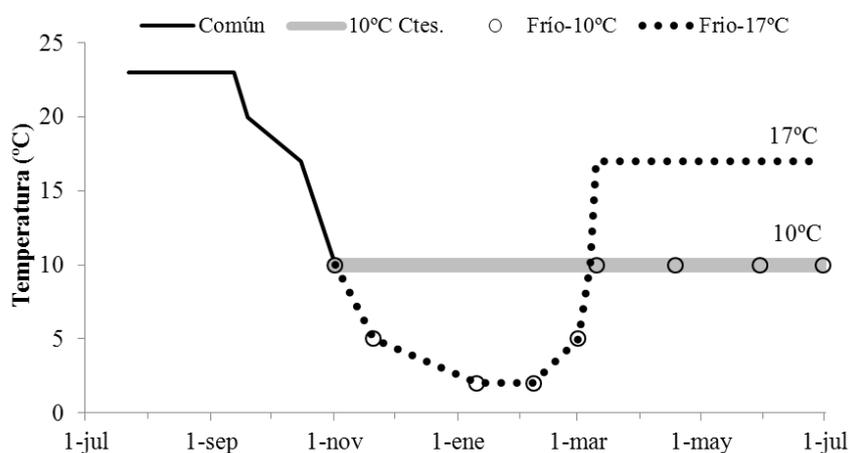


Figura 191 Floración de *C. nevadensis* tras dos meses de frío (5 y 2°C) desde finales de noviembre hasta finales de enero y sin tratamiento previo de frío invernal (10°C ctes).

***C. vernus***

La especie alpina *C. vernus* se localiza en zonas de mayor altitud que aquellas en que, generalmente, se encuentra *C. nevadensis*, y es de floración más tardía, floreciendo en los meses de abril-mayo. Con objeto de simular el efecto del período de frío invernal sobre la floración de esta especie, se sometieron los cormos a un tratamiento de 5-2°C desde el mes de noviembre y hasta finales de febrero, y se comparó con un tratamiento a temperatura constante de 10°C. Asimismo, se ensayó el efecto de dos temperaturas (10 y 17°C), tras el tratamiento frío, sobre la floración. Tras la formación del meristemo floral en verano, todos los tratamientos sufren una bajada progresiva de la temperatura hasta alcanzar 10°C a principios de noviembre (Figura 192).

El mantenimiento de los cormos a una temperatura constante de 10°C desde noviembre, da lugar a una floración temprana en la primera quincena de marzo, ya que en su hábitat natural florece a finales de abril (Tabla 94 y Figura 193).



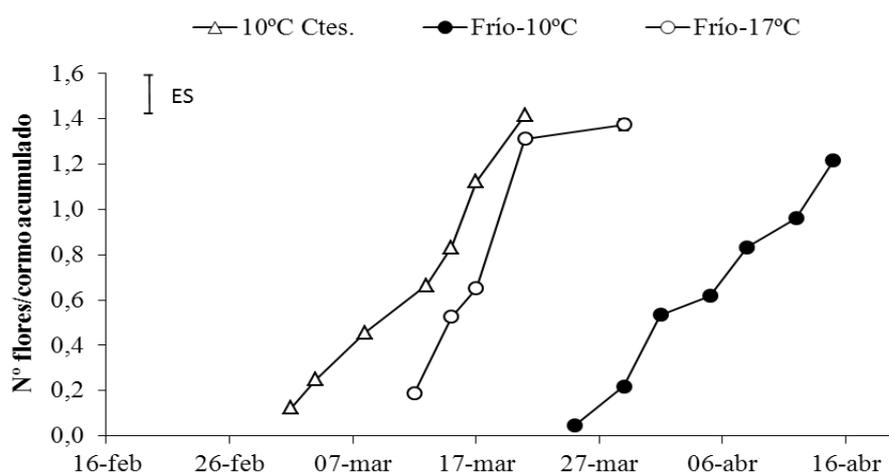
**Figura 192 Tratamientos térmicos de los ensayos de floración realizados con cormos de *C. vernus* en 2010**

Un período de bajas temperaturas desde noviembre a primeros de marzo (5-2°C) retrasa la floración entre 15 y 30 días (Tabla 94 y Figura 193). Un ascenso de la temperatura a 17°C, tras el período de frío, provoca un adelanto significativo de la floración (10- 20 días), respecto a la floración a 10°C tras el período frío. En ningún caso se ve afectada la intensidad de la floración. El período de floración de los cormos sometidos a 17°C tras período frío, llega a solaparse con la floración del tratamiento a 10°C constantes, pero es de una duración significativamente menor ( $p\text{-value} > 0,05$ ). Un ensayo realizado en el siguiente año (Figura 194) da resultados muy similares, no existiendo un efecto año significativo.

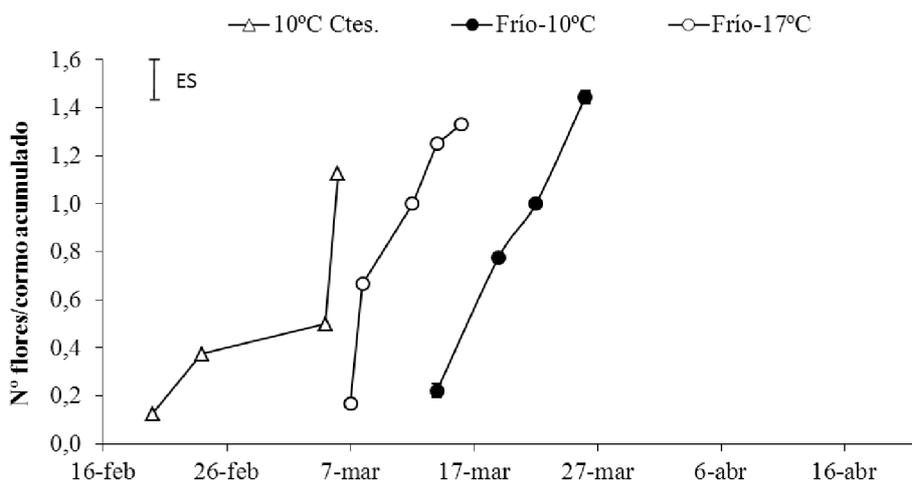
#### IV. RESULTADOS

**Tabla 94** Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de *C. vernus* en el periodo de floración, en el periodo transcurrido desde el 1 de agosto hasta que el 50% de las plantas florecen y en el número de flores por cormo. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). Datos conjuntos de los años 2010 y 2011.

	Periodo de floración (días)		Días hasta floración		Nº de flores por cormo	
10°C constantes	16	b	217	a	1,3	a
Frío - 10°C	16	b	239	b	1,3	a
Frío - 17°C	7	a	223	a	1,3	a



**Figura 193** Influencia de la temperatura en la floración de *C. vernus*.  $\Delta$  10°C desde mediados de noviembre;  $\circ$  5-2°C desde mediados de noviembre hasta primeros de marzo en que se sube la temperatura a 17°C.  $\bullet$  5-2°C desde noviembre hasta primeros de marzo en que se sube la temperatura a 10°C. ES: error estándar. Datos del año 2010.



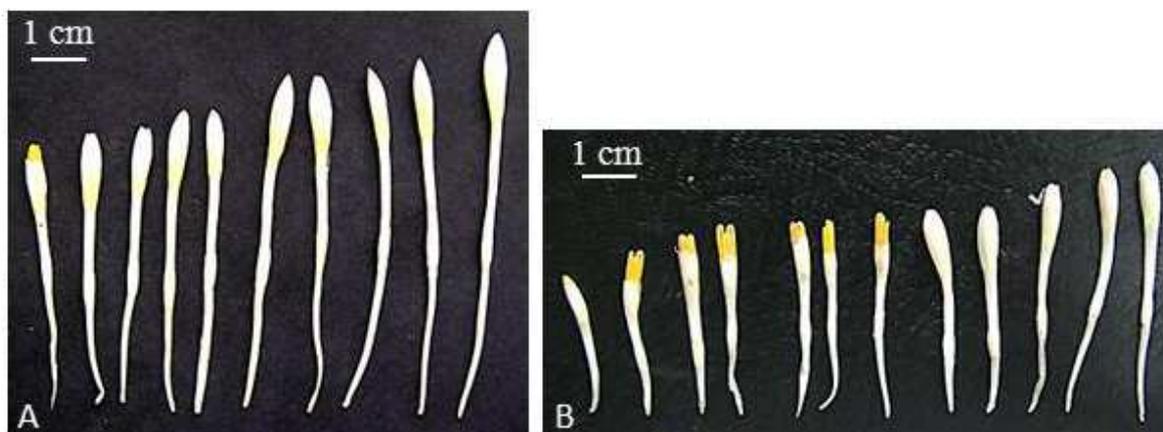
**Figura 194** Influencia de la temperatura en la floración de *C. vernus*.  $\Delta$  10°C desde mediados de noviembre;  $\circ$  5-2°C desde mediados de noviembre hasta finales de febrero en que se sube la temperatura a 17°C.  $\bullet$  5-2°C desde noviembre hasta finales de febrero en que se sube la temperatura a 10°C. ES: error estándar. Datos del año 2011.

Las flores desarrolladas tras el tratamiento frío y que florecen a 10°C son las que alcanzan mayor longitud final, y tienen una vida más larga más que las que florecen a 17°C (Tabla 95).

**Tabla 95** Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de *C. vernus* en la vida media y la longitud máxima de las flores producidas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas tratamientos ( $p < 0,05$ ). Datos del año 2010.

	Longitud media (mm)	Vida media(días)
10°C constantes	97,5 a	10 b
Frío - 10°C	108,3 b	9 b
Frío - 17°C	96,4 a	7 a

En la Figura 195A se observa la mayor uniformidad en el desarrollo de las flores en el tratamiento a temperatura constante de 10°C. Estas flores han sido muestreadas en una misma fecha y provienen de cormos diferentes. Esta figura refleja la variabilidad del desarrollo de las flores dentro del tratamiento, así como las diferencias en el tamaño de la flor de aquellas que se desarrollan a 10°C y las que crecen con un tratamiento de frío (5° y 2°C).



**Figura 195** Influencia del tratamiento térmico en la variabilidad observada en el estado de desarrollo de la flor. A) Tratamiento térmico de 10°C constantes desde principios de noviembre y B) 5-2°C desde finales de noviembre hasta finales de febrero en que se sube la temperatura a 10°C.

En la Figura 196 siguiente se ilustran la influencia del tratamiento previo de frío en el retraso de la floración.

**CROCUS VERNUS**

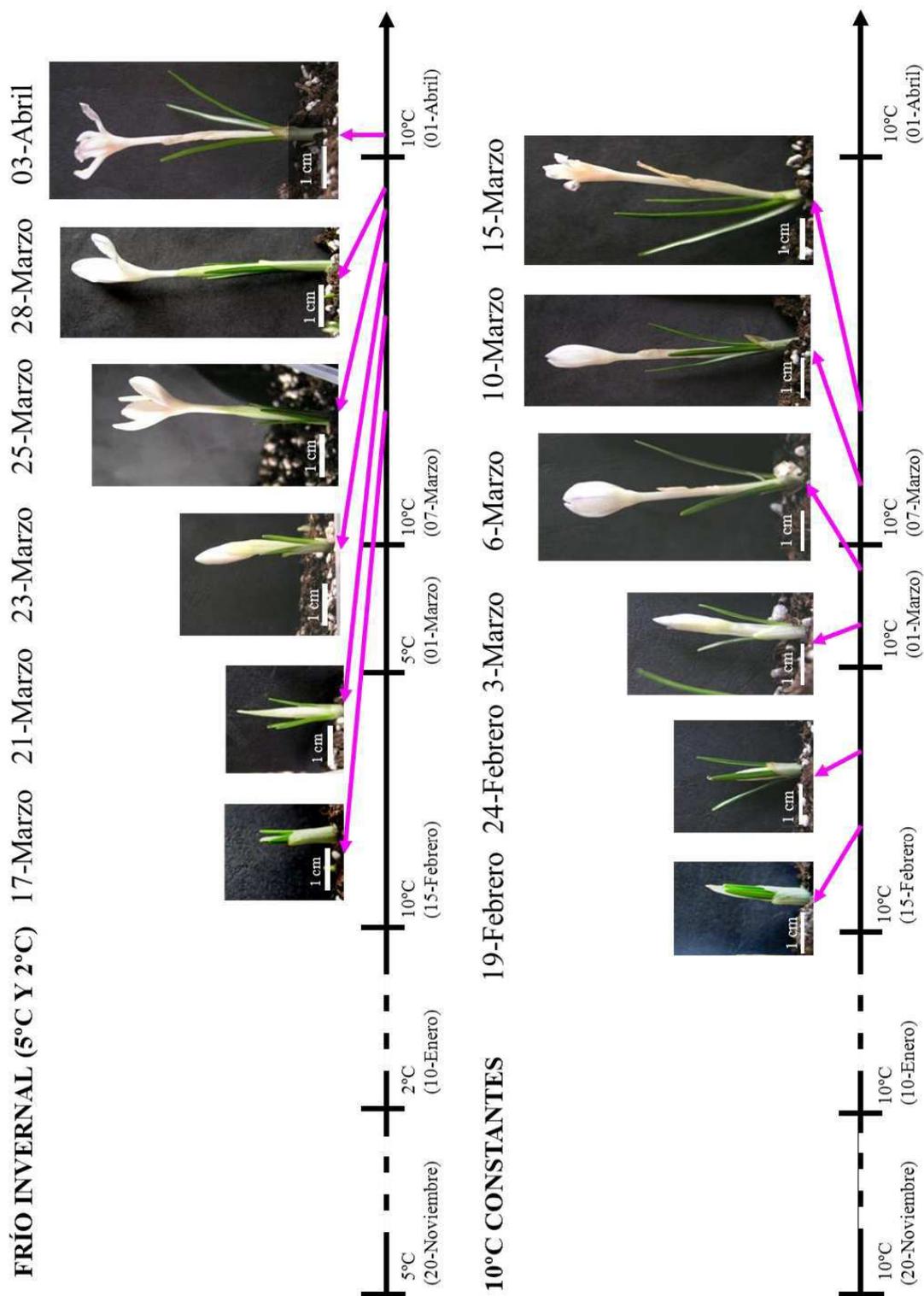


Figura 196 Floración de la especie *C. vernus* tras tres meses de frío invernal (<5°C) desde noviembre hasta finales de febrero y sin tratamiento previo de frío invernal (10°C constantes).

### 1.3 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA FLORACIÓN Y EN LA LONGITUD DE LAS FLORES DE LAS ESPECIES DE FLORACIÓN OTOÑAL

#### *C. serotinus*

A finales de septiembre la temperatura se baja progresivamente desde 23°C hasta alcanzar las temperaturas de los tratamientos de floración 17°C y 10°C (Figura 197). La intensidad de floración es similar para las dos temperaturas ensayadas, pero a 17°C la floración es ligeramente más rápida que a 10°C. El 50% de la floración se alcanza con 8 días de diferencia entre los diferentes tratamientos (Tabla 96 y Figura 198). Temperaturas elevadas (25-30°C) inhiben la floración.

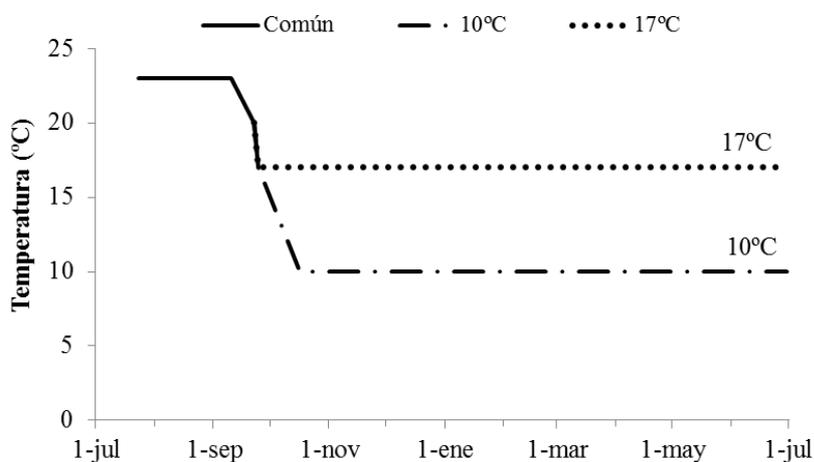
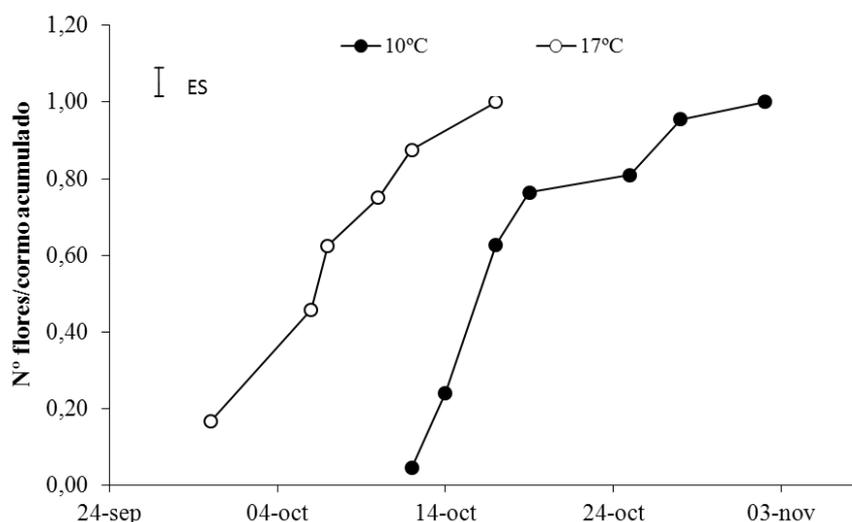


Figura 197 Tratamientos térmicos de los ensayos de floración realizados con cormos de la entrada silvestre de *C. serotinus*.

Tabla 96 Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de la entrada silvestre de *C. serotinus* en el periodo de floración, en el periodo transcurrido desde el 1 de agosto hasta que el 50% de las plantas florecen y en el número de flores por cormo. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ).

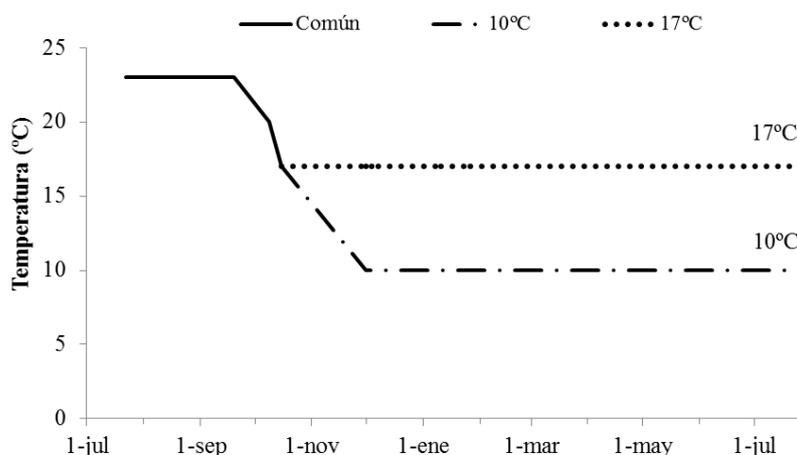
	Periodo de floración (días)	Días hasta floración	Nº de flores por cormo
10°C	17 a	76 a	1 a
17°C	9 a	66 a	1 a

#### IV. RESULTADOS



**Figura 198** Influencia de la temperatura en la floración de la entrada silvestre de *C. serotinus* ○ 10°C desde principios de noviembre y ● 17°C desde principios de noviembre. ES: error estándar.

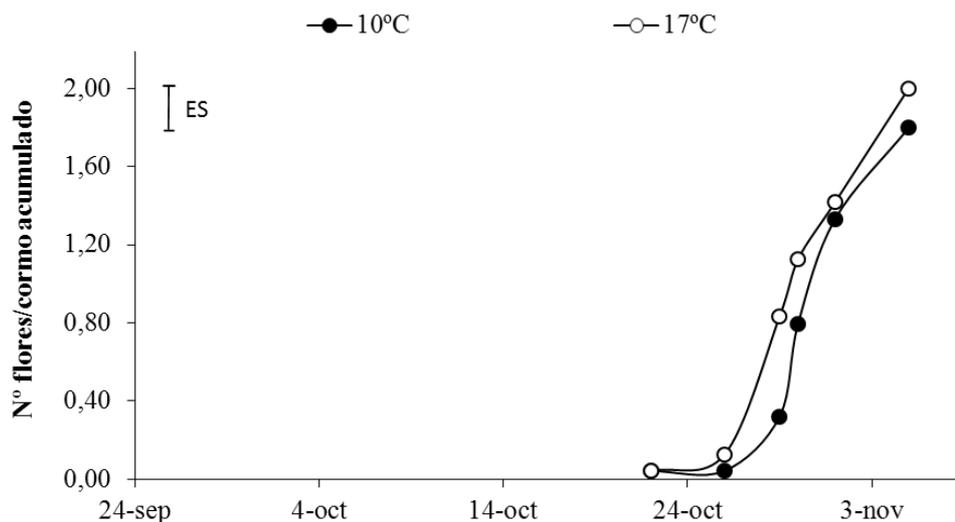
Un retraso en el descenso de las temperaturas (Figura 199) hace desaparecer las diferencias en todos los caracteres estudiados entre los tratamientos ensayados (Tabla 97 y Figura 200).



**Figura 199** Tratamiento térmico de los ensayos de floración realizados con cormos de la entrada de *C. serotinus* suministrada por un vivero. La bajada de las temperaturas se retrasa 15 días.

**Tabla 97** Influencia del tratamiento térmico al que se someten la entrada comercial de *C. serotinus* en el periodo de floración, en el periodo transcurrido desde el 1 de agosto hasta que el 50% de las plantas florecen y en el número de flores por cormo. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ).

	Periodo de floración (días)	Días hasta floración	Nº de flores por cormo
10°C	12 a	90 a	1,9 a
17°C	10 a	89 a	2 a



**Figura 200** Influencia de la temperatura en la floración de la entrada de *C. serotinus* suministrada por un vivero. La temperatura de floración se retrasa quince días respecto del momento de floración de la especie silvestre. ES: error estándar.

La longitud de las flores de *C. serotinus* si se desarrolla a 10°C, es 20 mm superior y tiene una duración de dos días más que si se aplican temperaturas superiores (Tabla 98).

**Tabla 98** Influencia del tratamiento térmico al que se someten los cormos de la entrada de *C. serotinus* suministrada por un vivero en la vida media y longitud máxima de las flores producidas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ).

	Longitud media (mm)	Vida media(días)
10°C	223 b	8 b
17°C	204 a	6 a

En la Figura 201 siguiente se ilustran la influencia de la temperatura (a 10°C y a 17°C constantes) sin tratamiento previo de frío en la floración de la especie *C. serotinus*.

*C. SEROTINUS*

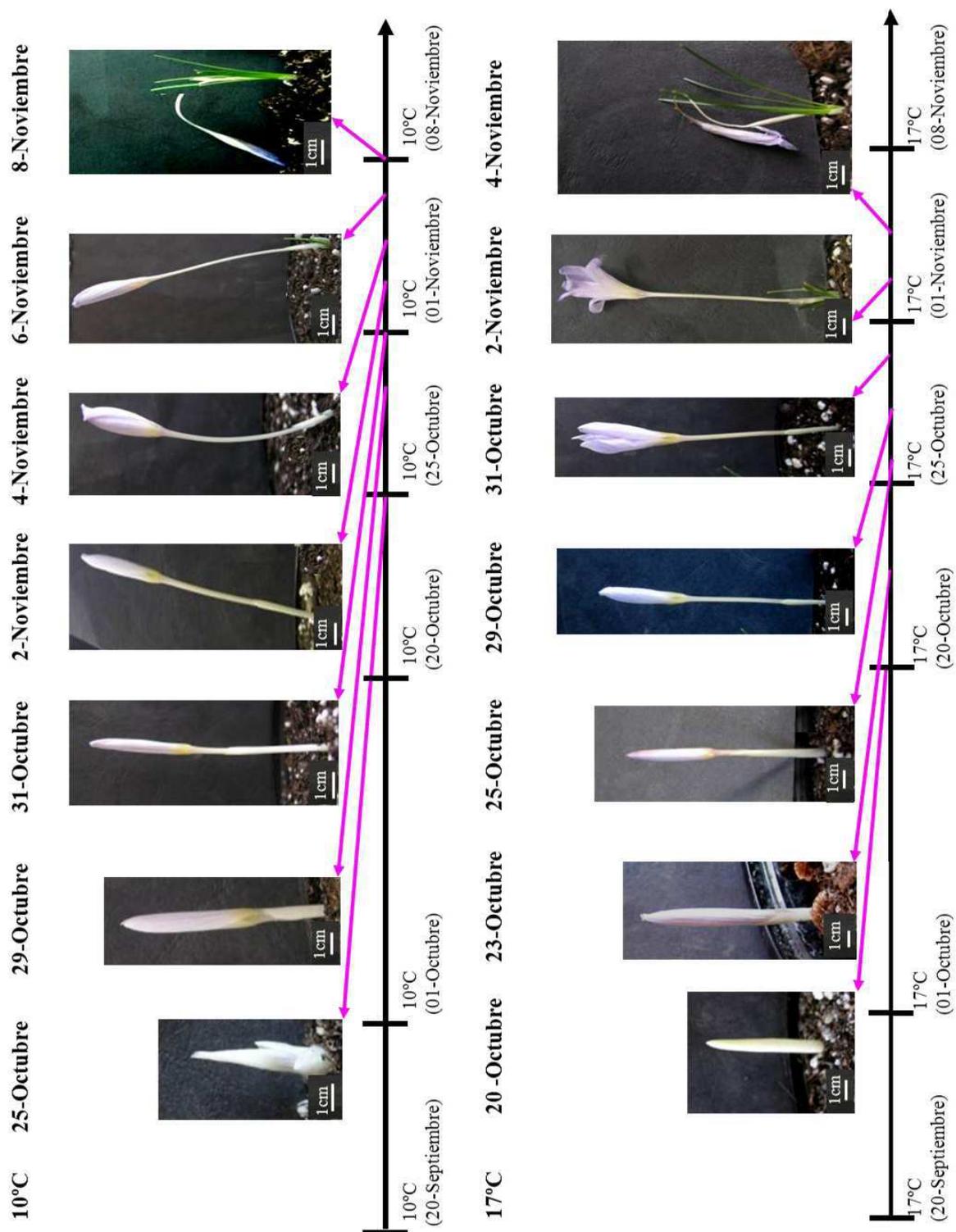


Figura 201 Floración de la especie *C. serotinus* a 10°C y a 17°C constantes sin tratamiento previo de frío (5 y 2°C).

#### 1.4 INFLUENCIA DE UN PERÍODO FRÍO EN EL CRECIMIENTO DE LA YEMA FLORAL DE ESPECIES PRIMAVERALES.

Una vez finaliza la diferenciación floral en agosto, la flor sigue desarrollándose bajo la superficie del sustrato hasta la floración, si bien existen diferencias en la velocidad de crecimiento en función de la especie. Este desarrollo es algo más rápido en las especies otoñales que florecen en octubre-primeros de noviembre, que en las especies primaverales, de forma que estas especies son sometidas a muy bajas temperaturas sin que la yema se haya desarrollado hasta alcanzar la floración. Con objeto de estudiar el retraso de la floración de las especies primaverales, que no puede explicarse por diferencias en el estado de desarrollo a finales de verano, hemos estudiado la influencia de las bajas temperaturas en este proceso de crecimiento de la yema hasta la floración de las especies primaverales.

Este proceso se ha estudiado en *C. nevadensis*, que florece en febrero (en las condiciones naturales), y en la especie *C. vernus*, que florece en marzo.

##### *C. nevadensis*

Las temperaturas a las que se mantuvieron las macetas en verano (23º) fueron descendiendo progresivamente, hasta mediados de noviembre. En esta fecha, un grupo de cormos se mantuvo a 10ºC constantes y en otro grupo fue descendiendo la temperatura hasta que se alcanzaron los 2ºC a finales de diciembre (Figura 202) para, posteriormente, ir ascendiendo lentamente hasta alcanzar a finales de enero los 10ºC, temperatura a la que se mantuvo el cultivo hasta la floración.

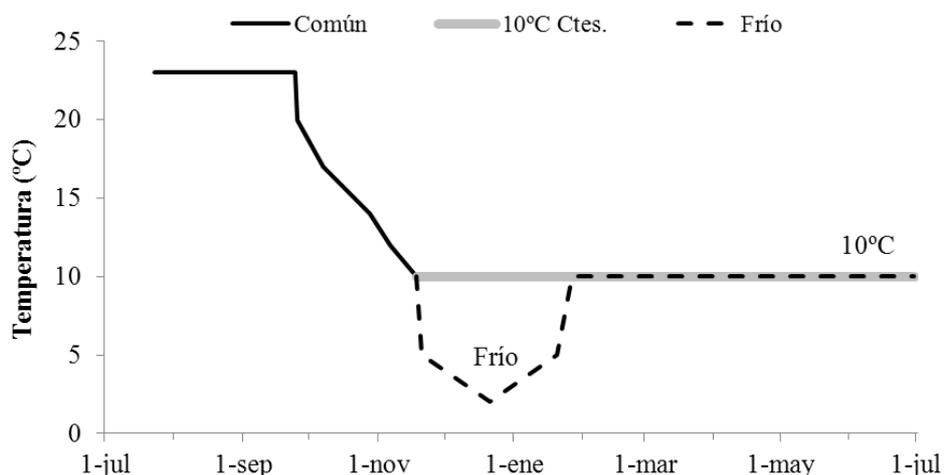
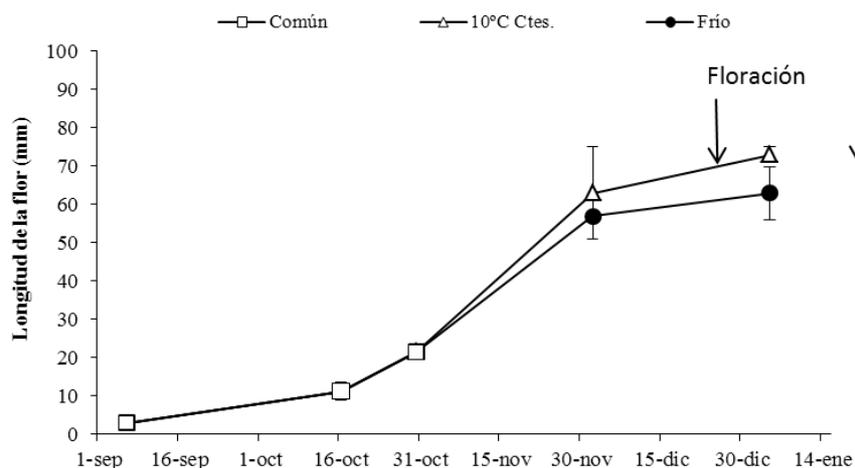


Figura 202 Tratamiento térmico de los ensayos previos a la floración realizados con cormos de *C. nevadensis*.

A finales de septiembre, cuando la temperatura comienza a descender, las yemas florales continúan su desarrollo con un crecimiento rápido de aproximadamente 3cm/mes, hasta finales de noviembre. A partir de este momento, en que se aplica el tratamiento frío, si bien el crecimiento parece algo más lento en los cormos mantenidos a temperaturas más bajas, las diferencias en longitud de la yema no resultan significativas

## IV. RESULTADOS

debido a la gran variabilidad existente. A partir del momento en que se alcanzan los 2°C, parece darse un retraso mayor en el crecimiento de las yemas de los cormos sometidos a frío (Figura 203). Si bien la longitud de las yemas, debido a la gran variabilidad existente en el tratamiento frío, no resulta significativa, un hecho diferencial es que aquellos mantenidos a 10°C comienzan a florecer, de forma uniforme, en la segunda quincena de diciembre. Sin embargo, en el tratamiento en que se aplica frío, los cormos no florecen, aunque algunas yemas alcancen la longitud requerida, debido a que no se produce la apertura de los catafilos y la floración.



**Figura 203** Influencia del frío en el desarrollo de la yema floral en la especie *C. nevadensis*. Con flechas se indica el momento de la floración en cada tratamiento. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

### *C. vernus*

Esta especie presenta una floración primaveral más tardía que *C. nevadensis*, floreciendo en marzo-abril en su ambiente natural. Con objeto de ensayar la influencia del período frío invernal sobre el desarrollo de la flor, después del verano las temperaturas se bajan hasta 10°C a finales de septiembre. En esta fecha, un grupo de cormos se mantuvo a 10°C constantes y en otro grupo fue descendiendo la temperatura hasta que se alcanzaron los 2°C a primeros de enero (Figura 204) para, posteriormente, ir ascendiendo lentamente hasta alcanzar a principios de marzo los 10°C, temperatura a la que se mantuvo el cultivo hasta la floración.

El tratamiento a 10°C constantes se inicia con un tamaño de flor de 20 mm. Esta longitud no se duplica hasta febrero, hecho que muestra el gran retraso en el desarrollo de la flor que presenta esta especie, incluso en ausencia de frío, respecto *C. nevadensis* (que duplica el tamaño de su flor en diciembre).

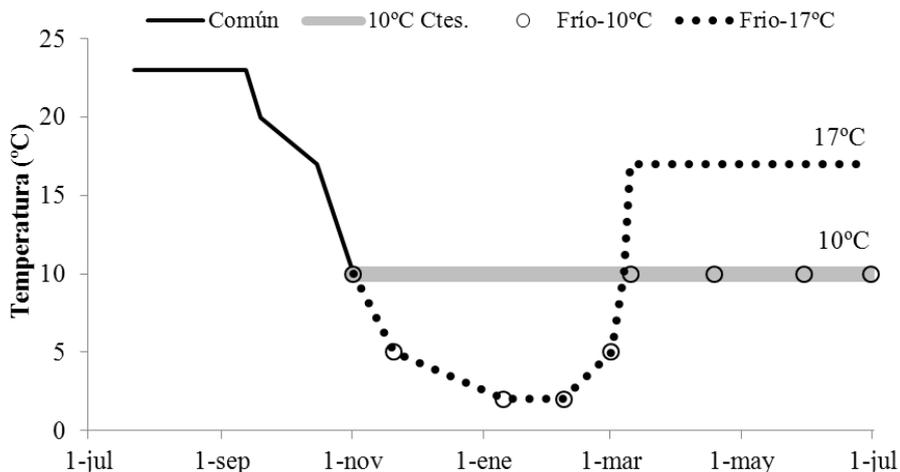


Figura 204 Tratamiento térmico de los ensayos previos a la floración realizados con cormos de *C. vernus*

En el tratamiento en que se mantienen los cormos a bajas temperaturas, se observa una parada del crecimiento durante el período frío (Figura 205). No obstante, hay que señalar que las flores de cormos mantenidos a 10°C tiene un crecimiento muy lento durante este mismo período, aunque hay diferencias significativas con el tratamiento de frío. Con el aumento de las temperaturas, se acelera mucho el crecimiento, sobre todo a la temperatura de 17°C, de forma que estos cormos florecerán a la vez que aquellos mantenidos a 10°C constantes. Sin embargo, si la temperatura no se eleva a 17°C, sino que sólo se alcanzan los 10°C, vemos que el período frío retrasa el desarrollo de la flor y la floración ocurre un mes después.

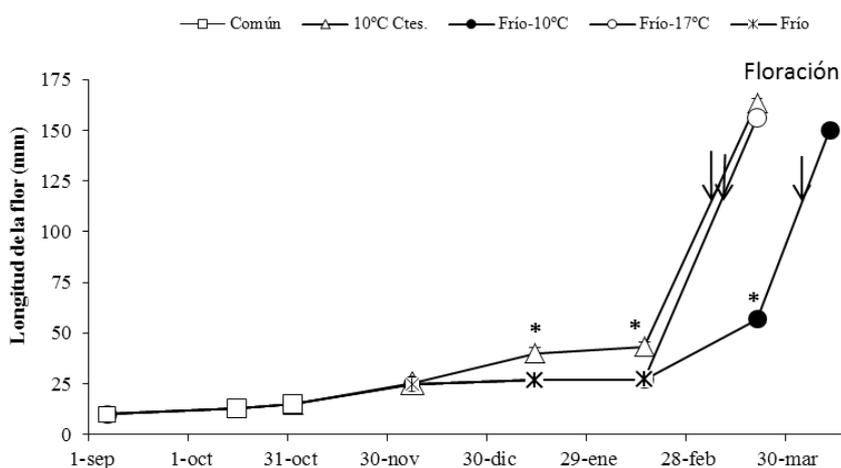


Figura 205 Influencia del frío en el desarrollo de la flor antes de florecer en la especie *C. vernus*. Con flechas se indica el momento de la floración en cada tratamiento. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

#### IV. RESULTADOS

---

En la siguiente figura, se puede observar el crecimiento de la flor desde la formación del meristemo floral a la floración de las especies primaverales *C. nevadensis*, que florece cuatro meses después del desarrollo de las yemas florales y *C. vernus*, que florece seis meses después. También se muestra una figura de la especie de floración otoñal *C. serotinus*, que florece dos meses después del desarrollo de las yemas florales. Todo este material proviene de un tratamiento a 10°C (Figura 206).

En las especies otoñales estudiadas, no se han observado diferencias en el desarrollo de las yemas hasta la floración. En la Figura 207 se ilustra el proceso.

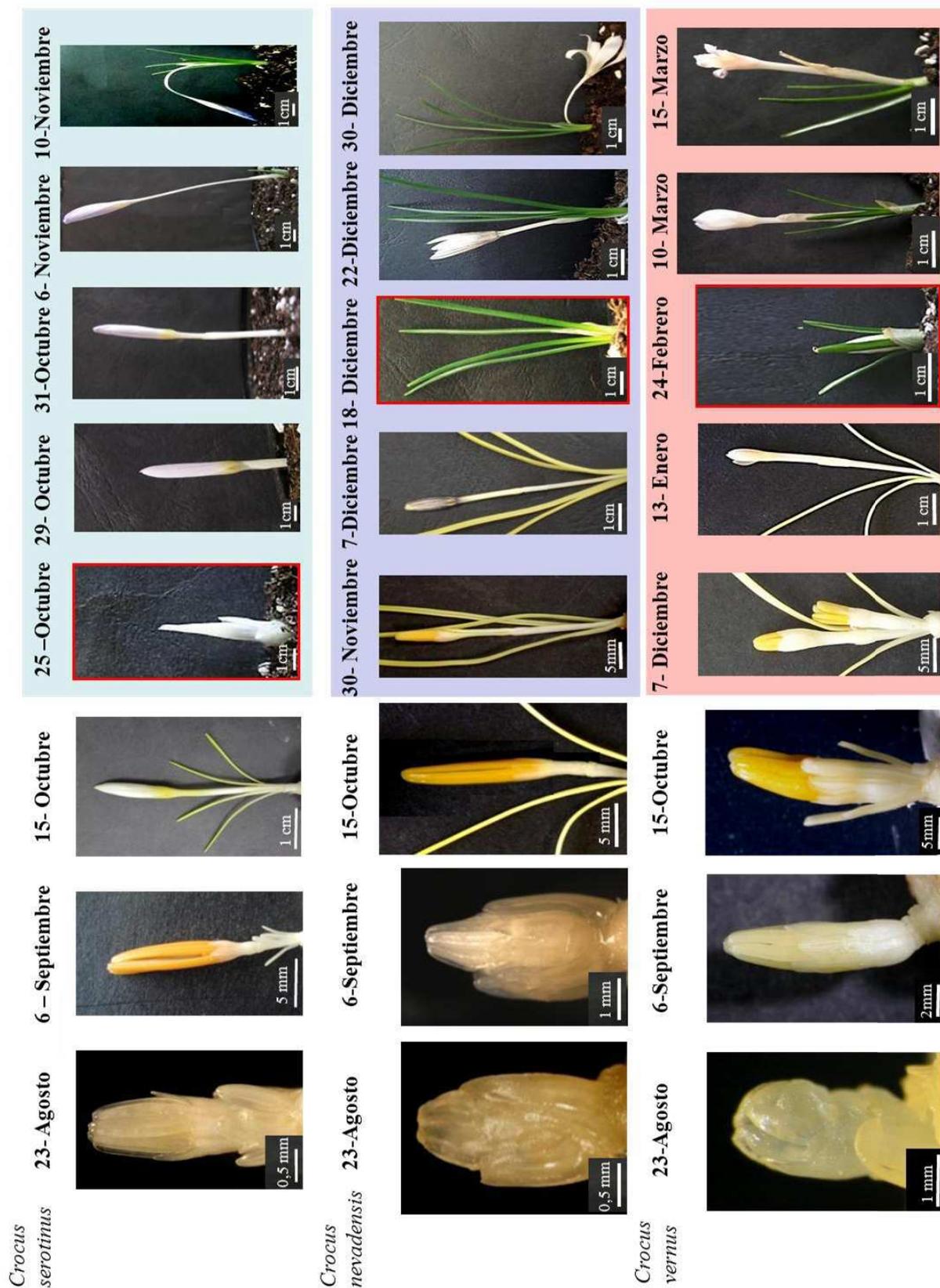


Figura 206 Comparación del desarrollo entre especies primaverales y otoñales. Se ha considerado una especie primaveral que florece más precozmente (*C. nevadensis*) y una más tardía (*C. vernus*). Las fotos con margen rojo indican el momento de inicio de la floración.

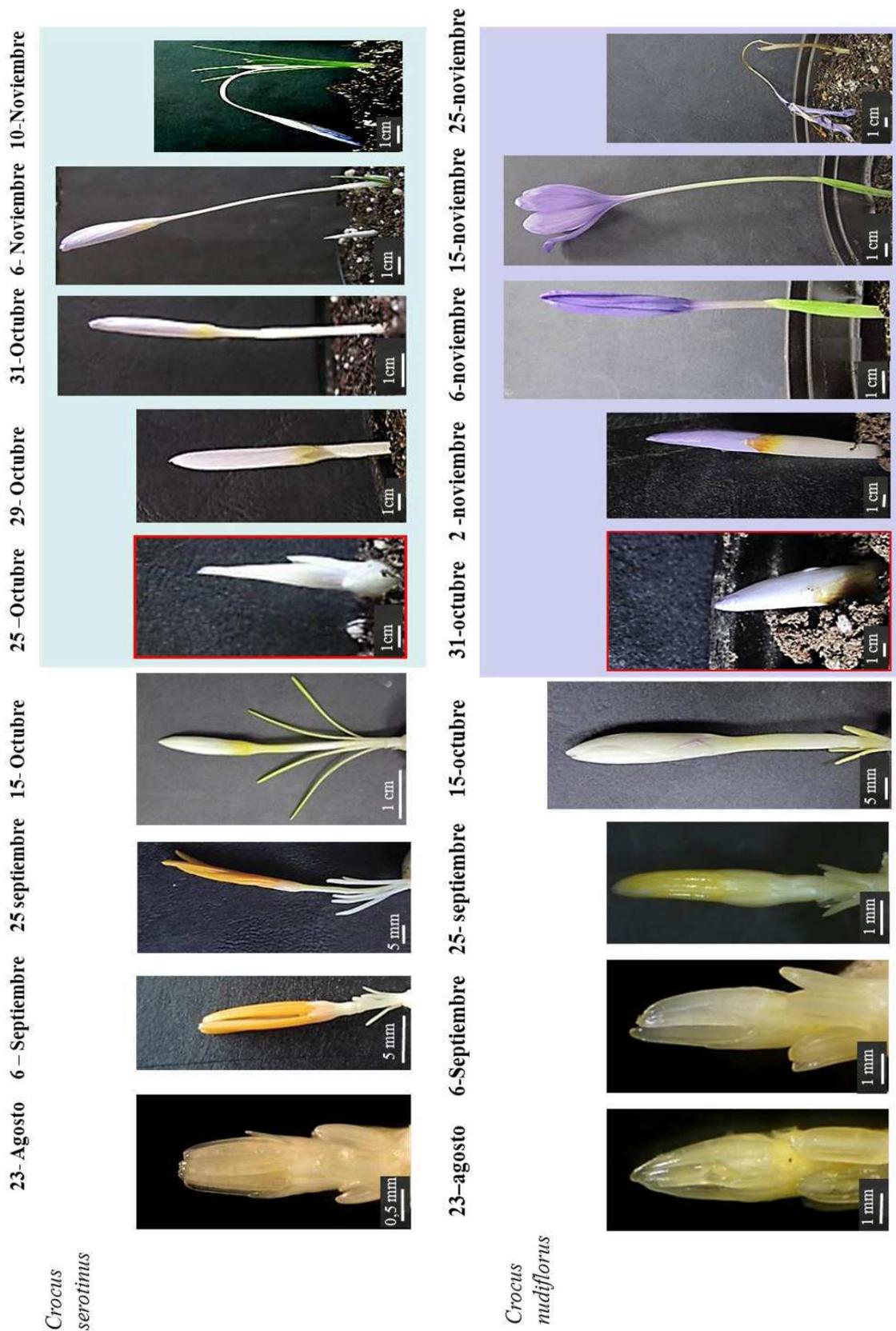


Figura 207 Comparación del desarrollo entre dos especies otoñales: *C. serotinus* y *C. nudiflorus*. Las fotos con margen rojo indican el momento de inicio de la floración.

## 2 FISIOLÓGÍA DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO *CROCUS*

El desarrollo vegetativo en este género comprende el desarrollo de las hojas, raíces y cormos hijos. Como se ha estudiado en el apartado de fenología, la aparición de hojas puede ser simultánea o muy cercana a la floración, como ocurre en la mayor parte de las especies, o bien puede existir una marcada histerantia, como es el caso de *C. nudiflorus*. Los cormos hijos reciben fotoasimilados para su crecimiento, tanto del cormo madre como de los productos de la fotosíntesis de las hojas, y su desarrollo es posterior a la floración. Las raíces tienen un desarrollo rápido tras las primeras lluvias de final de verano-principios de otoño. Con objeto de conocer la evolución durante el año del desarrollo de los distintos órganos y de la influencia de la temperatura, se realizan mediciones de longitud de la hoja, peso seco de hojas, de cormo y de raíces, desde el inicio del ciclo hasta el final del desarrollo de los cormos hijos en que concluye el mismo. En aquellas especies cuya floración y salida de la hoja es posterior al frío invernal, se estudia el efecto de dos temperaturas de desarrollo (10 y 17°C), tras un período de frío intenso (2-5°C). En el caso de la especie de floración otoñal *C. serotinus*, en que la salida de la hoja es simultánea a dicha floración, se estudia la influencia en el desarrollo de dos temperaturas (10°C y 17°C) a las que se mantiene el cultivo desde el mes de septiembre. Con una entrada de vivero de esta misma especie se realiza un ensayo similar al realizado con las especies primaverales, en este caso con aplicación de frío tras la floración. La selección de las temperaturas se llevó a cabo en base a trabajos previos de otros autores en otros genotipos de este género (Badri *et al.*, 2007) y teniendo en cuenta experiencias preliminares de nuestro grupo.

### 2.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO VEGETATIVO DE ESPECIES DE FLORACIÓN PRIMAVERAL

#### *C. nevadensis*

En la Figura 208 se muestra el tratamiento térmico aplicado en esta especie. El desarrollo de las hojas en el interior de los catafilos, comienza a finales de agosto, y a la vez que crece la yema floral, y continúan su crecimiento lentamente, dentro de los catafilos y sin salir a la superficie, todo el mes de octubre. En noviembre, y sólo un día después de aplicar el tratamiento frío la hoja emerge del sustrato. A partir de este momento, no experimenta apenas crecimiento posterior hasta que comienzan a subir las temperaturas. La temperatura más elevada (17°C) acelera el final del crecimiento de la hoja, que alcanza un menor tamaño que cuando el cultivo se realiza a temperaturas más bajas (10°C). El crecimiento de la hoja termina a mediados de abril a la temperatura de 10°C, y en la segunda quincena del mes de marzo a la temperatura de 17°C (Figura 209 y Figura 210). En el momento en el que la hoja alcanza su máximo peso seco, las reservas del cormo madre se han agotado (ver gráfica de evolución del peso del cormo madre en anejo 8).

## IV. RESULTADOS

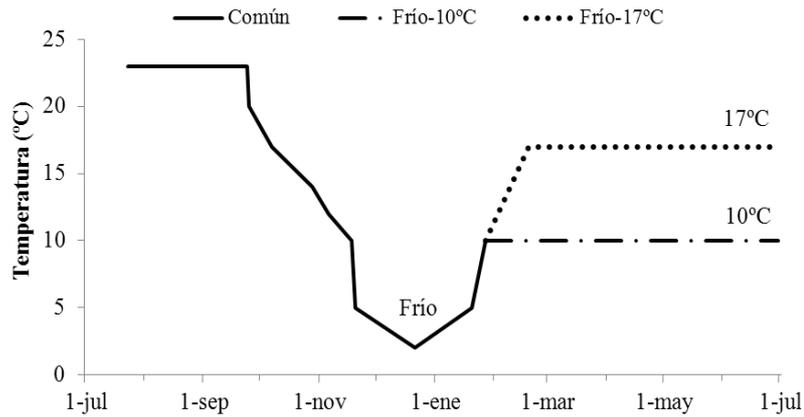


Figura 208 Tratamientos térmicos aplicados a la especie *C. nevadensis* para estudiar su desarrollo vegetativo.

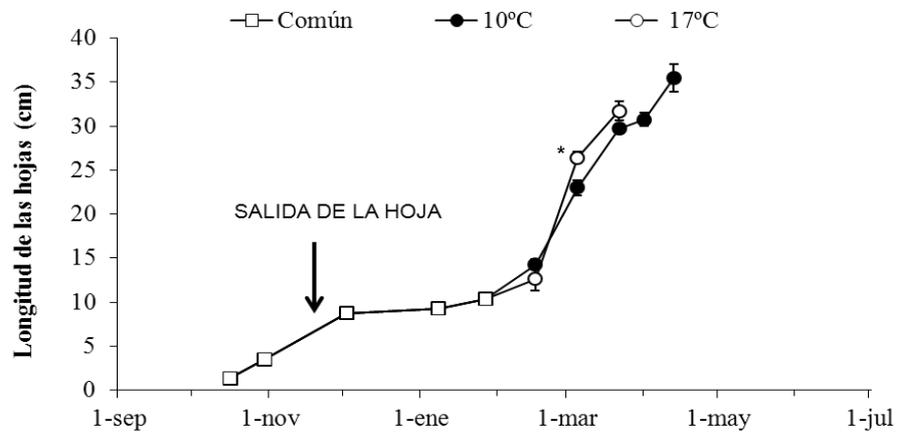


Figura 209 Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de *C. nevadensis* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

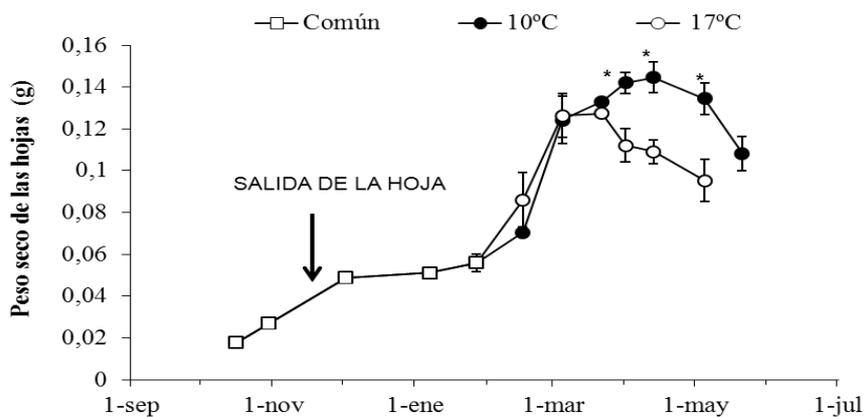
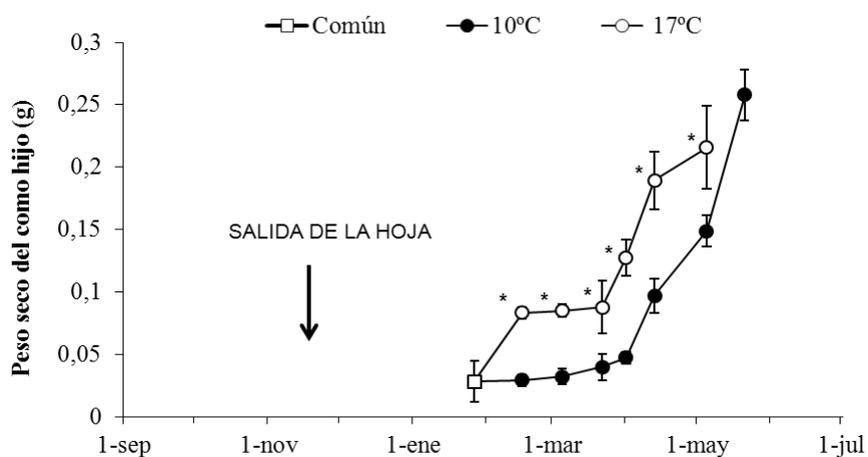


Figura 210 Influencia de la temperatura en el peso seco de las hojas de *C. nevadensis* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

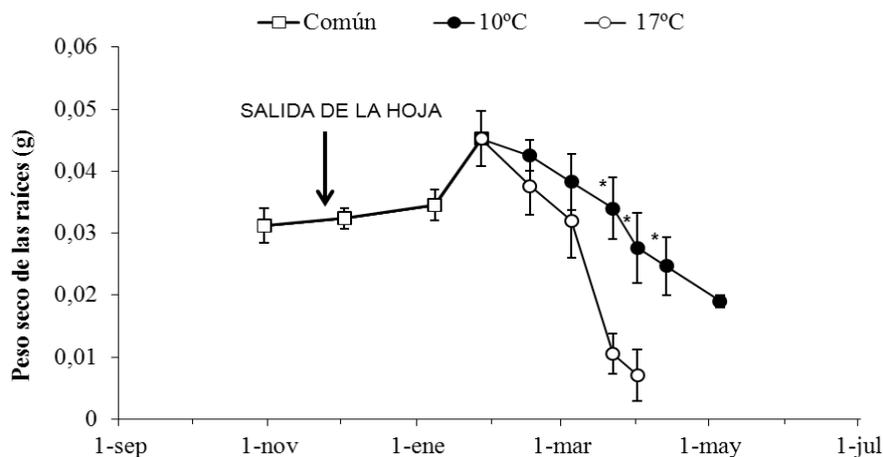
El desarrollo del cormo hijo comienza a finales de enero, tres meses más tarde que las hojas, y cuando todavía las temperaturas están por debajo de 10°C (Figura 211). El crecimiento del cormo en los meses siguientes es lento en ambos tratamientos, pero con diferencias evidentes entre ambos. Este periodo de crecimiento paulatino del cormo hijo coincide con el desarrollo exponencial de la hoja. En abril, comienza el desarrollo exponencial del cormo hijo, justo cuando la hoja alcanza su máxima longitud y peso fresco. Del mismo modo que ocurre con el desarrollo de la hoja, los cormos que crecen a 17°C concluyen antes su desarrollo (finales de abril frente finales de mayo) que los mantenidos a 10°C, y alcanzan un menor tamaño. El cormo que crece a 10°C alcanza un tamaño 1,74 veces mayor (Figura 211).



**Figura 211** Influencia de la temperatura en el peso seco del cormo hijo en desarrollo de *C. nevadensis* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

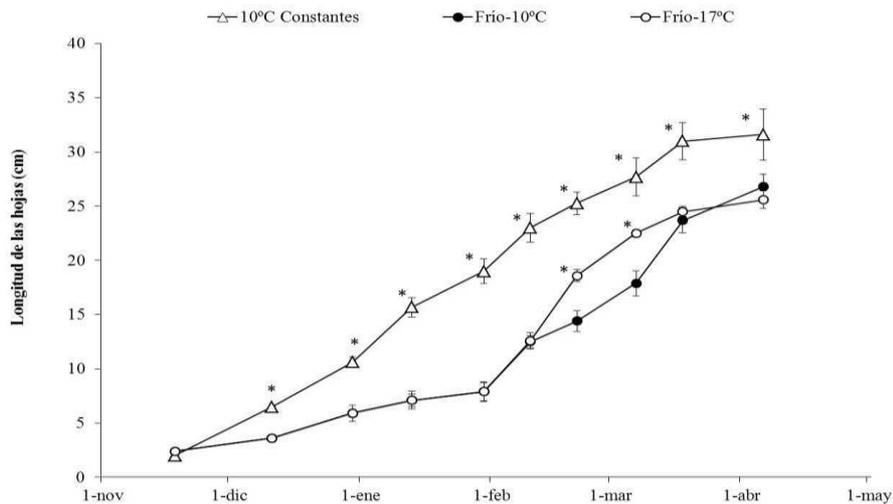
Las raíces inician su desarrollo en octubre, cuando bajan las temperaturas y se da el primer riego. A partir de este momento, hay un crecimiento paulatino hasta mediados de enero en que se inicia el ascenso de la temperatura hasta 10°C. Es en este mes cuando se acelera el crecimiento y alcanzan su peso máximo al final del mes. Este momento coincide con el inicio del desarrollo del cormo hijo. A partir de este momento, comienza su pérdida progresiva de peso. La diferencia de temperatura a que han sido sometidos los cormos a partir de febrero, provoca diferencias en la pérdida de peso del sistema radicular que llega a ser mucho mayor a 17°C que a 10°C (Figura 212).

#### IV. RESULTADOS



**Figura 212** Influencia de la temperatura en el peso seco de las raíces de *C. nevadensis* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Con objeto de estudiar si un cultivo en condiciones controladas de temperatura constante y sin frío, podía mejorar el desarrollo de las hojas, se ensayó su crecimiento a temperatura constante de 10°C sin pasar por frío invernal. En la siguiente gráfica se muestra el crecimiento en longitud de la hoja tomado una vez que han brotado, midiendo las mismas desde el suelo (Figura 213). Se tomaron medidas en plantas de cada tratamiento: 10°C y a 17°C, ambos con una fase previa de tres meses de frío invernal después del verano, y a 10°C constantes después del desarrollo de la yema floral en verano. La brotación y salida de la hoja es similar en los tres tratamientos dado que sucede sólo un día después de bajar las temperaturas ( $p\text{-value} < 0,05$ ). No obstante, se observa que el frío invernal ralentiza el desarrollo de la hoja, de forma que 40 días después de brotar, las hojas que padecen frío miden 5 cm menos. La longitud final de las hojas del tratamiento sin frío es superior al resto. Sin embargo, su ciclo vital acaba 24 días antes que el tratamiento a la misma temperatura con período previo de frío. El final de su ciclo vital coincide con la seca del tratamiento más cálido de los que sufre frío. El tratamiento térmico que da lugar a unas plantas con el ciclo vital más largo es el que presenta frío y se desarrolla a temperaturas más frescas (Figura 213).



	LONGITUD MEDIA (cm)	VIDA MEDIA (días)
10°C Constantes	31,5 b	139 a
Frío-10°C	27,8 ab	163 b
Frío-17°C	25,6 a	142 a

**Figura 213** Influencia de la temperatura en la longitud y en la vida media de las hojas de *C. nevadensis* durante su desarrollo vegetativo hasta que la hoja alcanza el valor máximo de su longitud. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ).

### *C. carpetanus*

Esta especie recibe un tratamiento térmico equivalente al aplicado en *C. nevadensis*. Del mismo modo que sucede con la especie anterior, después del frío invernal, una temperatura más fresca (10°C), da lugar a un mayor desarrollo de la hoja y del corno hijo. La principal diferencia que se observa entre ambas especies se encuentra en que *C. carpetanus* inicia el desarrollo de sus órganos un mes después que *C. nevadensis* (Figura 214). Tras el desarrollo de la yema floral en verano, las hojas continúan su crecimiento dentro de los catafilos durante los dos meses siguientes de forma poco notable (septiembre y octubre). A finales de noviembre, iniciado el periodo de frío invernal, el crecimiento de la hoja se hace más aparente y brota en la primera quincena de diciembre. *C. carpetanus* no presenta el periodo de crecimiento nulo que muestra *C. nevadensis* por efecto del frío invernal. No obstante, a pesar de mostrar un desarrollo foliar más tardío que *C. nevadensis*, ambas brotan con menos de un mes de diferencia y la fase de crecimiento exponencial de la hoja comienza al mismo tiempo. En las especies primaverales, la brotación y la salida de la hoja son simultáneas (Figura 215 y Figura 216).

## IV. RESULTADOS

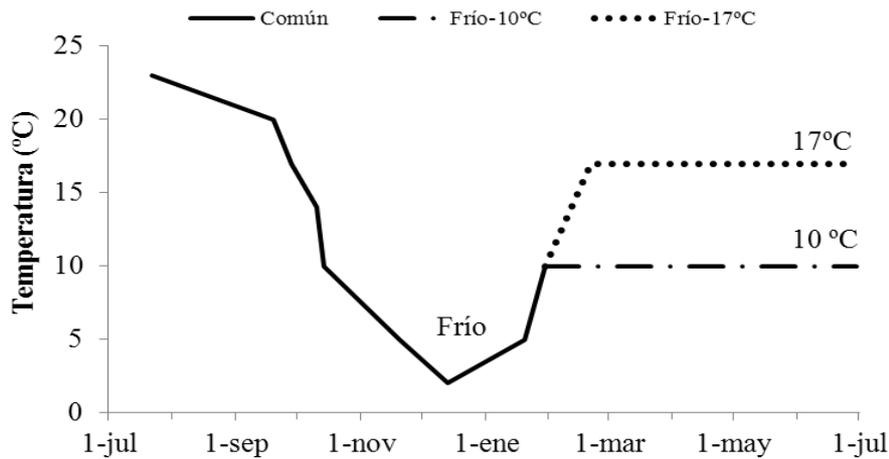


Figura 214 Tratamientos térmicos aplicados a la especie *C. carpetanus* para estudiar su desarrollo vegetativo.

Hay que señalar, en los estudios sobre la fenología anteriormente expuestos, la elevada variabilidad existente en *C. carpetanus*. Esta especie presenta entradas que brotan desde mediados de noviembre hasta enero, debido a la existencia de una gran variabilidad entre entradas de esta especie. Estos estudios de fisiología no presentan dicha variabilidad por realizarse con un único genotipo.

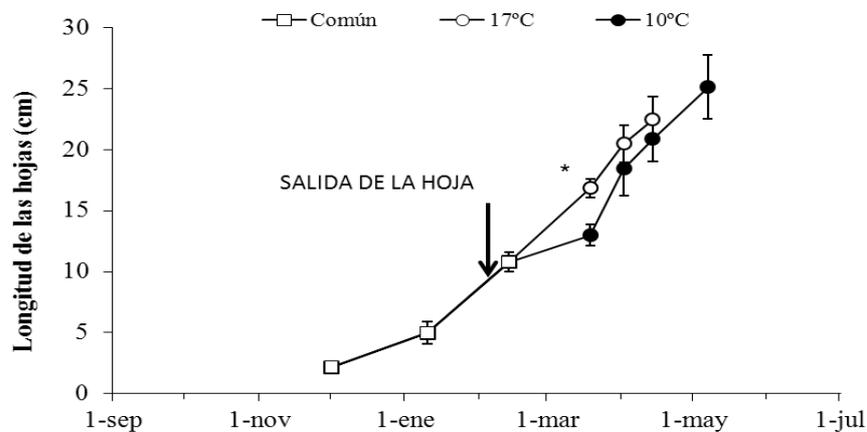
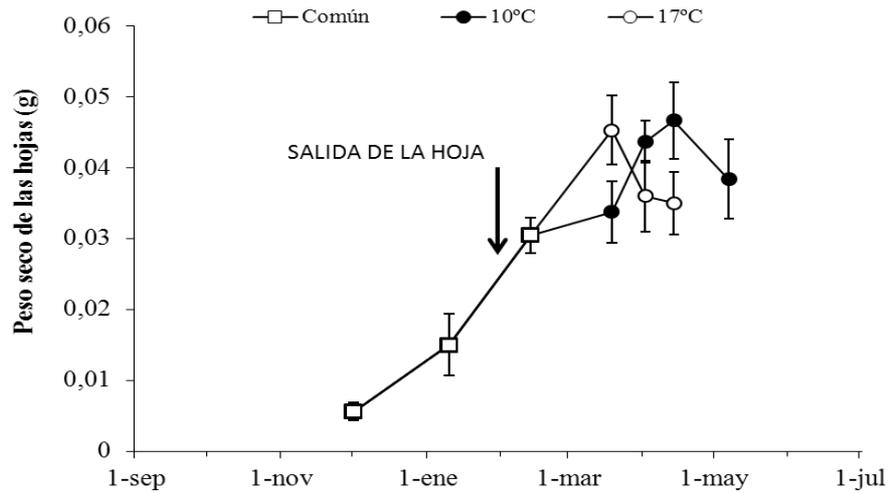


Figura 215 Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de *C. carpetanus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

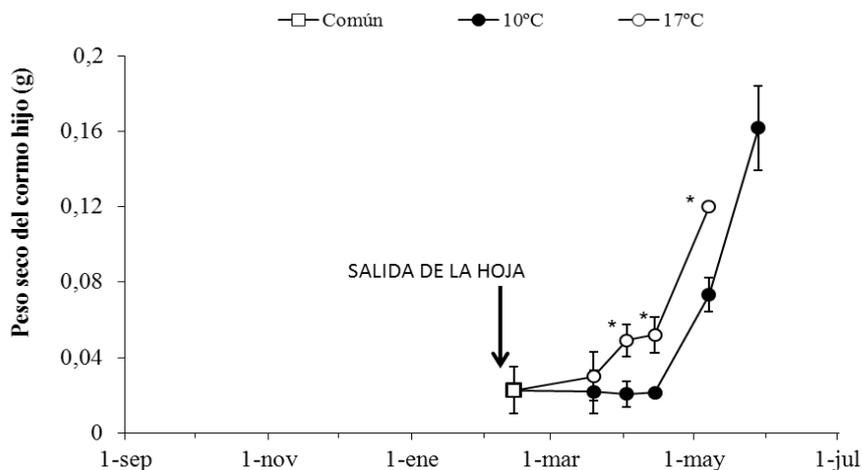
Ambas especies muestran un desarrollo final de la hoja similar, si bien estas alcanzan menor tamaño y tardan 15 días más en alcanzar su tamaño máximo.

También en esta especie, en el momento en el que la hoja alcanza su máximo peso seco, las reservas del cormo madre alcanzan sus valores mínimos (ver gráfica de evolución del peso del cormo madre en anejo 8).



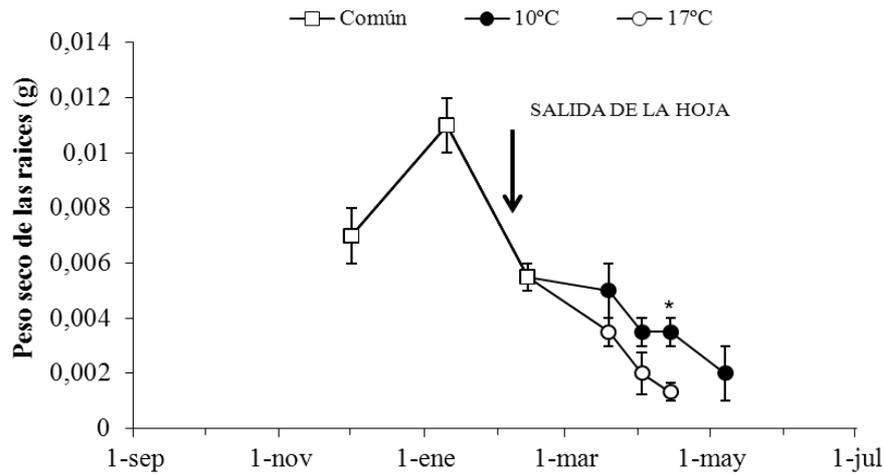
**Figura 216** Influencia de la temperatura en el peso seco de las hojas de *C. carpetanus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Las pautas de crecimiento del cormo hijo y el desarrollo de las raíces de las especies *C. carpetanus* y *C. nevadensis* son muy similares. Únicamente se puede desatacar el retraso en el desarrollo que presenta *C. carpetanus* respecto *C. nevadensis*. Del mismo modo que se observaba en la especie *C. nevadensis*, el incremento acelerado de peso del cormo hijo se inicia cuando las hojas han alcanzado su longitud máxima (Figura 217). El desarrollo radicular sigue la misma pauta que la especie *C. nevadensis*, pero finaliza antes en *C. carpetanus* (Figura 218).



**Figura 217** Influencia de la temperatura en el peso seco del cormo hijo en desarrollo de *C. carpetanus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

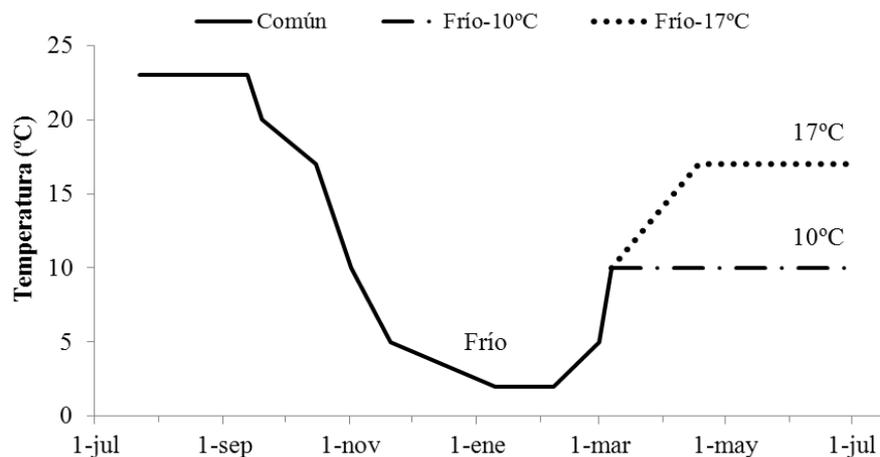
## IV. RESULTADOS



**Figura 218** Influencia de la temperatura en el peso seco de las raíces de *C. carpetanus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

### *C. vernus*

En la especie *C. vernus* el tratamiento térmico aplicado (Figura 219) contiene un periodo frío invernal de cuatro meses, un mes adicional respecto las especies anteriores, simulando su ambiente natural.



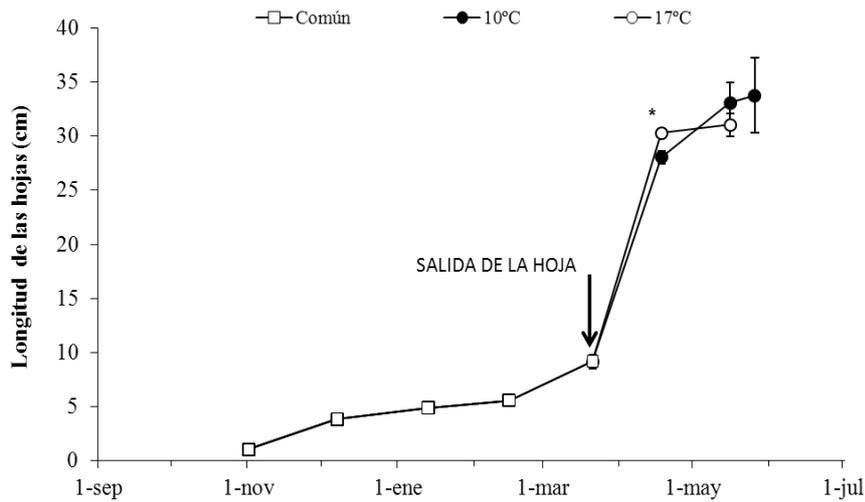
**Figura 219** Tratamientos térmicos aplicados a la especie *C. vernus* para estudiar su desarrollo vegetativo.

En esta especie de floración también primaveral, la temperatura más baja ensayada (10°C) produce, como en *C. nevadensis* y *C. carpetanus*, un mayor desarrollo foliar y del cormo hijo así como un secado más tardío de las raíces (Figura 220-Figura 222). No obstante, existen algunas diferencias a destacar.

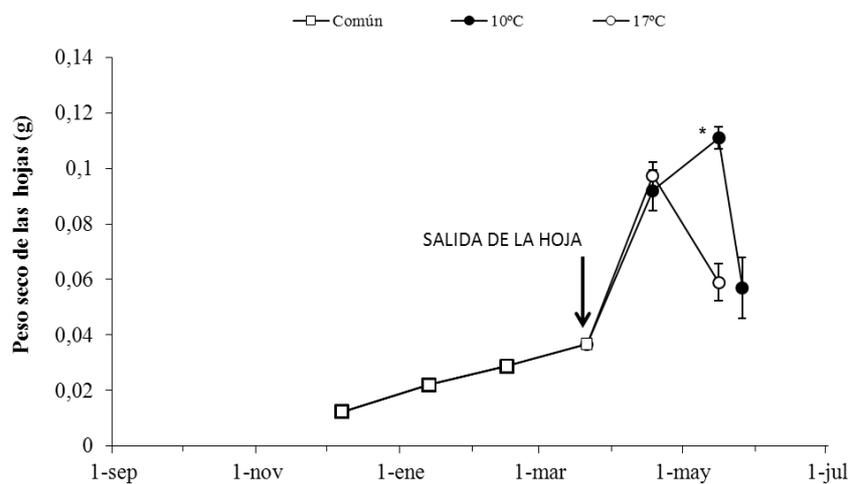
En esta especie, la hoja durante el periodo frío se desarrolla de forma continua desde principios de noviembre hasta finales de febrero (Figura 220 y Figura 221). No obstante, este desarrollo es lento y no alcanza la superficie hasta poco después del aumento de la

temperatura. En este momento, a finales de febrero, cuando las temperaturas alcanzan los 10-17°C, se inicia su crecimiento exponencial. Es de destacar que también en esta especie las hojas desarrolladas a 10°C alcanzan un peso significativamente superior a aquellas que se desarrollan a 17°C (Figura 220 y Figura 221).

En *C. vernus*, como también sucede en las especies *C. nevadensis* y *C. carpetanus*, el momento en el que la hoja alcanza su máximo peso seco, las reservas del cormo madre se han agotado (ver gráfica de evolución del peso del cormo madre en anejo 8).



**Figura 220** Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de *C. vernus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).



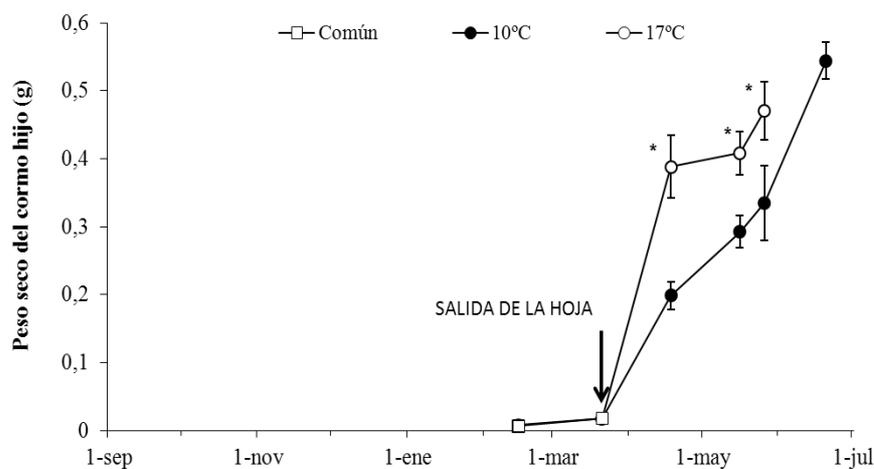
**Figura 221** Influencia de la temperatura en el peso seco de las hojas de *C. vernus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

No obstante, no se aprecian diferencias en el momento de la salida de la hoja de *C. vernus* entre ambos tratamientos ( $p\text{-value} > 0,05$ ). Hay que señalar, que igual que sucede

## IV. RESULTADOS

en la especie *C. carpetanus*, los estudios sobre la salida de la hoja al exterior expuestos en el apartado de fenología presentan una gran variabilidad entre entradas. En aquel apartado, se observó la salida de la hoja de la especie *C. vernus* desde la segunda quincena de noviembre hasta mediados de marzo. Estos estudios de fisiología no presentan dicha variabilidad por realizarse con un único genotipo.

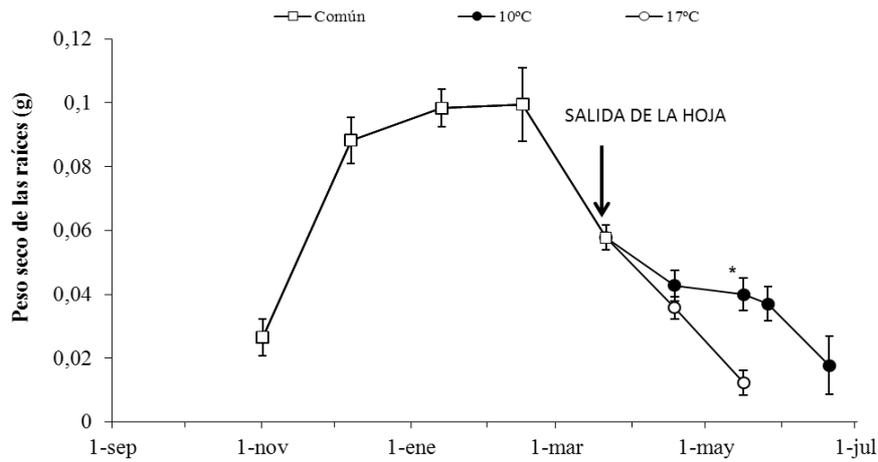
El desarrollo del cormo hijo no es apreciable hasta marzo (Figura 222). El momento en el que se inicia el crecimiento exponencial del cormo coincide con el crecimiento exponencial de las hojas. Hay que destacar, que el final del desarrollo del cormo sucede un mes después que el resto de especies primaverales en ambos tratamientos (a finales de mayo y finales de junio).



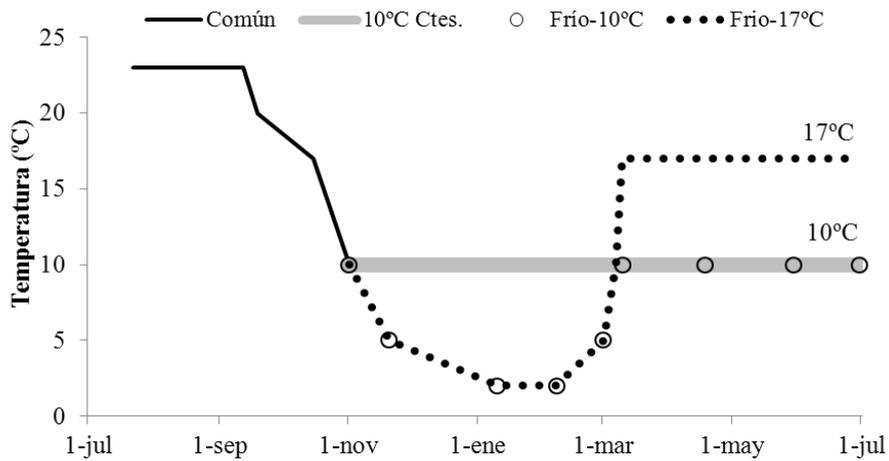
**Figura 222** Influencia de la temperatura en el peso seco del cormo hijo en desarrollo de *C. vernus*. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

El máximo desarrollo radicular en *C. vernus* se alcanza un mes después que en la especie también primaverales *C. carpetanus*, pero casi al mismo tiempo que en la otra especie primaverales *C. nevadensis* (Figura 223).

Del mismo modo que se realizó en la especie *C. nevadensis*, en esta especie también se estudió si un cultivo en condiciones controladas de temperatura constante a 10°C, podía mejorar el desarrollo de las hojas. Los tratamientos aplicados se reflejan en la Figura 224. En la siguiente gráfica se muestra el crecimiento en longitud de la hoja tomado una vez que han brotado, midiendo las mismas desde el suelo (Figura 225).



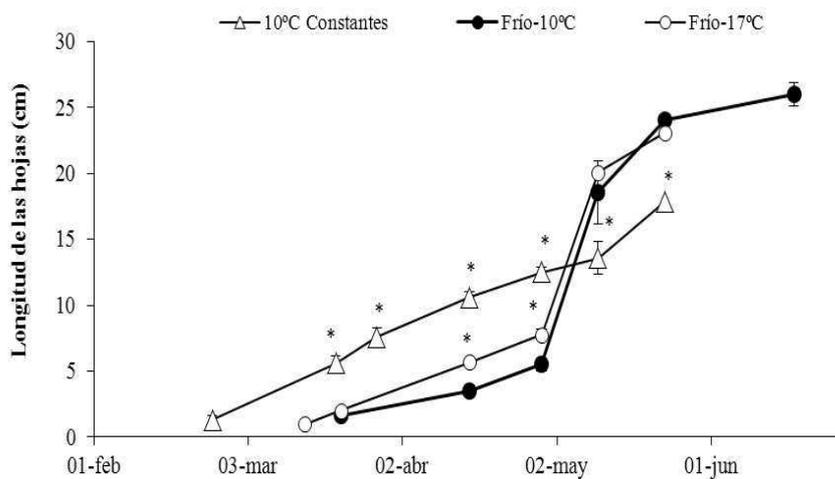
**Figura 223** Influencia de la temperatura en el peso seco de las raíces de *C. vernus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 224** Tratamientos térmicos aplicados a la especie *C. vernus* para estudiar la longitud de la hoja desde la floración.

La temperatura constante de 10°C adelanta la salida de las hojas ( $p\text{-value} < 0,05$ ), pero los tratamientos con frío invernal acaban superando en longitud a este tratamiento a partir del mes de mayo. El momento de la salida de la hoja al exterior a 10°C y 17°C con tratamiento previo de frío invernal no muestra diferencias ( $p\text{-value} > 0,05$ ) (Figura 225).

#### IV. RESULTADOS



	LONGITUD MEDIA (cm)	VIDA MEDIA (días)
<b>10°C Constantes</b>	21,4 a	98 b
<b>Frío- 10°C</b>	25,7 b	88 b
<b>Frío- 17°C</b>	23,1 ab	70 a

**Figura 225** Influencia de la temperatura en la longitud y en la vida media de las hojas de *C. vernus* durante su desarrollo vegetativo hasta que la hoja alcanza el valor máximo de su longitud. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

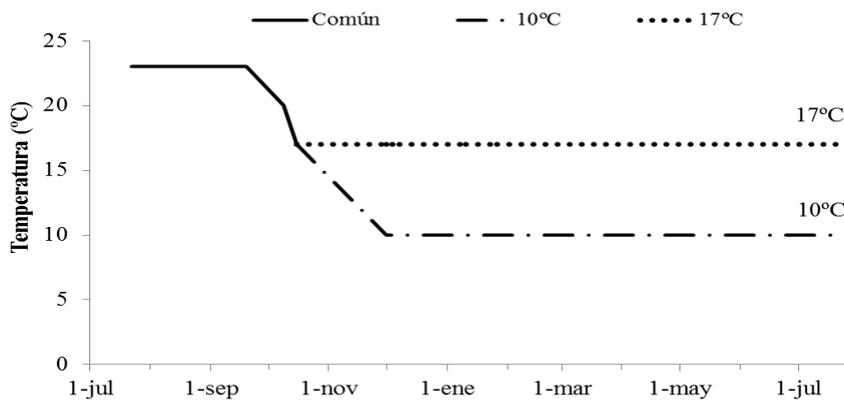
## 2.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO VEGETATIVO DE ESPECIES DE FLORACIÓN OTOÑAL

### *C. serotinus*

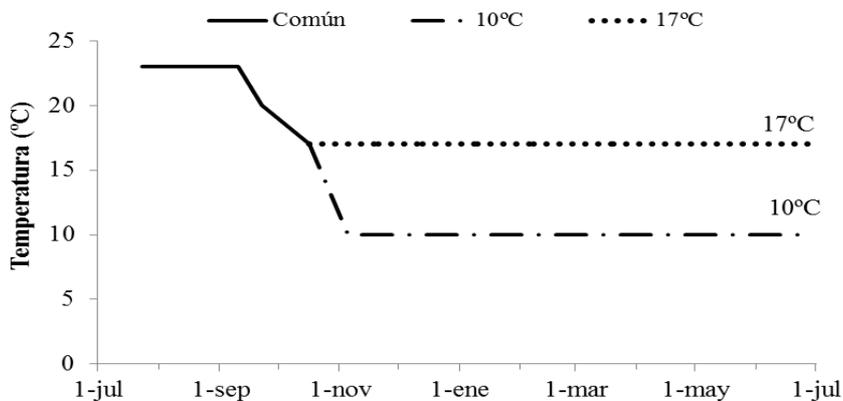
En esta especie de floración otoñal se realizan cuatro tratamientos diferentes. En un primer tratamiento los cormos se mantienen después de la floración a 10°C o a 17°C constantes. En el segundo tratamiento, son sometidos a bajas temperaturas (<5°C) tras la floración, como sucede en su ambiente natural, para después continuar su desarrollo a 10°C ó 17°C.

#### Efecto de la temperatura constante en el desarrollo

Este tratamiento se realizó con la especie *C. serotinus* silvestre, recogida inicialmente en su ambiente natural, y con la misma especie suministrada por un vivero. En este tratamiento, tras la floración, los cormos continúan su desarrollo a dos temperaturas diferentes, 10°C y 17°C (Figura 226 y Figura 227).



**Figura 226** Tratamientos térmicos aplicados a la especie *C. serotinus* suministrada por un vivero para estudiar su desarrollo vegetativo.



**Figura 227** Tratamientos térmicos aplicados a la especie *C. serotinus* recogida inicialmente en su ambiente natural para estudiar su desarrollo vegetativo.

#### IV. RESULTADOS

A la temperatura de 17°C el desarrollo de las hojas es más rápido, alcanzando a los tres meses el 95 % de su peso final. El desarrollo a temperaturas inferiores es más lento y tarda aproximadamente un mes más en alcanzar su peso máximo, pero este peso es entre un 15 y 40 % mayor. Así mismo, a esta temperatura más baja la hoja alcanza una mayor longitud (19 y 25% más larga). Hay que señalar que las diferencias en el desarrollo de la hoja debidas al efecto de la temperatura son más acusadas en la especie silvestre (Figura 228-Figura 231).

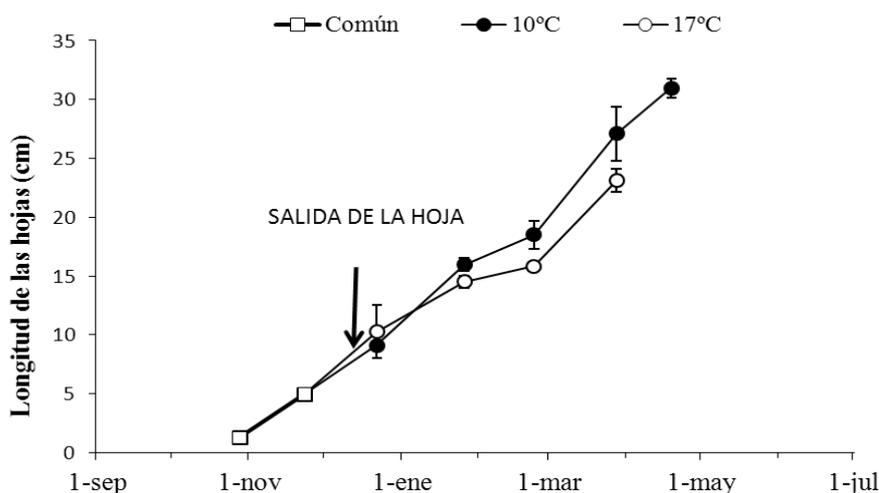


Figura 228 Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de la especie *C. serotinus* suministrada por un vivero durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

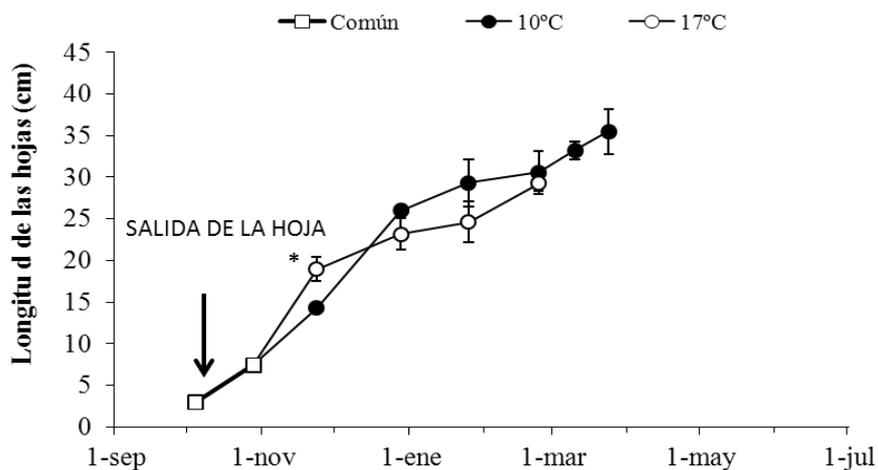
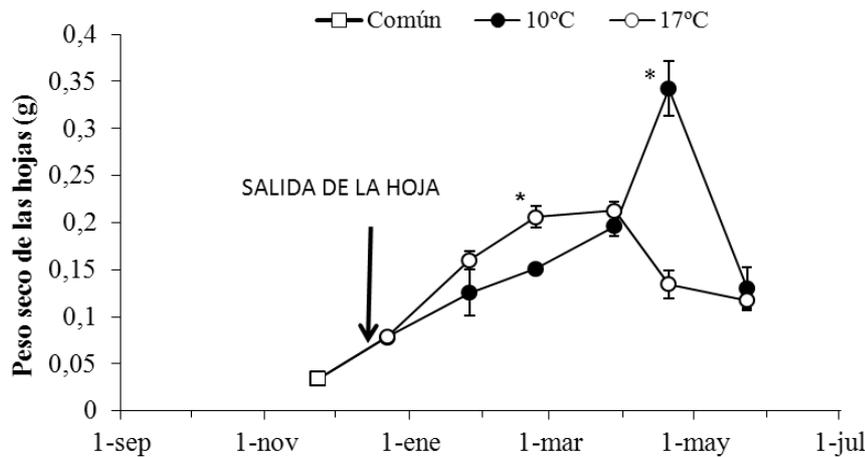


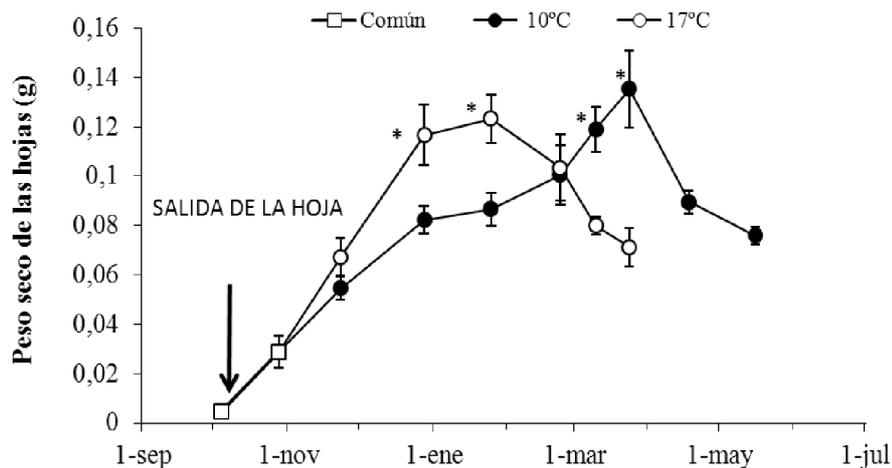
Figura 229 Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de la especie *C. serotinus* recogida inicialmente en su ambiente natural durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

El momento en el que la hoja alcanza su máximo peso seco, las reservas del cormo madre prácticamente se han agotado (ver anejo 8). Esto mismo se observó en las

especies de floración primaveral, a las que se les aplica un periodo de frío.



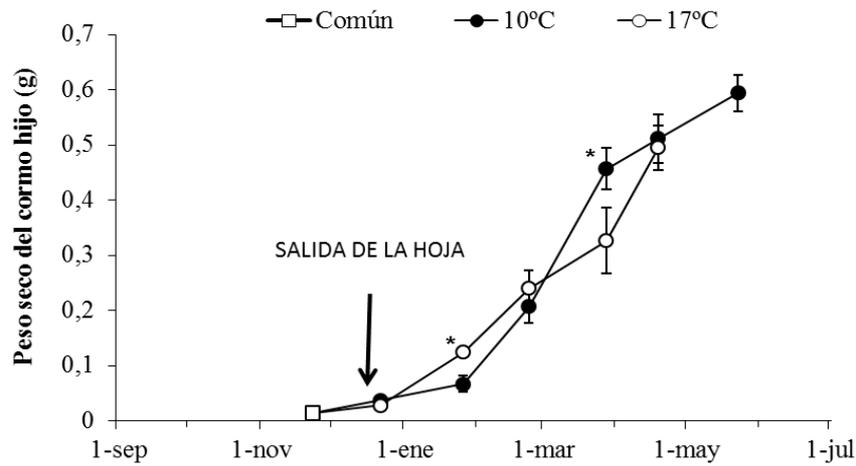
**Figura 230** Influencia de la temperatura en el peso seco de las hojas de *C. serotinus* suministrada por un vivero durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 231** Influencia de la temperatura en el peso de las hojas de la especie *C. serotinus* recogida inicialmente en su ambiente natural durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

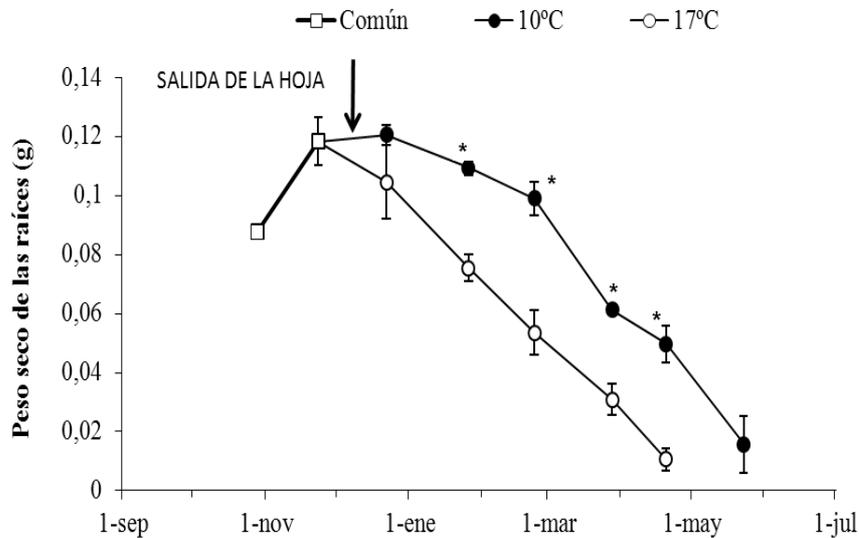
El desarrollo del corno hijo, que se analizó solo en la entrada procedente de vivero, se inicia también rápidamente a la temperatura más elevada, pero se da un mayor crecimiento y mayor duración del proceso a la temperatura más baja de 10°C. El momento en que los cormos que crecen a 10°C superan a aquellos que crecen a 17°C coincide con el momento en el que las hojas desarrolladas a 10°C aceleran su crecimiento y superan en peso a aquellas desarrolladas a 17°C (Figura 232).

#### IV. RESULTADOS

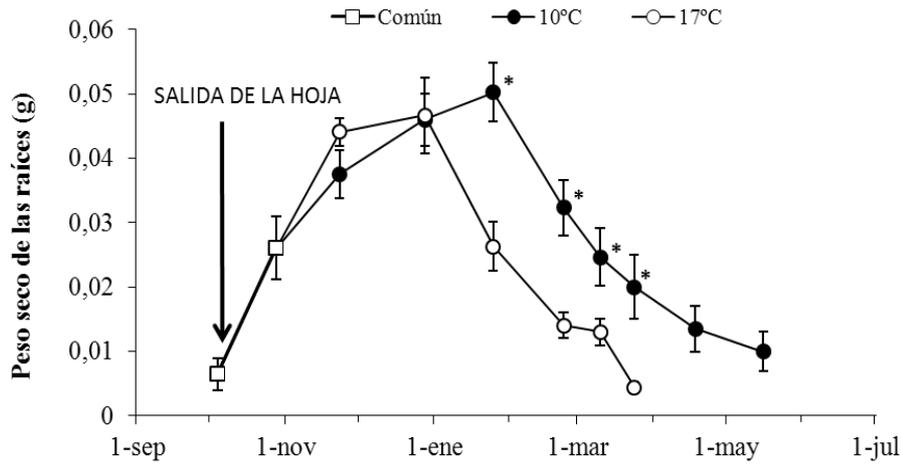


**Figura 232** Influencia de la temperatura en el peso seco del cormo hijo de la especie *C. serotinus* suministrada por un vivero durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

A temperaturas más elevadas la raíz comienza antes su pérdida de peso, y la marchitez de este órgano se adelanta más de un mes. Hay que resaltar que en la entrada silvestre el desarrollo inicial es más lento (Figura 233 y Figura 234).



**Figura 233** Influencia de la temperatura en el peso de las raíces de la especie *C. serotinus* suministrada por un vivero durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

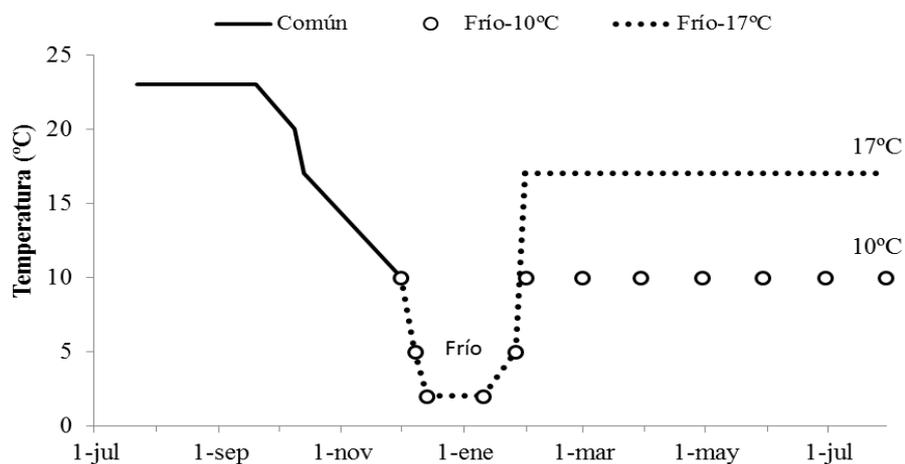


**Figura 234** Influencia de la temperatura en el peso de las raíces de la especie *C. serotinus* recogida inicialmente en su ambiente natural durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Tanto el sistema radicular como los restantes órganos alcanzan un menor tamaño en la especie silvestre a cualquier temperatura.

#### **Influencia de un periodo de frío invernal (5 y 2°C) en el desarrollo**

En este apartado se estudia el efecto de un periodo de frío invernal en el desarrollo de cormos de la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus*. El tratamiento térmico aplicado a los cormos que se someten a frío se observa en la Figura 235.

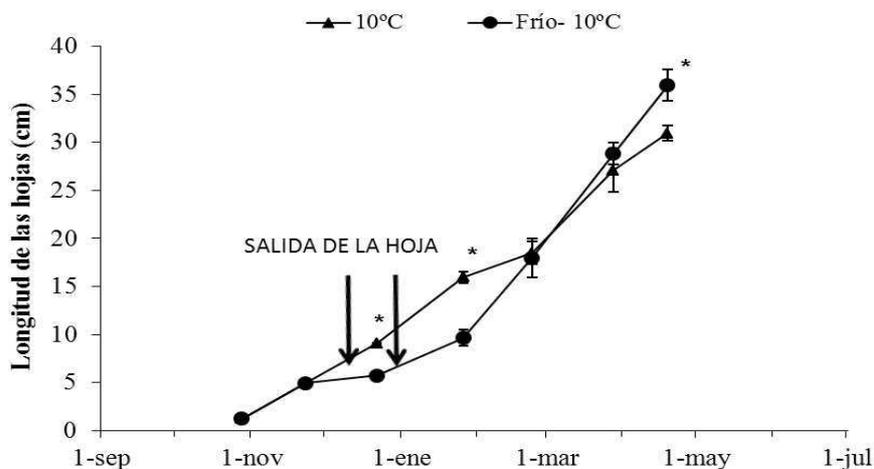


**Figura 235** Tratamientos térmicos aplicados en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* para estudiar su desarrollo vegetativo bajo la influencia de un periodo de frío invernal.

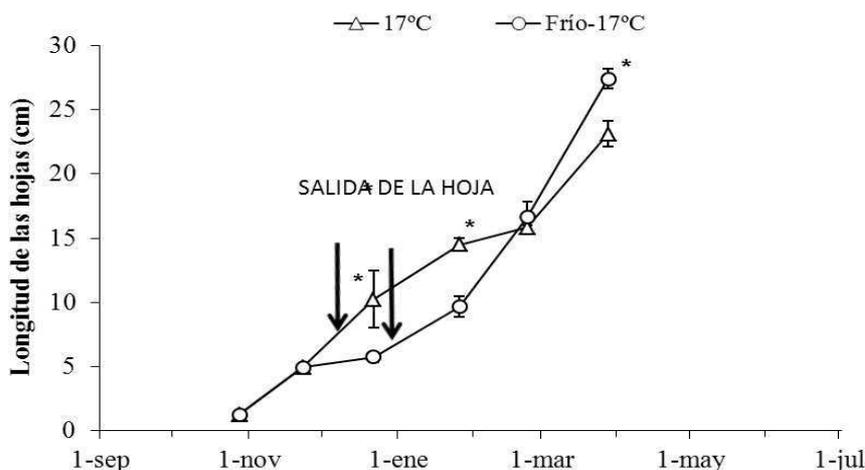
La longitud de las hojas es ligeramente superior en aquellas plantas que sufren un periodo de frío invernal (Figura 236 y Figura 237). Este frío invernal retrasa el desarrollo de la hoja si bien el peso seco máximo alcanzado no varía significativamente para ninguna

#### IV. RESULTADOS

de las temperaturas ensayadas (Figura 238 y Figura 239). No obstante, a la temperatura de 17°C el retraso provocado por el frío invernal es más acusado.

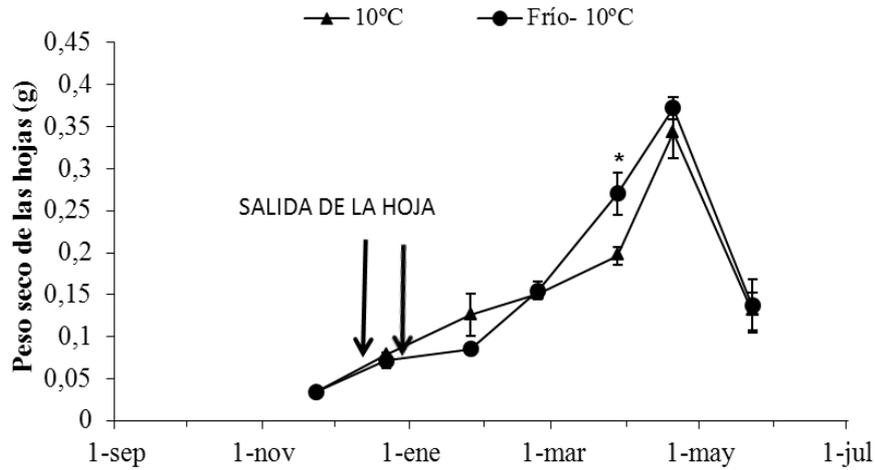


**Figura 236** Influencia de un tratamiento de frío invernal previo al desarrollo a 10°C en la longitud de las hojas de en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

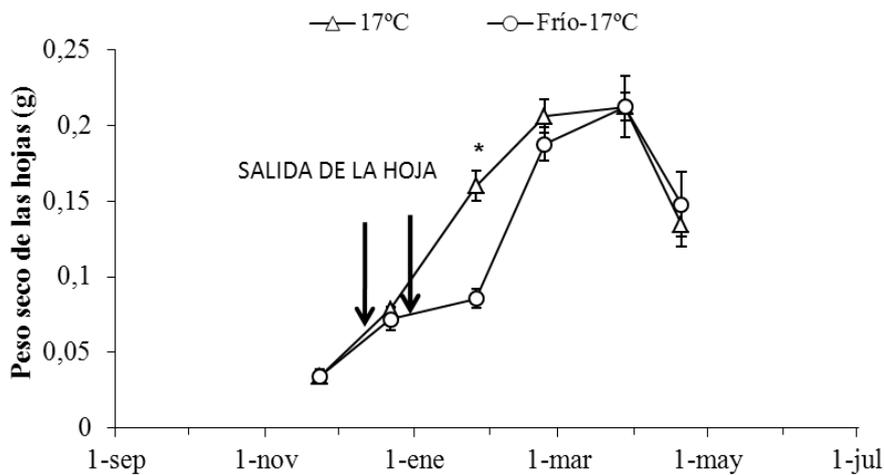


**Figura 237** Influencia de un tratamiento de frío invernal previo al desarrollo a 17°C en la longitud de las hojas en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

En la especie *C. serotinus*, con independencia de la aplicación de un periodo frío, el momento en el que la hoja alcanza su máximo peso seco, las reservas del cormo madre prácticamente se han agotado (ver gráfica de evolución del peso del cormo madre en anejo 8).



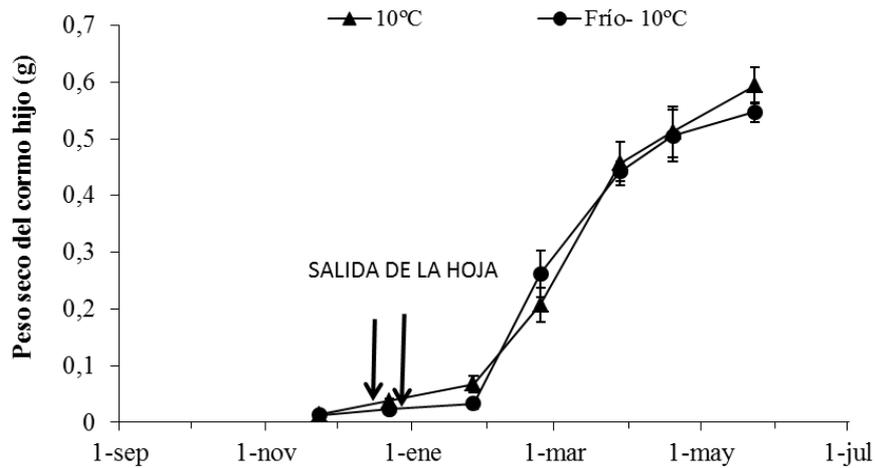
**Figura 238** Influencia de un tratamiento de frío invernal previo al desarrollo a 10°C en el peso seco de las hojas en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).



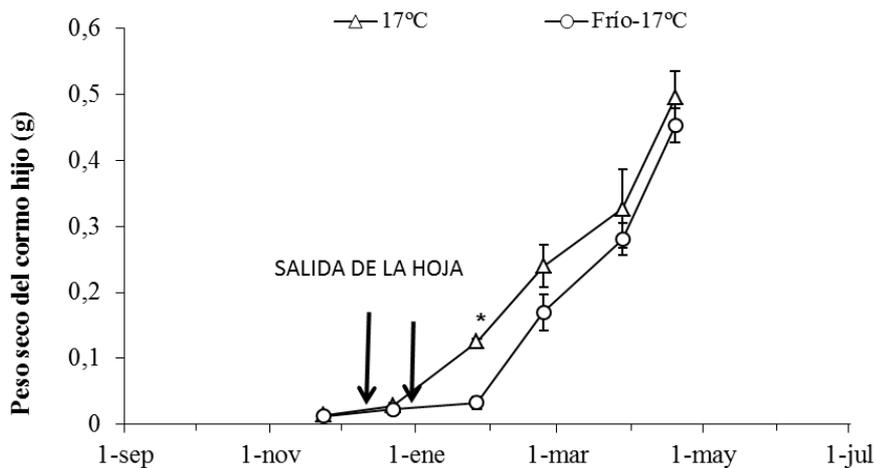
**Figura 239** Influencia de un tratamiento de frío invernal previo al desarrollo a 17°C en el peso seco de las hojas en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

El desarrollo del cormo hijo se ve poco afectado por el periodo de frío invernal cuando las plantas crecen a 10°C. A la temperatura de 17°C, se observa un retraso en el desarrollo de los cormos que sufren un periodo de frío invernal, pero el tamaño final alcanzado y el momento en que cesa el crecimiento no muestra diferencias entre plantas crecidas a temperatura constante de 17°C, y aquellas sometidas a frío hasta finales de enero (Figura 240 y Figura 241).

#### IV. RESULTADOS

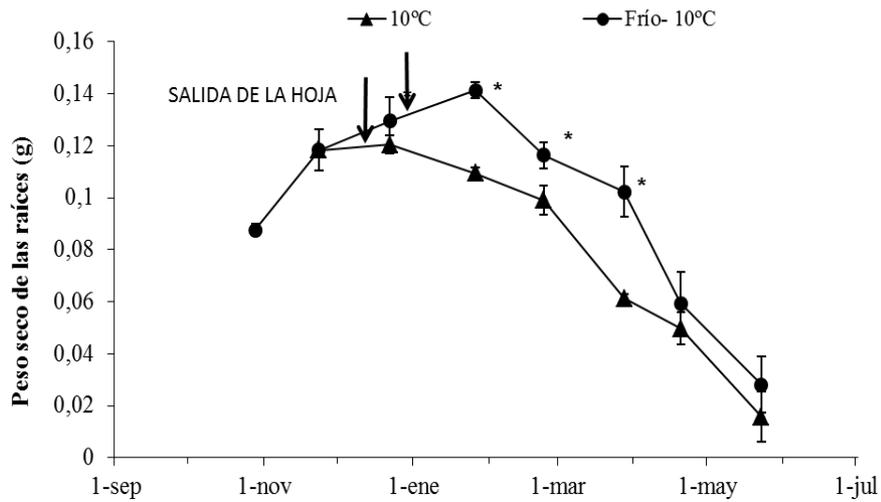


**Figura 240** Influencia de un tratamiento de frío invernal previo al desarrollo a 10°C en el peso seco del corno hijo en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

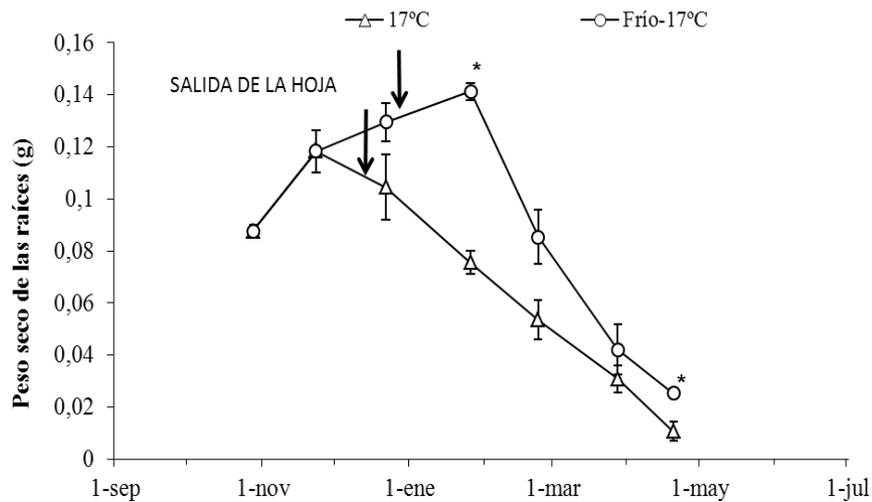


**Figura 241** Influencia de un tratamiento de frío invernal previo al desarrollo a 17°C en el peso seco del corno hijo en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* durante su desarrollo vegetativo. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

La aplicación de un periodo de frío desde finales de noviembre a finales de enero retrasa el inicio de la senescencia de las raíces, que comienza a finales de noviembre en los tratamientos a temperatura constante. Este retraso da lugar a un mayor desarrollo de las raíces que alcanzan un peso seco superior en un 30% aproximadamente (Figura 242 y Figura 243).



**Figura 242** Influencia de un tratamiento de frio invernal previo al desarrollo a 10°C en el peso seco de las raíces en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 243** Influencia de un tratamiento de frio invernal previo al desarrollo a 17°C en el peso seco de las raíces en la entrada procedente de vivero de la especie *C. serotinus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

## IV. RESULTADOS

### *C. nudiflorus*

En esta especie el periodo de frío se inicia una vez acaba la floración, a finales de noviembre. Los tratamientos térmicos ensayados se muestran en la Figura 244.

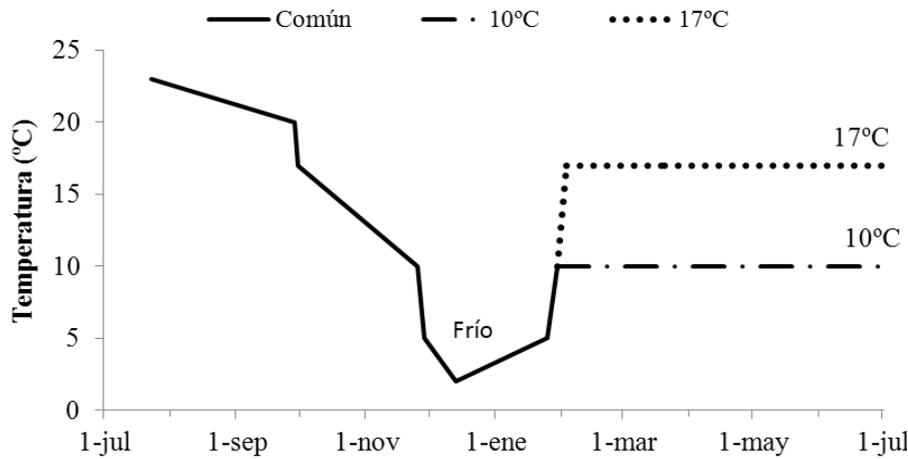


Figura 244 Tratamientos térmicos aplicados a la especie *C. nudiflorus* para estudiar su desarrollo vegetativo.

Esta especie que presenta el fenómeno de la histerantia comienza a desarrollar las hojas a finales de octubre, al mismo tiempo que florece, aunque no salgan al exterior hasta febrero en su ambiente natural. El frío intenso (5-2°C) produce una ralentización del desarrollo de las hojas hasta que vuelven a subir las temperaturas y comienza el crecimiento exponencial de las mismas (Figura 245). Del mismo modo que ocurre en la especie *C. serotinus*, el peso seco final de la hoja a 10°C es aproximadamente el doble del que se alcanza a temperaturas superiores (Figura 246).

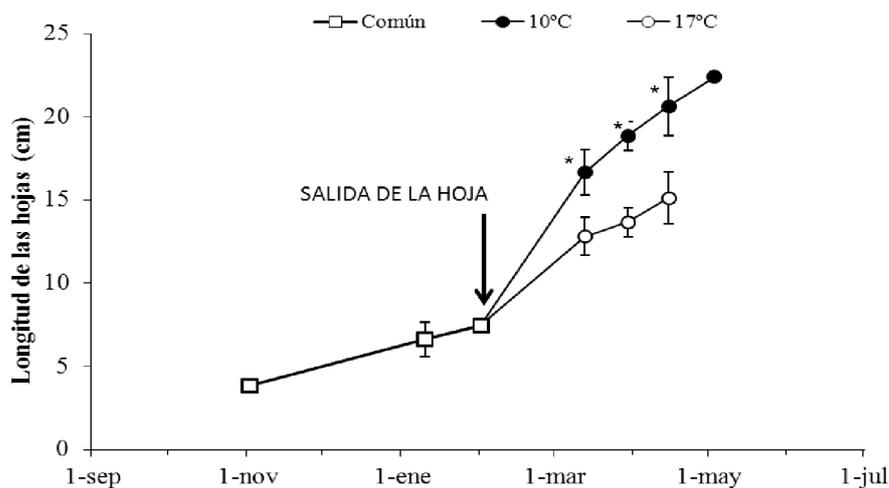
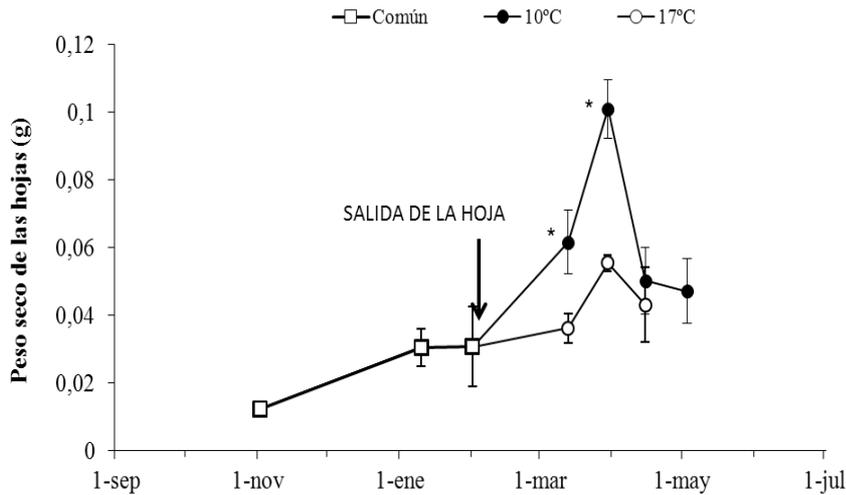


Figura 245 Influencia de la temperatura en la longitud de las hojas de *C. nudiflorus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

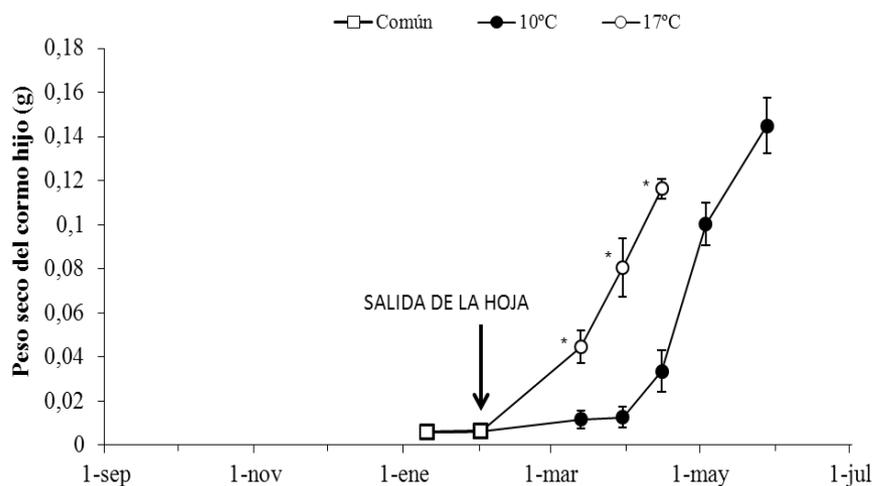
En la especie *C. nudiflorus*, como también sucede en el resto de especies, el momento en el que la hoja alcanza su máximo peso seco, las reservas del cormo madre

prácticamente se han agotado (ver gráfica de evolución del peso del corno madre en anejo 8).



**Figura 246** Influencia de la temperatura en el peso seco de las hojas de *C. nudiflorus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

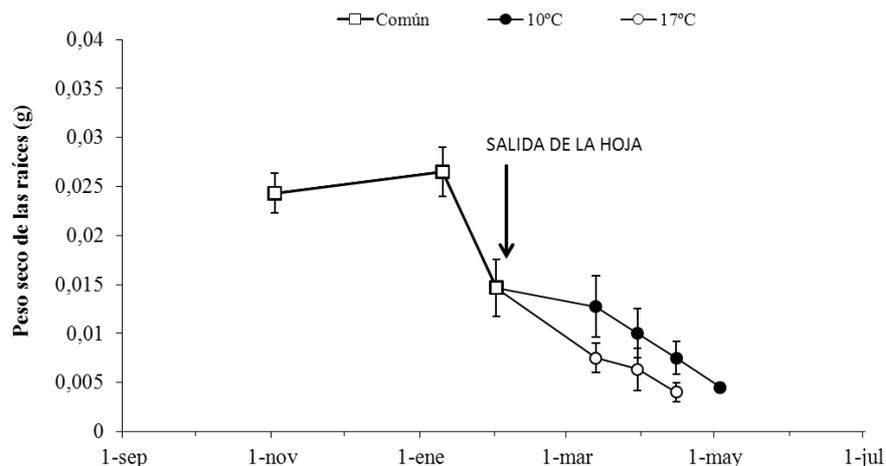
El desarrollo del corno hijo de *C. nudiflorus* comienza a finales de enero y temperaturas elevadas (17°C) adelantan su crecimiento, pero su tamaño final es mayor cuando el desarrollo se lleva a cabo a la temperatura más baja de 10°C (Figura 247).



**Figura 247** Influencia de la temperatura en el peso seco del corno hijo en desarrollo de *C. nudiflorus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

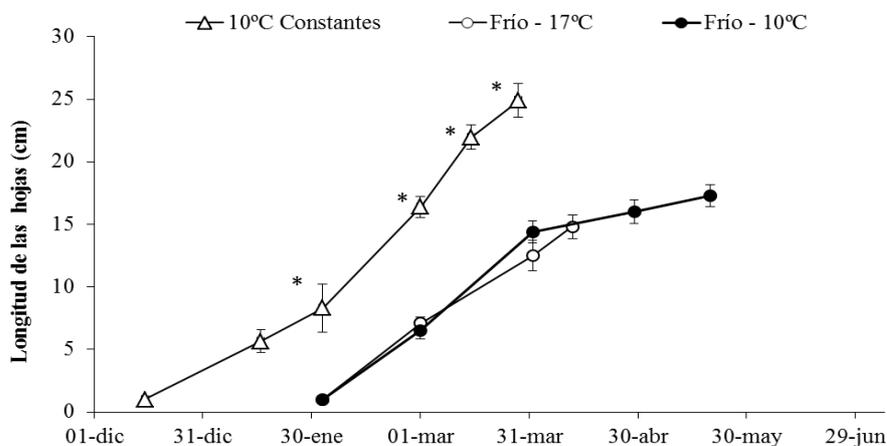
De nuevo observamos que la raíz inicia antes su pérdida de peso a temperaturas de 17°C, y que las temperaturas más bajas dan un mayor desarrollo radicular (Figura 248).

#### IV. RESULTADOS



**Figura 248** Influencia de la temperatura en el peso seco de las raíces de *C. nudiflorus* durante su desarrollo vegetativo. Con una flecha se indica el momento de la salida de la hoja. La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Al comparar el efecto de los tratamientos ensayados con frío invernal, con un tratamiento a temperatura constante de 10°C en el crecimiento de la hoja, observamos que a temperaturas constantes de 10°C se adelanta la salida de la hoja y alcanza un mayor tamaño (Figura 249).



	LONGITUD MEDIA (cm)		VIDA MEDIA (días)	
10°C Constantes	24,9	b	103	b
Frío -10°C	17,3	a	107	b
Frío - 17°C	14,8	a	69	a

**Figura 249** Influencia de la temperatura en la longitud y en la vida media de las hojas de *C. nudiflorus* durante su desarrollo vegetativo hasta que la hoja alcanza el valor máximo de su longitud. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). La presencia de asterisco indica diferencias significativas en esa fecha entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

### 2.3 DESARROLLO VEGETATIVO COMPARADO DE CUATRO ESPECIES DE *CROCUS*

Se compara el crecimiento en longitud de la hoja, de dos especies otoñales y dos especies primaverales, medida desde su salida a la superficie del sustrato, a una temperatura constante de 10°C. Los cormos, tras ser incubados a 23°C durante el verano, pasan a temperaturas más frías progresivamente durante el mes de septiembre. En octubre comienza el tratamiento de 10°C constantes que continua hasta la senescencia de la planta.

El desarrollo de las hojas de las especies ensayadas a 10°C constantes sucede de forma escalonada en el tiempo. La especie *C. serotinus*, especie de floración otoñal, presenta un desarrollo más temprano de la hoja. La especie de floración primaveral temprana, *C. nevadensis*, brota quince días después. *C. nudiflorus*, especie de floración otoñal con histerantia, desarrolla sus hojas con posterioridad a la especie primaveral temprana, pero antes que la especie de floración primaveral tardía (Figura 250).

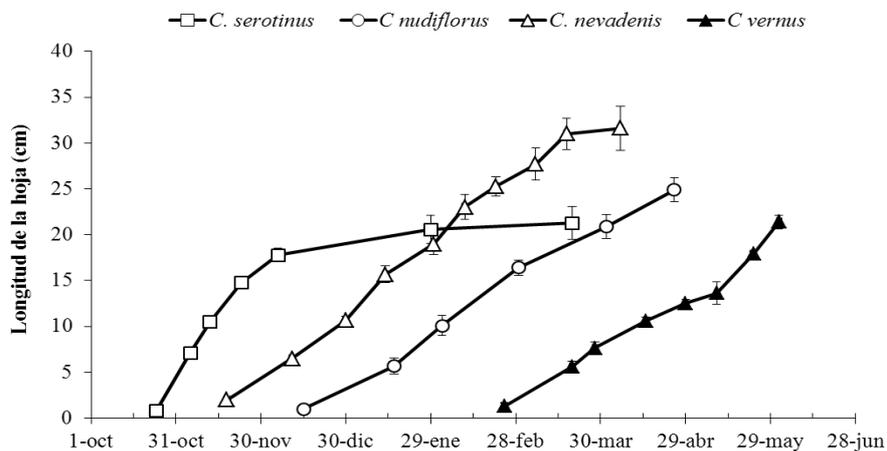
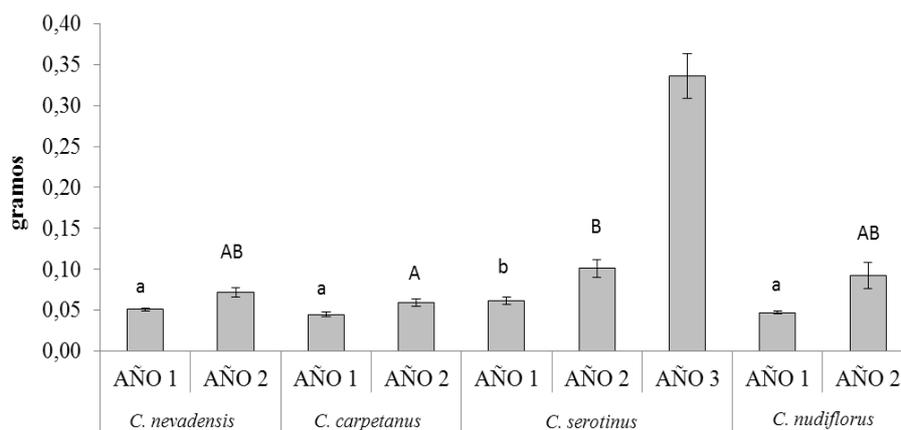


Figura 250 Efecto de una temperatura constante de 10°C en el desarrollo de la hoja de las especies *C. serotinus*, *C. nudiflorus*, *C. nevadensis* y *C. vernus* hasta que la hoja alcanza el valor máximo de su longitud.

### 2.4 FISIOLÓGÍA DE LOS CORMOS PROCEDENTES DE SEMILLA

Se ha evaluado la evolución del peso de los cormos procedentes de semilla a lo largo de 2 -3 años en las especies primaverales *C. nevadensis* y *C. carpetanus* y en las especies de floración otoñal *C. serotinus* y *C. nudiflorus*. El peso que alcanza el cormo formado a partir de la semilla es menor de 0,05 g y no presenta diferencias significativas entre las especies evaluadas. Los cormos formados el segundo año adquieren un peso mayor de 0,05 g. Los cormitos de la especie *C. serotinus* adquieren un peso significativamente superior (0,1 g de peso). Los cormos de la tercera generación sólo se han estudiado en la especie *C. serotinus* y consiguen un peso de 0,3 g (ver Figura 251).

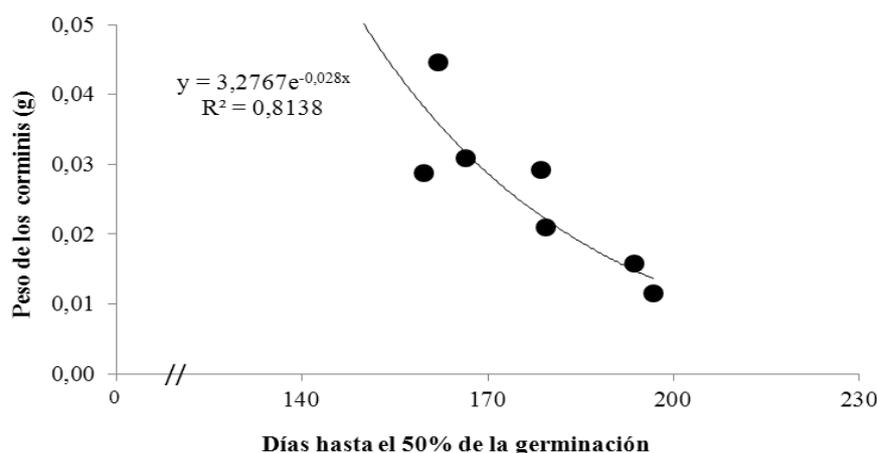
#### IV. RESULTADOS



**Figura 251** Evolución del peso de los cormos procedentes de semillas a lo largo de dos o tres generaciones para las especies *C. nevadensis*, *C. carpetanus*, *C. nudiflorus* y *C. serotinus*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre especies dentro del mismo año ( $p < 0,05$ ).

Estos cormos procedentes de semilla tendrán que engordar durante varios años más para poder adquirir el peso mínimo de floración, que en estas especies silvestres de *Crocus* se ha estimado que se encuentra entre 0,8 y 1 g (Figura 251).

Se ha estudiado la correlación entre el peso de los cormos procedentes de semilla y el tiempo que tardan las mismas a germinar (Figura 252). Se ha observado que existe una correlación significativa y elevada con el tiempo que tardan las semillas a germinar (Coeficiente de correlación de Pearson: 0,8\*. Significación al nivel del 5%). Cuanto antes empiezan a germinar y brotar sus hojas, más elevado es el peso de los cormos obtenidos, tal y como se puede observar en la Figura 252. Esta relación sólo se ha podido observar en cormitos de la especie *C. nevadensis*, en la que se tuvieron cormitos suficientes.



**Figura 252** Recta de correlación entre el peso de los cormitos obtenidos a partir de semillas germinadas en diferentes tratamientos de germinación con los días hasta el 50% de la germinación de las mismas. Recta de correlación exponencial.

## 2.5 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO DE CORMOS ESTOLONÍFEROS

La formación de estructuras estoloníferas se ha observado únicamente en el caso de la especie *C. nudiflorus*. Estas estructuras se desarrollan a partir de las yemas vegetativas de los cormos y son capaces de brotar en la superficie, formar hojas y así dar lugar a nuevos individuos (Figura 253).



Figura 253 Estolones producidos por cormos de la especie *C. nudiflorus* (BCU002944).

Se ha estudiado el efecto de la temperatura de incubación de los cormos durante el periodo llamado de latencia previo a la siembra sobre la inducción de yemas que darán lugar a estolones. Se ha ensayado tanto bajas temperaturas (5-10°C) como temperaturas más elevadas (23-30°C). Tras el periodo de latencia los cormos se sometieron a un tratamiento que simula las condiciones naturales. Los resultados (Figura 254) indican que la mayor proporción de cormos con estolones se forma en temperaturas más extremas. Es decir, a la temperatura más baja de 5°C y más alta de 30°C.

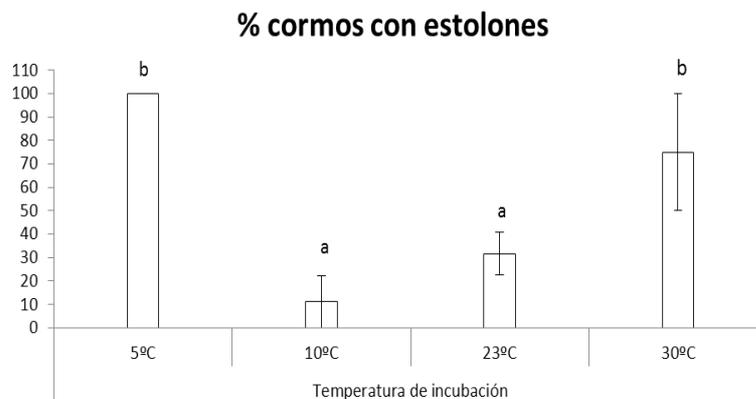


Figura 254 Influencia de la temperatura de incubación en la formación de estolones en cormos de *C. nudiflorus*. Tratamientos con letras diferentes presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3 FISIOLÓGÍA DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE LAS ESPECIES SILVESTRES DE *CROCUS* ESPAÑOLES.

#### 3.1 INFLUENCIA DE TRATAMIENTOS DE ROTURA DE LATENCIA

Se trabajó con cinco especies de las siete que se han identificado en el territorio español. Dos de estas especies son de floración otoñal, una que brota y florece simultáneamente en otoño (*C. serotinus*), y otra que florece en otoño pero desarrolla su hoja después del invierno (*C. nudiflorus*). Dentro de las especies de floración primaveral, se ha estudiado *C. nevadensis* que si bien florece al final del invierno, brota con anterioridad a la floración. Asimismo, se ha trabajado con *C. carpetanus*, que muestra una brotación y floración simultánea y ligeramente más retrasada que la anterior. Como especie de brotación tardía, se ha trabajado con *C. vernus*, que brota y florece al final de la primavera.

Se desconoce el momento de germinación de estas semillas en condiciones naturales. La selección de las temperaturas se llevó a cabo en base a dos trabajos previos de otros autores en otras especies de este género y teniendo en cuenta experiencias preliminares de nuestro grupo (Vurdu *et al.*, 2004; Grilli–Caola, 2005). La temperatura de germinación utilizada en todos los tratamientos es 10°C.

#### 3.1.1 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE ESPECIES OTOÑALES

##### *C. serotinus*

Dado que el fruto de *C. serotinus* madura antes del verano y la germinación se produce en otoño, se aplican tratamientos de almacenamiento en seco a 23°C para favorecer la rotura de la latencia de las semillas.

##### Efecto del almacenamiento en seco

Al incrementar el período de almacenamiento en seco, desde 15 hasta 125 días, se incrementa la tasa de germinación. El porcentaje máximo de germinación se obtiene para un período de almacenamiento 45-125 días a 23°C. Tras este período, la germinación tiene lugar de forma más o menos constante a los 45 -50 días (Tabla 99).

Tabla 99 Efecto de distintos períodos de almacenamiento en seco a 23°C (0, 15, 30, 45, 60, 80 y 125 días) sobre la germinación de las semillas de *C. serotinus* a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Días a 23°C	% GERMINACIÓN	DH50%G
0	5 a	186 e
15	29 ab	73 a
30	71 bc	78 a
45	76 bc	94 b
60	81 c	104 b
80	78 bc	126 c
125	76 bc	170 d

En la siguiente gráfica se representa la evolución de la tasa de germinación de las semillas de la especie *C. serotinus* en condiciones óptimas (almacenamiento en seco a 23°C durante 30, 45 y 60 días) (Figura 255).

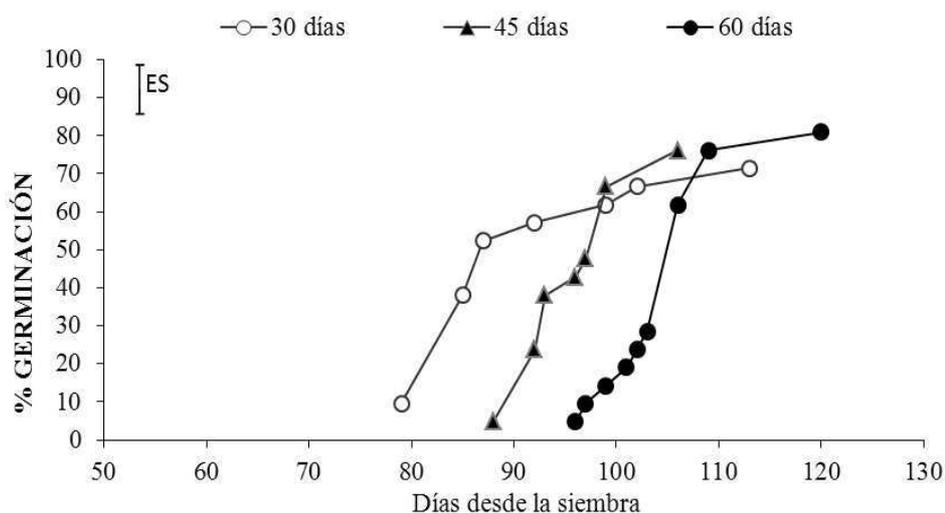


Figura 255 Evolución de la tasa de germinación de semillas de *C. serotinus* en condiciones óptimas (30, 45 o 60 días de almacenamiento en seco (23°C) y germinación a 10°C). Siembra realizada a finales de junio. ES: error estándar.

### *C. nudiflorus*

Esta especie de floración otoñal e histerantia, brota durante el otoño, pero sus hojas aparecen meses después. Se aplican tratamientos de almacenamiento en seco a 23°C y estratificación fría a 5°C para romper la latencia de las semillas.

#### Efecto del almacenamiento en seco

La aplicación del almacenamiento en seco durante 45-60 días mejora la germinación alcanzando el 95%. Al mismo tiempo da lugar a un adelanto de la germinación (80 días) respecto del tratamiento control (Tabla 100).

#### IV. RESULTADOS

**Tabla 100 Efecto de distintos periodos de almacenamiento en seco a 23°C (0, 45 y 60 días) sobre la germinación de las semillas de *C. nudiflorus* a 10°C. Siendo: DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ).**

Días a 23°C	% GERMINACIÓN	DH50%G
0	5 a	239 b
45	81 b	156 a
60	95 b	165 a

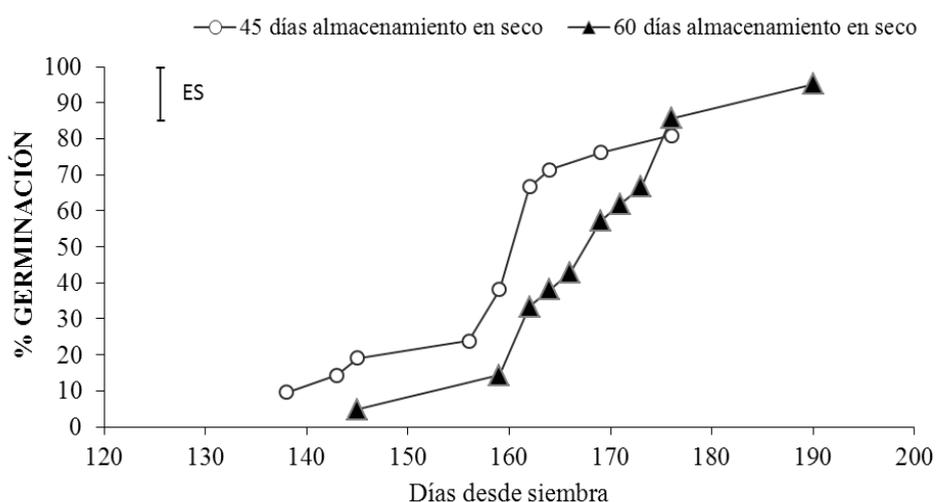
#### **Efecto de una estratificación fría con almacenamiento en seco previo**

Si se aplica una estratificación fría después de un almacenamiento en seco, se produce un drástico descenso de la tasa de germinación, con independencia del periodo de dicho tratamiento (Tabla 101).

**Tabla 101 Efecto de distintos periodos de estratificación en frío (0, 30 y 60 días) tras 60 días de almacenamiento en seco a 23°C, sobre la germinación de las semillas de *C. nudiflorus* a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ).**

Días a 23°C	Días a 5°C	% GERMINACIÓN	DH50%G
60	0	95 b	165 a
60	30	19 a	177 a
60	60	10 a	243 b

En la gráfica siguiente se representa la evolución de la tasa de germinación de semillas de *C. nudiflorus* en condiciones óptimas (45 y 60 días de almacenamiento en seco a 23°C y germinación a 10°C) (Figura 256).



**Figura 256 Evolución de la tasa germinación de semillas de *C. nudiflorus* en condiciones óptimas (45 y 60 días de almacenamiento en seco (23°C) y germinación a 10°C). Siembra realizada a finales de junio. ES: error estándar.**

### 3.1.2 GERMINACIÓN DE ESPECIES PRIMAVERALES

#### *C. nevadensis.*

El hecho de que en condiciones naturales se observe el desarrollo vegetativo de esta especie a finales de invierno, indica que podría ser necesario establecer tratamientos de rotura de latencia mediante almacenamiento en seco a 23°C y estratificación fría a 5°C.

#### Efecto del almacenamiento en seco

En un primer ensayo, se observa que el almacenamiento en seco durante 60 días incrementa significativamente la germinación de las semillas y disminuye el tiempo de latencia. En un ensayo posterior, en que se incrementa el período de almacenamiento en seco a 80 días, se observa que este incremento tiene un efecto positivo sobre la germinación, llegando a incrementar ésta en un 24%, si bien no afecta al período requerido para romper la latencia. (Tabla 102 y Tabla 103). No obstante, hay que señalar que el segundo experimento fue realizado con posterioridad, y las semillas habían estado más tiempo almacenadas, perdiendo capacidad de germinación.

*Tabla 102 Efecto de un almacenamiento en seco de 60 días previo sobre la germinación de las semillas de C. nevadensis a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). Estas semillas se mantuvieron dos meses en condiciones de conservación en nevera (5°C y baja humedad).*

Días a 23°C	% GERMINACIÓN	DH50%G
0	14 a	230 b
60	76 b	192 a

*Tabla 103 Efecto de distintos períodos de almacenamiento en seco (60 y 80 días) previos, sobre la germinación de las semillas de C. nevadensis a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). Estas semillas se mantuvieron cinco meses y medio en condiciones de conservación en nevera (5°C y baja humedad).*

Días a 23°C	% GERMINACIÓN	DH50%G
60	43 a	162 a
80	67 a	179 a

#### Efecto de la estratificación fría tras el almacenamiento en seco

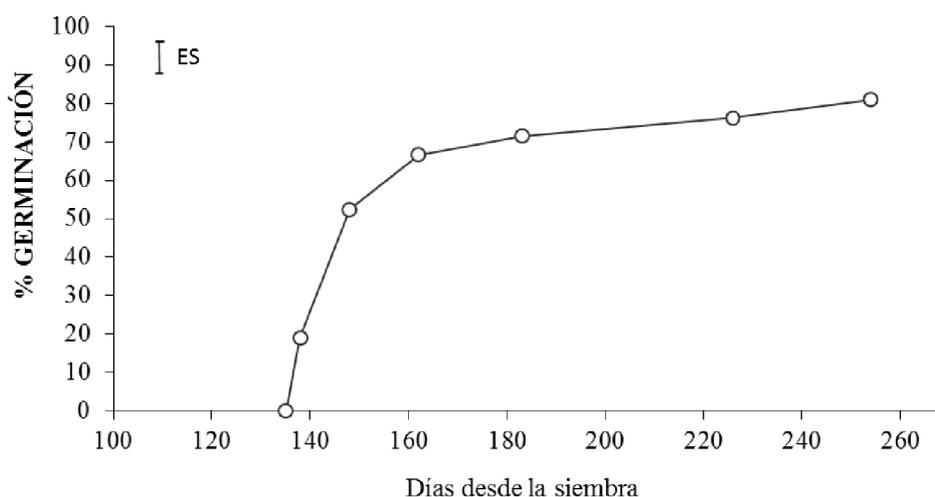
El tratamiento de estratificación fría no incrementa por sí solo el porcentaje de germinación. Sin embargo, disminuye el periodo de latencia de las pocas semillas que han germinado. Si el tratamiento frío se aplica tras un periodo prolongado de almacenamiento en seco, se consigue incrementar la germinación hasta el 81% y reducir significativamente el periodo de latencia hasta la germinación (143 días respecto 192 días, tabla anterior). Los resultados no mejoran si se reduce el periodo de frío a 30 días (Tabla 104).

## IV. RESULTADOS

**Tabla 104 Efecto de distintos períodos de almacenamiento en seco (0, 45, 60 y 80 días) previos a diferentes períodos de estratificación fría (0, 45 y 30), sobre la germinación de las semillas de *C. nevadensis* a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). Estas semillas se mantuvieron dos meses en condiciones de conservación en nevera (5°C y baja humedad).**

Días a 23°C	Días a 5°C	% GERMINACIÓN	DH50%G
0	0	14 a	230 b
0	45	19 ab	179 ab
45	30	14 a	226 b
45	45	24 ab	130 a
60	30	48 abc	166 ab
60	45	81 c	143 a
80	30	52 bc	194 ab

En la siguiente gráfica se muestra la evolución de la tasa de germinación obtenida con el tratamiento óptimo de rotura de latencia para las semillas de la especie *C. nevadensis* (81% de tasa de germinación) (Figura 257).



**Figura 257 Evolución de la tasa de germinación de semillas de *C. nevadensis* en condiciones óptimas (60 días de almacenamiento en seco (23°C) seguidos de 45 días de estratificación fría (5°C), y germinación a 10°C). Siembra realizada a finales de junio. ES: error estándar.**

### ***C. carpetanus***

A esta especie de brotación invernal próxima a *C. nevadensis*, se le aplican tratamientos de germinación similares a los anteriormente detallados.

#### **Efecto de un almacenamiento en seco y de una estratificación fría**

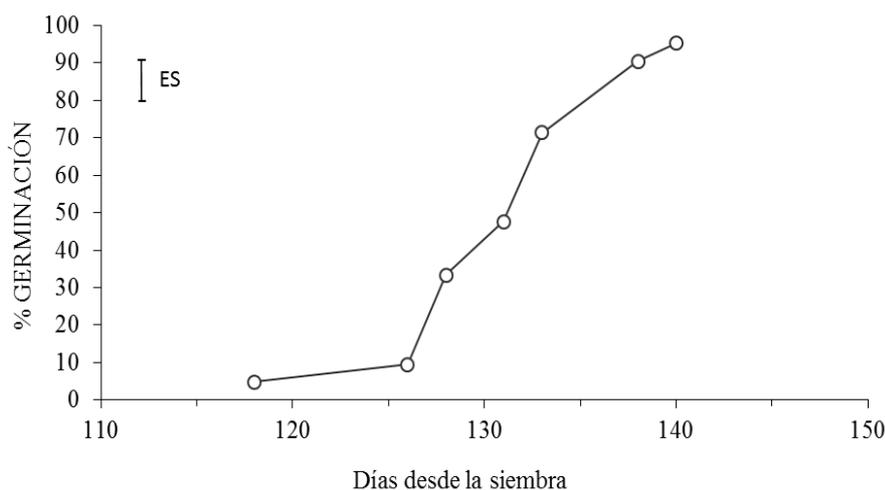
La tasa de germinación de esta especie sin tratamiento de rotura de latencia es muy superior a la observada en *C. nevadensis*, si bien su fenología es muy similar.

El periodo de almacenamiento en seco durante 60 días a 23°C duplica la tasa de germinación llegando al 95% de semillas germinadas, si bien retrasa su inicio 60 días. La estratificación fría tras el almacenamiento en seco reduce la germinación (Tabla 105).

**Tabla 105 Efecto de distintos periodos de almacenamiento en seco (0, 60 y 80 días) previos a diferentes tiempos de estratificación fría (0 y 30 días), sobre la germinación de las semillas de *C. carpetanus* a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ).**

Días a 23°C	Días a 5°C	% GERMINACIÓN	DH50%G
0	0	52 a	69 a
60	0	95 b	130 b
60	30	33 a	171 c
80	30	33 a	236 d

En la siguiente gráfica se muestra la evolución de la germinación de semillas de *C. carpetanus* del tratamiento óptimo de rotura de latencia (60 días de almacenamiento en seco y germinación a 10°C) (Figura 258).



**Figura 258 Evolución de la tasa de germinación de semillas de *C. carpetanus* en condiciones óptimas (60 días de almacenamiento en seco (23°C) y germinación a 10°C). Siembra realizada a finales de junio. ES: error estándar.**

### ***C. vernus.***

En esta especie se obtuvo una cantidad escasa de semillas, quizás debido al hecho de que proviene de especies comerciales que se mantienen por bulbos. Como en casos anteriores, se aplican tratamientos de almacenamiento en seco y de rotura de latencia.

El almacenamiento en seco mejora la tasa de germinación, aunque se obtienen porcentajes relativamente bajos, que no se consiguen incrementar aplicando posteriormente una estratificación en frío (Tabla 106).

## IV. RESULTADOS

**Tabla 106 Efecto de distintos periodos de estratificación fría a 5°C (0, 30 y 60 días) tras diferentes periodos de almacenamiento en seco (0 y 60 días) sobre la germinación de las semillas de *C. vernus* a 10°C. Siendo DH50%G: días desde la siembra hasta la germinación del 50% de las semillas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ).**

Días a 23°C	Días a 5°C	% GERMINACIÓN	DH50%G
0	0	0 a	- -
60	0	29 b	218 a
60	30	24 b	236 a
60	60	5 a	256 a

### 3.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE GERMINACIÓN

Los experimentos llevados a cabo para estudiar la rotura de latencia en las especies españolas de *Crocus* se han realizado utilizando una temperatura de germinación constante de 10°C. Sin embargo, es interesante ensayar si temperaturas ligeramente superiores podrían mejorar el proceso en algunas especies.

Una temperatura de germinación de 23°C constantes da lugar a una germinación nula en todas las especies estudiadas.

#### ***C. serotinus***

En la especie de floración y brotación otoñal *C. serotinus*, una temperatura de germinación más elevada (17°C) sin tratamiento de rotura de latencia, da lugar a una mayor tasa de germinación que la temperatura de germinación a 10°C. Sin embargo, si se aplica un tratamiento de almacenamiento en seco (45 días a 23°C), la temperatura más fría de 10°C es más adecuada para la germinación de *C. serotinus*, alcanzándose porcentajes de germinación cerca del 80% (Tabla 107).

**Tabla 107 Influencia de la temperatura y del tratamiento de rotura de latencia (sin tratamiento previo; 23°C (45 días) siendo almacenamiento en seco de 45 días) en la germinación de semillas de *C. serotinus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas de germinación y letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos de rotura de latencia.**

% GERMINACIÓN		TRATAMIENTO	
Tª germinación		Sin tratamiento previo	23°C (45 días)
10°C	5 aA	76 aB	
17°C	43 bA	48 aA	
DÍAS HASTA 50% GERMINACIÓN		TRATAMIENTO	
Tª germinación		Sin tratamiento previo	23°C (45 días)
10°C	186 a	94 a	144 A
17°C	162 a	142 b	177 B
	193 B	129 A	

El tratamiento de germinación a 17°C no adelanta la germinación de las semillas que no han sido sometidas a almacenamiento en seco, y retrasa la germinación de aquellos que si han sufrido este tratamiento de rotura de latencia (Tabla 107).

### **C. nudiflorus**

Las semillas de *C. nudiflorus* presentan similares comportamientos que aquellas de *C. serotinus*. La temperatura de 17°C es la más adecuada para semillas que no han estado sometidas a almacenamiento en seco. Pero aquellas que si lo han sufrido, germinan a una tasa más elevada a 10°C. Asimismo, mientras que el aumento de la temperatura atrasa la germinación cuando no hay tratamiento previo, cuando se someten a un tratamiento de rotura de latencia se retrasa (Tabla 108).

*Tabla 108 Influencia de la temperatura y del tratamiento de rotura de latencia (sin tratamiento previo; 23°C (45 días) siendo almacenamiento en seco de 45 días) en la germinación de semillas de C. nudiflorus. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas de germinación y letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos de rotura de latencia.*

% GERMINACIÓN		TRATAMIENTO			
Tª germinación		Sin tratamiento previo	23°C (45 días)		
10°C	5	aA	95	bB	
17°C	52	bA	38	aA	

DÍAS HASTA 50% GERMINACIÓN		TRATAMIENTO			
Tª germinación		Sin tratamiento previo	23°C (45 días)		
10°C	239	a	165	a	211 A
17°C	275	a	257	b	257 B
	266	B	202	A	

### **C. carpetanus**

En la especie de floración primaveral temprana *C. carpetanus*, que brota en invierno, se observa que, sin tratamiento previo de rotura de latencia, sólo germinan aquellas semillas incubadas a la temperatura inferior de 10°C. Sin embargo, tras el tratamiento de rotura de latencia, la temperatura de germinación no tiene un efecto significativo sobre la tasa de germinación (Tabla 109).

## IV. RESULTADOS

**Tabla 109** Influencia de la temperatura y del tratamiento de rotura de latencia (sin tratamiento previo; 23°C (60 días) /5°C (30 días) siendo almacenamiento en seco de 60 días seguido de estratificación fría de 30 días) en la germinación de semillas de *C. carpetanus*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas de germinación y letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos de rotura de latencia.

% GERMINACIÓN		TRATAMIENTO	
Tª germinación	Sin tratamiento previo	23°C (60 días) /5°C (30 días)	
10°C	52 bA	33	aA
17°C	0 aA	29	aB

DÍAS HASTA 50% GERMINACIÓN		TRATAMIENTO	
Tª germinación	Sin tratamiento previo	23°C (60 días) /5°C (30 días)	
10°C	69 A	171	aB
17°C		172	a

### *C. nevadensis*

En la especie de brotación invernal *C. nevadensis*, y de floración al final del invierno en condiciones naturales, al contrario de lo que observamos en el resto de especies, una temperatura de 17°C da lugar a un mayor porcentaje de germinación que a 10°C, con independencia de que se haya aplicado o no un tratamiento de latencia (Tabla 110).

**Tabla 110** Influencia de la temperatura y del tratamiento de rotura de latencia (sin tratamiento previo; 23°C (60 días) /5°C (30 días) siendo almacenamiento en seco 60 días seguido de estratificación fría 30 días) en la germinación de semillas de *C. nevadensis*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas de germinación y letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos de rotura de latencia.

% GERMINACIÓN		TRATAMIENTOS	
Tª germinación	Sin tratamiento previo	23°C (60 días) /5°C (30 días)	
10°C	14 a	48 a	31 A
17°C	38 a	76 a	57 B
	26 A	62 B	

DÍAS HASTA 50% GERMINACIÓN		TRATAMIENTOS	
Tª germinación	Sin tratamiento previo	23°C (60 días) /5°C (30 días)	
10°C	230 a	166 a	198 A
17°C	199 a	160 a	179 A
	214 B	163 A	

No obstante, hay que señalar que en esta especie el tratamiento de rotura de latencia difiere de los demás requiriendo un periodo posterior al almacenamiento en seco o un periodo de estratificación fría posterior al almacenamiento en seco. Sin embargo, no

se da un efecto negativo en la reducción del periodo hasta la germinación si sube la temperatura de germinación de 10 a 17°C (Tabla 110).

### 3.3 EVOLUCIÓN DE LA TASA DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CINCO ESPECIES DE *CROCUS* BAJO LAS MISMAS CONDICIONES.

Se compara la evolución de la tasa de germinación de las especies *C. serotinus*, *C. nudiflorus*, *C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus*, tras un tratamiento de rotura de latencia de 60 días de almacenamiento en seco y germinación a 10°C.

La especie que antes termina su germinación es la especie de floración otoñal *C. serotinus*. No obstante, la especie de floración primaveral temprana, *C. nevadensis*, comienza 10 días antes a germinar, aunque concluye posteriormente su germinación. *C. carpetanus* comienza a germinar a continuación, pero concluye poco antes que *C. nevadensis*. La especie de floración otoñal con histerantia, *C. nudiflorus*, inicia su germinación cuando han finalizado las tres especies anteriores. La especie primaveral tardía, es la última en iniciar su germinación, aunque de forma escasa (Figura 259).

El orden de la germinación de las semillas de las especies ensayadas, es idéntico a la pauta de brotación de los cormos a 10°C constantes, observado en el apartado de desarrollo vegetativo.

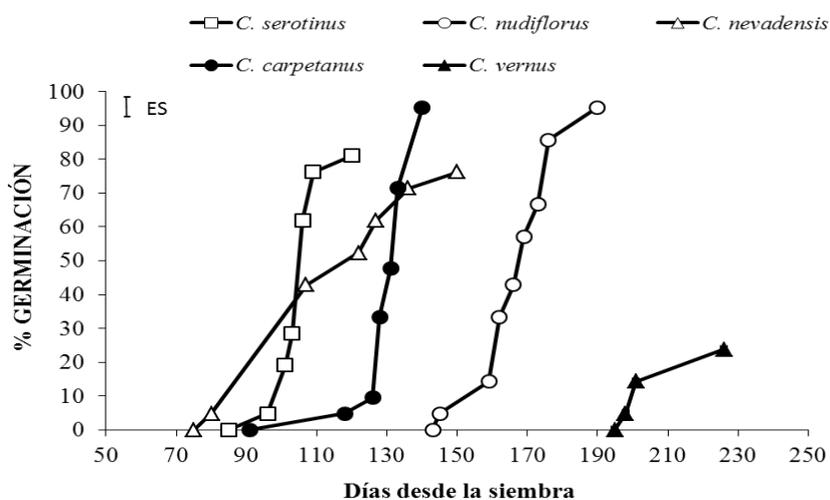


Figura 259 Efecto de un mismo tratamiento de rotura de latencia (60 días de almacenamiento en seco y posterior germinación a 10°C) en la germinación de semillas de cinco especies diferentes de *Crocus*. ES: error estándar.

## IV. RESULTADOS

### 4 FRUCTIFICACIÓN

El estudio de la influencia de la temperatura sobre el cuajado de los frutos, su desarrollo y la viabilidad de las semillas se ha estudiado en tres especies representativas de cada periodo de floración: *C. serotinus*, especie de floración otoñal, *C. nevadensis*, especie que florece a principios de la primavera, y *C. vernus*, de floración primaveral tardía.

El porcentaje de frutos cuajados a una temperatura de 10°C permite una elevada tasa de cuajado de frutos en la especie *C. serotinus* (93%). Sin embargo, en las especies de floración primaveral, no se observan diferencias entre las dos temperaturas ensayadas. *C. vernus* muestra el mayor porcentaje de cuajado (Tabla 111).

Estas temperaturas dan lugar a una adecuada floración, pero en la especie *C. nevadensis*, no son las óptimas para favorecer la fructificación. En esta especie será necesario estudiar en profundidad las condiciones de cuajado y optimizar la obtención de semillas viables.

**Tabla 111** Influencia de la temperatura de floración en el cuajado de los frutos en una especie otoñal y dos especies primaverales. % de frutos con semillas viables observado en el tratamiento óptimo de cuajado. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones ( $p < 0,05$ ).

Especie	Temperatura de cuajado	% frutos cuajados
<i>C. serotinus</i>	10°C	93% b
	17°C	25% a
<i>C. nevadensis</i>	10°C	58%a
	17°C	77%a
<i>C. vernus</i>	10°C	100%a
	17°C	100%a

El desarrollo del fruto presenta diferencias significativas en las temperaturas estudiadas en la especie *C. serotinus*. Los frutos se desarrollan antes y también comienzan antes su seca a 17°C que a temperaturas menos elevadas. En la especie *C. nevadensis* no se observan diferencias en el desarrollo de las cápsulas a las dos temperaturas ensayadas (Tabla 112).

## IV. RESULTADOS

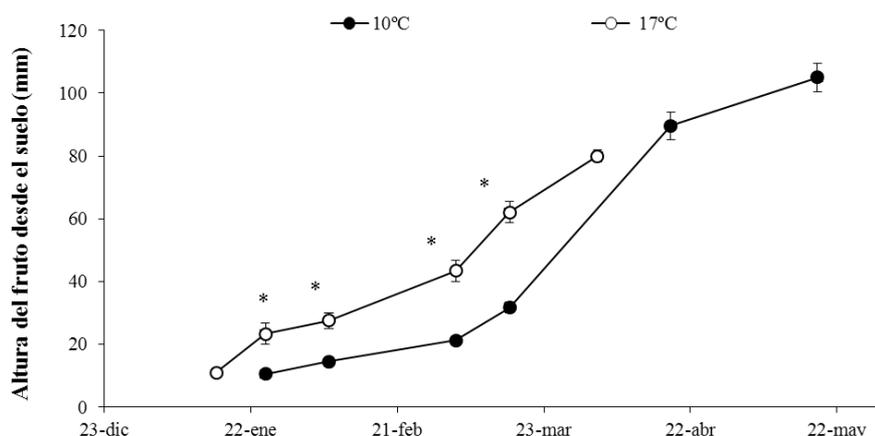
**Tabla 112** Influencia de la temperatura de desarrollo de la flor y cuajado del fruto sobre el desarrollo de la cápsula en especies que difieren en su época de floración (*C. serotinus* de floración otoñal y *C. nevadensis* de floración primaveral). Se da el período transcurrido desde el 1 de agosto hasta que el 50% de las plantas desarrollan las cápsulas y hasta que el 50% de las cápsulas maduran. Se muestran los valores medios. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

<i>C. serotinus</i>				
	Días hasta la salida de las cápsulas		Días hasta la seca de las cápsulas	
10°C	177	b	290	b
17°C	167	a	245	a

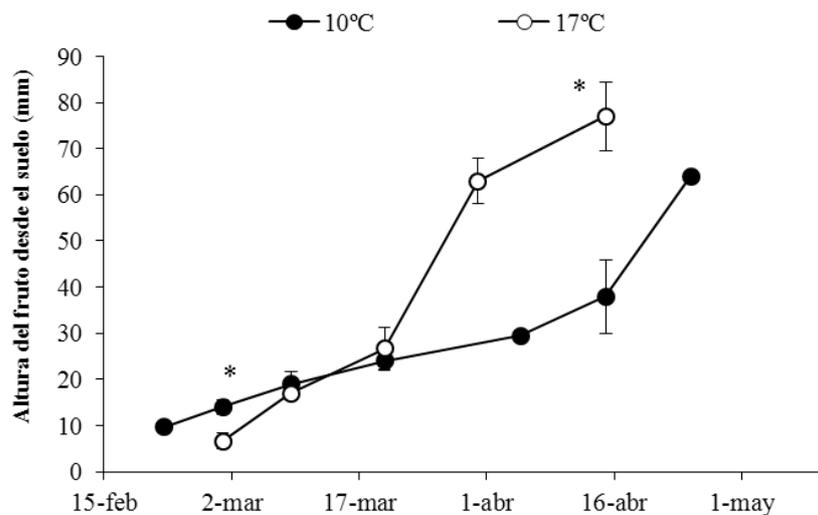
<i>C. nevadensis</i>				
	Días hasta la salida de las cápsulas		Días hasta la seca de las cápsulas	
Frío-10°C	205	a	267	a
Frío-17°C	212	a	253	a

Los frutos de la especie de floración otoñal *C. serotinus*, aparecen más tempranamente, en la segunda quincena del mes de enero. Temperaturas más elevadas (17°C) favorecen su desarrollo, si bien son los frutos desarrollados a 10°C los que alcanzan una mayor altura final (Figura 260). Los frutos de la especie primaveral *C. nevadensis* emergen del sustrato un mes después y, a las temperaturas ensayadas, no se observan efectos significativos de este factor sobre el desarrollo de las cápsulas de esta especie primaveral. En este caso, los frutos desarrollados a 17°C son los que alcanzan una mayor altura desde el suelo (Figura 261).



**Figura 260** Evolución de la longitud del fruto más el pedúnculo de la especie *C. serotinus* a 10°C y a 17°C. Se presenta en cada punto el error estándar. Los asteriscos señalan diferencias significativas.

#### IV. RESULTADOS



**Figura 261** Evolución de la longitud del fruto más el pedúnculo de la especie *C. nevadensis* a 10°C y a 17°C. Se presenta en cada punto el error estándar. Los asteriscos señalan diferencias significativas.

En la Figura 262 y Figura 263 se puede observar el desarrollo del fruto a las temperaturas de 10°C y 17°C. Por lo general, los frutos desarrollados a 17°C se secan antes, adelantándose también la apertura de la cápsula.

*C. SEROTINUS*

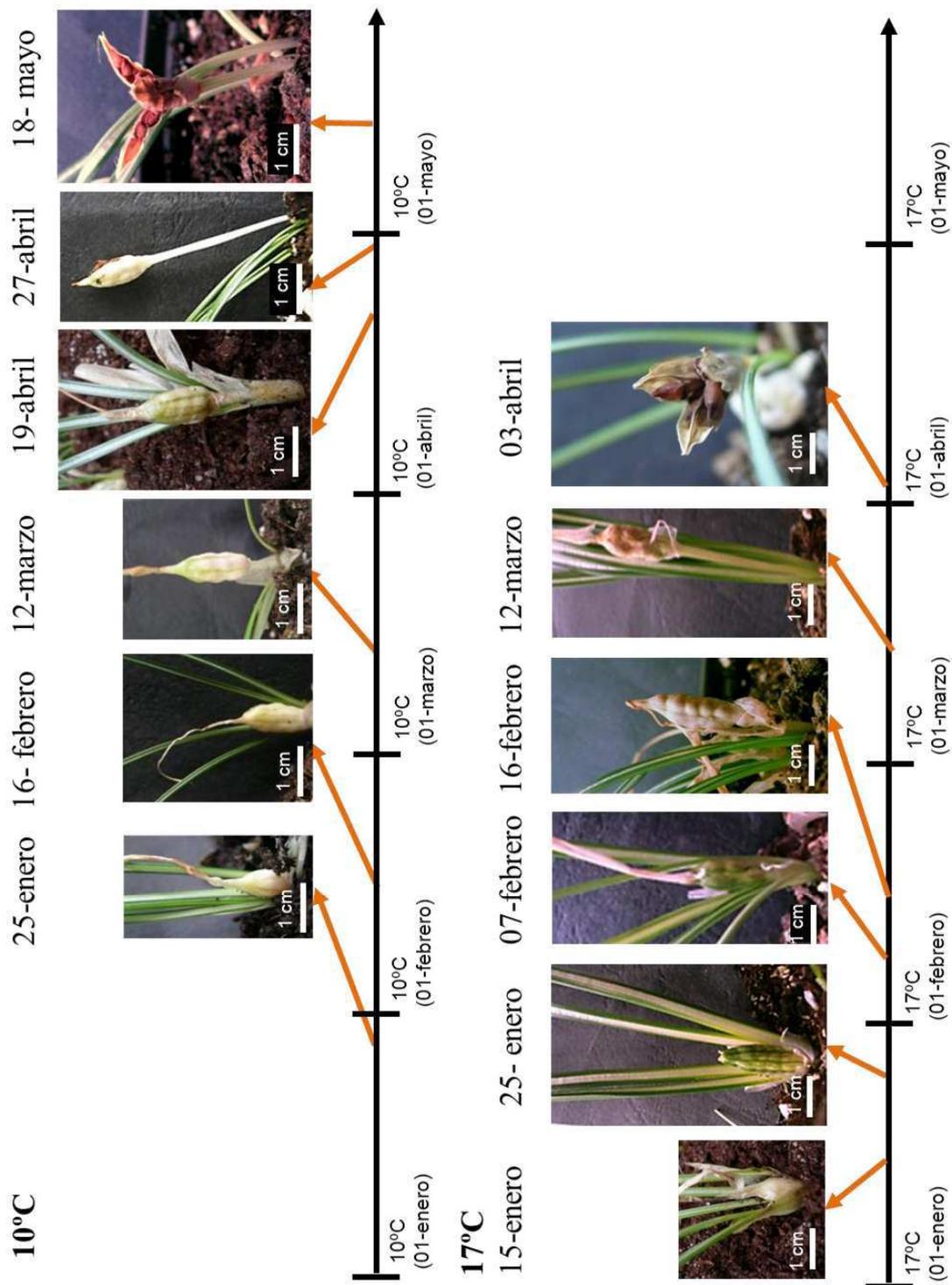


Figura 262 Desarrollo del fruto de *C. serotinus* a 10°C y a 17°C constantes sin tratamiento previo de frío (5 y 2°C).

*C. NEVADENSIS*

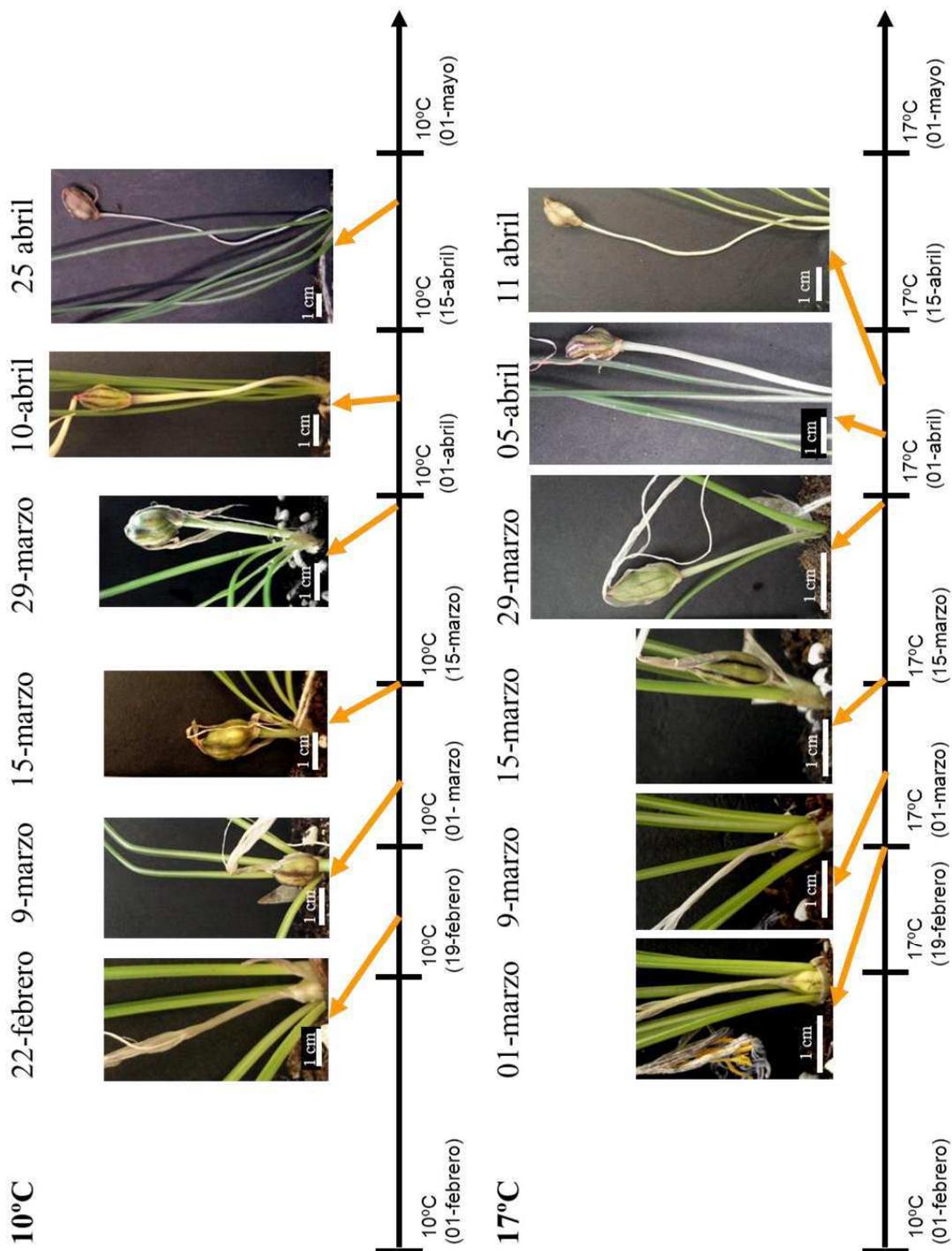


Figura 263 Desarrollo del fruto de *C. nevadensis* a 10°C y a 17°C tras dos meses de frío (25 y 2°C) desde finales de noviembre hasta finales de enero.

## 5 SENESCENCIA DE LA HOJA EN LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS*. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO.

Se estudia la influencia de la temperatura en la senescencia de la hoja y en el periodo de vida de la misma. Se observa el desarrollo de la hoja a 10°C y a 17°C.

Los días hasta que se alcanza la senescencia de la hoja, desde el momento de la siembra, varía con la especie y con la temperatura de cultivo. Así, las especies que antes sacan la hoja (*C. serotinus* y *C. nevadensis*) son aquellas que sufren antes senescencia (Tabla 113) y aquellas que la sacan más tardíamente (*C. carpetanus*, *C. nudiflorus* y *C. vernus*,) presentan la seca más tarde, si bien la diferencia no es mayor de 25 días entre los valores extremos. Asimismo, la temperatura más elevada adelanta la seca de la hoja, y de forma más acusada en las especies de brotación más temprana. No obstante, hay que señalar un efecto muy importante de la elevación de la temperatura en *C. nudiflorus* que lo acusa más que las otras especies de floración más tardía.

*Tabla 113 Influencia de la temperatura durante el desarrollo de la hoja en la duración de la vida de la misma en las distintas especies españolas de Crocus. Se aplica un periodo de frío invernal previo en todas ellas excepto en C. serotinus. Se da el valor medio de los días transcurridos desde la siembra de los cormos iniciales (1 de agosto) hasta que se observan el 50% de las plantas con las hojas totalmente secas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre las temperaturas ensayadas para una misma especie (p < 0,05).*

Tª desarrollo de la hoja	DIAS HASTA LA SENESCENCIA				
	<i>C. serotinus</i>	<i>C. nudiflorus</i>	<i>C. nevadensis</i>	<i>C. carpetanus</i>	<i>C. vernus</i>
10°C	263 bA	285 bD	273 bB	280 bC	288 bE
17°C	205 aA	237 aC	229 aB	270 aD	275 aE

Tª desarrollo de la hoja	VIDA DE LA HOJA				
	<i>C. serotinus</i>	<i>C. nudiflorus</i>	<i>C. nevadensis</i>	<i>C. carpetanus</i>	<i>C. vernus</i>
10°C	196bE	98bC	158bD	77aB	56aA
17°C	139aD	47aA	114aC	67aB	43aA

Las diferencias en el período de vida de la hoja entre especies son elevadas ya que si bien hay diferencias muy grandes en la brotación, las diferencias en el momento en que se secan las hojas no son mayores de 25 días. Así, las especies que antes brotan tienen periodos de vida largos (Tabla 113), mientras que las que brotan más tarde tienen una vida más corta. Estas diferencias pueden llegar a ser de hasta 153 días cuando se cultiva a una temperatura de 10°C. El aumento de temperatura de cultivo a 17°C disminuye la vida de la hoja y de manera más acusada cuando más larga sea la vida de la hoja. Así, en *C. serotinus*, la disminución de la vida de la hoja al aumentar la temperatura es de 57 días mientras que en *C. vernus* es de 13 días.



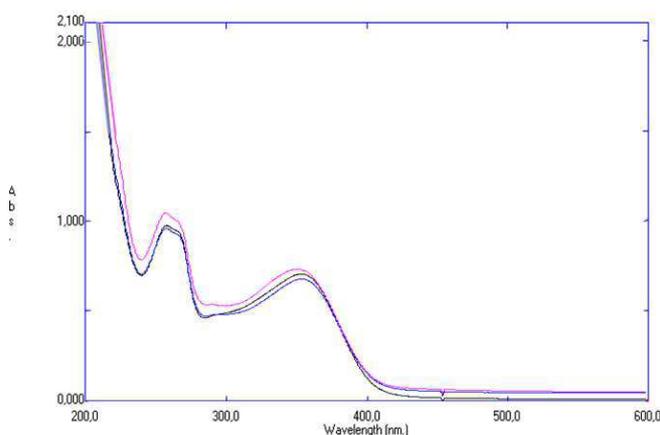
**5. Variabilidad de las especies silvestres españolas del género *Crocus* spp. para el contenido en carotenoides y flavonoides en sus estilos**



# 1 VARIABILIDAD DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS* PARA EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES EN SUS ESTILOS

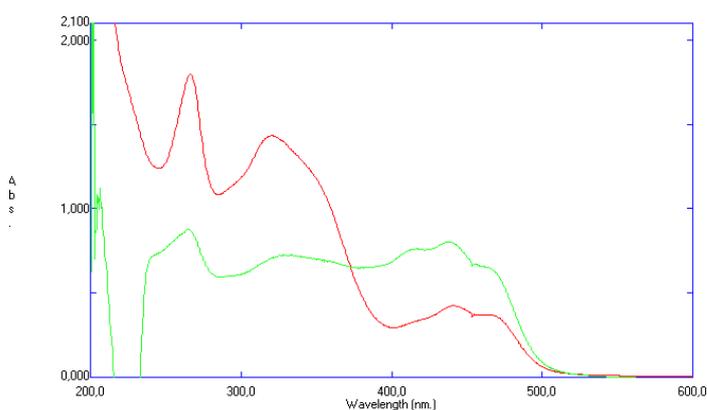
## 1.1 VARIABILIDAD EN EL ESPECTRO UV-Vis.

En los espectros UV-Vis de orden cero del grupo formado por las especies *C. nevadensis* y *C. carpetanus* no se observan carotenoides (Figura 264), dado que no presentan picos en el rango de longitud de onda de 400-500 nm. Sin embargo, si que aparecen flavonoides que absorben entre 260-380 nm. En el segundo grupo de especies formado por *C. vernus*, *C. serotinus* y *C. nudiflorus*, se observa la presencia de pigmentos carotenoides y flavonoides (Figura 265, Figura 266 y Figura 267). No es posible diferenciar entre especies en cuanto al contenido de pigmentos detectado mediante estas metodología, pudiendo ser mayor la variabilidad intraespecífica que interespecífica.



COLOR	Nº BCU	ESPECIES	ORIGEN
Pink	BCU003192	<i>C. carpetanus</i>	Ávila
Blue	BCU003190	<i>C. nevadensis</i>	Jaén
Black	BCU003189	<i>C. nevadensis</i>	Cuenca

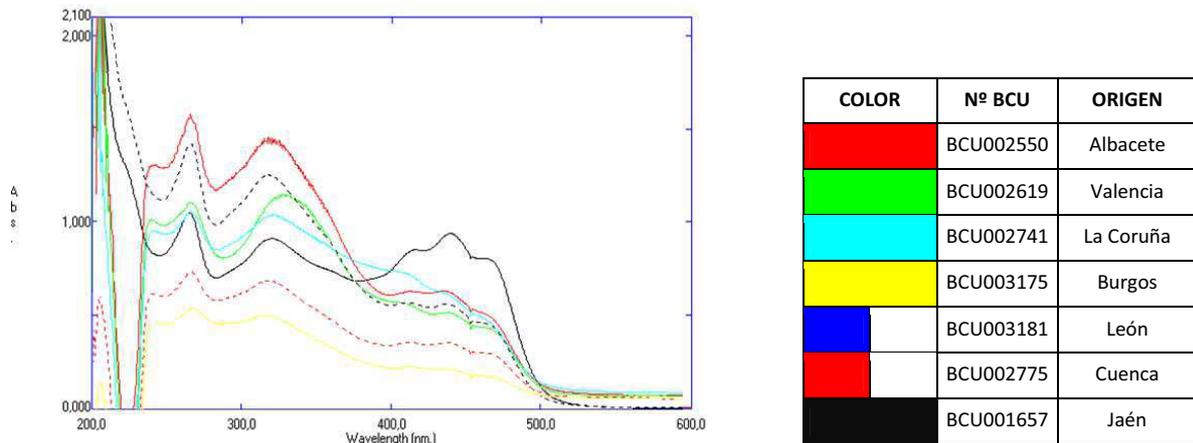
**Figura 264 . Perfil UV-Vis. Espectro de orden cero para las especies *C. carpetanus* y *C. nevadensis*. En la tabla se relaciona el color de la gráfica con la entrada, indicando su lugar de procedencia.**



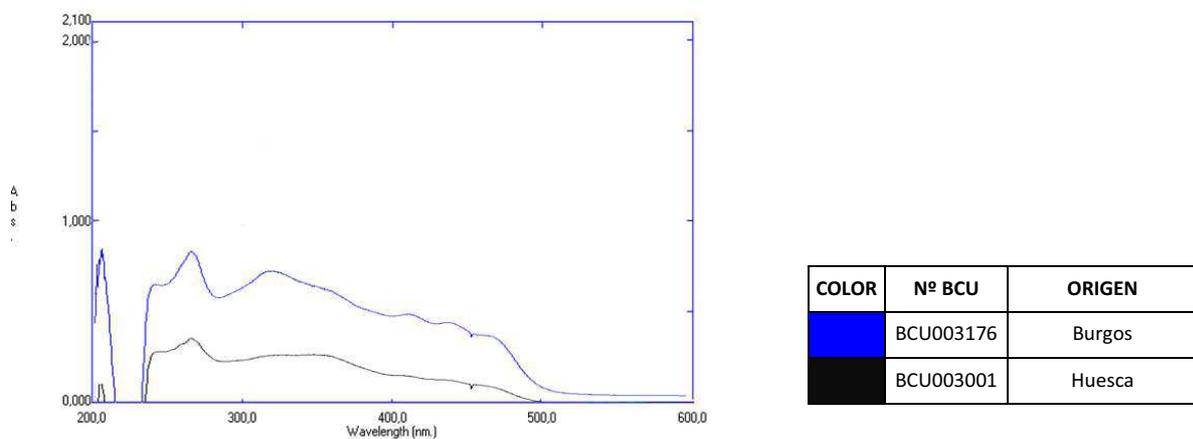
COLOR	Nº BCU	ORIGEN
Red	BCU003198	Huesca
Green	BCU003018	Vivero

**Figura 265 . Perfil UV-Vis. Espectro de orden cero de dos entradas de la especie *C. vernus*. En la tabla se relaciona el color de la gráfica con la entrada, indicando su lugar de procedencia.**

## IV. RESULTADOS



**Figura 266 . Perfil UV-Vis. Espectro de orden cero de siete entradas de la especie *C. serotinus*. En la tabla se relaciona el color de la gráfica con la entrada, indicando su lugar de procedencia.**



**Figura 267 . Perfil UV-Vis. Espectro de orden cero de dos entradas de la especie *C. nudiflorus*. En la tabla se relaciona el color de la gráfica con la entrada, indicando su lugar de procedencia.**

Así por ejemplo, tres entradas de *C. serotinus* presentan el contenido más elevado en carotenoides, y algunas entradas de esta misma especie muestran los contenidos más bajos de estos pigmentos. También en *C. nudiflorus* se observa esta variabilidad.

El extracto en agua y metanol de los estilos refleja claramente las diferencias en el contenido de estos pigmentos entre los dos grupos de especies antes mencionados (Figura 268).



*C. serotinus* (BCU001657)



*C. carpetanus* (BCU003192)

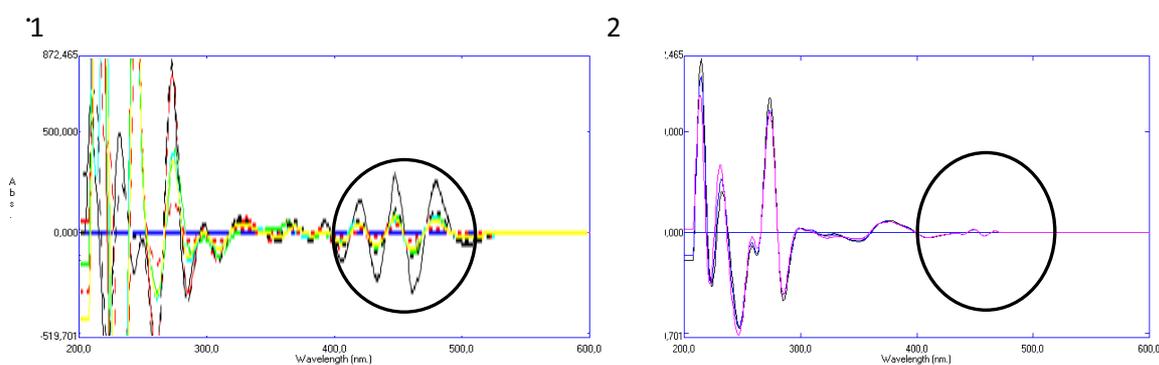
**Figura 268 . Extracto en agua y metanol de los estilos secos de *C. carpetanus* y *C. serotinus*.**

### 1.1.1 DATOS PROCEDENTES DE LA SEGUNDA DERIVADA DEL ESPECTRO UV-VIS.

Las derivadas de los espectros del UV-Vis pueden utilizarse para obtener una mayor resolución y facilita la interpretación de las características del espectro.

La segunda derivada de los espectros UV-Vis de las entradas de las especies *C. serotinus*, *C. nudiflorus* y *C. vernus*, presentan un triplete de picos en la región de longitud de onda entre 400-500nm, que corrobora la presencia de carotenoides en estas especies (Figura 269). El espectro de segundo orden de las especies *C. nevadensis* y *C. carpetanus* muestra de forma casi imperceptible la presencia de dicho triplete, confirmando la ausencia de estos pigmentos (Figura 269).

Las longitudes de onda del espectro útiles para diferenciar entre las especies que muestran carotenoides (*C. serotinus*, *C. nudiflorus* y *C. vernus*) podría ser suficiente observar el espectro en la zona de los tripletes (Tabla 114.1). En cambio, para poder diferenciar entre las especies *C. carpetanus* y *C. nevadensis*, debería buscarse por debajo de los 400nm (Figura 269.2).



**Figura 269.** Espectro UV-Vis de segundo orden: (1) de las especies que contienen carotenoides (*C. serotinus*, *C. nudiflorus* y *C. vernus*) y (2) de las especies que no contiene dichos pigmentos (*C. nevadensis* y *C. carpetanus*).

Los picos de valores mínimos de absorbancia de la segunda derivada corresponden a picos máximos de absorción en el espectro de UV-Vis de orden cero. Los valores máximos de absorbancia en un determinado rango podrían utilizarse como descriptor del contenido de flavonoides y carotenoides de estas especies. Las especies *C. carpetanus* y *C. nevadensis* presentan dos máximos de absorbancia entre 200-400 nm. Las especies que contienen carotenoides presentan todas 3 máximos de absorbancia entre los 200-500nm. No muestra diferencias significativas ni para los tres máximos de absorción, ni para el número de picos observados ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ) (Tabla 114).

## IV. RESULTADOS

**Tabla 114 . Longitud de onda de los máximos de absorbancia presentes entre los 200-500 nm de las especies que presentan pigmentos carotenoides en sus estilos. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones ( $p$ -value<0,05). \* indican plantas que sufrieron un problema de cultivo y no se ha tenido en cuenta en el análisis de medias.**

Máximos de absorbancia				
ESPECIES	$\lambda$ 1º máx. (nm)	$\lambda$ 2º máximo	$\lambda$ 3º máximo (nm)	Nº de máximos 200-500 (nm)
<i>C. SEROTINUS</i>	261 b	309 a	461 a	10 b
<i>C. NUDIFLORUS</i>	260 b	309 a	460 a	9 b
<i>C. VERNUS</i>	260 b	309 a	461 a	11 b
<i>C. NEVADENSIS</i>	247 a	349 b	-	6 a
<i>C. CARPETANUS</i>	246*	351*	-	6*

### 1.1.2 CÁLCULO DEL FACTOR $E^{1\%}_{1cm}$

El factor  $E^{1\%}_{1cm}$  es un parámetro de calidad ISO 3632-2 que permite evaluar las variables de calidad del azafrán: el poder colorante, el sabor y el aroma. Es necesario medir en triplicado la absorbancia del extracto de la muestra en tres longitudes de onda: 257, 330 y 440 nm.

Los datos obtenidos muestran que el poder colorante, debido a la presencia de crocinas, de las especies silvestres de *Crocus* españoles es muy bajo ( $E^{1\%}_{440} = 1 - 21$ ) (Tabla 116) en comparación con azafrán ( $E^{1\%}_{440} = 274,3$ ) (Tabla 115). De nuevo observamos como las especies *C. nevadensis* y *C. carpetanus* son las que presenta menos absorbancia en esta longitud de onda. (440 nm) que el resto de especies (Tabla 116). Sin embargo, es de destacar que en este rango del espectro *C. nudiflorus* presenta menos absorbancia que las otras dos especies que contienen carotenoides.

**Tabla 115 . Valor  $E^{1\%}$  del extracto acuoso de los estigmas secos de *C. sativus*. Extracción realizada con el mismo protocolo que la extracción realizada con el material de las especies silvestres.**

	$E^{1\%}_{440}$	$E^{1\%}_{330}$	$E^{1\%}_{257}$
<i>C. SATIVUS</i>	274,3	44,71	99,89

**Tabla 116 . Valor  $E^{1\%}$  de los extractos acuosos de los estilos secos de las diferentes especies silvestres de *Crocus* que han sido analizadas. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones ( $p$ -value < 0,05).**

	$E^{1\%}_{440}$	$E^{1\%}_{330}$	$E^{1\%}_{257}$
<i>C. SEROTINUS</i>	12 b	21,36 a	21,08 a
<i>C. NUDIFLORUS</i>	6,36 ab	10,86 a	11,64 a
<i>C. VERNUS</i>	13,5 b	23,02 a	25,15 a
<i>C. NEVADENSIS</i>	0,81 a	13,14 a	21,47 a
<i>C. CARPETANUS</i>	1,47 a	14,46 a	23,37 a

El valor  $E_{330}^{1\%}$  de las especies silvestres ( $E_{330}^{1\%} = 13-30$ ), que no muestra diferencias significativas ( $p\text{-value} > 0,05$ ), es próximo al que presenta azafrán ( $E_{330}^{1\%} = 44,71$ ) (Tabla 115 y Tabla 116). Esta componente está relacionada con la presencia de *cis*-carotenoides y flavonoides, responsables del aroma. *C. vernus* es la especie que muestra el valor más elevado ( $E_{330}^{1\%} = 30$ ) (Tabla 116).

El parámetro  $E_{257}^{1\%}$ , relacionado con el sabor picante de la especia, es más pequeño en las especies silvestres de *Crocus* ( $E_{257}^{1\%} = 17-33$ ) que en azafrán ( $E_{257}^{1\%} = 99,89$ ). Este valor es debido al bajo contenido en picrocrocinas y flavonoides. Si bien *C. vernus* muestra un valor más elevado ( $E_{257}^{1\%} = 33$ ), existe una gran variabilidad y no existen diferencias significativas entre especies (Tabla 115 y Tabla 116).

Se concluye, que las especies silvestre españolas de *Crocus* tienen mucho menos poder colorante que el azafrán, siendo *C. serotinus* y *C. vernus* aquellas que presentan el valor más elevado de absorbancia a 440 nm ( $E_{440}^{1\%}$ ) (Tabla 116). El parámetro que hace referencia al aroma es más similar al del azafrán, mientras que aquel responsable del sabor picante de la especie muestra valores hasta cuatro veces menor.

No existen diferencias significativas entre las especies españolas de *Crocus* para los parámetros de la norma ISO 3632-2 relativas al aroma y al sabor del azafrán.

## 1.2 VARIABILIDAD EN EL PERFIL DE HPLC-DAD

Los pigmentos carotenoides presentan tres picos de máxima absorción en su espectro de UV-Vis en las siguientes longitudes de onda: 250, 320 y 400-500 nm. Sin embargo, los flavonoides manifiestan su máximo pico de absorbancia entre los 260- 380 nm. Por estas razones, la absorbancia se registra entre 200-550 nm, para poder detectar ambos componentes.

Las longitudes de onda de los perfiles cromatográficos individuales de cada entrada, corresponden con aquellas dónde se han observado los máximos de absorbancia en el espectro UV-Vis (ver apartado 1.1.1). Los máximos de absorbancia detectados en el espectro UV-Vis de las especies sin pigmentos carotenoides *C. nevadensis* y *C. carpetanus* se producen en las longitudes de onda 246-248 nm y 349-351 nm. Los máximos de absorbancia detectados en las especies que si presentan pigmentos carotenoides se presentan en las longitudes de onda 260-261 nm, 308-309 nm y 460-462 nm.

Asimismo, se pueden comparar los perfiles HPLC de todas las entradas evaluadas a 310 nm, muestren o no carotenoides. En esta longitud de onda se podrá comparar la presencia de pigmentos carotenoides y flavonoides.

## IV. RESULTADOS

### 1.2.1 VARIABILIDAD EN EL PERFIL DE HPLC-DAD A 310 NM

Los cromatogramas de las especies sin carotenoides se comparan a 310 nm de longitud de onda, aunque muestran su máximo de absorbancia a 350 nm, dado que no existen diferencias cualitativas y cuantitativas significativas entre los cromatogramas a 310 y 350 nm (Figura 270).

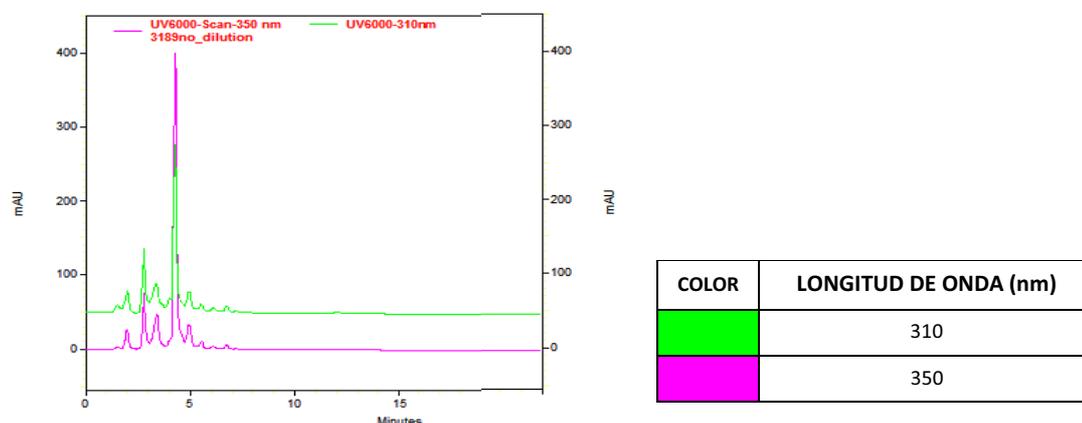


Figura 270 . Cromatograma de *C. nevadensis* (BCU003189) a 310nm y 350nm.

El perfil cromatográfico de las especies que no presentan pigmentos carotenoides es muy similar, comparten los picos principales que se observan en el cromatograma a 310 nm (Figura 271). No se observan diferencias entre especies, ni entre las dos accesiones de *C. nevadensis*.

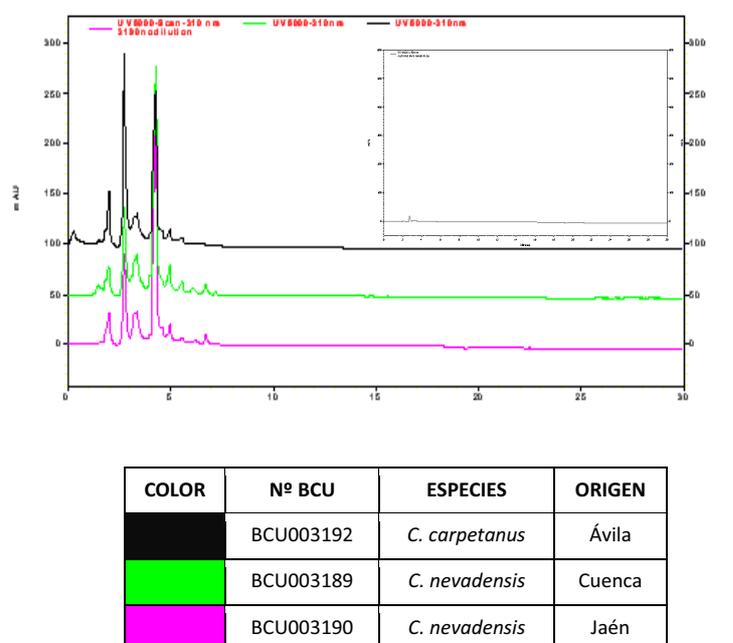
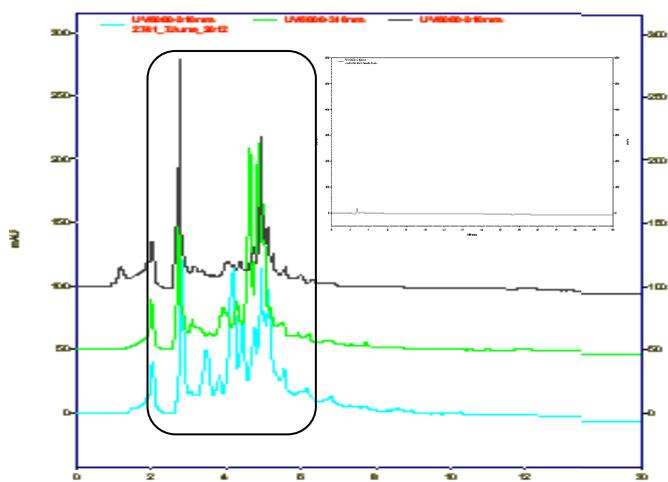


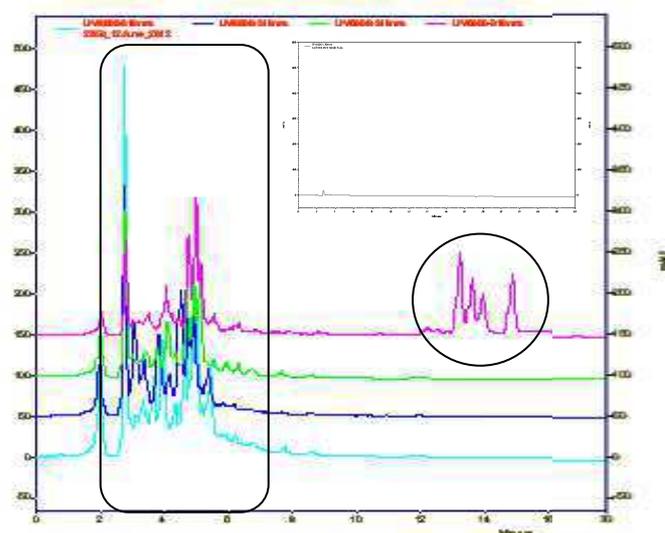
Figura 271 . Cromatograma a 310 nm de las especies *C. carpetanus* procedente de Ávila, y la especie *C. nevadensis* de Jaén y Cuenca. El cromatograma de menor tamaño corresponde al del solvente a 310 nm.

La Figura 272 muestra el perfil cromatográfico a 310 nm de las entradas de *C. serotinus*

analizadas. Se representan las entradas agrupadas en dos cromatogramas diferentes. Las diferencias entre los perfiles se señalan en los mismos cromatogramas.



COLOR	Nº BCU	ORIGEN
Black	BCU003175	Burgos
Green	BCU003181	León
Cyan	BCU002741	La Coruña



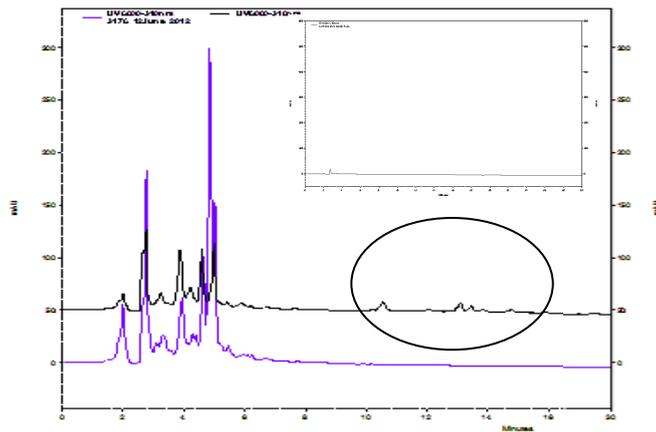
COLOR	Nº BCU	ORIGEN
Magenta	BCU002619	Valencia
Green	BCU001657	Jaén
Blue	BCU002775	Cuenca
Cyan	BCU002550	Albacete

Figura 272 . Perfil de HPLC a 310nm de los extractos de los estilos en metanol y agua de las diferentes entradas analizadas de *C. serotinus*. Las tablas muestran la entrada correspondiente con su origen.

Se observan diferencias cualitativas y cuantitativas. El número de compuestos es mayor en las entradas originarias de Valencia, Jaén, Cuenca y Albacete. No obstante, si tenemos en cuenta los picos principales, aparecen perfiles muy similares de las entradas (Figura 272).

La Figura 273 muestra el perfil cromatográfico a 310 nm de las entradas de *C. nudiflorus* analizadas. Se señalan las principales diferencias en la misma figura.

## IV. RESULTADOS

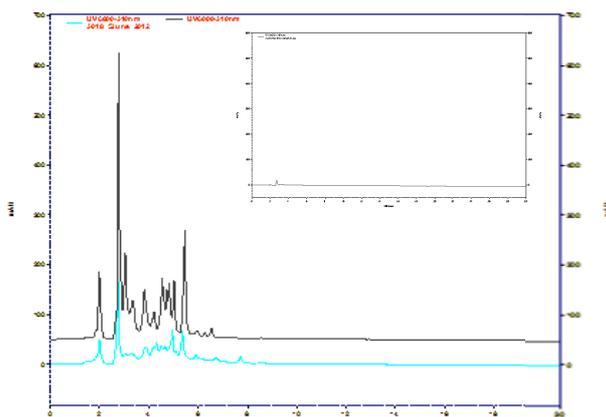


COLOR	Nº BCU	ORIGEN
	BCU003001	Huesca
	BCU003176	Burgos

**Figura 273 . Perfil de HPLC a 310nm de los extractos de los estilos en metanol y agua de las diferentes entradas analizadas de *C. nudiflorus*. La tabla muestra la entrada con su origen.**

El perfil cromatográfico de las entradas de *C. nudiflorus* muestran pocas diferencias cualitativas en cuanto a los picos principales. No obstante, se observan diferencias en compuestos con picos de menor área a esta longitud de onda. En la entrada procedente de Huesca se observan unos picos a partir del minuto 10, que no se observan en la entrada de Burgos. Estos picos también se observan en la entrada de *C. serotinus* de Valencia, donde las diferencias cuantitativas son más evidentes (Figura 272).

El perfil cromatográfico de las dos entradas de *C. vernus* subsp. *vernus* muestra diferencias cuantitativas y cualitativas. Del mismo modo que sucede con la especie *C. serotinus* y *C. nudiflorus*, si tenemos en cuenta los picos principales, el perfil cromatográfico es muy similar entre las entradas. No obstante, el perfil de la entrada procedente de Huesca es más rico en compuestos (Figura 274).



COLOR	Nº BCU	ORIGEN
	BCU003198	Huesca
	BCU003018	Vivero

**Figura 274 . Perfil de HPLC a 310nm de los extractos de los estilos en metanol y agua de las diferentes entradas de *C. vernus*. Las tablas muestran la entrada correspondiente, con su origen y la procedencia de la muestra.**

### 1.2.2 . ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD EN EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES DETERMINADO MEDIANTE HPLC-DAD A 440 Y 260 NM

En este análisis se tienen en cuenta los picos más importantes de los cromatogramas

obtenidos a las longitudes de onda características de cada familia de metabolitos. A partir de los cromatogramas obtenidos a 460-462 nm, se detectaron los picos correspondientes a los compuestos carotenoides. A partir de los cromatogramas obtenidos en el rango 308-309 nm y 260-261 nm, se detectaron los picos correspondientes a compuestos flavonoides y carotenoides. Para aquellos picos con más de 50 miliunidades de absorbancia (mUA), se estudió su espectro de absorción, con objeto de identificar los compuestos. Para considerar la semejanza entre compuestos, se tuvo en cuenta el tiempo de retención (TR) y el espectro de absorción.

### 1.2.2.1 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ENTRE ESPECIES

Teniendo en cuenta los picos más importantes de los cromatogramas a 440nm, en que se detectan los carotenoides, y los espectros de absorción de dichos picos, el perfil de carotenoides que presentan las especies *C. serotinus* y *C. nudiflorus* es muy similar, y muestran claras diferencias cualitativas con la especie *C. vernus* (Tabla 117 y Figura 275). Así, los picos 4 y 6 del cromatograma que, según su espectro, son crocinas que eluyen en los minutos 5,2 y 6,02, se encuentran sólo en *C. vernus* y presentan un espectro diferente del de aquellas que eluyen en esos mismos TR en las especies *C. serotinus* y *C. nudiflorus* (Tabla 117).

**Tabla 117 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides de las especies *C. serotinus*, *C. nudiflorus* y *C. vernus*, según el rango de TR en el que eluyen y su espectro de absorción. Se indica el número de pico que se muestra en los cromatogramas. X<sup>1</sup> pico importante en una única entrada, encontrándose en las restantes en menor cantidad. X<sup>2</sup> Pico identificado sólo en una de las entradas.**

CAROTENOIDES							
Nº DE PICO	1	2	3	4	5	6	7
Rango TR (minutos)	2,8-3,1	4,1-4,5	5,0-5,3	5,2-5,3	5,8-6,1	6,02	8,6-8,9
<i>C. vernus</i>	x	x		x	x <sup>2</sup>	x <sup>2</sup>	x <sup>1</sup>
<i>C. nudiflorus</i>	x <sup>1</sup>	x <sup>1</sup>	x <sup>1</sup>		x <sup>1</sup>		x <sup>1</sup>
<i>C. serotinus</i>	x	x	x		x		x

Hay que señalar que la crocina correspondiente con el pico 5 está sólo presente en la entrada procedente de vivero, mientras que está ausente en la entrada silvestre. En su lugar aparece el pico 6 identificado como una crocina diferente, y que no se observa en el resto de especies (Tabla 118).

#### IV. RESULTADOS

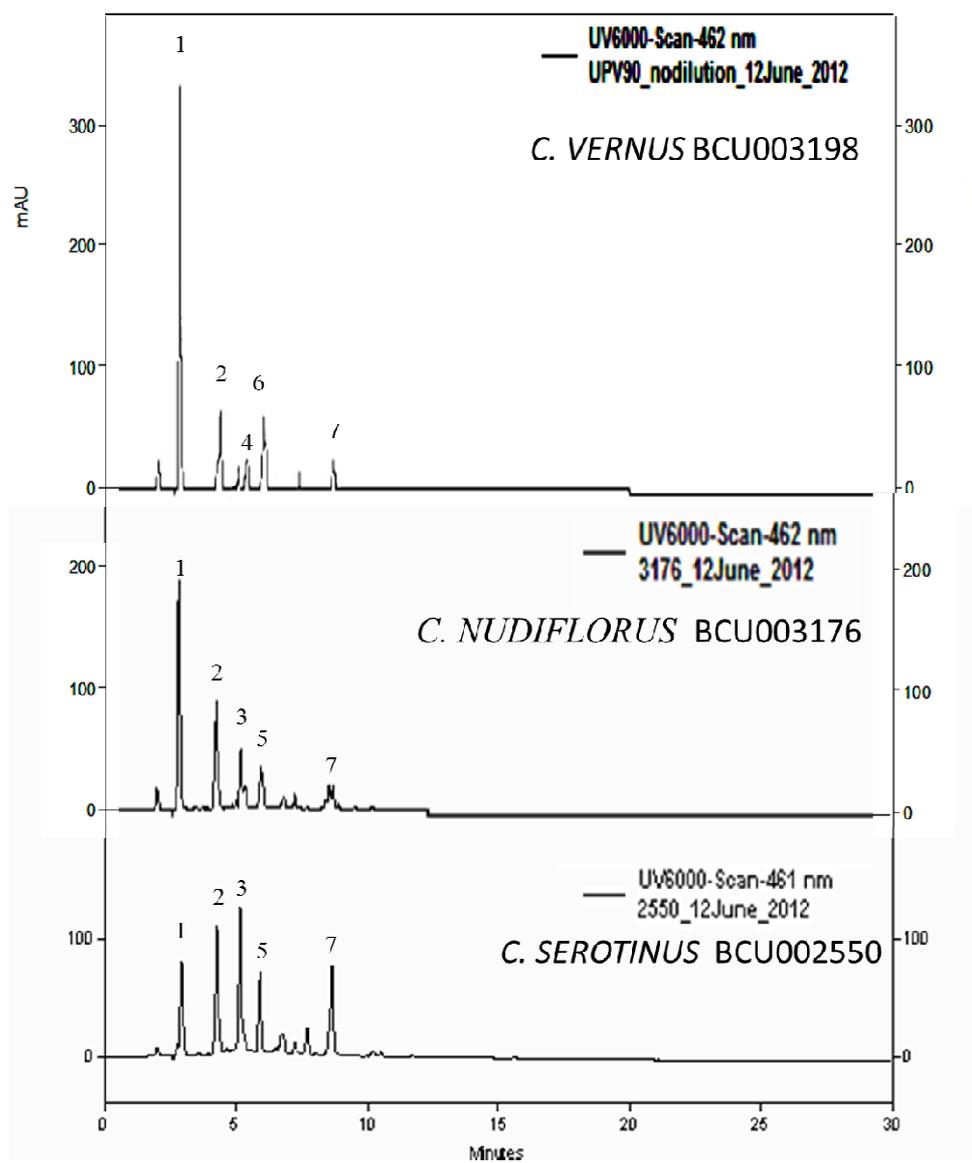
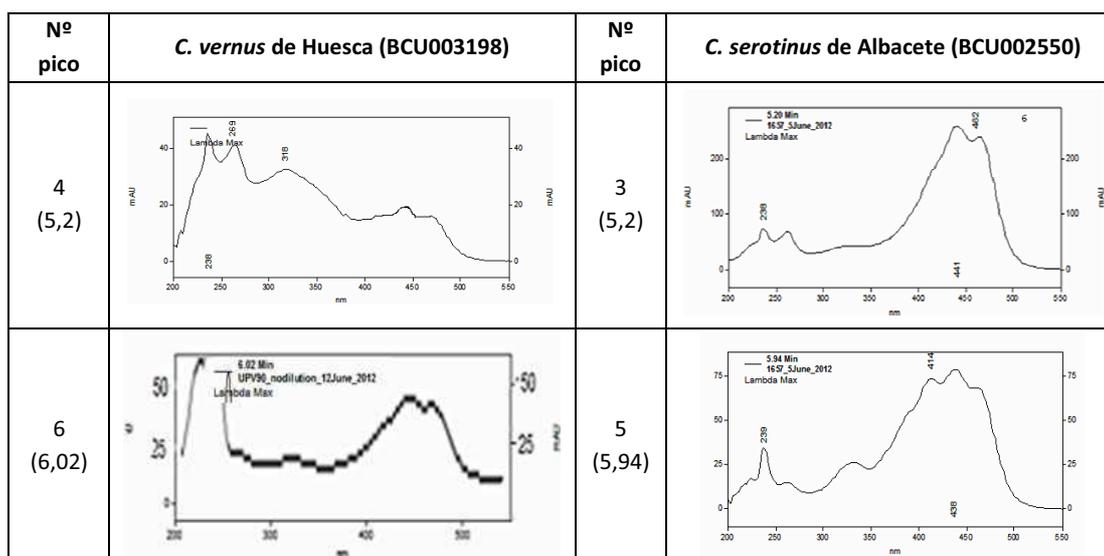


Figura 275 . Cromatogramas a 461-462nm de *C. vernus* (BCU003198), *C. nudiflorus* (BCU003176) y *C. serotinus* (BCU002550). Se indica el número de pico en cada cromatograma. Se han despreciado los picos de absorbancia menor de 50 mUA.

Tabla 118 Comparación compuesto 3 y 6 presentes en *C. vernus* y compuesto 4 y 5 presentes en *C. serotinus*.

El perfil correspondiente a flavonoides presenta diferencias cualitativas entre especies que permiten diferenciarlas, con la excepción de las especies que no presentan carotenoides, que muestran idéntico perfil de flavonoides. Estas especies, *C. nevadensis* y *C. carpetanus*, contienen los mismos compuestos flavonoides correspondientes a los picos 1, 2, 4, 6 y 10 del cromatograma (Tabla 119). El resto de especies presentan más compuestos flavonoides.

Tabla 119. Picos cromatográficos más importantes correspondientes a flavonoides de las especies *C. nevadensis*, *C. carpetanus*, *C. serotinus*, *C. nudiflorus* y *C. vernus*, según el rango de TR en el que eluyen. Se indica el número de pico que se indicará en los cromatogramas.  $X^1$  indica pico importante en una única entrada, encontrándose en las restantes en menor cantidad.  $X^2$  una única entrada analizada.

FLAVONOIDES										
Nº DE PICO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Rango TR (minutos)	1,9-2	2,6-2,9	3-3,2	3,3-3,6	3,7-4,15	4,15-4,48	4,5-4,95	4,8-5,15	5,3-5,72	19,2-19,3
<i>C. nevadensis</i>	x	x		x		x				x
<i>C. carpetanus</i>	$x^2$	$x^2$		$x^2$		$x^2$				$x^2$
<i>C. vernus</i>	x	x	x	x	x	$x^1$	x	x	x	x
<i>C. nudiflorus</i>	x	x		x	$x^1$	x	x	x		x
<i>C. serotinus</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

La especie *C. vernus* y *C. serotinus* muestran un perfil que contiene los 10 picos que se han observado en el conjunto de cromatogramas. Se diferencian de la especie *C. nudiflorus* porque en ésta no se observan los picos 3 y 9 (Figura 276).

Cabe destacar la presencia del pico 10 que eluye aproximadamente 15 minutos más tarde que los anteriores compuestos, que no es posiblemente un flavonoide, y es de gran abundancia en todas las especies.

## IV. RESULTADOS

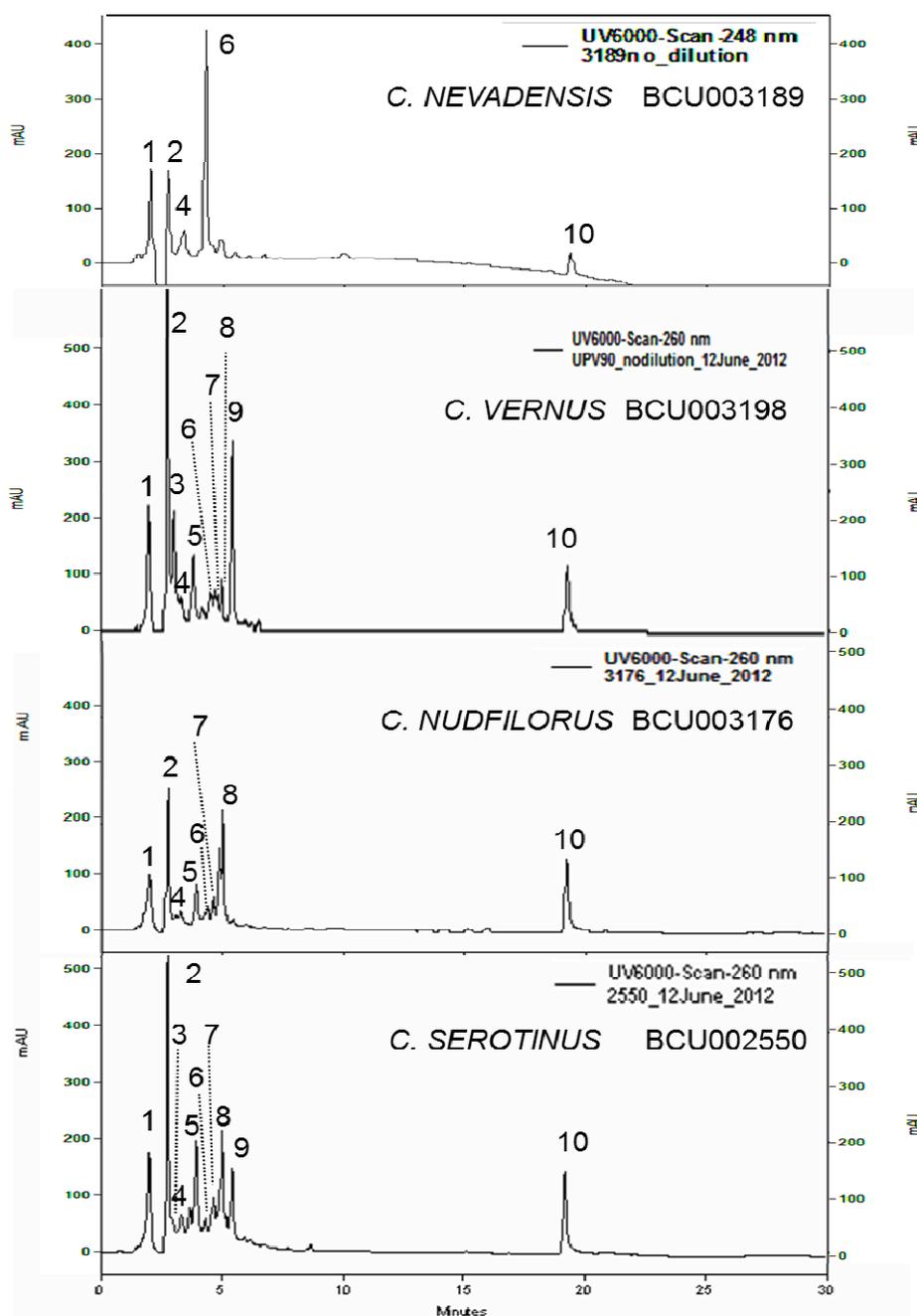


Figura 276 . Cromatogramas a 248-260 nm de *C. nevadensis* (BCU003189), *C. vernus* (BCU003198), *C. nudiflorus* (BCU003176) y *C. serotinus* (BCU002550). Se indica el número de pico en cada cromatograma. Se han despreciado los picos de absorbancia menor de 50 mUA.

### 1.2.2.2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DENTRO DE ESPECIES

#### 1.2.1.2.1. VARIABILIDAD EN EL PERFIL DE CAROTENOIDES

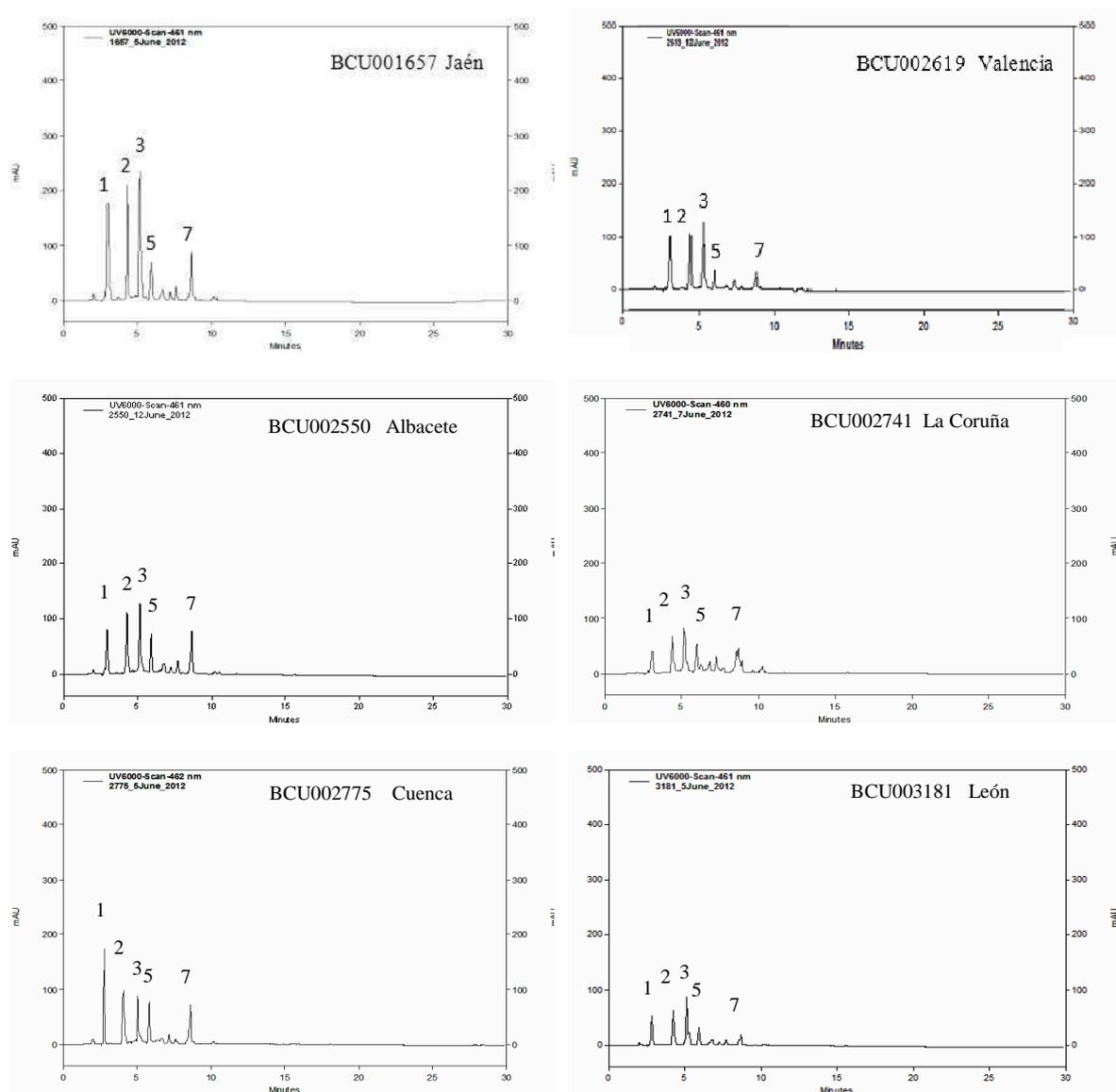
#### **C. SEROTINUS**

El perfil cromatográfico obtenido a 460-462 nm de las entradas de *C. serotinus* es cualitativamente similar, es decir, existe un perfil de carotenoides común para todas ellas. Este perfil contiene cinco picos cromatográficos principales que podrían identificarse como crocinas (Figura 277 y Tabla 121), y sus tiempos de retención corresponden a unos

rangos reflejados en la Tabla 120. Como señalábamos con anterioridad para esta especie, los picos número 4 y 6 no aparecen o son de muy poca importancia en cualquier entrada.

**Tabla 120 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides de las entradas de la especie *C. serotinus*, y el rango de TR en el que eluyen.**

CAROTENOIDES					
Número de pico	1	2	3	5	7
Rango TR (minutos)	2,8-3,1	4,1-4,5	5,0-5,3	5,8-6,1	8,6-8,9



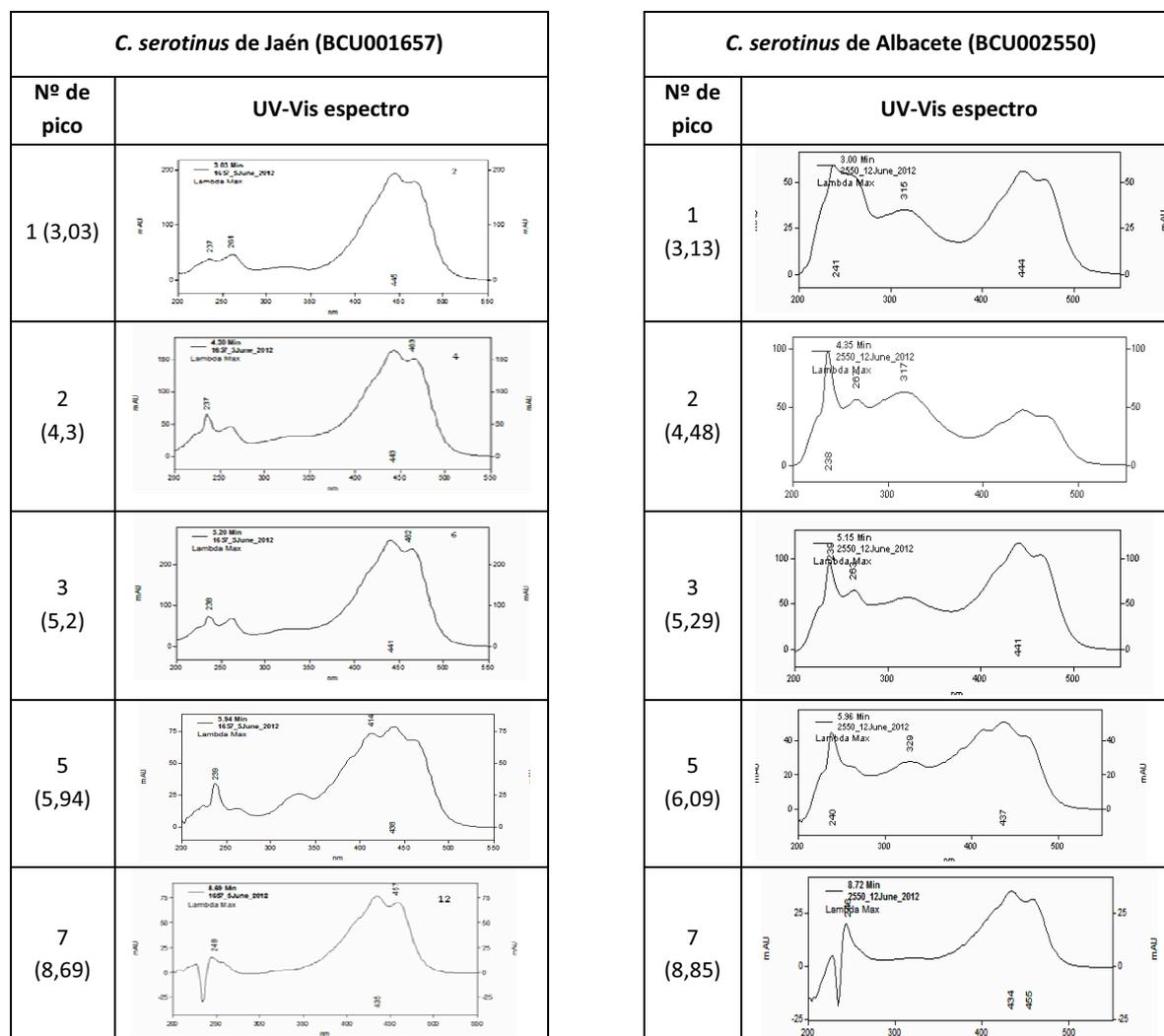
**Figura 277 . Perfil de HPLC-DAD a 460-462 nm del extracto de los estilos de las diferentes entradas de *C. serotinus* que sean analizado.**

En algunas entradas las crocinas y flavonoides eluyen al mismo tiempo, observándose un espectro con ambos compuestos (ver pico 1 de la entrada BCU002550 de la Tabla

## IV. RESULTADOS

121).

**Tabla 121 . Espectro UV-Vis de los principales picos del perfil cromatográfico a 460 y 461 nm de *C. serotinus* procedente de Jaén y Albacete. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos.**



### *C. NUDIFLORUS*

El perfil cromatográfico obtenido a 458 y 462 nm de las dos entradas de *C. nudiflorus* es cualitativamente similar (Figura 278). Es decir, existe un perfil de carotenoides común para todas ellas. Este perfil contiene cinco picos cromatográficos principales y sus tiempos de retención corresponden a unos rangos reflejados en la tabla (Tabla 122). Este perfil de compuestos carotenoides es idéntico al observado en la especie *C. serotinus* (Tabla 123).

**Tabla 122 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides de las entradas de la especie *C. nudiflorus*, y el rango de TR en el que eluyen.**

CAROTENOIDES					
Número de pico	1	2	3	5	7
Rango TR (minutos)	2,8-3,1	4,1-4,5	5,0-5,3	5,8-6,1	8,6-8,9

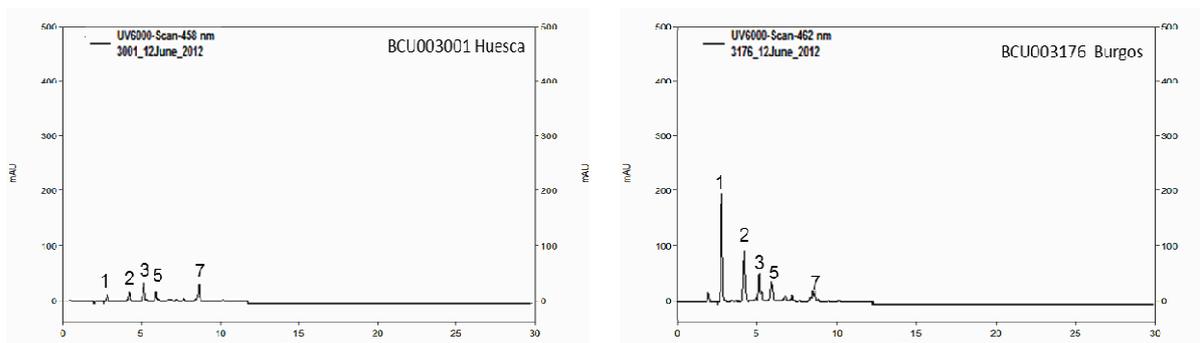


Figura 278 . Perfil de HPLC-DAD a 458-462 nm del extracto de los estilos de las dos entradas de *C. nudiflorus* analizadas.

Tabla 123 . Espectros del UV-Vis que corresponden a cada pico cromatográfico principal del perfil a 458 y 462 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos (Continúa en la siguiente página).

<i>C. nudiflorus</i> de Huesca (BCU003001)		<i>C. nudiflorus</i> de Burgos (BCU003176)	
Nº de pico	UV-Vis espectro	Nº de pico	UV-Vis espectro
1 (2,74)		1 (2,8)	
2 (4,21)		2 (4,28)	
3 (5,15)		3 (5,08)	
5 (5,89)		5 (5,96)	
7 (8,72)		7 (8,65)	

**C. VERNUS**

Las dos entradas evaluadas de la especie *C. vernus* presentan seis picos principales (Tabla 124). Como se señaló anteriormente, los compuestos 4 y 6 están ausentes en las especies *C. nudiflorus* y *C. serotinus* porque en similar TR eluyen los picos 3 y 5 que

## IV. RESULTADOS

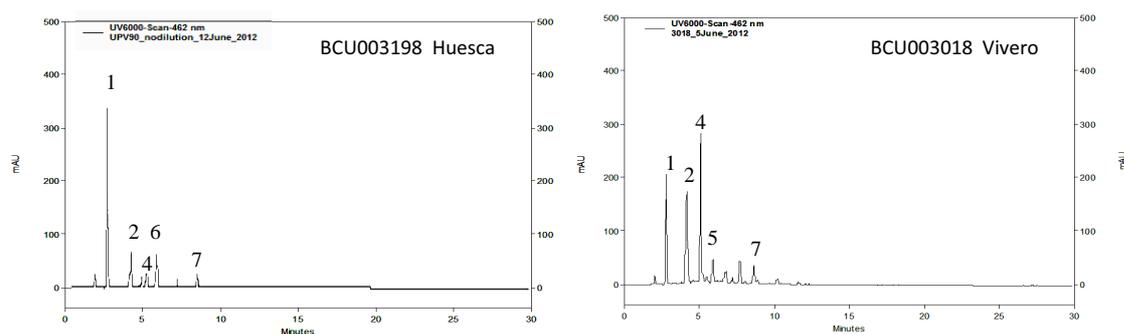
corresponden a crocinas diferentes.

La entrada silvestre colectada en Huesca (BCU003198) presenta un perfil de carotenoides cualitativamente menos rico (Figura 279). Es destacable la escasa presencia de los compuestos carotenoides que eluyen a 4,28 (pico 2) y 5,3 minutos (pico 4) en esta misma entrada.

**Tabla 124 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides de la especie *C. vernus*, y el rango de TR en el que eluyen.**

CAROTENOIDES						
Número de pico	1	2	4	5	6	7
Rango TR (minutos)	2,8-3,1	4,1-4,5	5,2-5,3	5,8-6,1	6,02	8,6-8,9

Hay que señalar que el pico 5 (TR de 5,86 minutos), presente en las especies *C. nudiflorus* y *C. serotinus*, sólo se ha observado en la entrada procedente de vivero (ver Tabla 125). Con TR similar eluye el pico 6 (6,02), una crocina que muestra un espectro diferente al anterior pico, y que sólo se observa en la entrada silvestre.



**Figura 279 .Perfil de HPLC-DAD a 462 nm del extracto de los estilos de las dos entradas de *C. vernus***

Tabla 125 . Espectros del UV-Vis que corresponden a cada pico cromatográfico principal del perfil a 462 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos.

C. vernus de Huesca (BCU003198)		C. vernus entrada de vivero (BCU003018)	
Nº de pico	UV-Vis espectro	Nº de pico	UV-Vis espectro
1 (2,8)		1 (2,81)	
2 (4,28)		2 (4,23)	
4 (5,3)		4 (5,2)	
6 (6,02)		5 (5,86)	
7 (8,69)		7 (8,69)	

### 1.2.2.3 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD EN EL PERFIL DE FLAVONOIDES DENTRO DE ESPECIES

#### C. NEVADENSIS

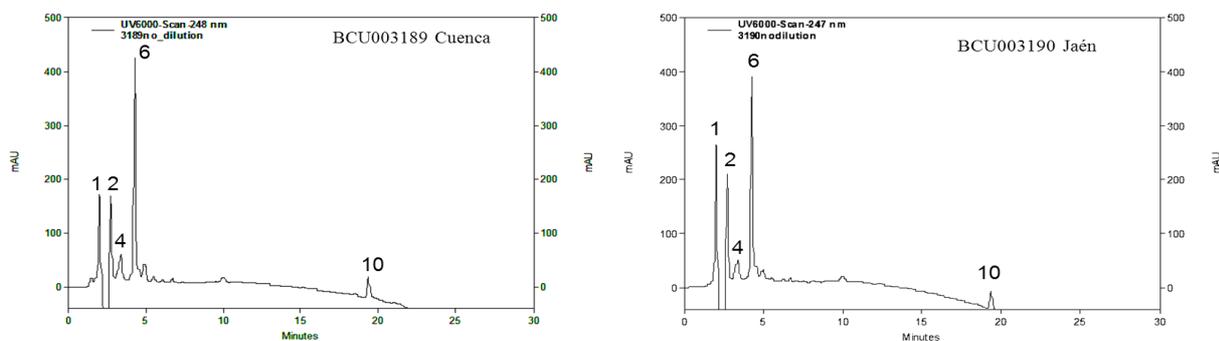
El perfil de flavonoides de la especie sin carotenoides *C. nevadensis* presenta 5 picos de los 10 que se han tomado como referencia para analizar este perfil en todas las especies (Tabla 126).

Hay que destacar que todas las entradas de *C. nevadensis* analizadas presentan un perfil de flavonoides idéntico (Figura 280). No se observan diferencias cualitativas entre los perfiles cromatográficos. Los cinco picos eluyen en TR similares y los espectros son equivalentes (Tabla 127). Asimismo, la especie *C. carpetanus* muestra un perfil de flavonoides idéntico a *C. nevadensis* (datos no mostrados).

## IV. RESULTADOS

**Tabla 126** Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides de las entradas de la especie *C. nevadensis*, y el rango de TR en el que eluyen.

FLAVONOIDES					
Nº DE PICO	1	2	4	6	10
Rango TR (minutos)	1,9-2	2,6-2,9	3,3-3,6	4,15-4,48	19,2-19,3

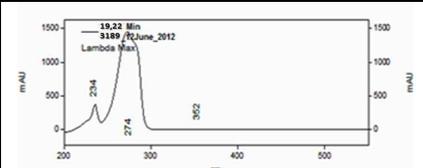
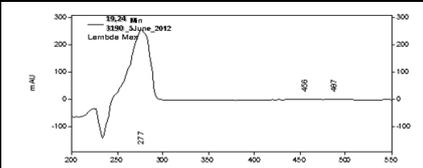


**Figura 280** . Perfil de HPLC-DAD a 247 y 248 nm del extracto de los estilos de *C. nevadensis*

**Tabla 127 .1.** Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 247 y 248 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos (continua en página siguiente).

<i>C. nevadensis</i> de Cuenca (BCU003189)		<i>C. nevadensis</i> de Jaén (BCU003190)	
Nº de pico	UV-Vis espectro	Nº de pico	UV-Vis espectro
1 (1,94)		1 (1,97)	
2 (2,83)		2 (2,78)	
4 (3,37)		4 (3,33)	
6 (4,15)		6 (4,28)	

**Tabla 127.2** Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 247 y 248 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos.

<i>C. nevadensis</i> de Cuenca (BCU003189)		<i>C. nevadensis</i> de Cuenca (BCU003189)	
Nº de pico	UV-Vis espectro	Nº de pico	UV-Vis espectro
10 (19,22)		10 (19,25)	

### ***C. SEROTINUS***

Las entradas de *C. serotinus* presentan un perfil de flavonoides similar. Es decir, en todas ellas se observa la presencia de los mismos picos (Tabla 128 y Tabla 129 y Figura 281). No obstante, se observan diferencias cuantitativas. En las entradas procedentes de Valencia (BCU002619) y de León (BCU003181) es menos importante el pico 4. Asimismo, en esta última entrada el pico 9 es menos apreciable.

Es de destacar la relación cuantitativa entre los picos 1, 2, 5 y 9, dado que no se ha observado esta uniformidad entre entradas dentro de especie, ni para el contenido en flavonoides de las restantes especies, ni para el contenido en crocinas (Figura 281).

**Tabla 128.** Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides de las entradas de la especie *C. serotinus*, y el rango de TR en el que eluyen.

FLAVONOIDES										
Nº DE PICO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Rango TR (minutos)	1,9-2	2,6-2,9	3-3,2	3,3-3,6	3,7-4,15	4,15-4,48	4,5-4,95	4,8-5,15	5,3-5,72	19,2-19,3

## IV. RESULTADOS

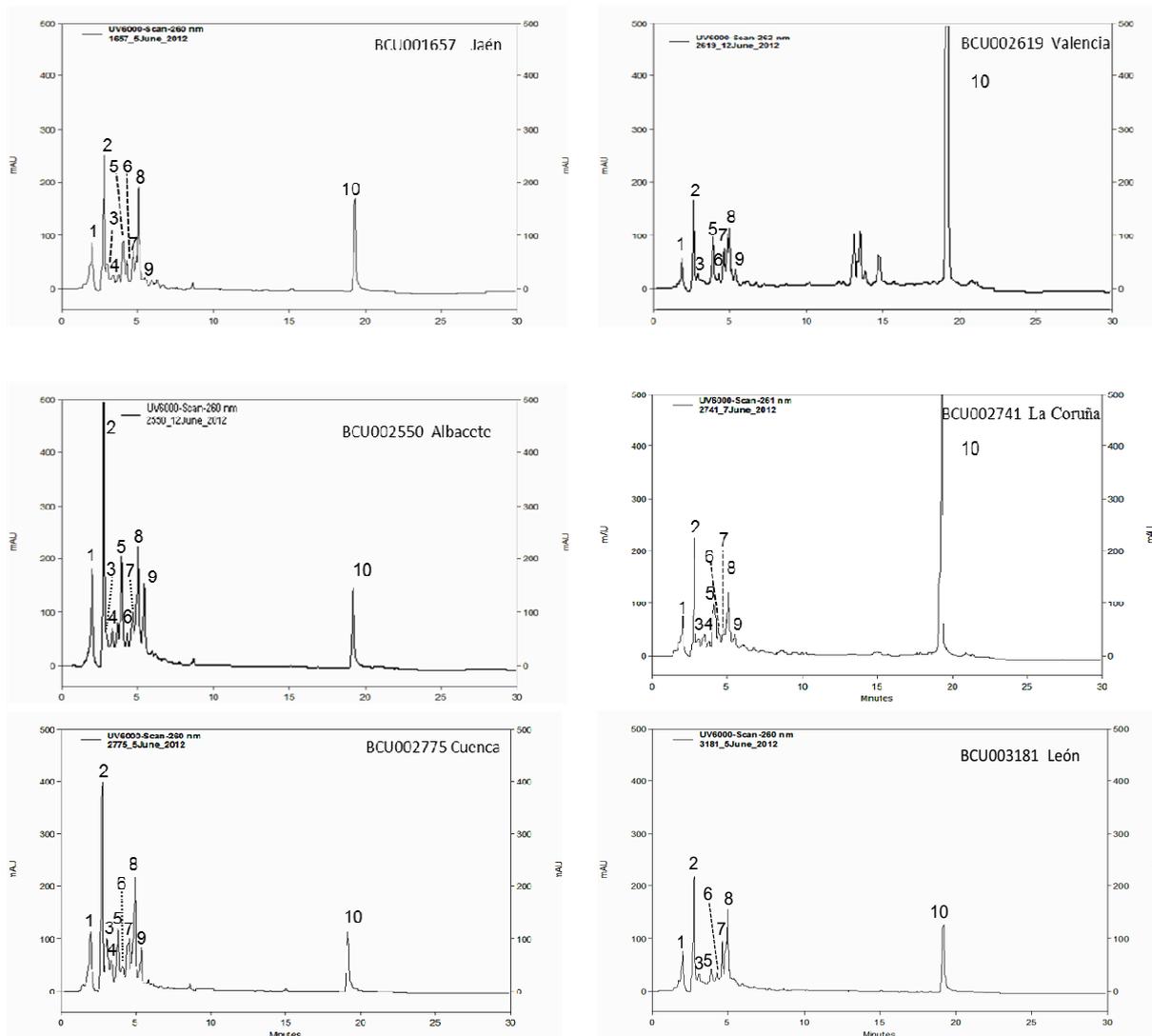


Figura 281 . Perfil de HPLC-DAD a 260-262 nm del extracto de los estilos de seis entradas de *C. serotinus*.

Tabla 129 1.. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 260 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR minutos (continua en página siguiente).

<i>C. serotinus</i> de Cuenca (BCU002775)		<i>C. serotinus</i> de Albacete (BCU002550)	
Nº de pico	UV-Vis espectro	Nº de pico	UV-Vis espectro
1 (1,99)		1 (1,99)	
2 (2,88)		2 (2,76)	

Tabla 129 .2. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 260 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR minutos.

3 (3,18)		3 (3)	
4 (3,47)		4 (3,34)	
5 (3,78)		5 (3,74)	
6 (4,15)		6 (4,35)	
7 (4,52)		7 (4,75)	
8 (4,97)		8 (5,02)	
9 (5,35)		9 (5,49)	
10 (19,21)		10 (19,25)	

**C. NUDIFLORUS**

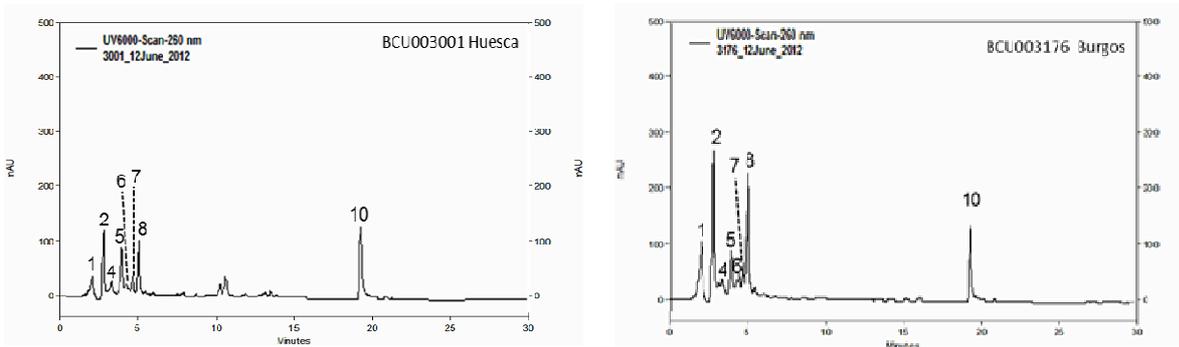
Las entradas de *C. nudiflorus* presentan un perfil de flavonoides similar. Se observan diferencias cuantitativas, pero están presentes los mismos 8 picos importantes en los cromatogramas (Tabla 130 y Tabla 131 y Figura 282).

## IV. RESULTADOS

Los picos que presentan mayor absorbancia en estas entradas son siempre el 1, 2, 5 y 8. Las diferencias cuantitativas se deben principalmente a los picos 1 y 5. Aparecen ciertas diferencias cualitativas para picos de poca relevancia (Figura 282).

**Tabla 130 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides de las entradas de la especie *C. nudiflorus*, y el rango de TR en el que eluyen.**

FLAVONOIDES								
Nº DE PICO	1	2	4	5	6	7	8	10
Rango TR (minutos)	1,9-2	2,6-2,9	3,3-3,6	3,7-4,15	4,15-4,48	4,5-4,95	4,8-5,15	19,2-19,3



**Figura 282 . Perfil de HPLC-DAD a 260 nm del extracto de los estilos de las dos entradas de *C. nudiflorus***

**Tabla 131 .1. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 462 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos (continua en página siguiente).**

<i>C. nudiflorus</i> de Huesca (BCU003001)		<i>C. nudiflorus</i> de Burgos (BCU003176)	
Nº de pico	UV-Vis espectro	Nº de pico	UV-Vis espectro
1 (1,99)		1 (1,99)	
2 (2,66)		1 (2,80)	
4 (3,3)		4 (3,34)	

Tabla 131. 2. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 462 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos (continua en página siguiente).

C. nudiflorus de Huesca (BCU003001)		C. nudiflorus de Burgos (BCU003176)	
Nº de pico	UV-Vis espectro	Nº de pico	UV-Vis espectro
5 (3,88)		5 (4,01)	
6 (4,21)		6 (4,28)	
7 (4,68)		7 (4,75)	
8 (4,88)		8 (5,08)	
10 (19,22)		10 (19,25)	

### C. VERNUS

Las entradas de *C. vernus* presentan un perfil de flavonoides similar, es decir, los cromatogramas de las entradas ensayadas presentan todos los mismos picos importantes detectados en el análisis de variabilidad (Tabla 132 y Tabla 133). No obstante, el perfil de la entrada procedente de vivero es más pobre en flavonoides, ya que los picos que presenta su cromatograma son de menor tamaño (Figura 283). Cabe destacar la menor abundancia de los picos 3 y 4 en esta entrada de vivero.

Tabla 132. Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides de las entradas de la especie *C. vernus*, y el rango de TR en el que eluyen.

FLAVONOIDES										
Nº DE PICO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Rango TR (minutos)	1,9-2,1	2,6-2,9	3-3,2	3,3-3,6	3,7-4,15	4,15-4,48	4,5-4,95	4,8-5,15	5,3-5,72	19,2-19,3

## IV. RESULTADOS

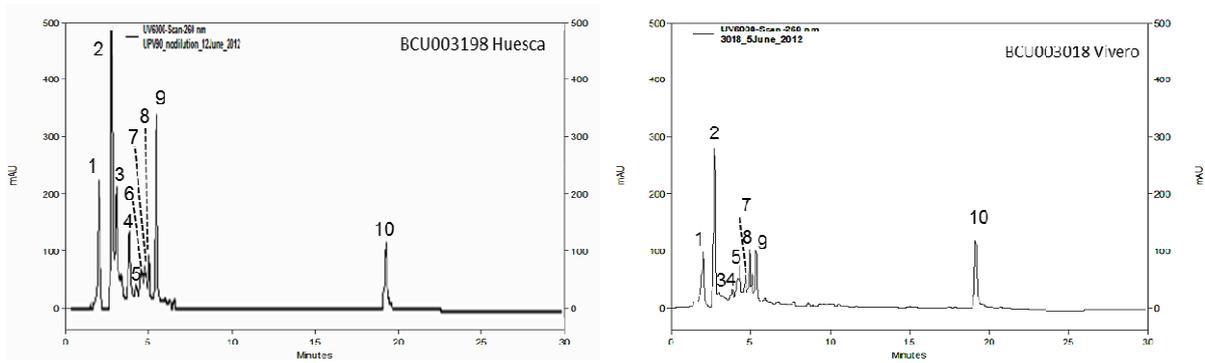
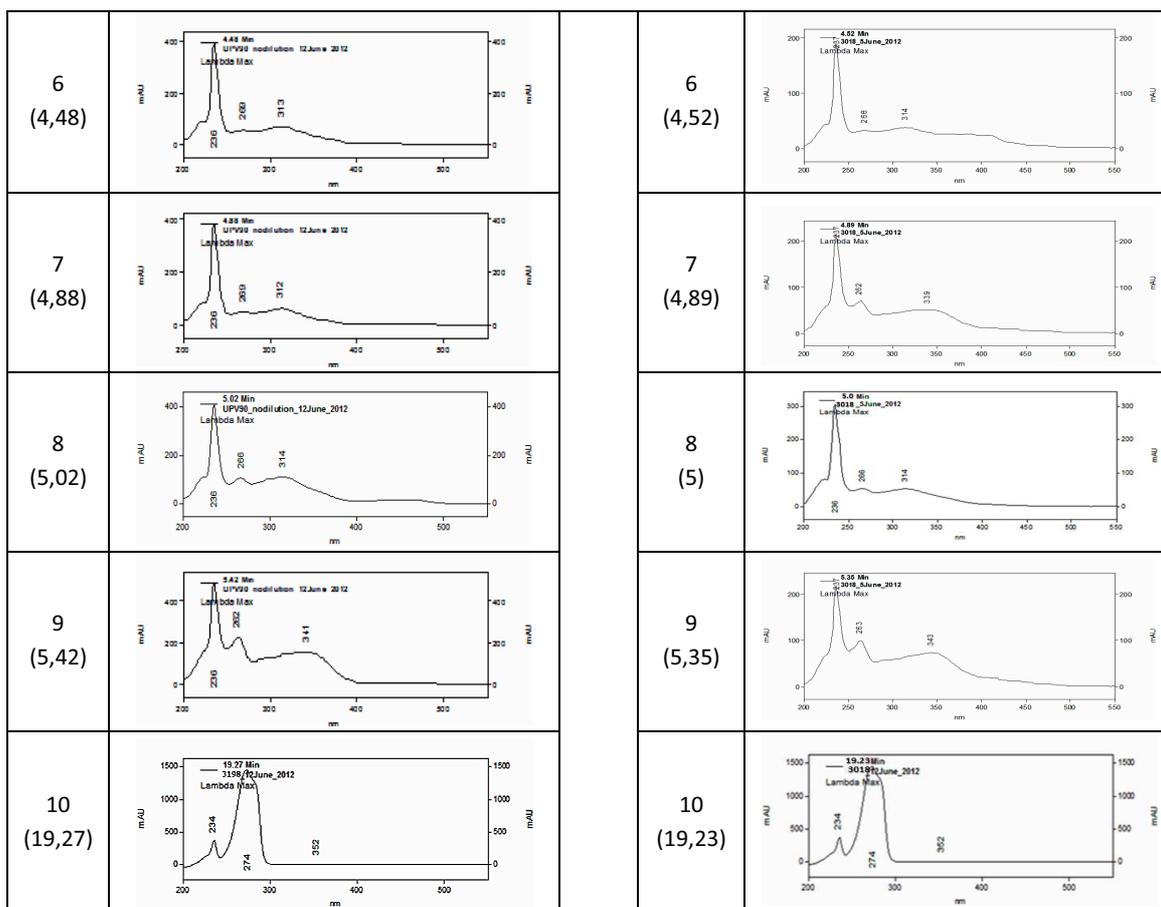


Figura 283 . Perfil de HPLC-DAD a 260 nm del extracto de los estilos de dos entradas de *C. vernus*.

Tabla 133 1.. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 260 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos (Continúa en página siguiente).

C. vernus de Huesca (BCU003198)		C. vernus entrada de vivero (BCU003018)	
Nº de pico	UV-Vis espectro	Nº de pico	UV-Vis espectro
1 (2,01)		1 (2,06)	
2 (2,8)		2 (2,81)	
3 (3)		3 (3)	
4 (3,41)		4 (3,38)	
5 (3,88)		5 (4)	

**Tabla 133.2. Espectros del UV-Vis que corresponden a cada principal pico cromatográfico del perfil a 260 nm. Al lado del número de pico entre paréntesis se indica el TR en minutos**



## 2 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS CAROTENOIDES MÁS ABUNDANTES MEDIANTE HPLC

Teniendo en cuenta el espectro UV-Vis, el tiempo de retención, la absorbancia máxima registrada para cada pico y la literatura relativa a la identificación de crocinas en azafrán y otras especies afines, se podría realizar la identificación tentativa de algunos de los compuestos (Tarantilis *et al.*, 1994 y 1995; Straubinger *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Lozano *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2001; Carmona *et al.*, 2006a y Datos no publicados del proyecto europeo CROCUSBANK (AGRI GEN RES 018, 2012)).

Los compuestos identificados en estos trabajos pertenecen a la familia de los carotenoides (Tabla 134), y se han identificado como ésteres glicosilados del ácido 8,8'-diapo- $\Psi$ ,  $\Psi'$ -carotenodioico, denominado crocetina. Ésta es la estructura base de los compuestos que a continuación se tratan de identificar tentativamente (Tabla 135).

En esta memoria, con el fin de abreviar, se ha utilizado la siguiente nomenclatura para designar los ésteres de crocetina. En primer lugar, se hace referencia a la conformación *cis* o *trans*, seguida por un guión que la separa del número de residuos de glucosa en la molécula. Posteriormente, se indica la distribución de los residuos como (t) triglicósido, (n) neapolitanósido, (G) gentiobiosíido o (g) glucósido.

## IV. RESULTADOS

**Tabla 134 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides que se han identificado en las especies *C. serotinus*, *C. nudiflorus* y *C. vernus*, según el rango de TR en el que eluyen y su espectro de absorción. Se indica el número de pico que se muestra en los cromatogramas.**

CAROTENOIDES							
Nº DE PICO	1	2	3	4	5	6	7
Rango TR (minutos)	2,8-3,1	4,1-4,5	5,0-5,3	5,2-5,3	5,8-6,1	6,02	8,6-8,9

Se puede decir que los picos 1, 2, 3 y 7 (Tabla 135) corresponderían a glucósidos derivados de la *trans*-crocina. El pico 1 correspondería a la crocina *trans*-5-tG y el pico 2 a la crocina *trans*-5nG. El pico 3 podría ser un derivado de la digentiobiosa o crocina *trans*-4-GG (Crocina 1, la principal crocina presente en *C. sativus*). El pico 7 se puede deber a la presencia de derivados de la monogentiobiosa, la crocina *trans*-2G.

El pico 4, que se presenta únicamente en la especie *C. vernus*, se trata de una crocina *cis*-x, pero no sabemos el número y tipo de residuos de glucosa que acompaña la molécula. El pico 5, que sólo se ha observado en el perfil de *C. nudiflorus* y *C. serotinus* y en la entrada procedente de vivero de *C. vernus* (Tabla 135), se pueden identificar, tentativamente, como el compuesto denominado crocina *cis*-5nG. El pico 6 sólo se ha observado en la entrada silvestre de *C. vernus* y podría identificarse, tentativamente, como crocina *cis*-4GG (Tabla 135).

La picrocrocina, glucósido responsable del sabor picante de azafrán, se presenta en los cromatogramas a 440 nm de esta especie a TR muy bajos, siendo uno de los primeros compuestos que eluye. En las especies silvestres, no se observa ningún compuesto que eluya a TR próximos y que presente un espectro similar. Por esta razón, podríamos decir que este compuesto no se encuentra presente en los cromatogramas de las especies analizadas. Este hecho implica que la biosíntesis de la picrocrocina debe seguir una ruta diferente a la que se produce en *C. sativus*.

**Tabla 135 . Espectro UV-Vis de los principales picos del perfil cromatográfico a 460 y 462 nm. Los espectros de los picos 1, 2, 3, 5 y 7 proceden del cromatograma de *C. serotinus* (BCU001657) y los picos 4 y 6 proceden del cromatograma de *C. vernus* (BCU003198). Entre paréntesis se indica el TR en minutos. Se indica el nombre del compuesto y sus  $\lambda_{max}$  (nm)**

Nº de pico	UV-Vis espectro	Identificación tentativa y $\lambda_{max}$ (nm)
1 (3,03)		Crocina <i>trans</i> -5-tG (237/445/462)
2 (4,3)		Crocina <i>trans</i> -5nG (237/443/463)
3 (5,2)		Crocina <i>trans</i> -4-GG (238/441/462)
4 (5,3)		Crocina <i>cis</i> -x (238/318/410/443)
5 (5,94)		Crocina <i>cis</i> -5nG (239/329/414/438)
6 (6,02)		Crocina <i>cis</i> -4GG (236/320/441/461)
7 (8,69)		Crocina <i>trans</i> -2G (248/435/457)

## 2.1 COMPARACIÓN DE LAS CROCINAS PROCEDENTES DE ESPECIES SILVESTRES CON AQUELLAS CONTENIDAS EN LOS ESTILOS DEL AZAFRÁN

Al comparar los cromatogramas a 440nm de las especies silvestres con aquél obtenido a partir de azafrán, se observa que el tiempo de elución de las crocinas en las especies silvestres comprende un rango entre 2,5 y 10 min, mientras que en azafrán este rango está entre 4,5 y 11 (Figura 284).

## IV. RESULTADOS

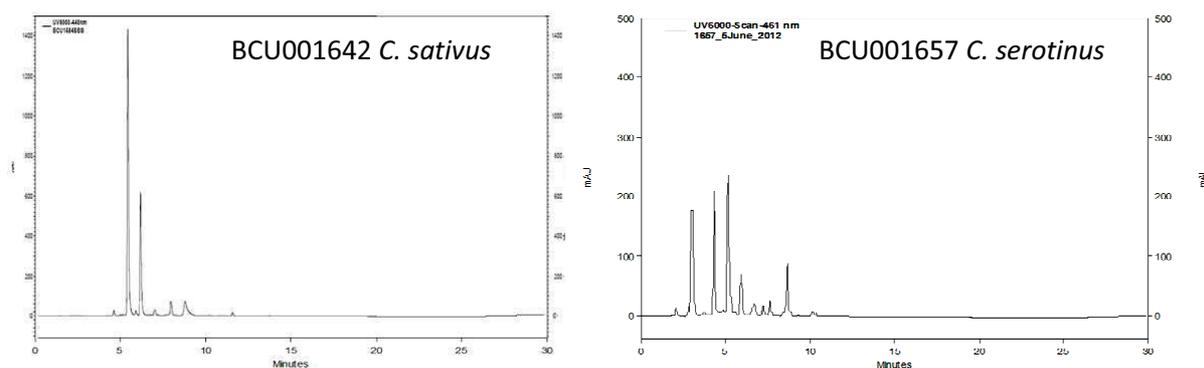


Figura 284 . Cromatograma de *C. sativus* a 440 nm y de *C. serotinus* a 461 nm.

### 3 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FLAVONOIDES MÁS ABUNDANTES MEDIANTE HPLC

Del mismo modo que se realizó con los compuestos carotenoides, se identificaron tentativamente algunos de los compuestos que presentan sus máximos de absorbancia entre 200-400 nm, teniendo en cuenta el espectro UV-Vis, el tiempo de retención, la absorbancia máxima registrada para cada pico y la literatura relativa a la identificación de los flavonoides presentes en azafrán y otras especies afines (Tarantilis *et al.*, 1995; Lozano *et al.*, 1999; Nørbæk *et al.*, 2002; Carmona *et al.*, 2006a; Carmona *et al.*, 2007 y Datos no publicados del proyecto europeo CROCUSBANK (AGRI GEN RES 018, 2012)). Asimismo, se tuvo en cuenta la identificación mediante el método de adición del analito puro realizada en algunas de las muestras, que se refleja en el apartado siguiente (3.1). La identificación tentativa del compuesto alcaloide se realizó a partir del trabajo de McConnell *et al.*, (1962).

Todos los picos observados presentes en el perfil de flavonoides (Tabla 136) se podrían identificar como derivados del kaempferol, a excepción del pico 10 que es un alcaloide (Tabla 137). El kaempferol es el compuesto flavonoide identificado en extractos de azafrán, y es muy interesante por su posible contribución a las propiedades y atributos de la especie, a pesar de encontrarse en menores proporciones que el resto de los compuestos.

Tabla 136 . Picos cromatográficos más importantes correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides presentes en las especies *C. nevadensis*, *C. carpetanus*, *C. serotinus*, *C. nudiflorus* y *C. vernus*, según el rango de TR en el que eluyen. Se indica el número de pico que se indicará en los cromatogramas.

FLAVONOIDES										
Nº DE PICO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Rango TR (minutos)	1,9-2	2,6-2,9	3-3,2	3,3-3,6	3,7-4,15	4,15-4,48	4,5-4,95	4,8-5,15	5,3-5,72	19,2-19,3

El pico 1 podría identificarse, tentativamente, como el Kaempferol 3-glucósido-7-neapolitanósido. Los picos 2, 3 y 9 serían probablemente un Kaempferol 3-O-soforósido-

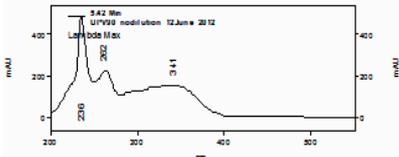
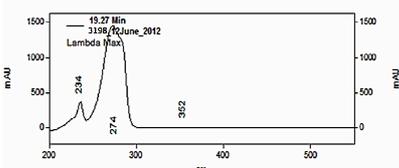
7-O-glucósido. Los picos consecutivos desde el 4 al 8 presentan un espectro similar, podrían tratarse de un mismo Kaempferol. El pico 10 se puede deber a la presencia de un compuesto alcaloide identificado (Tabla 137).

**Tabla 137.1 Espectro UV-Vis de los principales picos del perfil cromatográfico a 260 nm. Los espectros de los proceden del cromatograma de *C. vernus* (BCU003198). Entre paréntesis se indica el TR en minutos. Se indica el nombre del compuesto y sus  $\lambda_{max}$  (nm)**

Nº de pico	UV-Vis espectro	Identificación tentativa y $\lambda_{max}$ (nm)
1 (2,01)		Kaempferol 3-glucósido-7-neapolitanósido (239/262/316)
2 (2,8)		Kaempferol 1 (236/260/339)
3 (3)		Kaempferol 3-O-soforósido-7-O-glucósido (236/266/334)
4 (3,41)		Kaempferol 2 (236/267/314)
5 (3,88)		Kaempferol 3 (236/264/325)
6 (4,48)		Kaempferol 4 (236/269/313)
7 (4,88)		kaempferol-3-O-rutinósido (236/269/312)
8 (5,02)		Kaempferol 5 (236/266/314)

## IV. RESULTADOS

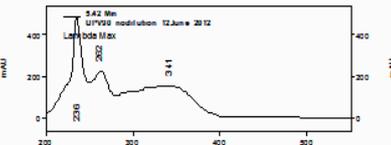
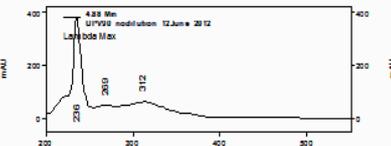
**Tabla 137.2. Espectro UV-Vis de los principales picos del perfil cromatográfico a 260 nm. Los espectros de los proceden del cromatograma de *C. vernus* (BCU003198). Entre paréntesis se indica el TR en minutos. Se indica el nombre del compuesto y sus  $\lambda_{max}$  (nm) (continuación).**

9 (5,42)		Kaempferol-3-O-glucósido (236/262/341)
10 (19,27)		Alcaloide (234/274)

### 3.1 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO DE ADICIÓN DEL ANALITO PURO

Mediante la técnica de HPLC-DAD ha sido posible la identificación de dos de los picos presentes en las muestras analizadas (Tabla 138), con el método de adición del analito puro o estándar (*spiking*). Se ha comprobado la presencia de 2 estándares correspondientes a dos flavonoides, Kaempferol-3-O-glucósido y kaempferol-3-O-rutinósido, en la entrada BCU003198 de la especie *C. vernus* y la entrada BCU003001 de *C. nudiflorus*, respectivamente.

**Tabla 138 . Espectros, TR y  $\lambda_{max}$  (nm) de los flavonoides identificados en *C. vernus* y *C. nudiflorus*.**

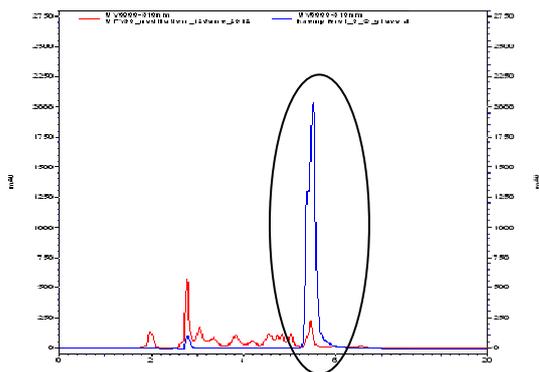
Entrada	Nº de pico	UV-Vis espectro	Identificación y $\lambda_{max}$ (nm)
<i>C. vernus</i> BCU003198	9 (5,42)		Kaempferol-3-O-glucósido (236/262/341)
<i>C. nudiflorus</i> BCU003001	7 (4,88)		kaempferol-3-O-rutinósido (236/269/312)

A continuación, se explica el proceso realizado para llevar a cabo la identificación.

#### 1.Elución de la muestra y el estándar

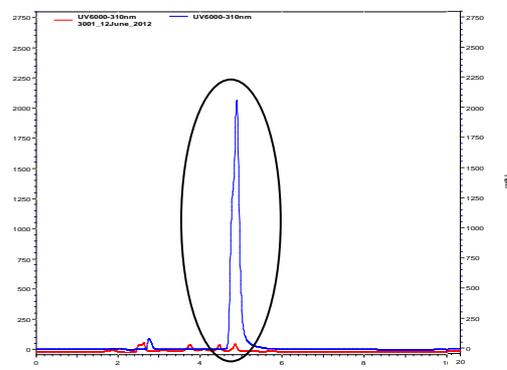
Se inyectan en el sistema cromatográfico la muestra y el estándar puro de forma separada. Se solapan en un solo cromatograma los gráficos obtenidos y se observa si a la misma  $\lambda_{max}$  y en el mismo tiempo de retención aparece de forma coincidente el principal pico del estándar con algún pico importante de la muestra. Si así ocurre, ese pico correspondiente a la muestra podría tratarse de un compuesto similar al patrón puro utilizado. En los pasos siguientes se realizan las comprobaciones.

Se observa una coincidencia de un pico del cromatograma del extracto de la muestra de *C. vernus* BCU003198 (Huesca) y el pico correspondiente al analito puro (el flavonoide kaempferol-3-O-glucósido) (Figura 285). El tiempo de retención para ambos picos coincide, y es de 5,4 min, como también lo es  $\lambda_{max}$  (262, 345) visible en el espectro UV-Vis. Lo mismo ocurre en la entrada BCU003001 (Huesca) de la especie *C. nudiflorus*, que se detecta la presencia del pico correspondiente al flavonoide kaempferol-3-O-rutinósido. Ambos picos eluyen en el minuto 4,88 y presentan la misma  $\lambda_{max}$  (263,345) en el espectro de UV-Vis (Figura 286).



COLOR	Descripción
	Extracto de los estilos de BCU003198
	kaempferol-3-O-glucósido

Figura 285 Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de *C. vernus* (BCU003198) y el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O-glucósido).



COLOR	Descripción
	Extracto de los estilos de BCU003001
	kaempferol-3-O-rutinósido

Figura 286 Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de *C. nudiflorus* (BCU003001) y el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O-rutinósido).

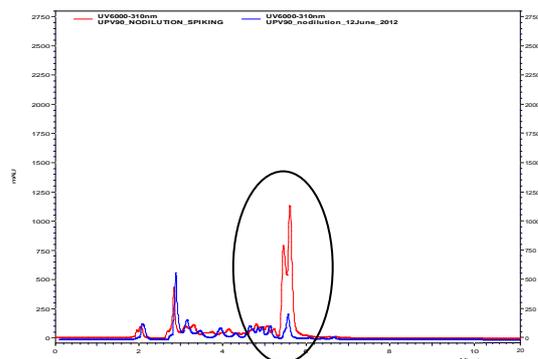
## 2. Adición de la muestra con el estándar

Para asegurar que la identificación es correcta, se realiza la co-cromatografía, que consiste en mezclar la muestra con el estándar. Se solapa el cromatograma obtenido tras correr la mezcla de la muestra con el estándar con el cromatograma de la muestra. Si la identificación ha sido correcta, los picos que corresponden con el estándar aparecen con mayor tamaño.

Observamos que en la muestra de la entrada BCU003198 el pico correspondiente al flavonoide kaempferol-3-O-glucósido, aparece con mayor tamaño (Figura 287). Asimismo,

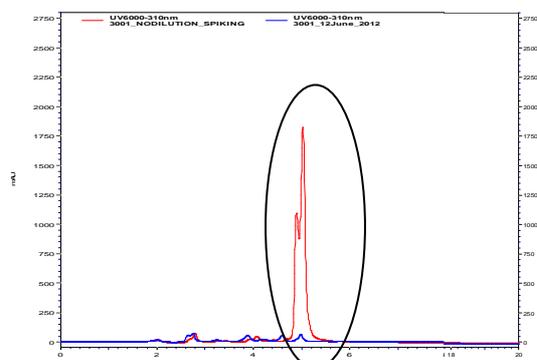
## IV. RESULTADOS

se observa como en la entrada BCU003001, el pico correspondiente al flavonoide kaempferol-3-O-rutinósido aparece con mayor tamaño (Figura 288).



COLOR	Descripción
Blue	Extracto de los estilos de BCU003198
Red	Extracto de los estilos de BCU003198 mezclado con el analito puro

**Figura 287** Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de *C. vernus* (BCU003198) y la mezcla de este extracto con el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O- glucósido).



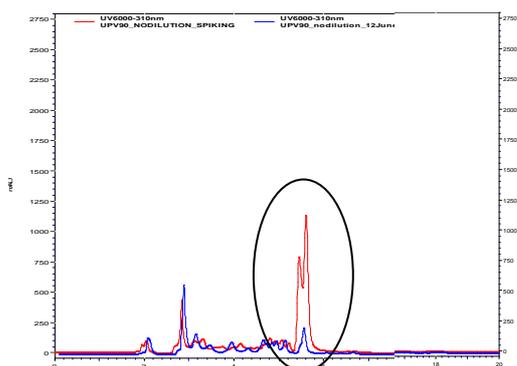
COLOR	Descripción
Blue	Extracto de los estilos de BCU003001
Red	Extracto de los estilos de BCU003001 mezclado con el analito puro

**Figura 288** Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de *C. nudiflorus* (BCU003001) y la mezcla de este extracto con el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O-rutinósido).

### 3. Correr la muestra con el co-cromatograma y los estándares en otro sistema cromatográfico.

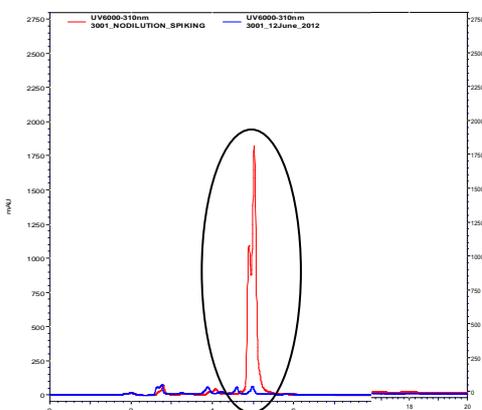
Como última comprobación se analiza la muestra con el co-cromatograma y los estándares en otro sistema cromatográfico, que cuenta con una columna diferente a la del anterior sistema. Observamos como los picos identificados en las muestras comentadas eluyen al mismo tiempo que el estándar correspondiente.

Así, podríamos concluir la presencia del flavonoide kaempferol-3-O-glucósido en la entrada BCU003198 (Figura 289) y del flavonoide kaempferol-3-O-rutinósido en la entrada BCU003001 (Figura 290).



COLOR	MUESTRA	Descripción
	Extracto de BCU003198	Extracto de los estilos de BCU003198
	Extracto BCU003198 + analito puro	Extracto de los estilos de BCU003198 mezclado con el analito puro

Figura 289 . Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de *C. vernus* (BCU003198) y la mezcla de este extracto con el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O-glucósido).



COLOR	MUESTRA	NOMBRE
	Extracto de BCU003001	Extracto de los estilos de BCU003001
	Extracto con analito puro	Extracto de los estilos de BCU003001 mezclado con el analito puro

Figura 290 . Perfil de HPLC-DAD a 310nm del extracto en metanol-agua de los estilos de *C. nudiflorus* (BCU003001) y la mezcla de este extracto con el analito puro del flavonoide (kaempferol-3-O-rutinósido).

#### 4 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL EN FLAVONOIDES Y CROCINAS MEDIANTE HPLC-DAD

Se ha realizado la cuantificación de crocinas y flavonoides totales mediante el método del patrón externo. Las rectas de calibración se obtuvieron con los patrones externos Crocina 1 (Crocina *trans*-4-GG) y el flavonoide Quercetina.

##### 4.1 CUANTIFICACIÓN DE LAS CROCINAS TOTALES

La curva de calibración obtenida para el cálculo del contenido en crocinas totales es la siguiente.

$$y=32415x-1000000, R^2=0.9819$$

Dónde **y** es el área de integración cromatográfica del pico (uA), y **x** la masa del analito (ng). Los valores totales de crocinas, en cada una de las muestras, se expresaron en porcentaje respecto del peso de los estilos secos (Tabla 139).

## IV. RESULTADOS

Tabla 139 . Contenido total de crocinas en relación al peso de los estilos de las especies silvestres españolas de *Crocus*. Calculado tomando como patrón el pigmento carotenoide Crocina 1. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones ( $p$ -value <0,05). \* indican plantas que por problemas de cultivo al final del ciclo no se ha tenido en cuenta en el análisis de medias.

% Crocinas totales (g de Crocinas en 100 g de estilos secos)			
Especie	Media	Mínimo	Máximo
<i>C. nevadensis</i>	0 a	-	-
<i>C. carpetanus</i>	0 *	-	-
<i>C. vernus</i>	1,2 b	0,1	2,1
<i>C. serotinus</i>	1,36 b	0,4	2,5
<i>C. nudiflorus</i>	0,9 b	0,6	1,2

El contenido en crocinas totales de las especies que sí que presentan estos pigmentos en sus estilos (*C. vernus*, *C. nudiflorus* y *C. serotinus*) no muestra diferencias significativas ( $p$ -value > 0,05). Se observa una elevada variabilidad intraespecífica en la especie *C. serotinus*, con la entrada que muestra el mayor contenido en crocinas en sus estilos (BCU001657 con 2,5% de crocinas en sus estilos). Dentro de esta especie, las entradas procedentes de León y Burgos son las que menor contenido de crocinas presentan (Tabla 139).

Como se ha indicado en apartados anteriores, las especies *C. nevadensis* y *C. carpetanus* no contienen crocinas en sus estilos.

### 4.2 CONTENIDO EN CROCINAS CIS Y TRANS

El contenido en crocinas *trans* totales en las especies silvestres de *Crocus* se sitúa entre el 65-82% respecto de las crocinas. Existen diferencias significativas entre las especies analizadas. Son las especies de floración otoñal las que presentan mayor cantidad de crocinas *trans* en sus estilos (Tabla 140). En la especie *C. vernus* existe una elevada variabilidad intraespecífica. La entrada de *C. vernus* (BCU003018) procedente de vivero presenta el menor contenido de crocinas *trans* (54%), mientras que la entrada silvestre presenta una proporción similar a las especies *C. serotinus* y *C. nudiflorus* (65,5%).

El contenido de crocina *trans*-4-GG, identificada tentativamente en las especies silvestres de *Crocus* españolas, se reduce a menos de la mitad en las especies *C. serotinus* y *C. nudiflorus* (17,4% y 20,1% respectivamente), y existe gran variabilidad intraespecífica (Tabla 140). Esta crocina parece estar ausente en *C. vernus*. En ninguna de estas especies españolas se ha observado la presencia de la crocina *trans*-3-Gg. Así pues, deben existir otros tipos de crocinas *trans*, posiblemente con más residuos glucosídicos.

**Tabla 140** Porcentaje de los isómeros *trans* y *cis* y de *crocina trans 4-GG* respecto de la masa total de *crocinas*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones ( $p$ -value < 0,05).

Especie	% <i>trans</i>		% <i>cis</i>		%Ct 4GG	
<i>C. serotinus</i>	81,7	b	18,3	a	20,1	a
<i>C. vernus</i>	65,5	a	34,5	b	0	
<i>C. nudiflorus</i>	82,3	b	17,6	a	17,4	a

### 4.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES TOTALES

La curva de calibración obtenida para el cálculo del contenido en flavonoides totales es la siguiente:

$$y=10235x+734585; R^2=0.9928$$

Dónde **y** es el área de integración cromatográfica del pico (uA), y **x** la masa del analito (ng). Los valores totales de flavonoides de cada una de las muestras se expresaron en mg por g de estilos secos (Tabla 141).

**Tabla 141**. Contenido total de flavonoides en los estilos de las especies silvestres españolas de *Crocus*. Se ha calculado tomando como patrón el flavonoide *Quercetina*. Valores seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas entre estas accesiones ( $p$ -value < 0,05). \* indican plantas que por problemas de cultivo al final del ciclo no se han tenido en cuenta en el análisis de medias.

Especie	Flavonoides (mg/g de estilos secos)		
	Media	Mínimo	Máximo
<i>C. nevadensis</i>	27,13 a	25,47	30,47
<i>C. carpetanus</i>	27,89 *	-	-
<i>C. vernus</i>	33,77 a	8,30	64,00
<i>C. serotinus</i>	22,81 a	8,80	56,40
<i>C. nudiflorus</i>	20,69 a	10,60	30,80

No se observan diferencias significativas en cuanto al contenido en flavonoides entre las especies. La variabilidad intraespecífica del contenido de flavonoides en los estilos es muy elevada.

## 5 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL PERFIL FITOQUÍMICO DE LAS ESPECIES SILVESTRES DE *CROCUS* MEDIANTE ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES

### 5.1 ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES TENIENDO EN CUENTA LA AUSENCIA O PRESENCIA DE LOS PICOS MÁS IMPORTANTES

Se realizó un análisis de coordenadas principales para determinar cuáles son los compuestos más discriminantes y si era posible agrupar las entradas de las distintas

#### IV. RESULTADOS

especies en función de la ausencia o presencia de los principales picos cromatográficos que corresponden a carotenoides y flavonoides. En la Tabla 142 y Tabla 143 se muestran los picos que se han seleccionado relacionados con la presencia/ausencia de las crocinas o flavonoides.

**Tabla 142 . Picos cromatográficos correspondientes a metabolitos de la familia de los carotenoides que se han seleccionado para realizar el análisis de coordenadas principales. El número de pico corresponde con el número que se muestra en los cromatogramas. Se indica el rango de TR en el que eluyen.**

CROCINAS					
Nº DE PICO	1	3	4	5	6
Rango TR (minutos)	2,8-3,1	5,0-5,3	5,2-5,3	5,8-6,1	6,02

**Tabla 143 . Picos cromatográficos correspondientes a metabolitos de la familia de los flavonoides que se han seleccionado para realizar el análisis de coordenadas principales. El número de pico corresponde con el número que se muestra en los cromatogramas. Se indica el rango de TR en el que eluyen.**

FLAVONOIDES					
Nº DE PICO	1	3	4	6	9
Rango TR (minutos)	1,9-2	3-3,2	3,3-3,6	4,15-4,48	5,3-5,72

Las tres primeras componentes explicaron un 58,1%, un 17,2% y un 11,6 % de la varianza respectivamente. En total, las tres componentes explicaron un 86,9% de la variación total observada (Tabla 144).

**Tabla 144 . Ecuación de cada una de las tres coordenadas principales, en función de los caracteres considerados para el presente análisis y porcentaje de la varianza total explicada por cada una de ellas. Se indica si el pico corresponde a una crocina (c) o a un flavonoide (f).**

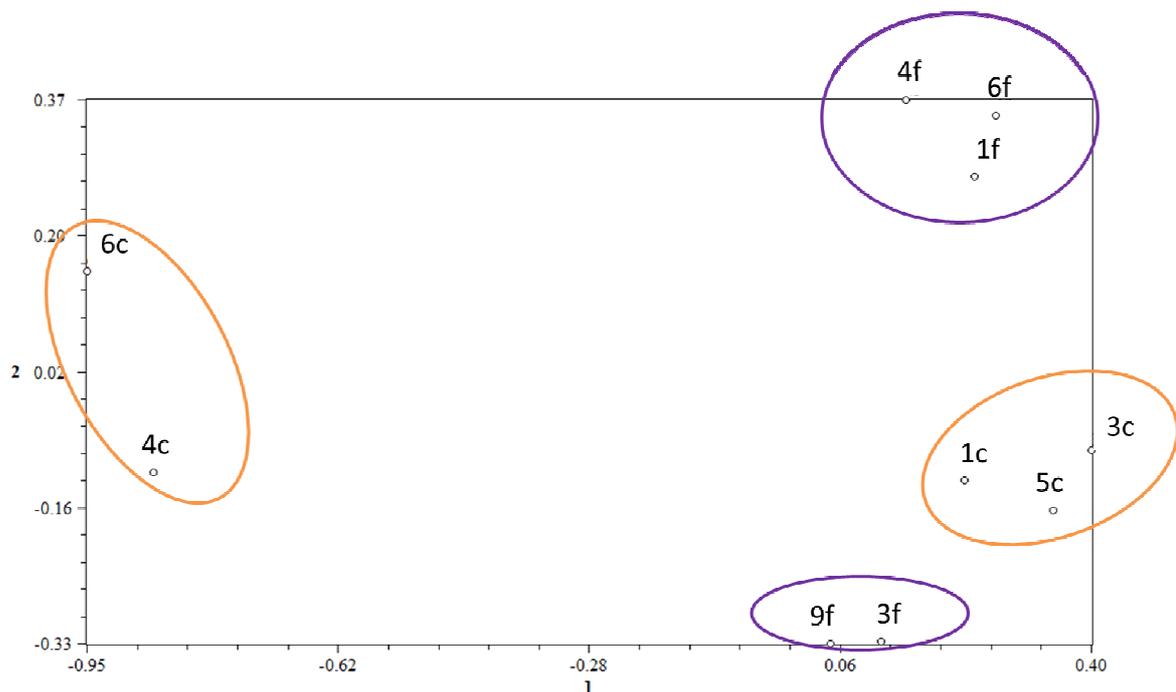
COORDENADAS PRINCIPALES			
CARACTERES CUALITATIVOS	1	2	3
1c	0,2300	-0,1224	-0,0418
3c	0,4022	-0,0824	-0,3246
4c	-0,8653	-0,1123	0,2733
5c	0,3508	-0,1618	-0,1089
6c	-0,9550	0,1495	-0,3589
1f	0,2447	0,2722	0,1198
3f	0,1173	-0,3321	0,0632
4f	0,1519	0,3717	0,2519
6f	0,2735	0,3519	-0,0411
9f	0,0499	-0,3344	0,1672
<b>Varianza explicada</b>	<b>58,1%</b>	<b>17,2%</b>	<b>11,6%</b>

### 5.1.1 REPRESENTACIÓN DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS FRENTE A LAS COORDENADAS PRINCIPALES

Al proyectar los caracteres en el plano definido por las dos primeras componentes principales (Figura 292) se observa que la primera componente principal, que explica el 58,1% de la variabilidad, está fundamentalmente relacionada de forma negativa con la presencia de la crocinas 4c y 6c ( $r = -0,86$  y  $-0,95$ , respectivamente). En menor grado, presenta una correlación positiva con la presencia de las crocinas correspondientes a los picos 3c y 5c (0,4 y 0,35 respectivamente) (Tabla 144).

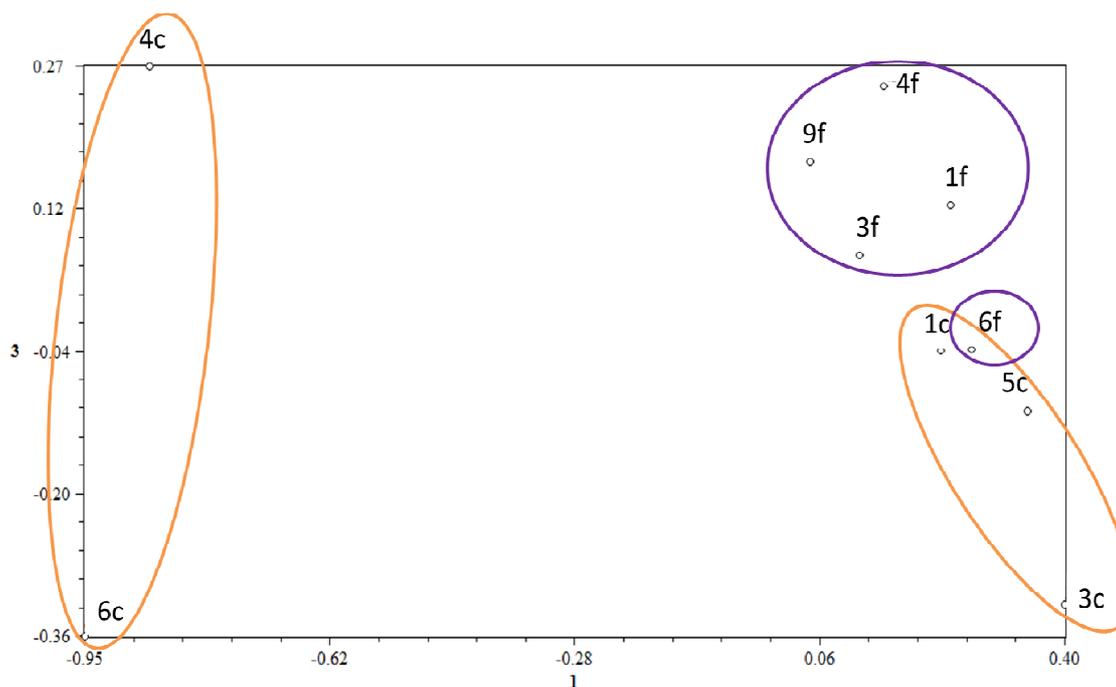
La segunda componente, que explica el 17,2% de la variabilidad observada, está relacionada con la presencia de flavonoides (Figura 292). Muestra una relación moderada y positiva con la presencia de los flavonoides representados por el pico 4f (0,37) y 6f (0,35), y de forma negativa con los que corresponden a los picos 3f (-0,33) y 9f (-0,33) (Tabla 144).

La tercera componente, que expresa el 11,6% de la variabilidad, está relacionada de forma negativa con las crocinas que corresponden a los picos 6c (-0,36) y 3c (-0,32). Asimismo, esta componente está relacionada en menor grado y de forma positiva con los picos 4c (0,27) y 4 f (0,25) (Figura 292 y Tabla 144).



**Figura 291 . Representación de los coeficientes de los caracteres en los vectores propios que definen las dos primeras componentes principales 1 y 2.**

## IV. RESULTADOS

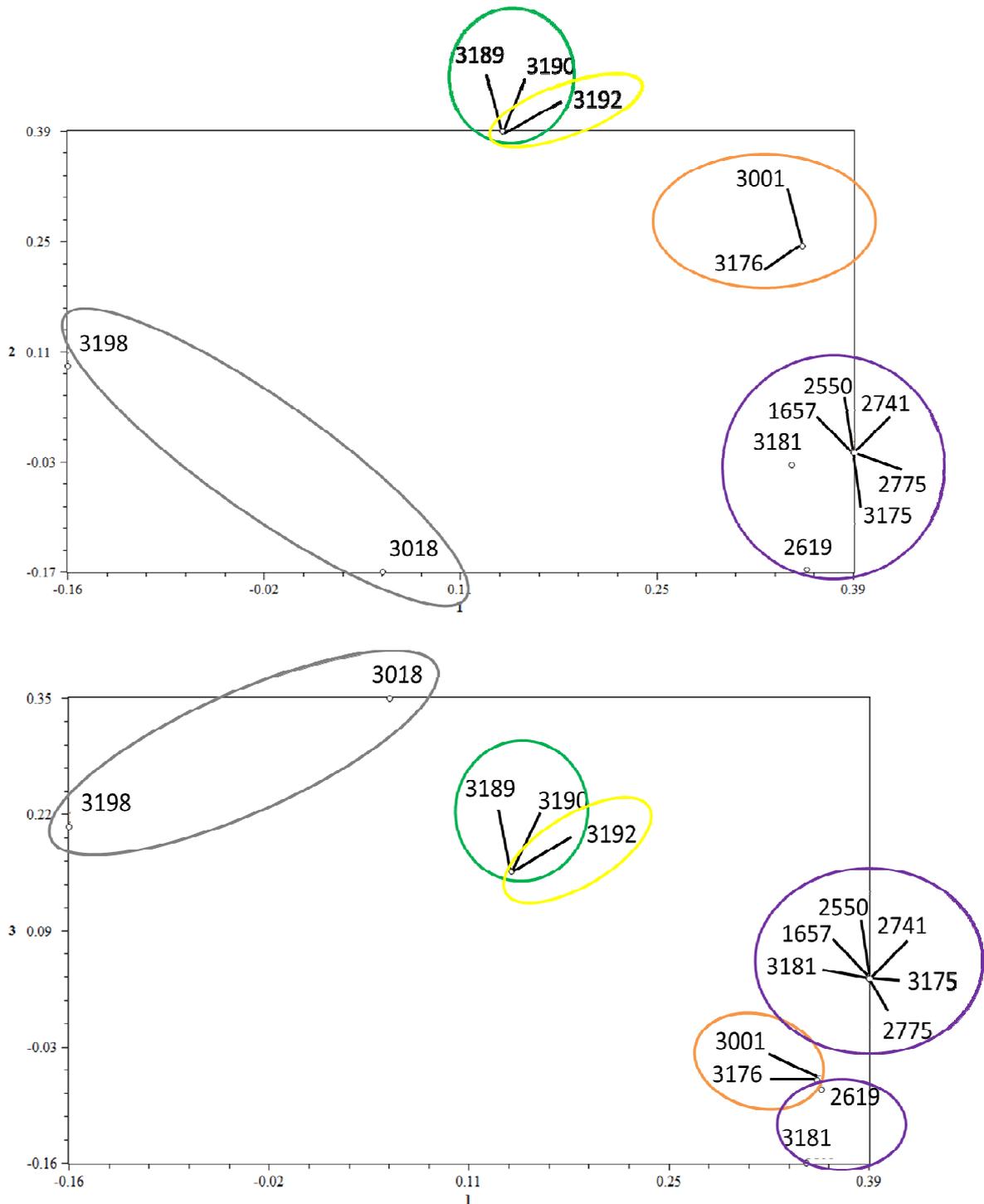


**Figura 292 . Representación de los coeficientes de los caracteres en los vectores propios que definen las dos primeras componentes principales 1 y 3.**

En resumen, la representación de las variables respecto a las componentes principales muestra que la mayor parte de la variación se debe a diferencias en la ausencia de dos crocinas que corresponden a los picos 4c y 6c (identificadas tentativamente como crocina *cis*-x y crocina *cis*-4GG, respectivamente). En menor grado, a la presencia de las crocinas 3c y 5c (crocina *trans*-4-GG y crocina *cis*-5nG, respectivamente) (58,1% de variación en conjunto). Las diferencias debidas a la presencia de flavonoides del grupo de los Kaempferoles son menos importantes y explican el 17,2 %. Esta variación se debe a la presencia de los picos 4f, 6f, 3f y 9f, identificados tentativamente como kaempferol 2, kaempferol 4, Kaempferol 3-O-soforósido-7-O-glucósido y Kaempferol-3-O-glucósido, respectivamente (Tabla 144).

### 5.1.2 REPRESENTACIÓN DE LAS DIFERENTES ENTRADAS FRENTE A LAS COORDENADAS PRINCIPALES.

La representación de las entradas en función de las componentes principales 1 y 2 (Figura 293), muestra una agrupación de éstas por especie. Las entradas de *C. serotinus* y *C. nudiflorus* están correlacionadas positivamente con la componente 1, reflejando en estas especies la ausencia de las crocinas 4c (crocina *cis*-x) y 6c (crocina *cis*-4GG), y la presencia de las crocinas 3c y 5c (crocina *trans*-4-GG y crocina *cis*-5nG). No obstante, es posible separar *C. serotinus* de *C. nudiflorus* por la ausencia en esta última de los picos 3f (Kaempferol 3-O-soforósido-7-O-glucósido) y 9f (Kaempferol-3-O-glucósido) que corresponden a flavonoides, y la presencia de los picos 4f (Kaempferol 2) y 6f (Kaempferol 4), también de flavonoides, como indica su mayor correlación con la componente 2.



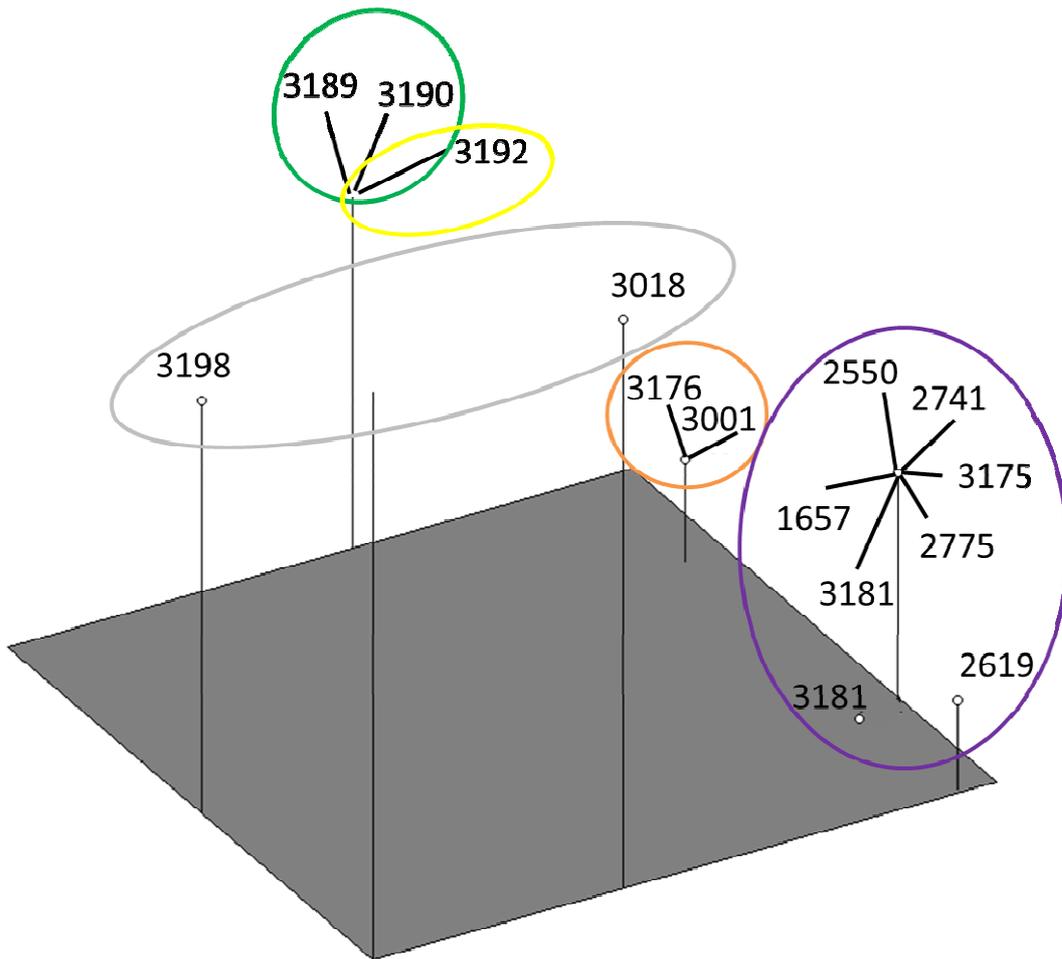
**Figura 293** Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: *C. nevadensis*; Amarillo: *C. carpetanus*; Gris: *C. vernus*; Violeta: *C. serotinus*; Naranja: *C. nudiflorus*.

Las especies *C. nevadensis* y *C. carpetanus* no se diferencian por su contenido en pigmentos, pero se separan en un grupo distinto de las demás por la ausencia de crocinas. Como ocurre con *C. nudiflorus*, también presentan ausencia de los flavonoides correspondientes a los picos 3f y 9f y la presencia de los flavonoides correspondientes a los picos 4f y 6f, presentando la mayor correlación con la componente 2. Las entradas de

#### IV. RESULTADOS

*C. vernus*, forman un grupo separado, si bien no están próximas entre sí. No obstante, tienen en común la presencia de crocina 4c y flavonoide 4f, así como la ausencia de crocina 3c, mostrando la mayor correlación con la componente 3 y una correlación muy baja o negativa para la componente 1 (Figura 293 y Figura 294).

Es de desatacar el perfil idéntico que presentan las entradas de *C. serotinus* procedentes de Jaén (1657), Albacete (2550), La Coruña (2741), Cuenca (2775) y Burgos (3175). Lo mismo sucede con el perfil de las entradas de *C. nevadensis* y *C. carpetanus* (Figura 293).



**Figura 294 . Representación de las entradas en función de las componentes principales 1, 2 y 3. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: *C. nevadensis*; Amarillo: *C. carpetanus*; Blanco: *C. vernus*; Violeta: *C. serotinus*; Naranja: *C. nudiflorus*.**

En resumen, los caracteres relacionados con la presencia o ausencia de los principales picos cromatográficos correspondientes a carotenoides y flavonoides, evaluados en 14 entradas ensayadas, permiten separar y agrupar las entradas en sus correspondientes especies (Figura 294).

## 5.2 ANÁLISIS CLÚSTER CON LOS CARACTERES CUALITATIVOS DE AUSENCIA O PRESENCIA DE LOS PICOS CROMATOGRÁFICOS MÁS IMPORTANTES

Para determinar el grado de asociación entre las entradas se realizó un dendograma a partir de la matriz de distancias formada por todos los caracteres relacionados con la ausencia o presencia de los picos cromatográficos utilizados en el análisis de coordenadas principales (Figura 295). Éste dendograma se obtuvo a partir del coeficientes de asociación de Dice. El árbol generado permitió agrupar correctamente las 14 entradas según su especies (*C. carpetanus*, *C. nevadensis*, *C. vernus*, *C. nudiflorus* y *C. serotinus*).

Se observa la existencia de tres grupos. Uno de ellos constituido por las entradas de *C. serotinus* caracterizado por la ausencia de las crocinas 4c (Crocina *cis*-x) y 6c (Crocina *cis*-4GG), y por la presencia generalizada de todos los flavonoides que se seleccionaron para el análisis. No obstante, hay que señalar la excepción de dos entradas de esta especie que difieren de las restantes por la ausencia de los flavonoides 4 f (Kaempferol 2) o bien el 4f y el 9f (Kaempferol-3-O-glucósido).

El segundo grupo está formado por las especies primaverales que se separaría claramente de las especies otoñales (robustez de nudo 51 y 100%). A su vez, el grupo de las primaverales, con una consistencia del nudo que las une de 58%, se separa en las que tienen crocinas (*C. vernus*) o no (*C. nevadensis* y *C. carpetanus*). Dentro de las que no tiene crocinas, no hay una diferencia clara entre especies, ya que presentan un perfil de carotenoides y flavonoides idéntico. Las entradas de la especie otoñal *C. nudiflorus* tienen un idéntico perfil de crocinas, y un bajo contenido de flavonoides formando un grupo con una consistencia de nudo del 80%.

Este análisis clúster de las entradas realizado con los caracteres relacionados con la ausencia o presencia de las principales crocinas y flavonoides (Figura 295) presenta un elevado y significativo coeficiente de correlación cofenético (0,93), que indica que el método de agrupamiento no ha distorsionado significativamente el resultado.

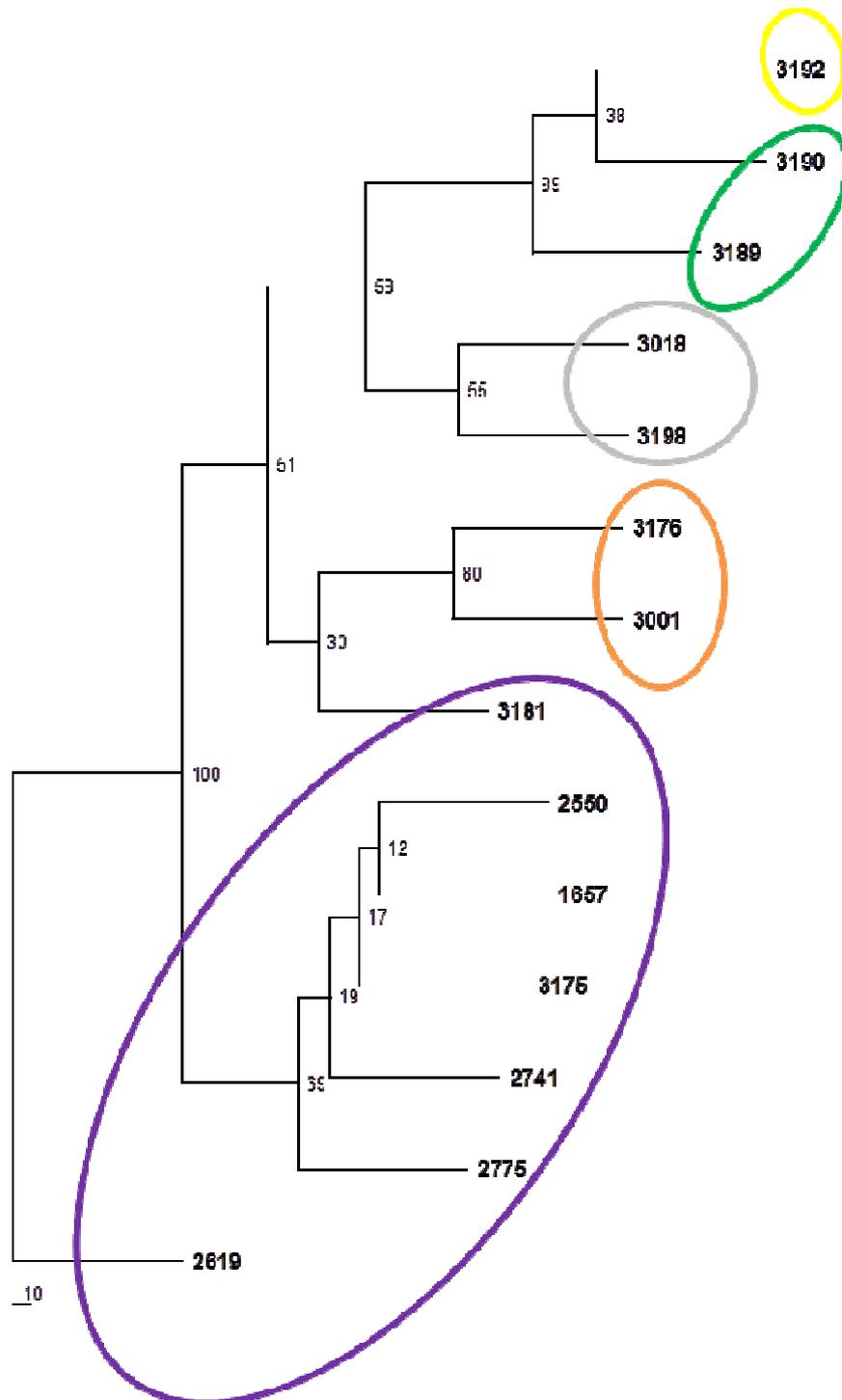


Figura 295 . Dendrograma consenso que representa las entradas según el análisis clúster realizado con los caracteres cualitativos, basado en índice de similitud Simple Matching y el método de análisis UPGMA. Se muestra al lado de cada nodo el número de veces que ese nodo se ha representado en 100 árboles calculados con el programa Phylip. El nombre de la especie y el número de la entrada se encuentra codificado, se puede observar su correspondencia en la tabla 16. Los colores indican la especie en la que se agrupan: Verde: *C. nevadensis*; Amarillo: *C. carpetanus*; Blanco: *C. vernus*; Violeta: *C. serotinus*; Naranja: *C. nudiflorus*.

**6. Estudio preliminar del uso  
de marcadores moleculares  
para la diferenciación  
especies silvestres españolas  
del género *Crocus* spp en  
estado vegetativo**



## 1 ESTUDIO PRELIMINAR DEL USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS* EN ESTADO VEGETATIVO

Aunque se ha conseguido una diferenciación entre las especies españolas de *Crocus* a partir de caracteres morfológicos, es de especial interés disponer de herramientas moleculares que permitan una identificación más rápida e independiente de efectos ambientales, y que no requiera esperar hasta obtener cormos con capacidad de floración. Hay que señalar que ciertas especies de *Crocus* comparten hábitat y que, en muchos casos, es difícil poder identificarlas antes de que el cormo alcance tamaño para florecer, lo que puede requerir varios años de cultivo. Por este motivo, se ha iniciado una línea de caracterización molecular con el fin de seleccionar los métodos más adecuados para nuestro objetivo. Se han puesto a punto protocolos y se han ensayado marcadores de tipo *RAPD* (*Random Amplified Polymorphic DNA*- Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), una metodología basada en la amplificación de intrones, utilizando cebadores diseñados en base al flanqueo de exones en PCR, conocido como *EPIC* (*Exon-Primed Intron-Crossing*) y marcadores de tipo microsatélite (*SSR*, *Simple Sequence Repeat* *microsatélite*, o *STR*, *Short Tandem Repeat*).

El estudio se ha realizado con un máximo de 133 individuos utilizados en el análisis mediante *RAPD* y un mínimo de 34 individuos empleados en el análisis mediante microsatélites. El material utilizado en cada análisis se refleja en la Tabla 145. Estas plantas pertenecen a las 7 especies silvestres españolas del género *Crocus*: *C. nevadensis*, *C. nudiflorus*, *C. vernus*, *C. carpetanus*, *C. clusii*, *C. serotinus* y *C. cambessedesii*, así como de *C. sativus*.

**Tabla 145** Material utilizado en cada uno de los análisis mediante marcadores moleculares

Marcador	Nº individuos	Nº individuos por entrada	Nº de entradas	Nº de entradas por especie
<b>RAPD</b>	133	1-8	26	1-7
<b>EPIC</b>	73	1-3	26	1-7
<b>SSR</b>	34	3-4	12	1-2

### 1.1 EMPLEO DE MARCADORES DE TIPO *RAPD*

#### 1.1.1 TIPADO DE POBLACIONES (*FINGERPRINTING*).

Con el fin de seleccionar los cebadores más adecuados para la PCR, se realizó un sondeo previo en el que se probaron 7 cebadores (OPL-11, OPL-16, OPR-05, OPR-06, OPR-07, OPK-09 y OPK-15) con ADN de 7 muestras, elegidas al azar, una por cada especie estudiada. Algunos de los cebadores produjeron alrededor de decenas fragmentos, pero otros produjeron menos de 10 bandas en total (ver Tabla 146 ).

## IV. RESULTADOS

De estos 6 cebadores se eligió trabajar con OPL-11 y OPL-16, debido a que estos generaron patrones de fragmentos claros y reproducibles. Cada uno de los cebadores generó entre 16 y 20 fragmentos de intensidad óptima, oscilando entre tamaños de 330 y 4000 pares de bases (pb). En total, se obtuvieron 36 marcadores, todos ellos polimórficos.

**Tabla 146** Número de bandas polimórficas y monomórficas obtenida en el test de cebadores realizado con las siete especies analizadas

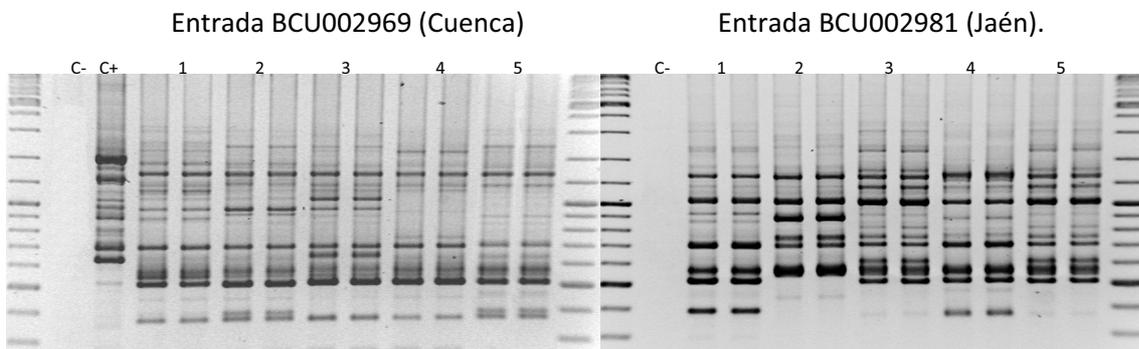
Nº de bandas polimórficas y monomórficas					
Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	Polimórficas	Monomórficas	Total
OPL-11	ACG ATG AGC C	300-4000	16	0	16
OPL-16	AGG TTG CAG G	400-3000	20	0	20
OPR-06	GTC TAC GGC A	650-2500	9	1	10
OPR-07	ACT GGC CTG A	500-3000	16	0	16
OPK-09	TGA GCA CGA G	600-2000	9	0	9
OPK-15	CTC CTG CCA A	350-3000	15	2	17

### 1.1.2 AMPLIFICACIÓN

El número de bandas por especie para el cebador OPL-11 fue de 6 a 14; y para el cebador OPL-16 fue de 4 a 12 (ver Tabla 147). En la Figura 296 y 297 se observan unos ejemplos de los patrones de bandas obtenidos en la especie *C. nevadensis* para cada uno de los cebadores OPL-11 y OPL-16.

**Tabla 147** Número de bandas de cada especie obtenidas mediante los cebadores OPL-11 y OPL-16

Especies	Número de bandas (OPL-11)	Número de bandas (OPL-16)
<i>C. nevadensis</i>	10	7
<i>C. carpetanus</i>	8	4
<i>C. vernus</i>	10	12
<i>C. serotinus</i>	14	10
<i>C. nudiflorus</i>	10	8
<i>C. clusii</i>	8	7
<i>C. cambessedesii</i>	6	7



**Figura 296**. Patrones RAPD obtenidos a partir de la amplificación del ADN de *C. nevadensis*, utilizando el oligonucleótido OPL-11. Siendo: C+: *C. sativus*; C-: control negativo.

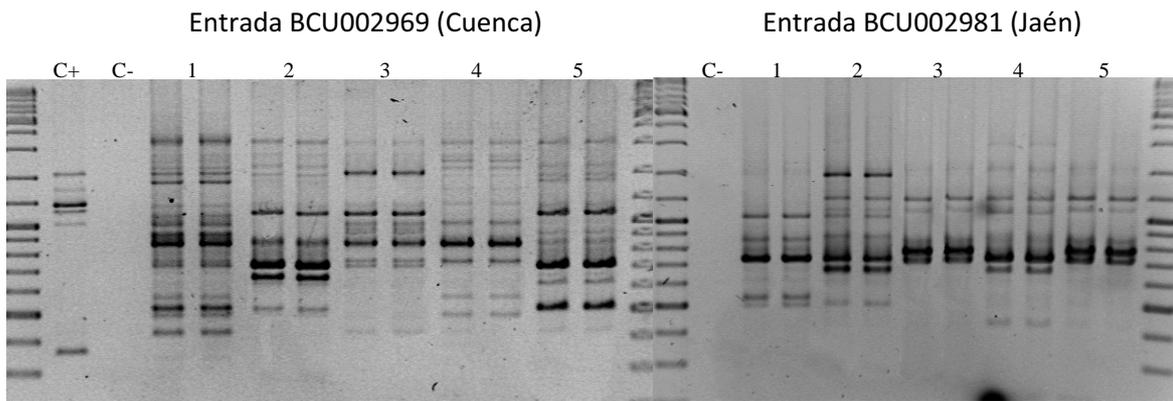


Figura 297 Patrones RAPD obtenidos a partir de la amplificación del ADN de *C. nevadensis*, utilizando el oligonucleótido OPL-16. Siendo: C+: *C. sativus*; C-: control negativo.

En la Tabla 148 se pueden observar aquellas parejas de especies que se pueden separar utilizando los cebadores OPL-11 y OPL-16 porque aparecen bandas de forma constante en una especie que nunca se observan en la otra. De las 21 parejas posibles, se pueden separar 11 parejas de especies. Las bandas útiles para estas separaciones presentan los siguientes tamaños: 570, 700, 850, 1150, 1200, 1300, 1350, 1400, 1450, 1700 y 1900 pb. Al tener en cuenta los dos cebadores, es posible separar entre sí las especies *C. nevadensis*, *C. carpetanus*, *C. vernus* y *C. cambessedesii*. Las especies que muestran mayor complejidad para diferenciarlas de las restantes son *C. clusii*, *C. nudiflorus* y *C. serotinus*.

Tabla 148 Separación de las posibles parejas de especies mediante cada cebador analizado. Rosa: OPL-16; Gris: OPL-11. Mezcla de rosa y gris: separación mediante los dos cebadores.

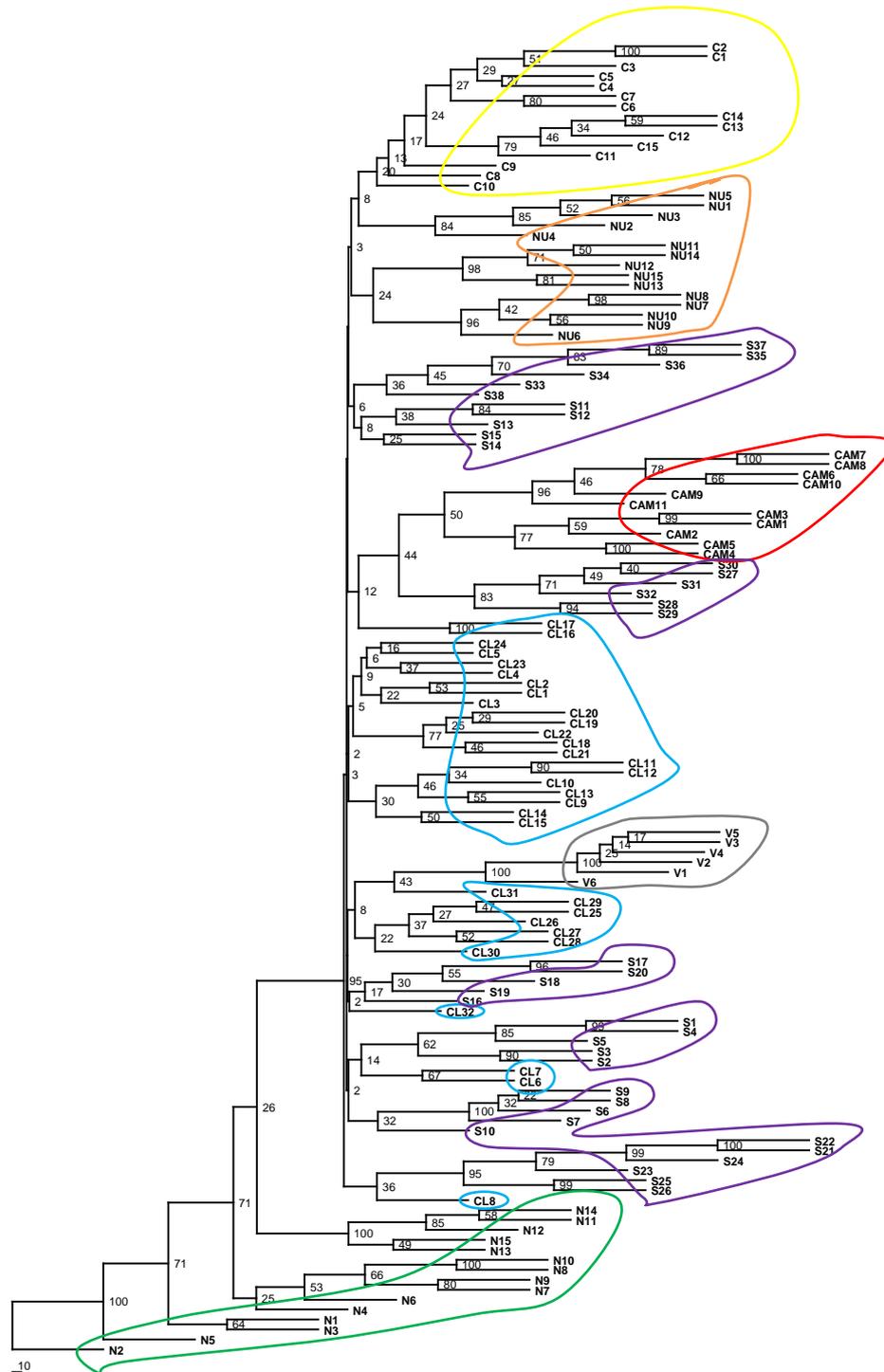
	<i>C. nevadensis</i>	<i>C. carpetanus</i>	<i>C. vernus</i>	<i>C. serotinus</i>	<i>C. nudiflorus</i>	<i>C. clusii</i>	<i>C. cambessedesii</i>
<i>C. nevadensis</i>	Black	Red hatched	Red hatched	White	Red hatched	Grey	Grey
<i>C. carpetanus</i>	White	Black	Grey	White	White	White	Grey
<i>C. vernus</i>	White	White	Black	Grey	Red hatched	White	Red hatched
<i>C. serotinus</i>	White	White	White	Black	White	White	White
<i>C. nudiflorus</i>	White	White	White	White	Black	White	Grey
<i>C. clusii</i>	White	White	White	White	White	Black	White
<i>C. cambessedesii</i>	White	White	White	White	White	White	Black

### 1.1.3 ANÁLISIS CLÚSTER

Se ha construido un dendrograma con las 24 entradas que incluyen a 132 individuos que corresponden a las siete especies de *Crocus* silvestres españolas (Figura 298). Este dendrograma ha sido construido a partir de la matriz de distancias calculadas con la distancia genética de Dice. También se construyó con la distancia genética *Simple Matching* y se obtuvieron resultados similares (dendrograma no mostrado).

En este dendrograma se observa la agrupación de la mayoría de las entradas en sus correspondientes especies, con la excepción de la especie *C. clusii* y *C. serotinus* que muestra una menor agrupación.

## IV. RESULTADOS



**Figura 298** Dendrograma de las relaciones entre individuos de diferentes especies españolas de *Crocus* basado en la distancia genética de Dice usando marcadores RAPD derivados del oligonucleótido OPL-16 y OPL-11. El método de agrupamiento utilizado es el Neighbor-joining. Se indica el valor de la robustez de cada nudo. Los colores y la letra indican la especie en la que se agrupan: Verde- N: *C. nevadensis*; Amarillo-C: *C. carpetanus*; Gris-V: *C. vernus*; Violeta-S: *C. serotinus*; Azul-CL: *C. clusii*; Rojo-CAM: *C. cambessedesii*, Naranja-NU: *C. nudiflorus*.

Se observa un grupo formado por las 3 entradas de *C. nevadensis* (que presentan una robustez de nudo del 26%) y una entrada de *C. serotinus* (BCU003174, S21-S26) procedente de León. Esta unión muestra una robustez de nudo del 95%. Dentro de la

especie *C. nevadensis*, la entrada procedente de Huesca (BCU002992, N11-N15) se encuentra más alejada del resto de entradas procedentes de Cuenca (BCU002969, N1-N5) y Jaén (BCU002981, N6-N10). Estas dos últimas se agrupan con una robustez de nudo del 71%.

Las tres entradas de la especie *C. carpetanus* se agrupan con una robustez de nudo entre los individuos C1-C15 del 20%. Estas a su vez se agrupan con las entradas de *C. nudiflorus*. Dentro de las entradas de *C. nudiflorus*, se observa mayor proximidad entre la entrada procedente de La Rioja BCU003123 (Nu11-Nu15) y la procedente de Huesca BCU003015 (Nu6-Nu10) con una robustez de nudo de 24%.

Las entradas de *C. cambesedesii* se agrupan con una robustez de nudo del 50%.

La única entrada de *C. vernus* analizada presenta todos sus individuos agrupados con una robustez de nudo del 100%. Esta entrada de *C. vernus* se encuentra próxima a una entrada de *C. clusii* procedente de Cádiz (BCU002966, CI26-CI31).

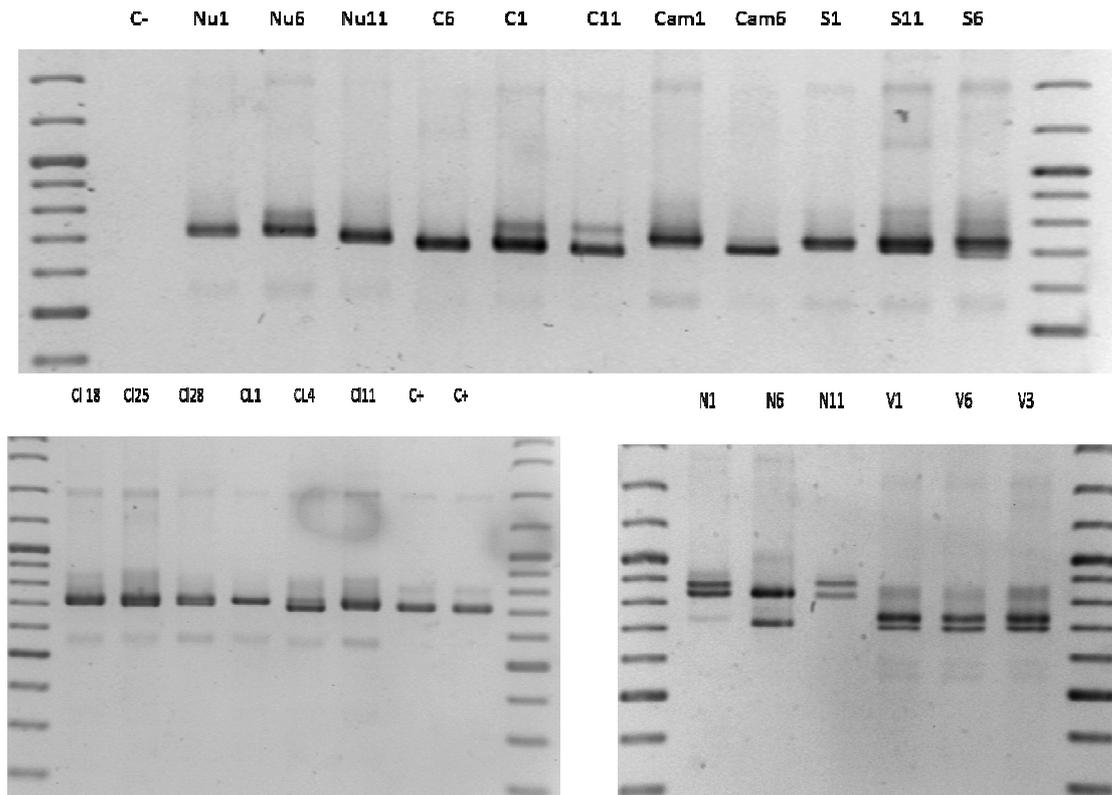
Podemos concluir que los marcadores RAPD parecen suponer una alternativa prometedora para la separación de las especies españolas de *Crocus*. Los dos cebadores empleados (OPL-16 y OPL-11) han permitido la diferenciación de algunas de las especies estudiadas. Algunas de las especies, como *C. serotinus* y *C. clusii*, no muestran apenas bandas diferenciadoras que permitan separarlas del resto. Para mejorar este aspecto es necesaria la utilización de marcadores RAPD adicionales.

## 1.2 EMPLEO DE MARCADORES DE TIPO EPIC Y SSR

Si bien, posiblemente, se podrían separar algunas de las posibles parejas de especies (11 de las 21 combinaciones posibles) utilizando marcadores SCAR desarrollados a partir de los marcadores tipo RAPD que se han obtenido utilizando los cebadores OPL-11 y OPL-16, no es posible separar todas las especies entre sí. Con este objetivo, se han aplicado otras técnicas basadas en el uso de marcadores de tipo EPIC y microsatélites.

Se ha estudiado la posibilidad de distinguir entre especies a través de los productos de amplificación obtenidos a partir del cebador descrito Castillo *et al.* (2005) para el gen  $\beta$ -*caroteno hidroxilasa* (*BCH*) utilizado en la especie *C. sativus*. Éste amplifica la región 5' del intrón I hasta el final 3' del intrón II del gen *BCH* (Figura 299). Se ha utilizado el protocolo de amplificación que citan los autores con la modificación realizada por Alcázar (2013) para mejorar la amplificación en las especies silvestres de *Crocus*.

## IV. RESULTADOS



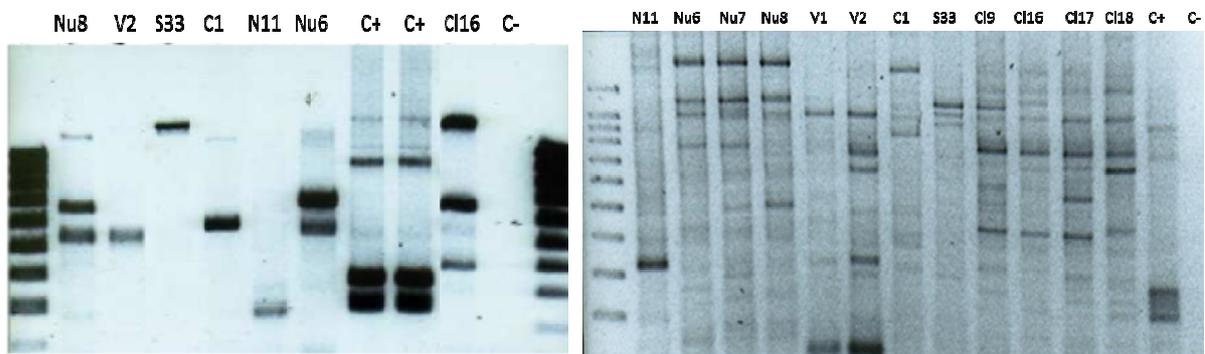
**Figura 299** Patrones de marcadores EPIC obtenidos a partir de la amplificación de la región 5' del intrón I hasta el final 3' del intrón II del gen *BCH* utilizando el cebador descrito Castillo *et al.* (2005) de las distintas especies españolas de *Crocus*: N: *C. nevadensis*, C: *C. carpetanus*, V: *C. vernus*, S: *C. serotinus*, Nu: *C. nudiflorus*, CL: *C. clusii*, C+: *C. sativus* y C-: control negativo.

Los resultados de la amplificación del gen *BCH* indican que no aparecen diferencias claras entre especies para poderlo utilizar como marcador (Figura 299). La única diferencia detectada es la presencia de una banda poco visible a 550pb que no aparece en *C. nevadensis*.

Adicionalmente, se hizo un pequeño ensayo para explorar la posibilidad de utilizar marcadores tipo microsatélites para diferenciar especies. Se utilizaron pares de cebadores 13M, 36M, 47M, 50M, 55M y 62M seleccionados a partir de los trabajos desarrollados para azafrán por Moraga *et al.* (2009) en el que se obtenía amplificación del DNA de *C. sativus* utilizando dichos cebadores. También se emplearon los cebadores Cs8, Cs11, Cs20, Cs28, Cs39 y Cs42 utilizados en el trabajo de Nemati *et al.* (2012), a partir del protocolo modificado por Alcázar (2013) para mejorar la amplificación en las especies silvestres.

Se observó que el número y tamaño de las bandas obtenidas utilizando los cebadores 13M, 36M, 47M, 50M y 55M no se correspondía con el tamaño esperado de los microsatélites, apareciendo productos con grandes diferencias en tamaño dentro de una misma entrada. Los resultados que señalaron la posibilidad de separar algunas parejas de especies, se obtuvieron utilizando el cebador 62M y Cs11 (Figura 300). Ambos cebadores podrían ser útiles para separar *C. nudiflorus*, *C. serotinus* o *C. clusii* entre sí. Asimismo

podrían ayudar a separar las parejas de especies *C. serotinus* y *C. nevadensis*, *C. serotinus* y *C. carpetanus*, *C. nudiflorus* y *C. carpetanus*, y también la pareja formada por *C. clusii* y *C. vernus*. No obstante, sería necesario ampliar este trabajo con más poblaciones para confirmar que esta metodología pueda ser de utilidad para la diferenciación de estas especies.



**Figura 300** Patrones SSR obtenidos utilizando el oligonucleótido 62 M (izquierda) y Cs11 (derecha) a partir de la amplificación del ADN de distintas especies españolas de *Crocus*: N: *C. nevadensis*, C: *C. carpetanus*, V: *C. vernus*, S: *C. serotinus*, Nu: *C. nudiflorus*, CL: *C. clusii*, C+: *C. sativus* y C-: control negativo.



# **V. DISCUSIÓN**



## 1 LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE FORESTAL DE LAS DIVERSAS ESPECIES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO CROCUS.

Todas las especies estudiadas son de ámbito forestal, aunque algunas poblaciones de especies otoñales pueden encontrarse en áreas del litoral muy cercanas a la playa.

En cuanto a la **distribución geográfica** de las especies, *C. serotinus* y *C. nevadensis* son las que tienen una presencia más extensa en el territorio nacional. *C. serotinus* aparece, de norte a sur sin traspasar el Sistema Ibérico (Valdés *et al.* 1987; Cebolla-Lozano y Rivas-Ponce, 1994; Aafi *et al.*, 2005; Laliga, 2007) mientras que *C. nevadensis* se extiende en la zona este, de norte a sur (Fernández-Liencre y Fernández-López, 1996; Lorda-López, 2001; Martínez-Labarga y Nogales-Ruiz, 2011). Las diferentes poblaciones citadas por los autores, para la especie *C. serotinus*, corresponden con algunas de las encontradas en las jornadas de colecta. A esta lista habría que añadir las nuevas poblaciones en La Coruña, Toledo y Jaén para las que no se ha dado una ubicación concreta por los autores hasta el momento. No obstante, aunque algunos autores han citado esta especie en zonas costeras de Andalucía (Rivas-Martinez *et al.*, 1980), el material colectado en diferentes localidades de Huelva corresponde a *C. clusii*. Las zonas de observación de la especie *C. nevadensis* durante las jornadas de colecta se ajustan a las localizaciones citadas en la bibliografía, aunque se han encontrado dos poblaciones no citadas antes por los autores (Motilla del Palancar y Olmeda del Rey en Cuenca).

Las especies *C. nudiflorus*, *C. carpetanus*, *C. vernus*, *C. clusii* y *C. cambessedesii* se localizan en zonas más restringidas. Así, *C. carpetanus* se distribuye principalmente a lo largo del macizo Herciniano (Martín-Blanco y Carrasco, 2005). Se han colectado poblaciones de todos aquellos lugares en que esta especie está citada (sierra de Gredos y Guadarrama, e incluso en la provincia de Orense), con la excepción de las zonas al sur del Sistema Central. No se han localizado nuevas poblaciones.

*C. nudiflorus* se localiza en la zona norte de la Península Ibérica (Pablos-Alcaraz, 2004; Martín-Blanco y Carrasco, 2005; Pérez Latorre *et al.*, 2009). Durante las jornadas de colecta, esta especie fue localizada únicamente en los Pirineos (Huesca y Lérida), Burgos y La Rioja, tal y como describe Barra (1982). No se localizó en las provincia de Ciudad Real, donde ha sido citada (Pablos-Alcaraz, 2004). En estas localidades, sin embargo, se localizó la especie *C. serotinus*, por lo que no pueden descartarse problemas de identificación, dada la similitud entre ambas especies. Tampoco se localizó en zonas próximas a provincias citadas por otros autores (Zamora por Gutiérrez-García, 1998; Málaga por Pérez-Latorre *et al.* en 2009). Se realizaron diferentes jornadas de colecta en los Montes de León, y en el sur de Andalucía sin éxito. Hay que destacar que se localizaron dos puntos geográficos hasta ahora no citados: en la Sierra de Guara en Jaca y en Benasque (Huesca).

La localización de las poblaciones de *C. vernus* subsp. *vernus* están descritas en Pirineos (Romero-Rodríguez, 1983; Carreras i Raurell *et al.*, 1993; Benito-Alonso, 2005). En este trabajo, no ha sido posible localizar material en otras zonas de la Península, Hay que señalar, la dificultad de encontrar esta especie durante su floración, ya que es efímera y sucede justo después de los deshielos en alta montaña.

La localización de la especie *C. clusii* está descrita, principalmente, en zonas litorales del suroeste de Andalucía (Pérez-Latorre *et al.*, 2003; López *et al.*, 2011), donde la hemos localizado y colectado. Sin embargo, a pesar de estar citada en la Cordillera Cantábrica (Romero-Rodríguez, 1983) y en la Sierra de Aracena en Huelva (Rivera y Cabezudo, 1985) no se ha encontrado dicho material. Tras estudiar el material colectado de esa zona, se concluyó que es la especie *C. serotinus*. Tampoco en este caso podemos excluir un problema de identificación, dado que la única diferencia clara entre ambas especies es la capa más externa de la túnica, no siempre visible.

La especie *C. cambessedesii* es un endemismo de las Islas Baleares (Alomar *et al.*, 1982) de donde se ha colectado y, más concretamente, en Mallorca.

En ocasiones, las especies **comparten hábitat**, y es importante destacar que cuando esto sucede, siempre coexisten especies con diferente fecha de floración, y no se puede dar la hibridación entre las mismas. Así, en Pirineos *C. nevadensis* que florece a finales de febrero, convive con *C. vernus* que florece en abril (Fernández y Sesé, 1989). *C. nevadensis* se encuentra con *C. serotinus*, de floración otoñal, en la Sierra Cazorla en Jaén, en la Sierra de Altomira (Cuenca) y en Sierra Nevada (Granada). *C. serotinus* y *C. carpetanus*, que florece a finales de febrero, comparten territorio en Galicia (Pino-Pérez *et al.*, 2007) y en Madrid. Asimismo, *C. nudiflorus* y *C. vernus* se encuentran en una misma área en Jaca (Huesca). El hecho de que no cohabiten especies con fecha similar de floración podría ser una ventaja, ya que no se compite por recursos relacionados con la reproducción como podrían ser polinizadores y, asimismo, dada la cercanía de las especies se evitarían polinizaciones que dieran lugar a cruces interespecíficos en que se iniciara el proceso pero no fuera viable.

En cuanto a la **altitud** a la que crecen, sólo encontramos una especie que no tiene un amplio margen de crecimiento para este parámetro. Se trata de *C. vernus* que se encuentra principalmente en zonas de una altitud de 1300 a 2200 msnm en Pirineos (Benito-Alonso, 2008). Es una especie de floración más tardía. Las especies que florecen a finales del invierno no se encuentran a menos de 350 m de altitud, pero pueden encontrarse también a más de 2000 msnm. Así, *C. nevadensis* se localiza en altitudes variables desde 350 msnm en Lérida, hasta zonas más altas de 2000 msnm en Sierra Nevada. La altitud a la que se puede encontrar *C. carpetanus*, que también florece a finales de febrero, varía desde los 370 m en Barbadás (Orense) y los 2100 en la Sierra de Guadarrama (Madrid) (Cebolla Lozano *et al.*, 1994). Las especies de floración otoñal, se localizan a muy diversas altitudes que van desde el nivel del mar hasta alta montaña. Así, *C. serotinus* se puede encontrar en zonas de costa de Galicia o

Cádiz, a 60 msnm (Valdés *et al.*, 1987) e incluso en alta montaña (2000 msnm), como en Navacerrada. *C. cambessedesii* se localiza en zonas de costa principalmente, pero también a grandes altitudes en la Sierra de la Tramontana (Castro y Rosselló, 2006). *C. nudiflorus* aparece a 40-150 msnm en Cantabria (Sánchez y Valdeolivas, 1995) y a 2500 msnm en el Parque Nacional de Aigüestortes ([www.anthos.es](http://www.anthos.es)).

Las **condiciones edafológicas** requeridas por las especies son muy variables. Así, las especies con un área de distribución más amplia (*C. serotinus* y *C. nevadensis*) presentan mayor tolerancia (Hervás y Fernández, 2000). Sin embargo, *C. carpetanus*, como se ha comentado, requiere de forma estricta suelos ácidos, y sólo la localizamos en suelos graníticos del Sistema Central y Galicia (García-Río, 2006). *C. nudiflorus* y *C. vernus* también se localizan principalmente en macizos ácidos del norte de la península. La especie endémica de las Islas Baleares requiere, sin embargo, suelos ricos en bases, y crece en las grietas y orificios de estas rocas carstificadas.

Así, los requerimientos edáficos, junto con los requerimientos térmicos para su reproducción, están condicionando, en parte, el mapa de distribución de las especies del género *Crocus* y existe una gran variación entre las distintas especies de la península.

En conjunto, el trabajo desarrollado ha permitido conseguir una representación importante del germoplasma de las diferentes especies del género *Crocus* en España, que se conserva en el Banco de Germoplasma Vegetal del CIAF de Albaladejito. Se ha estudiado su distribución y las características edafo-climáticas del ambiente forestal en que habitan, lo que supondrá una base para el posible establecimiento de una estrategia de conservación *in situ* y *ex situ*, junto con los estudios relativos a aspectos fisiológicos. Asimismo, hay que señalar que no sólo se ha comprobado el mantenimiento de poblaciones ya citadas, sino que se han descubierto nuevas poblaciones de estas especies en lugares no descritos con anterioridad.

### 2 VARIABILIDAD PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS DE LAS ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO *CROCUS*

Tras ponerse de manifiesto en el primer congreso mundial sobre azafrán (ISHS, Octubre 2003), la necesidad de medidas urgentes para proteger la diversidad en este género, se ha llevado a cabo un intenso trabajo de recolección, que hemos descrito para el grupo de especies españolas, que constituyen el objetivo de esta tesis. La utilidad de este trabajo de recolección está estrechamente relacionada con la disponibilidad y fiabilidad sobre la variación existente entre los distintos materiales recolectados. Dado su uso en jardinería, su posible utilidad como fuente de compuestos bioactivos útiles en la industria fitosanitaria y farmacéutica, y el hecho de que puedan ser fuente de variabilidad para la mejora del azafrán, es de interés el estudio de la variabilidad existente para un gran número de caracteres. Además, se debe recoger información que facilite la conservación y multiplicación de estas especies *ex situ*, en bancos de germoplasma vegetal.

La caracterización del material vegetal debe estar basada en descriptores previamente definidos. Al inicio de este trabajo, no existía una lista de Descriptores para el género *Crocus* y gran parte del valor de esta caracterización, que exponemos a continuación, ha sido el contribuir al desarrollo de dicha lista. En base a nuestras observaciones, junto con las realizadas en otras especies, se elaboró una lista preliminar de descriptores que fue mejorándose mediante un trabajo iterativo que sirvió de base para la versión definitiva publicada por *Biodiversity International*, UPV, UCLM y JCCM (2015).

En los últimos diez años, se han realizado diversos estudios morfológicos y anatómicos sobre la variabilidad entre especies silvestres del género *Crocus*, pero se ha trabajado únicamente con especie localizadas en el este de Europa, concretamente en Turquía (*C. olivieri*, *C. pallasii*, *C. flavus*, *C. biflorus* y *C. chrisantous*, entre otros) (Erol y Kuçuker, 2007; Kandemir, 2010 y 2011; Candan, 2012 y 2015) y no existe un estudio de la estructura de la variación. Hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio sobre variabilidad en este género de las especies silvestres españolas. Únicamente existen los trabajos de descripción de las especies llevados a cabo por Mathew (1982) y Rukšāns (2010), así como trabajos de descripción morfológica y de localización de las especies españolas (De Bolòs y Vigo, 1996; Barra, 1982; López *et al.*, 2011; Guillén, 2014) que no son estudios en profundidad sobre la variabilidad de estas especies.

#### 2.1 VARIABILIDAD OBSERVADA EN CARACTERES CUANTITATIVOS

##### *Estructura de la variación*

El estudio de la estructura de la variación observada señala que la mayor fuente de variación es aquella observada entre especies o bien la variación entre plantas dentro de entrada, siendo de menor importancia la variación entre entradas, si bien es significativa para la mayoría de caracteres estudiados. Así, parece que hay una

importante variabilidad genética entre especies, pero la variabilidad genética entre entradas suele ser menor que la variación debida a efectos ambientales. No obstante, existen diferencias, en función del grupo de caracteres a los que nos refiramos.

Así, para los caracteres analizados relacionados con **la morfología y la producción de flores**, se ha observado una gran variabilidad entre especies, fundamentalmente para el tamaño de los pétalos y la longitud del estilo, siendo escasa la variabilidad entre entradas. Tiene especial relevancia la baja variabilidad entre entradas y el alto componente de influencia ambiental en el carácter número de flores por brote. Una elevada variabilidad ambiental para el tamaño y la producción de flores, y mayor que aquella observada entre las entradas de distinto origen, se ha observado también en la especie cultivada *C. sativus* (De los Mozos *et al.*, 2009; Pastor-Férriz, 2011). La reproducción exclusivamente vegetativa del azafrán cultivado hace difícil el surgimiento de variación genética y es esperable, debido a la gran mezcla e intercambio de materiales a nivel no sólo nacional sino internacional, una escasa variabilidad entre azafranes de distintos orígenes. En el caso de las especies silvestres, cabría esperar una mayor variabilidad entre entradas que en el caso del azafrán. Los resultados observados nos indican que podría haber una tasa de reproducción vegetativa mayor que por semilla. Se ha descrito la necesidad de polinización por insectos de las flores de *Crocus*, que se han identificado como una de las principales fuentes de polen y néctar, cuando se empieza a derretir la nieve, para los insectos de ciertas áreas de clima frío en Europa (Maurizio y Grafl, 1969; Mehrl, 1987; Jaroszyńska, 1992; Dalby, 2000; Kołtowski, 2006 citado por Weryszko-Chmielewska y Chwil, 2011). No obstante hay pocos estudios sobre esta materia (Mathew, 1982). Asimismo, se desconoce el grado de alogamia de las distintas especies, y sólo *C. vernus* se ha descrito como especie con un alto grado de alogamia (Weryszko-Chmielewska y Chwil, 2011). La necesidad de insectos para la polinización que no son abundantes en las zonas frías en que crecen muchas de estas especies, así como la necesidad de 3 años para conseguir un cormo de tamaño para florecer, son factores que podrían condicionar una mayor importancia de la reproducción vegetativa. Por otra parte, el tipo de crecimiento en rodales con ejemplares muy cercanos también podría ser un factor de disminución de la variación.

Dado el uso de estas especies como ornamentales y fuente de compuestos bioactivos, es de interés señalar que las especies de floración otoñal son las que presentan un mayor **tamaño de los verticilos florales**, con la excepción de *C. cambessedesii*. En este trabajo, esta especie desarrolla los verticilos florales de menor tamaño, tal y como señalan Mathew (1982) y Guillén (2014). En los distintos trabajos en que se describe la morfología de las especies españolas de floración otoñal, no hay acuerdo sobre la diferencia entre especies en el tamaño de los verticilos florales. Así, en el trabajo de Mathew (1982) se señalan diferencias entre *C. serotinus* y *C. clusii*, siendo *C. serotinus* la especie con flores de mayor tamaño. En el trabajo posterior de

Guillén (2014) no aparecen estas diferencias entre especies. Nuestros resultados a partir de un mayor número de entradas muestran una mayor variabilidad para este carácter en ambas especies, pero existen entradas de *C. serotinus* de mayor tamaño que cualquiera de *C. clusii*.

Las especies de floración otoñal desarrollan las flores de mayor altura (suma de la longitud del pedúnculo y la de los tépalos), rasgo que podría ser de gran interés en la especie cultivada. Un aumento en la longitud de las flores facilitaría las tareas de recolección de la flor de la especie. Cabe señalar que en los trabajos de Mathew (1982) y Guillén (2014) se indica que las flores de *C. nudiflorus* pueden alcanzar una longitud tres veces superior al resto de flores otoñales. Sin embargo, en nuestro ensayo, llevado a cabo en condiciones ambientales similares para todas las especies, no encontramos diferencias de altura de la flor entre estas especies.

Dentro de los caracteres relacionados con el **desarrollo vegetativo**, sólo los relacionados con el desarrollo de la hoja durante la floración y la anchura de la misma tienen una mayor componente de variación interespecífica que ambiental. Las diferencias entre especies observadas en el desarrollo vegetativo durante la floración están descritas en trabajos previos (Mathew, 1982; Rukšāns, 2010; Guillén, 2014), y nos permite hacer tres grupos de especies. Un primer grupo estaría formado por las especies de floración primaveral y *C. cambessedesii*, que florecen cuando la hoja ha salido al exterior; un segundo grupo formado por *C. serotinus* y *C. clusii* que florecen y sacan la hoja prácticamente al mismo tiempo; y un tercer grupo formado únicamente por la especie que presenta histerantia, *C. nudiflorus*, que saca las hojas al exterior meses después de florecer.

Como ocurre para los caracteres florales, una elevada variabilidad ambiental y mayor que aquella observada entre las entradas de distinto origen, se ha observado también para los caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo al final del ciclo, si bien aunque baja, la variación entre entradas es significativa. En la especie cultivada *C. sativus*, Pastor-Férriz (2011) ha observado la misma estructura de la variación para este grupo de caracteres. Asimismo, señala que los caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo al final del ciclo, con excepción de la longitud de la hoja, presentan una elevada correlación con el tamaño del cormo madre muy influido por factores culturales.

Son también las especies de floración otoñal las que muestran un mayor **desarrollo vegetativo** al final de su ciclo, exceptuando *C. nudiflorus* que está entre aquellas de menor longitud. Hay que indicar, sin embargo, la discrepancia de nuestros resultados con los de otros autores que describen estas especies. Así, en los trabajos de Mathew (1982) y en los de Guillén (2014), basados en los anteriores, se dice que la longitud de la hoja de *C. nudiflorus* puede llegar a ser superior que la del resto de especies. No obstante, hay que tener presente que las hojas de *C. nudiflorus*, debido a su histerantia, salen al final del invierno, cuando las temperaturas comienzan a subir,

al mismo tiempo que sacan su hoja las especies primaverales, por lo que el hecho de que la hoja sea más corta en *C. nudiflorus* que en especies otoñales no está en desacuerdo con criterios fisiológicos, aunque no podemos descartar que existan poblaciones no colectadas que presenten esta mayor tasa de crecimiento. Cabe destacar la longitud de hoja que se ha observado en una entrada de *C. vernus*, que es llamativamente superior a la descrita en la literatura (media de 27,4 cm, frente a los 10-15 cm descritos) (Mathew, 1982; Guillén, 2014). Sin embargo, la anchura se ajusta a las medidas indicadas por los mismos autores. Estas diferencias podrían ser debidas a que el material de estudio procede de vivero y ha podido llevarse a cabo una selección.

La variación presente en los caracteres relacionados con el **tamaño de la semilla** es principalmente de naturaleza genética, siendo mayores las componentes de variación entre especies y entre entradas que la variación ambiental. El desarrollo del fruto (la cápsula) está, sin embargo, muy afectado por factores ambientales, siendo mucho menor la variación entre entradas. Incluso las diferentes especies tienen un tamaño de cápsula muy similar. No existen trabajos previos que estudien en profundidad la variabilidad para estos caracteres en el género *Crocus*.

El peso de las semillas ha sido considerado uno de los caracteres fenotípicamente menos variables en muchas especies (Harper, 1970; Fenner, 1992). No obstante, hay autores que señalan que si bien el peso medio se mantiene constante, hay una gran variabilidad intraespecífica debida a efectos ambientales, que se ha visto enmascarada por la forma en que se ha medido este carácter (peso de 100 o 1000 semillas) (Thompson, 1984, Milberg 1996; Michaels *et al.*, 1998). Hay pocos estudios sobre la base genética para el control del tamaño de la semilla y, por el contrario, diversos trabajos sugieren que la variación en el tamaño tiene una gran influencia ambiental (Winn, 1991; Fenner, 1992; Wolfe, 1995; citados por Milberg, 1996). Nuestros resultados en las especies estudiadas de *Crocus* señalan, sin embargo, una importante componente genética en la variación observada para el tamaño de la semilla, que es de mayor cuantía que la componente ambiental. Algunos modelos evolutivos han predicho el mantenimiento de la variación del tamaño de la semilla por la interacción de la selección en tres caracteres: dispersión, tamaño y latencia (Banovetz y Scheiner, 1994).

El tamaño de las semillas, que es el carácter con una menor influencia ambiental y un mayor peso de la variación debida a factores genéticos, es mayor en la especie *C. nevadensis*. El hecho de que esta especie aparezca a mediados-finales de febrero cuando se derrite la nieve, y se desarrolle en unas condiciones más desfavorables y quizás con un desarrollo más lento de las hojas por las bajas temperaturas, puede ser la causa de que se requieran mayor cantidad de reservas. Un mayor tamaño de la semilla se ha relacionado con su mayor viabilidad, capacidad de germinación, dispersión y supervivencia (Banovetz y Scheiner, 1994). No obstante, parece que el proceso de germinación es más lento (Hendrix, 1984). La mayoría de estudios señalan

que las semillas más grandes serán favorecidas por la selección. En este sentido, las condiciones más desfavorables de *C. nevadensis* podrían requerir este mayor tamaño. También observamos una mayor lentitud del proceso, tal y como hemos mencionado que está descrito.

Es importante destacar que si bien, en general, encontramos una variabilidad entre entradas menor que aquella encontrada dentro de entrada, hay diferencias entre especies. Así, las especie *C. nevadensis* y *C. serotinus* son las que presentan una mayor variabilidad entre entradas para los caracteres relacionados con la morfología floral, la producción de flores y el desarrollo vegetativo. Este hecho puede tener relación con la amplia extensión de su distribución en el territorio peninsular, habiéndose analizado entradas de una gran parte del territorio que cubren. Sin embargo, las otras especies tienen una distribución más restringida y las poblaciones se encuentran relativamente próximas, como es el caso de *C. vernus* o *C. nudiflorus*.

Para las especies *C. serotinus* y *C. nevadensis* encontramos una variación intraespecífica para el tamaño de la corola de interés en la obtención de cultivares para uso ornamental. Dentro de estas especies observamos flores que presentan unas diferencias de tamaño entre un 30-40%. Así, dentro de la especie *C. serotinus*, las plantas de la entrada BCU003172 poseen flores un 30% mayores que aquellas de la entrada BCU003175. En *C. nevadensis*, la entrada BCU001742 desarrolla flores un 40% más grandes que las que presenta la entrada BCU002359. También existe una interesante variación en la altura de la flor que puede llegar a ser casi el doble en unas entradas que en otras. Anteras grandes contrastando con la corola, es un carácter que puede tener interés y para el que encontramos también entradas que lo presentan. Para el desarrollo vegetativo, encontramos entradas dentro de estas especies, con doble longitud y número de hojas que las que menor tamaño o número presentan. En la especie *C. serotinus*, la entrada BCU002367 desarrolla hojas con longitudes un 50% mayor que las plantas de la entrada BCU002742. En esta misma especie, la entrada BCU002775 presenta doble número de hojas y de brotes por cormo que la entrada BCU002959. En la especie *C. nevadensis*, la entrada BCU002871 desarrolla el doble de hojas que la entrada BCU002999. La producción de un mayor número de brotes implica una mayor tasa de multiplicación vegetativa. Las plantas que desarrollan más cantidad de hojas u hojas de mayor tamaño, tienen una mayor tasa fotosintética y dan lugar a cormos más grandes, con mayor capacidad para florecer y tasa de multiplicación. Así, esta mayor producción de material vegetativo es de interés para la industria farmacéutica y fitosanitaria, como también para empresas de planta ornamental.

### *Análisis de las correlaciones*

Los resultados de correlación entre especies para **caracteres relacionados con el tamaño de la flor**, muestran que aquellas especies con los tépalos mayores, también presentan una mayor longitud del estilo y estambres mayores. Además, el tamaño de

ambos verticilos de tépalos está muy relacionado entre sí. Las especies otoñales tienen todos sus verticilos mayores que las primaverales. No obstante, la altura de la flor no muestra correlación con el tamaño de la misma. Estos resultados, también se presentan al estudiar la correlación entre las distintas entradas (en aquellas especies con elevado número de entradas) de una especie y han sido descritos también para la especie cultivada, *C. sativus* (De los Mozos *et al.*, 2009; Pastor-Férriz, 2011). La correlación entre el tamaño de todos los verticilos facilitaría una selección tanto para fines ornamentales como para la obtención de compuestos bioactivos. El hecho de que la altura del pedúnculo no se relacione con el tamaño de la flor tiene interés, pues con independencia del tamaño de la corola de la flor, podríamos conseguir flores fáciles de cosechar. Las correlaciones entre plantas dentro de entrada, que son, fundamentalmente, de naturaleza ambiental, nos indican que los factores ambientales están actuando en el mismo sentido. Unas condiciones más favorables al desarrollo de un verticilo, favorecen el desarrollo de los restantes. No obstante, en este tipo de correlaciones, sí que observamos que aquellos factores ambientales o epigenéticos que llevan al desarrollo de flores mayores, también dan lugar a flores más altas.

En relación a los caracteres vegetativos, se observa una correlación entre el número de brotes y la anchura de la hoja que tiene una componente genética importante, ya que se presenta al estudiar la variación entre especies y entre entradas. No podemos descartar que esta relación esté mediada por el tamaño del cormo, que difiere entre especies, habiéndose observado cormos mayores en aquellas especies de hoja más ancha, como es el caso de *C. vernus*. También en otras bulbosas, como es el caso del ajo, se ha observado que aquellas entradas con propágulos de mayor peso tienen las hojas más anchas (Singh, 2013). El carácter número de brotes también está correlacionado positivamente, a nivel de entrada, con el número de hojas en el brote principal y negativamente con la longitud de la hoja, y las correlaciones ambientales actúan en el mismo sentido, aunque son de menor cuantía. Estas correlaciones también podrían estar mediadas por el tamaño del cormo, como ocurre en azafrán, donde se ha descrito esta relación (Pastor-Férriz, 2011). También se ha observado que, tanto a nivel genético como ambiental, las plantas con mayor número de brotes tienen las hojas más cortas. Esta relación tiene sentido fisiológico dado que las reservas del cormo madre y los nutrientes son limitados. El carácter número de brotes por cormo tiene gran interés dado que cada brote da lugar a un cormo hijo. En un programa de mejora de producción de cormos sería, sin duda, un carácter a mejorar, que conllevaría a su vez, hojas más anchas y en mayor número, aunque de menor longitud. No obstante, la disminución en superficie debida a esa menor longitud es compensada largamente por el mayor número de hojas.

Existe una estrecha relación entre el desarrollo vegetativo y la floración. Las especies con un mayor desarrollo vegetativo tienen un mayor número de flores, pero también dentro de especie se observa esta relación. Aquellas entradas con más hojas

producen más flores. También en la especie cultivada se ha observado esta correlación (Baghalian *et al.*, 2010). Dentro de especie, la razón fisiológica parece clara. Un mayor desarrollo vegetativo dará cormos hijos de mayor tamaño que producen más flores. Si bien entre especies no tiene por qué presentarse necesariamente esta relación, ya que cada especie puede tener sus requerimientos metabólicos, en las especies analizadas sí que se presenta, señalando que en este aspecto no deben existir grandes diferencias fisiológicas.

Hay que señalar que correlaciones de naturaleza fundamentalmente ambiental, que aparecen en 3 de las especies estudiadas, señalan que los factores que llevan a un mayor desarrollo de las hojas durante la floración también dan lugar a flores de mayor tamaño. Dado que la flor no deja de ser un brote de crecimiento limitado y modificado para llevar a cabo funciones reproductoras, parece lógico que factores nutricionales que favorecen el desarrollo de las hojas también favorezcan el desarrollo de las flores ya formadas. Tampoco podemos excluir que la producción de hormonas o mayor cantidad de fotoasimilados en las plantas con hojas más desarrolladas influyeran en el tamaño de la flor. En la especie *C. nevadensis* esta relación tiene una componente genotípica y se observa una diferencia entre entradas en el tamaño de la flor que se correlaciona con el desarrollo de las hojas en ese momento.

El análisis de correlación entre especies para los caracteres relacionados con el fruto y las semillas, señala que en las especies en que se desarrollan los frutos con menor número de semillas, éstas alcanzan mayor tamaño. Como hemos señalado anteriormente, aquella especie de semillas más grandes es *C. nevadensis* que, a su vez, es aquella que produce menor número de semillas. Dado que como comentábamos con anterioridad un mayor tamaño de la semilla está relacionado con una mayor viabilidad (Hendrix, 1984; Banovetz y Scheiner, 1994), parece que en esta especie se ha seleccionado una estrategia que prefiere un menor número de semillas pero con más reservas que garanticen su supervivencia tras el deshielo. Sin embargo, dentro de especie esta relación no existe, y las relaciones tanto de naturaleza genética como ambiental indican que el tamaño de la semilla y su número están dependiendo del tamaño de la cápsula. Existe una amplia evidencia de que el control del tamaño del fruto está ejercido, fundamentalmente, por las hormonas producidas por las semillas (Taiz y Zeiger, 2010), lo que explicaría la relación observada.

Las semillas son el órgano más utilizado en el mantenimiento y conservación de recursos fitogenéticos porque requieren de inversiones menores y sus instalaciones no resultan tan sofisticadas como las que requieren otro tipo de reproducción. El conocimiento de este proceso en las distintas especies, su correlación con otros caracteres y la influencia de factores ambientales es de gran interés.

En la especie *C. serotinus* se observa que aquellas entradas de flores de mayor altura y con corolas de mayor tamaño, son las que posteriormente dan lugar a frutos más grandes y con mayor número de semillas. Las flores de este género presentan un

ovario subterráneo que emerge 5-6 meses más tarde de que la flor se haya marchitado y desprendido. No obstante, se forma al mismo tiempo que la flor. El tamaño del fruto depende de dos factores principales: el número de células del ovario antes de la anthesis y el crecimiento celular que tiene lugar con posterioridad. Es posible que aquellos factores del desarrollo que lleven a las flores a tener más células y de un mayor tamaño, también conduzcan a tener un ovario en el que hayan tenido lugar un mayor número de divisiones celulares y pueda alcanzar en marzo-abril mayores dimensiones. Dado que en esta especie se han podido caracterizar un buen número de frutos y existe variabilidad significativa para el tamaño de la flor, se ha podido observar bien esta relación. Esta correlación parece darse fundamentalmente a nivel de entrada, y podría pensarse que tuviera una componente genética importante. El hecho de que al seleccionar flores más grandes, también seleccionemos una mayor producción de semillas, tiene especial interés en estas especies con tasas de reproducción no muy elevadas.

Hay que indicar que este trabajo de correlaciones entre caracteres tanto florales, como vegetativos o de semilla no se había efectuado en este género con anterioridad con la excepción de algún trabajo en azafrán (De los Mozos *et al.*, 2009; Baghalian *et al.*, 2010; Pastor-Férriz, 2011) en el que no se pueden medir caracteres relacionados con el fruto y la semilla, dada la esterilidad de la especie.

## 2.2 VARIABILIDAD OBSERVADA EN CARACTERES CUALITATIVOS

La presente caracterización se ha llevado a cabo basándonos en la lista de descriptores de *Crocus* spp. (*Biodiversity International*, UPV, UCLM y JCCM, 2015) que incluye diversos caracteres que no se habían contemplado hasta la fecha en la literatura que describe estas especies (Mathew, 1982; Guillén, 2014), si bien se han mencionado en alguna publicación de especies turcas (Kerndorff *et al.*, 2012). Tal es el caso del patrón del color de los tépalos (uniforme o discontinuo, es decir, con gradación de dos colores), patrón de la venación (uniforme o continuo, sólo venas principales, sólo venas localizadas en la base, venación discontinua), tipo de venación (bien definidas, plumosas, plumosas con mancha), color de manchas en la base de los tépalos, o coloración de la cápsula, todos ellos de interés si consideramos el uso ornamental de estas especies.

El género *Crocus* muestra una gran variabilidad para el colorido y forma de los distintos verticilos florales, lo que lo hace muy apreciado por el sector de jardinería, llegando a darse incluso coleccionistas especializados en este género.

### *Caracteres con elevada variabilidad*

Para algunos caracteres, se da una gran variabilidad interespecífica pero uniformidad dentro de la especie. Para otros, fundamentalmente los relacionados con el color y la venación de los tépalos, se observa una gran variabilidad intraespecífica.

En el caso de las especies españolas esta variabilidad no ha sido descrita hasta la fecha, dándose en los manuales sobre la descripción del género, unas notas muy generales.

El análisis de la variabilidad para caracteres cualitativos realizado en esta tesis y que considera entradas de las diferentes áreas geográficas en que se encuentran las especies, nos indican que, en general, todos los caracteres que describen **el color de los tépalos** son los que muestran una mayor variabilidad, con hasta ocho niveles de colores diferentes para el color del fondo de los tépalos, o siete niveles en el color de la mancha de los tépalos, y dentro de cada especie pueden presentarse hasta cuatro coloraciones diferentes de estos órganos.

La variabilidad intraespecífica observada en **la forma de los tépalos, en la forma del ápice** y en su **venación**, es también elevada, y superior a lo descrito hasta al momento para todas las especies silvestres de *Crocus* en España (Mathew, 1982; Guillén, 2014), lo que se explica por el número de poblaciones de cada especie evaluadas en el presente trabajo. Así por ejemplo, la forma del tépalo se describe en la literatura como oblanceolada o abovada. En nuestro trabajo, sin embargo, se observan hasta cinco niveles diferentes y, en general, todas las especies presentan cuatro niveles. En especies procedentes de Turquía, también se ha descrito gran variabilidad intraespecífica en relación con el color y la venación de los tépalos (Kerndorff *et al.*, 2012; Erol *et al.*, 2014). Asimismo, en azafrán, se ha descrito variación en la forma del tépalo y en la venación de los mismos (Grilli-Caiola *et al.*, 2001).

Una mayor diversidad de color de tépalos, desde blanco hasta violeta, como también gradaciones de estos mismos colores, junto con la variabilidad observada en el patrón de venación que contrasta con los fondos más claros, da lugar a flores de gran vistosidad y variedad para crear diferentes composiciones en jardinería. Los materiales que mostraron mayor diversidad pertenecen a la especie *C. nevadensis* (BCU002981 y BCU2982 localizadas en Jaén) y *C. carpetanus* (BCU002971 y BCU002973 colectadas en Madrid). Las especies *C. serotinus* y *C. clusii* presentan también elevada variabilidad para el color del fondo del tépalo, pero son flores menos vistosas, porque sus colores se encuentran siempre en la gama violeta, y con una venación que no contrasta con el fondo del tépalo. Los caracteres de *C. serotinus* para los que se observa una gran variabilidad, como son el color de las manchas o color del inicio del tubo floral que son especialmente variables en la entrada BCU002741 de La Coruña, tienen un menor interés. La variedad de formas y colores es menor, en general, para la especie *C. vernus*, *C. cambessedesii* y *C. nudiflorus*.

Los caracteres **localización y color de la mancha de los tépalos, coloración del inicio del tubo floral y color y forma de la cápsula**, aunque de menor interés ornamental, son también muy variables en estas especies, presentándose entre 4 y 7 niveles diferentes de colores y formas. Para estos caracteres, la variabilidad intraespecífica observada es también muy elevada, habiendo especies que muestran casi todos los niveles posibles. Estos descriptores se citan en la literatura, pero

raramente se describe la variabilidad que existe en estas especies, pues no son usados para la clasificación (Mathew, 1982). Cabe destacar, que para algunos caracteres se han observado colores que no se habían descrito antes para ninguna de las especies. También hay que señalar que, por el contrario, alguna de las variantes de estos caracteres que se ha descrito en la literatura, no se ha observado en nuestros materiales. Tal es el caso del carácter coloración del inicio del tubo floral para el que se ha observado el color amarillo no descrito con anterioridad, al mismo tiempo que en *C. cambessedesii* no se observaron flores con tubo floral lila descrito en trabajos previos (Mathew, 1982; Guillén, 2014).

Los caracteres **continuación de las venas hacia el tubo floral, fragancia de flor, tamaño relativo entre bráctea y bractéola y los relacionados con el color y la textura de la bráctea**, presentan menos niveles de variación (entre 2 y 3), pero una elevada variabilidad intraespecífica, mostrando todas las especies todos los niveles observados en la mayoría de caracteres. Estos caracteres no serían de utilidad para diferenciar especies y, con la excepción de la fragancia de la flor, tienen poca importancia ornamental.

La **presencia de bractéola** es un carácter muy utilizado en clasificación y que es uniforme dentro de especie, y nuestra caracterización confirma este hecho. Sin embargo, el tamaño relativo entre bráctea y bractéola y el color de estas estructuras foliáceas también han sido utilizados en taxonomía y para describir especies (Mathew, 1982; Guillén, 2014), y nosotros encontramos variabilidad intraespecífica. Así, por ejemplo, la bractéola en *C. carpetanus* y *C. cambessedesii* se ha descrito como blanca sin variación intraespecífica, pero en nuestro trabajo hay un gran número de plantas (29,4-50%) con brácteas verdes en estas especies. Además, se ha detectado un nivel de color adicional, marrón claro. En cuanto a la textura de la bráctea, en la bibliografía (Mathew, 1982; Guillén, 2014) se indica que siempre es membranosa en estas especies. Sin embargo, nosotros hemos observado variabilidad en cuatro especies, siendo de destacar un porcentaje elevado de brácteas de textura rígida en las especies *C. vernus* y *C. carpetanus*.

#### *Caracteres de menor variabilidad*

Los caracteres relacionados con la morfología del estigma, del estambre, de la garganta floral, de las hojas, de la túnica, de la semilla, la época de floración y la presencia de la hoja en este periodo, así como la presencia de estolones, muestran menores niveles de variación y también una mayor uniformidad intraespecífica, por lo que podrían tener interés para diferenciar las especies.

Los caracteres relacionados con la **morfología del estigma, del estambre y de la garganta floral**, así como el carácter presencia de la hoja en floración y época de floración, son caracteres muy utilizados en taxonomía y que siempre se presentan en los trabajos descriptivos (Mathew, 1982; Guillén, 2014). Para la mayoría de estos

descriptores, nuestras observaciones coinciden con las indicadas por otros autores (Mathew, 1982; Guillén, 2014). Cabe citar alguna excepción, en relación a la morfología de la garganta floral. En la bibliografía se describe un color lila o púrpura que aparece en *C. vernus*, *C. serotinus*, *C. clusii*, y *C. nudiflorus* (Mathew, 1982; Guillén, 2014), y que nosotros nunca hemos observado. Asimismo, en relación con la presencia de papilas o pelos en la garganta floral, que han sido caracteres de importancia en taxonomía también encontramos discrepancias con lo publicado con anterioridad. Así, las especies *C. carpetanus* y *C. nudiflorus* se han descrito sin ningún apéndice en la garganta. Sin embargo, nosotros hemos observado pequeñas papilas en diversos ejemplares, llegando al 70% en *C. nudiflorus*. Asimismo, las especies *C. serotinus* y *C. clusii* han sido descritas con garganta pilosa (Mathew, 1982; Guillén, 2014), pero en nuestro trabajo se observa variabilidad, de forma que no todas las flores muestran este rasgo.

Los caracteres **forma de la semilla, textura de su superficie**, y los que describen el **desarrollo de la carúncula y el rafe**, a pesar de su uniformidad intraespecífica, no permiten por si solos separar todas las especies. Mediante técnicas de microscopía de barrido se han evaluado los caracteres presencia o ausencia de ceras y la presencia de estructuras en la superficie (ausencia de estructuras, presencia de papilas, escamas triangulares o escamas con ápice distal cilíndrico), que se han mostrado invariables dentro de especie, y de gran utilidad para diferenciarlas. El estudio sobre la variabilidad observada en semillas de las especies silvestres de *Crocus* españoles aquí presentado, es el más amplio y detallado hasta el momento. Los trabajos previos realizados mediante esta técnica con semillas de *C. vernus* subsp. *vernus* (Ryszard y Rafifiski; 1978; Harpke *et. al.*, 2013) y *C. nevadensis* (Harpke *et. al.*, 2013) obtienen idéntico resultado al presentado en esta tesis.

Es interesante resaltar que los estudios en relación con la morfología de las semillas y su fisiología son muy escasos en este género, en el que la propagación a nivel comercial se realiza mediante cormos, pues partiendo de la semilla harían falta al menos 3 años para obtener un cormo con capacidad de floración.

Un estudio anatómico ha permitido caracterizar la disposición de los distintos tejidos en la hoja de estas especies. La hoja del género *Crocus* presenta una sección muy característica, formada por una quilla central y dos brazos laterales, cuyos márgenes generalmente se curvan hacia la misma en mayor o menor grado. La única excepción es *C. carpetanus* cuya sección se ha descrito como semicilíndrica. En cuanto a la forma de la quilla y de los brazos, la posición y la longitud relativa de los mismos, existe una elevada variabilidad que se estima de gran utilidad para su taxonomía (Rudall y Mathew, 1990).

La **sección transversal de las hojas** observada en este trabajo para cada especie silvestre española coincide, a grandes rasgos, con las secciones descritas por los diferentes autores (Maw, 1886; Barra, 1982; Mathew, 1982; Guillén, 2014), si bien en

este estudio encontramos mayores diferencias en la anchura del limbo, la forma de la quilla y la curvatura de los extremos del limbo. Asimismo, en *C. carpetanus* cuya hoja se ha descrito como semicilíndrica, encontramos una morfología más bien en forma de media luna. Existen muchas similitudes en la anatomía de las distintas hojas estudiadas: La distribución de los haces vasculares es muy similar en todas las especies, siendo de mayor anchura aquellos localizados en los extremos de la quilla y de los brazos. En el mesófilo de todas las especies observamos tanto parénquima en empalizada como esponjoso y el primero se encuentra tanto en el haz como en el envés, aunque de forma más abundante en el haz, con la excepción de *C. carpetanus* en que se encuentra fundamentalmente en el envés.

En todas las especies existe una línea blanquecina que se observa en el haz de la hoja y que corresponde a células parenquimáticas que se encuentran en el centro de la hoja y se extienden desde el haz hasta el extremo final de la quilla. Se ha discutido la naturaleza de este parénquima, habiendo autores que lo han identificado como parénquima aerífero (Rudall y Mathew, 1990; Özdemir *et al.*, 2006; Yetişen *et al.*, 2013) y otros como acuífero (López *et al.*, 2000). Nuestros resultados muestran las características de un parénquima acuífero, sin espacios intercelulares regulares bien delimitados típicos de plantas acuáticas. Creemos que los espacios que se han observado por otros autores y en algunas de nuestras preparaciones son roturas de este parénquima acuífero de densidad muy distinta a los tejidos que le rodean. Una diferencia interespecífica a destacar en nuestro trabajo es la diferencia en la presencia de estomas en el haz que sólo son abundantes en *C. nevadensis*, siendo poco frecuentes en *C. vernus* y *C. carpetanus* y ausentes en las restantes especies. La ubicación de los estomas sólo en el envés ha sido también señalada en *C. aerioides* y *C. flavus* (Özdemir *et al.*, 2006). Hay que indicar que el estudio actual presentado en esta tesis es el único estudio anatómico de la hoja de las especies españolas del género *Crocus*.

El **aspecto de la túnica** y su persistencia son caracteres invariantes dentro de especies, por lo que resultan de interés para su diferenciación. El carácter persistencia se ha descrito como sujeto a condiciones ambientales (Mathew, 1982). Sin embargo, se ha observado cierta constancia del carácter en, al menos, una generación. Las especies que muestran siempre túnica persistente son *C. nevadensis* y *C. carpetanus*, la primera con gran adaptación a ambientes tanto secos como húmedos, y la segunda que crece en suelos ácidos y húmedos de alta montaña.

La túnica es, en algunos casos, el único elemento para diferenciar especies. Al inicio de este trabajo se consideraron tres subespecies dentro de la especie *C. serotinus* (Mathew, 1982). La diferencia clave para separar estas subespecies era el aspecto de la túnica, la subespecie *salzmanii* presentaba túnicas membranosas, mientras que las subespecies *serotinus* y *clusii* mostraban túnicas reticuladas, que se diferenciaban únicamente por el grosor de la retícula. La separación de estas dos últimas atendía

también a diferencias en el número de hojas y en la presencia de éstas durante la floración (Mathew, 1982). La valoración de estos caracteres en conjunto no facilitó nunca la separación de las subespecies. Actualmente, se tiene en cuenta la taxonomía propuesta por Flora Ibérica (Guillén, 2014), que consideran como taxones diferentes las especies *C. serotinus* (con túnica membranosa) y *C. clusii* (túnica reticulada), de forma que es posible separar estas dos especies con grandes similitudes en la morfología floral, de la hoja, de las cápsulas y semillas, de época de floración, salida de la hoja y hábitat.

En nuestro estudio sólo se observaron estructuras estoloníferas en algunos ejemplares de la especie *C. nudiflorus*. Sin embargo, la **presencia de estolones** ha sido también descrita en algunas poblaciones de *C. serotinus* (Mathew, 1982; Guillén, 2014). Estas estructuras se han citado en otras especies del género como en *C. fleischeri*, *C. gargaricus* y *C. kotschyanus*, entre otras (Mathew, 1982).

### *Agrupación de las especies en base a los caracteres estudiados*

El análisis de componentes y coordenadas principales así como el análisis clúster nos indica que los caracteres analizados nos permiten separar claramente todas las entradas en 7 grupos que corresponden a las 7 especies. Vemos un primer grupo formado por las entradas de las 3 especies *C. clusii*, *C. serotinus* y *C. nudiflorus*, tienen en común que sus verticilos florales son más grandes, la altura de flor de mayor tamaño, los estigmas de color amarillo-naranja con múltiples ramificaciones, floración otoñal y la presencia de excrecencias en la superficie de la semilla con base triangular y ápice distal cilíndrico. Dentro de este grupo, observamos que *C. nudiflorus* podría separarse de *C. serotinus* y *C. clusii* por la ausencia de hojas durante la floración y por ser estas más cortas y anchas. A su vez, *C. serotinus* forma un grupo separado, aunque muy cercano a *C. clusii* del que se diferencia por una hoja más larga y fina, garganta con pelos, y el tipo de túnica.

Un segundo grupo estaría formado por las especies *C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus*. Esta última se separa de las dos primeras, fundamentalmente, por su color anaranjado del estilo que contrasta con el blanco-crema de las anteriores, porque no tiene bractéola y sus hojas son más cortas y anchas. *C. nevadensis* y *C. carpetanus* forman dos grupos separados aunque muy próximos y que pueden diferenciarse por la forma de la hoja, el aspecto de la túnica y la pubescencia de la garganta floral.

Otro grupo está formado por *C. cambessedesii*, especie también de floración otoñal, que presenta, una importante altura de flor como el resto de flores otoñales, pero sus estilos tienen tres ramificaciones, desarrolla las flores con menor tamaño de corola, estilo y estambres que el resto de otoñales, y presenta venación plumosa púrpura o violeta en tépalos de fondo blanco o crema y superficie de la semilla con apéndices cilíndricos.

El agrupamiento obtenido a partir del dendrograma es idéntico al realizado por Mathew (1982) a partir de caracteres morfológicos, y muy similar al representado por Harpke *et al.*, 2013, a partir de secuencias de ADN plastidial y ADN ribosomal, así como al trabajo de Petersen *et al.* (2008), basado en la secuencia de cinco regiones plastidiales. Esta confirmación de los resultados revela la naturaleza de base genética de los caracteres estudiados.

Trabajos previos han señalado de especial interés el color y tamaño de los tépalos y de la antera, la estructura y color del estilo, la presencia o ausencia de pelos en la garganta floral, presencia o ausencia de bracteola, número de hojas, momento de salida de la hoja respecto de la floración (sinantia o histerantia), periodo floral y la morfología de la túnica del cormo (Mathew, 1982; Ozdemir, 2004; Kandemir, 2010; Selvi y Satil, 2013), así como, la sección transversal de la hoja y las características de la superficie de la semilla (Mathew, 1982; Erol y Kuçuker, 2007; Ozdemir *et al.* 2010; Candan, 2012 y 2015). Todos ellos han sido utilizados en este trabajo.

Otros estudios que han permitido agrupar exitosamente entradas de *C. vernus*, *C. ilvensis* y *C. etruscus*, que habitan la isla de Elba, en Italia (Peruzzi y Carta, 2011), han utilizado los siguientes caracteres morfológicos: tamaño del cormo, tamaño de las fibras del cormo, longitud del tubo floral, longitud de los verticilos florales, color de la garganta, ausencia o presencia de venación, longitud de la antera, longitud de las ramificaciones del estigma y relación de longitud entre la antera y el estilo. Con la excepción del tamaño del cormo, que creemos muy influido por factores ambientales y de edad de la plantación, así como de la relación entre la longitud de la antera y del estilo, todos los demás han sido utilizados en este trabajo.

También un análisis de coordenadas principales realizado con diferentes entradas de las especies incluidas en la serie Verni (*C. heuffelianus*, *C. neapolitanus*, *C. neglectus*, *C. siculus* y *C. vernus*) logra separar todas ellas teniendo en cuenta los siguientes caracteres cuantitativos y cualitativos: la longitud y color de los tépalos, la ausencia/presencia de venación, color de la garganta floral, periodo de floración, longitud del tubo floral, longitud de los lóbulos del estigma, diferencia entre la longitud del estigma y la antera, longitud de la antera y anchura de las fibras del cormo (Harpke *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta la importancia de los caracteres de nuestro estudio para separar especies, así como en jardinería, su base genética, y la consistencia con los trabajos que se han llevado a cabo anteriormente por otros autores y en otras especies (proyecto 018 AGRI GEN-RES 870/2004), todos ellos han sido incluidos en la lista de descriptores de *Bioversity International* que se ha elaborado en el marco del citado proyecto y otras iniciativas nacionales.

Cuando hemos intentado identificar las especies españolas de *Crocus* a partir de un solo órgano, es decir utilizando los grupos de caracteres referentes a la morfología de

la flor, la semilla, la hoja, o el cormo, no ha sido posible separar todas las especies, siendo necesario tener en cuenta caracteres estudiados en diferentes órganos. El trabajo de otros autores en especies turcas señala también esta necesidad (Ozdemir y Kiliç, 2008). No obstante, es de interés intentar minimizar el número de caracteres para poder identificar las especies a su llegada al Banco de Germoplasma, y seleccionar los más fáciles de medir, que suelen ser de tipo cualitativo.

Con este objetivo, hemos seleccionado 7 caracteres que nos permiten diferenciar todas las especies españolas y que las agrupan de forma similar a cómo lo hace el estudio con 34 caracteres. El bajo número de caracteres seleccionados y la facilidad para medirlos, facilitará enormemente las tareas en el Banco de Germoplasma y, dado el estudio previo de variabilidad llevado a cabo, se garantiza, en buena medida, una identificación precisa de las especies, mejorándose el trabajo realizado hasta la fecha (Mathew, 1982; Guillén, 2014) que no tenía en cuenta la variabilidad que existe para algunos de los caracteres con que se trabajaba.

### 3 FENOLOGÍA DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO *CROCUS*

Los trabajos sobre variabilidad en el comportamiento fenológico de este género se centran en la especie cultivada (De los Mozos *et al.*, 2009; Pastor-Férriz, 2011). Los estudios descriptivos realizados sobre las especies silvestres no analizan la variación del carácter en profundidad, limitándose a dar un amplio período de tiempo en que podría suceder el fenómeno y, además, hablan básicamente de la floración (Mathew, 1982; Espinosa Jiménez, 1994; Rukšāns, 2010; Guillén, 2014, referencias disponibles en <http://www.anthos.es> y las citadas en el apartado de Introducción 1.7.2.).

En este trabajo se ha realizado un análisis detallado de la variabilidad para caracteres fenológicos entre las siete especies de *Crocus* silvestres españolas. En cultivo protegido se evalúan 112 entradas que configuran una representación del género en España. También se ha realizado un trabajo en ambiente controlado con una muestra reducida de entradas.

#### *Cultivo protegido*

El carácter fecha de **salida de la flor**, que es de gran interés, presenta muy escasa variación dentro de especie, si bien la variación interespecífica es elevada, habiendo una diferencia de hasta 174 días entre *C. serotinus* que es la más precoz y *C. vernus* que es la más tardía. No parece posible poder ampliar el período de floración de una de estas especies basándonos en las diferencias genéticas intraespecíficas. Parece que sería necesario recurrir a técnicas relacionadas con la manipulación de las condiciones ambientales o bien a incorporar variabilidad extraespecífica. Trabajos llevados a cabo en la especie *C. sativus* han puesto de manifiesto la posibilidad de espaciar la floración en este género mediante el manejo de las temperaturas de conservación de los cormos y la fecha de siembra (Molina *et al.*, 2004b y 2005b). El tamaño del cormo también es un factor correlacionado positivamente con la precocidad (Douglas *et al.*, 2014).

La **brotación** presenta una mayor variación intraespecífica, si bien es de menor cuantía que entre especies. La brotación puede ser de un brote floral o vegetativo, o bien suceder sincrónicamente la salida de la flor y de la hoja. Nuestros resultados muestran que en las especies primaverales, la floración se retrasa entre 53-69 días tras la salida de la hoja. En las especies otoñales, sin embargo, encontramos casos en los que la floración se adelanta un poco a la salida de la hoja (11 días), como ocurre en *C. serotinus*, pero también hay especies en que la hoja sale entre 10 y 30 días antes que la flor, como es el caso de *C. clusii* y *C. cambessedesii*. Finalmente, *C. nudiflorus*, especie otoñal con una marcada histerantia, la flor se adelanta 71 días a la salida de la hoja. La existencia de variabilidad intraespecífica que corresponde a un 34% de la observada, hace pensar en la posibilidad de utilizar una selección intraespecífica para modificar este carácter. Es preciso señalar el interés que tendría poder espaciar la floración de la salida de la hoja en aquellos casos donde se requiriera la cosecha de la

flor, por tener un uso en la industria de compuestos bioactivos. Asimismo, incorporar el carácter de histerantia al azafrán, sería un hito importante, en la medida en que permitiría facilitar enormemente la mecanización de la recogida. Se ha descrito que el desarrollo de los cormos a una temperatura de 15°C constantes (Halevy, 1989) y en condiciones de secano (Moya *et al.*, 2003) retrasarían la salida de la hoja en *C. sativus*. No obstante, en el caso de *C. nudiflorus*, que habita en terrenos del Pirineo con bastante humedad en otoño no se puede pensar que las condiciones de secano produzcan este fenómeno, sino más bien en la necesidad de algún requerimiento térmico para la salida de la hoja que no presenta la especie cultivada. En nuestros ensayos el retraso de la salida de *C. nudiflorus* tampoco se puede explicar por un fenómeno de sequía.

La diferencia entre especies en la **salida del fruto** es mucho menor que para la salida de la flor. Con independencia de la fecha de floración, los frutos emergen entre mediados de febrero y mediados de abril y no existen diferencias significativas para la fecha de secado del fruto que tiene lugar en mayo. Así, las especies primaverales requieren completar el desarrollo de la cápsula en menor tiempo que las otoñales. No obstante, este hecho no influye en el tamaño final alcanzado de las cápsulas o de las semillas.

La **senescencia de la hoja** tiene una importante variación intraespecífica, de mayor cuantía que aquella entre especies. En *C. serotinus* pueden haber diferencias de 40 días entre dos entradas para el momento en que se seca la hoja. Estas diferencias pueden ser tanto de naturaleza genética como epigenética. Un secado posterior de la hoja tiene interés debido a que supone un mayor tiempo de producción de fotoasimilados y, por tanto, del tamaño del cormo hijo. No obstante, trabajos en azafrán y *C. vernus* señalan que la limitación en el tamaño final alcanzado puede ser más una limitación en el sumidero que una limitación en las fuentes (Lundmark *et al.*, 2009; Lapointe, 2001; Renau-Morata *et al.*, 2013).

### *Cultivo controlado (17°C constantes)*

El cultivo a temperatura constante de 17°C no modifica el orden relativo de **floración** de las especies, si bien se adelanta la **brotación** y la floración en la mayoría de especies. Estos resultados apoyan la variación genética observada, ya que en un ambiente tan controlado deben ser las diferencias de esta naturaleza las responsables de las variaciones en la emergencia de la flor, y que pueden deberse a variaciones tanto en el proceso de inducción floral como en la emergencia del primordio floral ya formado. El adelanto en la brotación de plantas cultivadas en condiciones de cámara (17°C) respecto de aquellas cultivadas en el campo, se observó también en la especie cultivada *C. sativus* (Koocheki *et al.*, 2006).

Este experimento descarta la necesidad de frío para la **formación del meristemo floral** ya que en ningún momento la temperatura fue menor de 17°C. En relación a la

salida de la flores, es de destacar la especie *C. nevadensis* que adelanta la floración 40 días respecto a su desarrollo en el umbráculo. En *C. vernus*, el momento de la floración prácticamente no se ve alterado. Este hecho puede ser significativo y puede indicar que la floración en esta especie no es tan dependiente de las variaciones térmicas en este rango ensayado. En su ambiente natural es también la flor que más tarda en aparecer.

En relación a la **senescencia de la hoja**, esta temperatura constante adelanta el proceso en todas las especies, excepto en *C. vernus* y *C. nudiflorus*, en que la hoja sale más tardíamente. Este hecho podría deberse a que, mientras en las restantes especies y en nuestros experimentos, es el final del desarrollo del cormo hijo el que marca el secado de la hoja, en estas especies, que comienzan más tarde a producir fotoasimilados, el secado de la hoja en invernadero se debe, fundamentalmente a la temperatura. Un descenso de las mismas prolonga la vida de éstas, dado que el cormo hijo no ha completado su crecimiento tan pronto como en las otras especies.

En relación con la duración de la **vida de la hoja**, observamos que las especies cuya hoja sale primero (*C. serotinus*, *C. carpetanus* y *C. nevadensis*) ven acortado su ciclo de vida a 17°C en relación con aquél (cultivo protegido) en que se dan temperaturas bajas al final del otoño y en el invierno. En el caso de *C. serotinus*, esta disminución puede llegar a ser de casi 50 días. En estas especies podría ser que, como se ha descrito en otras bulbosas (De Hertogh y Le Nard; 1993; Lapointe y Lerat, 2006; Lundmark *et al.*, 2009; Gandin *et al.*, 2011; Khodorova y Boitel-Conti, 2013), la ausencia de frío invernal durante el periodo de crecimiento pueda conducir a un desarrollo más rápido, una floración más temprana y una reducción del ciclo vital de la planta. Una vez estas especies han brotado, florecido y se ha desarrollado el cormo, la ausencia de temperaturas elevadas al final de la primavera, como sucede en cultivo protegido a partir de la mitad del mes de abril, no parece alargar la duración del cultivo.

En las especies *C. vernus* y *C. nudiflorus*, aunque también en ausencia de frío invernal se adelanta la brotación, brotan más tarde que las anteriores y su ciclo de vida es más largo. En ausencia de temperaturas elevadas, el ciclo se alarga. Si bien el frío puede influir en la salida de la hoja, es clara la diferencia genética entre especies a esta respuesta. Además, la velocidad de desarrollo de los cormos hijos puede influir en un secado más o menos precoz de esta hoja. Si el cormo hijo tiene un desarrollo más lento, la ausencia de subidas de temperaturas a partir de mayo alargará la vida de la hoja, como resultaría si se diera una limitación en la fotosíntesis por sumidero que hemos señalado anteriormente (Lundmark *et al.*, 2009; Lapointe, 2001; Renau-Morata *et al.*, 2013). El alargamiento del ciclo vegetativo en plantas bulbosas al disminuir la temperatura también ha sido señalado por otros autores (De Hertogh y Le Nard; 1993; Lapointe y Lerat, 2006; Lundmark *et al.*, 2009; Gandin *et al.*, 2011; Khodorova y Boitel-Conti, 2013).

### *Comparación de diferentes ambientes (protegido, controlado y ambiente natural)*

La **floración** observada en campo durante las colectas se ajusta a los trabajos descriptivos *in situ*, si bien estos trabajos previos citan fechas de floración más tardías que nosotros no hemos detectado (Mathew, 1982; Espinosa Jiménez, 1994; ver apartado Introducción 7.2.). Probablemente sea debido a que sus trabajos se basan en citas de diversos autores, observaciones de diferentes años y es un muestreo más amplio que el nuestro.

Si comparamos el comportamiento de las especies en los tres ambientes de desarrollo (en cultivo protegido, en cámaras o en su ambiente natural) observamos que las especies otoñales tienen un desarrollo más precoz en su ambiente natural y las especies primaverales tienen una floración más temprana en cultivo protegido o controlado. El cultivo en umbráculo retrasa la llegada del frío al inicio del otoño, y adelanta el calor al inicio de la primavera, lo que podría explicar estos periodos de floración.

Como hemos señalado, anteriormente, al comparar la floración en el umbráculo y en cámaras, observamos que también en su ambiente natural se observa el mismo orden de floración.

En ambiente controlado el período de floración es muy corto para la mayoría de las especies, lo que no ocurre en cultivo protegido donde dada la mayor cantidad de entradas y la mayor variación ambiental se encuentra una gran heterogeneidad. Las especies más ampliamente distribuidas son las que presentan una mayor extensión de este período.

### *Influencia del tamaño del cormo en la fenología*

El tamaño del cormo es el factor más estudiado en la capacidad de floración, ya que es el aspecto de mayor interés en azafrán, *C. sativus*. Es sabido que, en las bulbosas, existe un tamaño crítico del bulbo a partir del cual es posible la floración. En *C. sativus*, se ha visto que los cormos de mayor tamaño son los que mayor número de flores producen (Pandy y Srivastava 1979; Negbi *et al.*, 1989; De Mastro y Ruta, 1993; Le Nard y De Hertog, 1993, De Juan *et al.*, 2009; Douglas *et al.*, 2013). No hay consenso en cuanto al peso mínimo necesario para obtener la floración en la especie cultivada, pudiera ser porque no siempre se ha hecho un estudio concreto para averiguar este aspecto y, en ocasiones, se trata de observaciones realizadas en ensayos que tienen otros objetivos de estudio. Así, Benschop (1993) señaló que el diámetro del cormo de *C. sativus* tiene que ser de más de 1 cm para poder florecer. Negbi *et al.*, (1989) observaron que es necesario cormos de más de 3,2 g, mientras que otros autores indican que es mejor cormos de más de 2,5 cm de diámetro, que corresponden a 7,3g aproximadamente (Plessner *et al.*, 1989; Tamaro, 1999). De Juan *et al.*, (2009) obtuvieron mejores producciones de flor con cormos de más de 2,25 cm (5 g). Sin embargo, McGimpsey *et al.*, (1997) no obtuvieron flor con cormos de menos de 6,9g.

Los cormos comerciales tienen un diámetro entre 2,5-3,5 cm, que equivalen a cormos de 8-16g (Kumar *et al.*, 2009). Nuestros resultados reflejan la existencia de este tamaño crítico también en las especies silvestres de *Crocus*, observándose flores únicamente en cormos de determinado peso inicial que, en general, está próximo a 1g, un peso considerablemente más pequeño que el recomendado para la especie *C. sativus*. Este aspecto ampliamente descrito para la especie cultivada no había sido estudiado antes en estas especies silvestres. Esta información puede ser de gran interés en la multiplicación de material orientado a la obtención de flores.

En nuestro trabajo, en un ensayo realizado con la especie otoñal *C. serotinus*, hemos observado como aquellos cormos de mayor tamaño brotaban antes que los de menor tamaño. Estas diferencias pueden ser de hasta 37 días entre cormos de 1,5 g y 0,06g. En la especie *C. sativus*, se ha observado también una relación positiva y significativa entre el tamaño del cormo y la precocidad en la brotación/floración (Negbi, 1999; Koocheki *et al.*, 2006; Çavuşoğlu y Erkel, 2009; De los Mozos *et al.* 2009; Douglas *et al.*, 2013).

### 4 FISIOLÓGÍA DE LAS ESPECIES SILVESTRES DE *CROCUS*

#### 4.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA INDUCCIÓN FLORAL

La mayoría de plantas bulbosas finalizan su desarrollo cuando llega la época estival. La senescencia de las hojas va seguida de la senescencia de las raíces, y el cormo finaliza aquí su actividad hasta la temporada siguiente (Khodorova y Boitel-Conti, 2013). Las especies de este género, al igual que otras plantas geófitas de la zona Mediterránea (*Cyclamen*, *Pancratium*, *Bellevalia*) presentan un largo periodo de latencia, que coincide con las elevadas temperaturas estivales. Durante este periodo los cormos de reemplazo, que inicialmente no muestran yemas diferenciadas en flor, presentan un estado actividad no aparente en sus meristemas. En el presente trabajo, también se observa que al final del ciclo y al inicio de su entrada en latencia los cormos de las especies silvestres de *Crocus* españolas no presentan yemas florales. Los meristemas tienen forma de cúpula y no presentan ningún verticilo diferenciado.

En las especies bulbosas, la transición del estadio vegetativo al reproductivo del meristemo, está regulada por distintos factores: la edad fisiológica, la genética de las especies y las condiciones ambientales, como el fotoperíodo, la temperatura y también la acumulación de fotoasimilados en el órgano vegetativo (Rees, 1972; Halevy, 1990; De Hertogh y Le Nard, 1993; Flaishman y Kamenetsky, 2006; Di Benedetto, 2008). La interacción de todos los factores afecta procesos moleculares y bioquímicos que determinan la inducción floral (Flaishman y Kamenetsky, 2006). El tiempo para completar la diferenciación floral depende directamente de la temperatura, siendo éste el factor más importante que afecta a la iniciación floral y a las siguientes etapas de desarrollo floral (Rees, 1972; De Hertogh y Le Nard, 1993).

Al contrario de lo que sucede en otras plantas, en ciertos geófitos, los factores de regulación de la floración se inducen por las altas temperaturas, como en *Narcissus* (De Hertogh y Le Nard, 1993; Noy-Porat *et al.*, 2009; Kamenetsky, 2008). El retraso en la diferenciación floral por las altas temperaturas asegura la llegada de la antesis cuando este periodo de calor o sequía ha pasado (Molina *et al.*, 2005a; Noy-Porat *et al.*, 2009). Estas adaptaciones evitan que la antesis suceda en las épocas más calurosas o más frías (Le Nard y De Hertogh, 1993; Flaishman y Kamenetsky, 2006), que desembocarían en la muerte de la flor y en la pérdida de reservas, poniendo en peligro su supervivencia como especie.

Los estudios existentes hasta la fecha sobre fisiología de la floración realizados en el género *Crocus* se han centrado en la especie cultivada azafrán, ya que sus flores son las de mayor valor económico. En esta especie se ha descrito que la temperatura óptima para la diferenciación floral se sitúa entre 23-27°C (Molina *et al.*, 2004c y 2005a).

Nuestros resultados en especies silvestres de *Crocus* españoles muestran que, como también se ha visto en otras especies bulbosas, como *Iris*, *Tulipa* y *Hyacinthus*,

(Hartsema, 1961; Le Nard y De Hertog, 1993; Flaishman y Kamemetsky, 2006), la diferenciación floral de los meristemas se induce durante la época estival, tras la seca de la hoja. Hay que destacar que las especies primaverales no requieren de un período frío para que se dé la inducción floral en la yema terminal. Todas las especies primaverales forman flor en verano y no se requiere vernalización.

También en otros trabajos con especies del género *Crocus* de floración primaveral, *C. vernus* y *C. flavus*, se señala que esta iniciación floral ocurre durante el verano (Wilkins, 1985). En el presente trabajo hemos observado que este proceso se inicia aproximadamente un mes después del inicio de la incubación, a mediados de julio, y se completa a finales de agosto- principios de septiembre en todas las especies silvestres, independientemente de su época de floración, si bien en aquellas de floración otoñal el desarrollo es más rápido. El desarrollo del meristemo floral de la especie cultivada, *C. sativus*, también necesita aproximadamente de 50 días (Molina *et al.*, 2005a). Si bien a primeros de septiembre en las yemas de todas las especies están presentes todos los verticilos florales, el crecimiento de las yemas presenta ligeras diferencias, siendo las especies de floración otoñal las que presentan la yema floral en un estado más avanzado y de mayor longitud.

La temperatura más adecuada para inducir la diferenciación floral de los meristemas de las especies silvestres coincide con el descrito para azafrán de 23°C constantes (Molina *et al.*, 2005a; Koocheki *et al.*, 2010). No obstante, los límites de temperatura que inhiben esta diferenciación floral varían entre especies. Así, la especie otoñal *C. serotinus* puede diferenciar flor a 30°C, aunque con un cierto detrimento para el proceso (66%), pero es incapaz de formar flores a 10°C, como ocurre en azafrán (Molina *et al.*, 2005a) Sin embargo, *C. nudiflorus* forma algunas flores a 10°C (en el 15% de las yemas) pero no a 30°C. En cualquier caso, no se diferencia flor por encima de 30°C o por debajo de 10°C. Esta tolerancia para la formación de meristemas a las temperaturas extremas (*C. nudiflorus* a 10°C y *C. serotinus* a 30°C) en los diferentes ambientes podría ser una ventaja evolutiva.

Trabajos de principios de los años 90 (De Hertogh y Le Nard, 1993) hablan de temperaturas entre 17-23°C para inducir floración en el género *Crocus*. Sin embargo, trabajos posteriores en azafrán han demostrado que a 17°C no tiene lugar la inducción floral y que son temperaturas superiores a los 20°C las que resultan óptimas.

También en otras bulbosas, las bajas temperaturas durante el verano al inicio de la inducción floral, 12°C para *Narcissus tazetta* L., causa abortos y malformaciones de la flor (Noy-Porat *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos nos permitirán un buen manejo de conservación de cormos tras la recogida para que tenga lugar, posteriormente, una elevada tasa de floración. Asimismo, una buena caracterización de los requerimientos de estas especies para llevar a cabo la inducción floral, nos permitirá tener materiales

adecuados para llevar a cabo posteriores estudios de regulación génica que permitan aprovechar los materiales de los que se dispone para la mejora de las especies que se cultivan de este género.

Diversos trabajos en dicotiledóneas y monocotiledóneas muestran la existencia de genes y redes de señalización muy similares que regulan la floración en las especies estudiadas (Andrés y Coupland, 2012). Estos genes forman parte de redes que comprenden diversas rutas principales de señalización: La ruta que implica al fotoperíodo y al reloj circadiano, la ruta de la vernalización, la ruta relacionada con el contenido en nutrientes y giberelinas, la de la temperatura ambiental y aquella en relación con la edad de la planta. Estas rutas convergen para regular un pequeño número de genes integradores que controlan el momento de floración, integrando las señales de diferentes rutas. Un gen integrador que se ha encontrado en muchos sistemas estudiados es el gen *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). Cuando los genes integradores reciben las señales que indican que es el momento adecuado para florecer, inducen los llamados genes de identidad floral, que determinan ese meristemo como meristemo floral. Cabe destacar el gen *LEAFY* (*LFY*), que puede ser activado por *FT*, pero también directamente por giberelinas y azúcares. Los genes de identidad floral inician la expresión en cascada de los llamados genes del desarrollo floral o genes de identidad de los órganos florales, que son responsables de la diferenciación floral, según el modelo ABCDE basado a su vez en el modelo ABC postulado en *Arabidopsis* (Coen y Meyerowitz, 1991). La información disponible sobre la biología molecular de la inducción de la floración en bulbosas que requieran temperaturas elevadas para el proceso, es limitada. No obstante, los resultados en *N. tazetta* (De Hertogh y Le Nard, 1993; Noy-Porat *et al.*, 2009) una especie bulbosa que precisa temperaturas elevadas para la diferenciación floral, muestran que los transcritos de *Narcissus FLOWERING LOCUS T1* (*NFT1*) son abundantes durante la iniciación floral e incrementan su expresión a temperaturas elevadas, sugiriendo que *NFT1* posiblemente interviene en el control de la transición floral a elevadas temperaturas. En *C. sativus*, se ha identificado un homólogo de *FT*, si bien no se ha publicado su secuencia completa, ni se ha demostrado su implicación en el proceso de floración. Nuestros resultados en las distintas especies del género *Crocus* y lo que se conoce sobre fisiología de la floración en azafrán, señalan que habría que pensar en una ruta de inducción relacionada con la temperatura o contenido en azúcares. Se ha demostrado que no es necesaria una vernalización para que se dé el proceso de inducción floral de las especies primaverales y, dada la condición de órgano subterráneo en el momento de la diferenciación floral, no parece que el fotoperíodo vaya a jugar un papel en este proceso. No obstante, no podemos descartar su papel en etapas anteriores.

También se ha señalado la existencia de componentes de señalización comunes entre las rutas que regulan la floración y el cese del crecimiento que precede a la

endolancia de las yemas (Mazzitelli *et al.*, 2007; Horvath *et al.*, 2008; Melzer *et al.*, 2008; extraído de Kamenetsky, 2009). Los genes *MADS-box (DAM)* son factores de transcripción relacionados con la inducción de la endolancia. Se ha sugerido que los genes *DAM* son activados por bajas temperaturas y que conducen a la entrada en latencia por la regulación negativa de los genes *FT* (o de genes similares), dando lugar al cese del crecimiento y la endolancia (Horvath *et al.*, 2008; extraído de Kamenetsky, 2009). Se dice que estos genes podrían regular el desarrollo de los meristemas y consecuentemente afectar al crecimiento, especialmente bajo condiciones de días cortos (Melzer *et al.*, 2008; extraído de Kamenetsky, 2009).

La mayoría de estos estudios han sido realizados en plantas de especies de regiones frías, donde la latencia está regulada por fotoperiodos cortos y bajas temperaturas. Sin embargo, la regulación interna o ambiental de la latencia estival, a nivel bioquímico o molecular requiere futuras investigaciones, y los estudios realizados nos han hecho disponer de un conocimiento de la transición floral que permitiría iniciar una línea de investigación en este sentido.

## 4.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA FLORACIÓN

### 4.2.1 EFECTO DE UN PERÍODO DE FRÍO INVERNAL PREVIO A LA FLORACIÓN

Tras la formación del meristemo floral, sucede la floración. En plantas bulbosas, distintos factores genéticos y ambientales (Rees 1972; Halevy, 1990; De Hertogh y Le Nard, 1993; Flaishman y Kamenetsky, 2006; Di Benedetto, 2008) están influyendo en la floración, pero se ha observado que la temperatura es el factor ambiental más importante que afecta a las diferentes etapas del desarrollo floral (Rees, 1972; De Hertogh y Le Nard, 1993).

En especies bulbosas de zonas templadas con latencia estival, como es el género *Crocus*, pueden presentarse distintos ciclos (Kamenetsky, 2009):

Hay especies de la región irano-turánica con un ciclo termoperiódico tal que sufren dos momentos de latencia en su vida. El crecimiento del órgano subterráneo cesa en verano a temperaturas relativamente altas, pero los meristemas permanecen activos durante este período y son capaces de diferenciar yemas reproductivas. Pero para que la latencia se libere y florezcan, se requiere de un período de bajas temperaturas. Estas especies florecen en primavera. El tulipán es un buen ejemplo. Otros taxones de zonas áridas mediterráneas como *Cyclamen*, *Pancratium*, y *Bellevalia* sufren sólo un período de latencia estival durante el cual permanecen en un estado de aparente inactividad y cuando las temperaturas empiezan a decrecer brotan y florecen, no siendo necesario el frío para el alargamiento de los tallos o la emergencia de la inflorescencia. Se ha visto que en especies en las que no se requiere frío para que se produzca la floración, el frío produce un retraso de estos fenómenos y previene a la planta de la desecación (Rees, 1985; Boyle y Stimart, 1987). En estas especies bulbosas, las temperaturas óptimas para la elongación del tallo floral y la antesis se encuentran entre 15°C y 20°C

(Benschop, 1993; De Hertogh y Le Nard, 1993). En un estudio sobre la fenología de *C. cambessedesii* realizado con distintas poblaciones ubicadas en diferentes hábitats y climas, se observa que la llegada de la floración durante los cinco años de estudio, coincide siempre con un descenso medio de la temperatura de 10°C respecto a las temperaturas estivales (Jiménez-Cortés *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta las distintas épocas de floración dentro del género *Crocus*, cabría pensar que, mientras en el grupo de especies otoñales no se requiere frío para la brotación y floración, sino un descenso de las temperaturas estivales, en el caso de las especies primaverales, sería necesario un período invernal para que se diera el alargamiento de los tallos y pedúnculos florales, de forma que se llegara a la antesis. Sin embargo, nuestros resultados muestran que en las especies de floración primaveral, el frío invernal (2-5°C) retrasa la floración, mientras que el mantenimiento a temperaturas otoñales (10-17°C) la adelanta, luego bastaría con un descenso de las temperaturas estivales para florecer. El hecho de que en sus ambientes naturales, las llamadas especies de primavera de *Crocus* españolas, florezcan entre febrero y marzo, no se debe a un requerimiento de frío, sino a que el desarrollo de la flor, una vez inducido, es mucho más lento que en especies otoñales, y al llegar el otoño, en esos ambientes, la flor no ha alcanzado el desarrollo necesario para que se produzca la antesis. La rápida llegada de temperaturas invernales casi paraliza o ralentiza mucho el crecimiento de la flor, que sólo alcanzará el tamaño requerido para la antesis a finales de febrero cuando comienzan a ascender las temperaturas. No obstante, los brotes florales pueden permanecer asomando en la superficie sin que se produzca la antesis, dado que la apertura de los catafilos requerirá también de ciertas temperaturas superiores a las invernales, como se ha observado en *C. nevadensis*. En esta especie se observa que, aunque alcanzan la longitud suficiente para salir al exterior, los catafilos no se abren hasta que la temperatura no alcanza un mínimo de 10°C. El efecto que tienen las bajas temperaturas invernales en la floración de especies primaverales, al retrasar la floración, podría presentar algún tipo de ventaja evolutiva relacionada con la administración de recursos en zonas frías de montaña.

Teniendo en cuenta, el papel de las giberelinas en el alargamiento de los órganos, podría ser que las especies de *Crocus* presentaran diferencias en la síntesis o sensibilidad a esta hormona durante el desarrollo floral.

Es necesario señalar que, si bien en los manuales clásicos de bulbicultura (Benschop, 1993; De Hertogh y Le Nard, 1993) se señala la necesidad de un período “warm-cold-warm” para la floración de los *Crocus* de primavera, esta afirmación no es correcta y bastaría con un descenso de las temperaturas tras la época estival, cuando la flor esta ya desarrollada, para poder florecer. Así, en la especie *C. vernus* se ha descrito un programa térmico de rotura de latencia, que comienza con 9°C hasta que las raíces son visibles. En este momento la temperatura se puede bajar a 5°C. Cuando los brotes tienen la longitud adecuada la temperatura se baja de 0-2°C, hasta que las

temperaturas se vuelven a subir para forzar el desarrollo o crecimiento (De Hertogh y Le Nard, 1993; De Hertogh, 1996, Dole y Wilkins, 1999). A la vista de los resultados, este calendario no parece ser necesario

#### 4.2.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE FLORACIÓN

Cuando se ensayan las temperaturas de 10°C y 17°C sobre la precocidad, la tasa y el período de floración, se observa que en las especies en que el desarrollo de las yemas florales es mayor al inicio del tratamiento, al aplicar estas temperaturas (*C. serotinus* y *C. nevadensis*), no aparecen diferencias en precocidad significativas, y en *C. serotinus* existe una gran variabilidad dentro de un mismo tratamiento. Una vez la flor está casi desarrollada, brotará siempre que la temperatura esté dentro de un intervalo adecuado y no hay diferencias ni en precocidad ni en la duración del período de floración. Sin embargo, en *C. vernus*, en que la yema tiene un menor desarrollo en el momento en que se le aplican los tratamientos térmicos, el tratamiento más cálido (17°C) adelanta la floración y el período es más corto. Se han descrito temperaturas de floración óptima en azafrán a 15-17°C (Plessner *et al.*, 1989; Molina *et al.*, 2004b y 2010; Vafabakhsh *et al.*, 2009). La temperatura de 17°C también produce una floración del 100% de los cormos en las especies ensayadas, pero no existen diferencias con la tasa de floración cuando los cormos se cultivan a la temperatura inferior de 10°C.

En relación a la influencia de la temperatura sobre el tamaño de la flor, las observaciones referentes a las especies silvestres difieren de las que se han descrito en la especie cultivada. Así, en el presente trabajo realizado con especies silvestres se observa que, las flores procedentes del cultivo a temperaturas más elevadas de 17°C, son las de menor longitud, tanto en las especies primaverales como en la otoñal. Este es un hecho diferencial con lo observado en *C. sativus*, en el que se ha visto que la longitud de las flores es mayor cuando la temperatura de cultivo incrementa (Molina *et al.*, 2010). No se puede descartar que, debido a la selección realizada por el hombre, las temperaturas óptimas para un mayor desarrollo de la flor sean diferentes en especies silvestres, que generalmente habitan en zonas de alta montaña.

#### 4.3 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO VEGETATIVO

La fisiología del desarrollo del cormo en el género *Crocus* ha sido poco estudiada. Muchos de estos trabajos se centran en la especie cultivada y la mayoría de ellos son descriptivos y tienen un enfoque dirigido a la producción de especia (Rubio, 1997; De Juan *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2004; Kafi *et al.*, 2006; Molina *et al.*, 2010; Vafabakhsh *et al.*, 2010; Douglas *et al.*, 2014). Los trabajos que estudian la fisiología del desarrollo vegetativo de *C. sativus* en profundidad son escasos (Renau-Morata *et al.*, 2013), y los que se refieren a las especies silvestres se han centrado en la especie *C. vernus*, especie de región fría y desarrollo primaveral efímero (Badri *et al.*, 2007; Lundmark *et al.*, 2009).

Muchas plantas bulbosas están adaptadas a crecer a bajas temperaturas, pero su rendimiento y tamaño final es bajo (Körner y Larcher, 1988). Sin embargo, para ciertas especies bulbosas primaverales de floración efímera, se ha observado que crecen mejor a bajas temperaturas, alcanzando un mayor desarrollo final de sus órganos vegetativos (De Hertogh y Le Nard, 1993; Nault y Gagnon, 1993; Lapointe y Lerat, 2006). La mayor acumulación de biomasa en los órganos vegetativos de reserva de las especies de floración primaveral efímera, puede ser inducida por los efectos térmicos sobre el retraso de la senescencia de la hoja. Este hecho se explicaría porque al prolongar el periodo de desarrollo foliar, se aumenta el periodo de asimilación del carbono fotosintético y su almacenamiento, tal y como se observa en algunos cultivares de cebolla (Daymond *et al.* 1997). Sin embargo, en *C. vernus* se ha visto que mayores longitudes de hoja no implican el desarrollo de cormos de mayor tamaño (Lapointe y Lerat, 2006). También se ha observado que el cormo cuando se desarrolla a 18°C/10°C, alcanza su tamaño final antes de que la hoja presente senescencia. Sin embargo, cuando se desarrolla a temperaturas más bajas, el tamaño del cormo sigue aumentando incluso días después de iniciarse la senescencia. Parece ser que la duración de la vida de la hoja no puede explicar, por sí sola, la acumulación de biomasa en estas especies (Badri *et al.*, 2007). Algunos autores apoyan la hipótesis de que la fuerza de sumidero del cormo es el factor más importante en determinar la duración de la vida de la hoja, y un factor muy relevante en este proceso es la temperatura (Lapointe, 2001; Badri *et al.*, 2007). En el presente trabajo, hemos observado que en todas las especies silvestres españolas del género *Crocus* el desarrollo vegetativo es mayor a 10°C, la temperatura más baja de las ensayadas. Este hecho se da independientemente de que la especie sea de floración otoñal o primaveral, y de si presenta salida de la hoja otoñal o primaveral. También en la especie de floración otoñal y salida de la hoja primaveral, *C. nudiflorus*, las menores temperaturas dan lugar a un mayor desarrollo. Nuestros resultados apoyan el trabajo de Badri *et al.*, (2007) y Lundmark *et al.*, (2009) sobre desarrollo vegetativo en *C. vernus*, y el de otros autores que estudiaron el desarrollo en otras bulbosas de climas fríos (Nault y Gagnon 1993; De Hertogh y Le Nard 1993, Lapointe y Lerat, 2006,). Éstos describen como un régimen de temperaturas frío, en estas especies, da lugar un mayor desarrollo. Sin embargo, esta misma respuesta no es de esperar en especies de hábitats más cálidos, excepto en algunas variedades de cebolla, según Daymond *et al.* (1997). Nuestro trabajo muestra que este resultado es válido para todas las especies silvestres españolas de *Crocus*.

Este mayor desarrollo a 10°C puede ser explicado por cambios en la división celular (Pollock y Eagles, 1988), en la cantidad de acumulación de carbohidratos en los órganos subterráneos (Badri *et al.*, 2007), y en la elongación de las células (Grime y Mowforth, 1982; Paul, 1985). También se ha señalado que estos cambios puedan ser debidos a alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos (Nielson *et al.*, 1997, Rees *et al.*, 1988) que pueden mediar modificando la capacidad para utilizarlos o acumularlos, y que pueden influir drásticamente en el tamaño final del cormo.

Trabajos recientes (Lundmark *et al.*, 2009) señalan que el menor crecimiento de los cormos hijos a elevadas temperaturas no es debido a limitaciones en el suministro de fotoasimilados, ya que la fijación de CO<sub>2</sub> y la acumulación de almidón en los cormos hijos ocurren a tasas similares a las de aquellos cormos crecidos a bajas temperaturas.

La limitación está relacionada con una partición diferente entre los distintos tipos de azúcares en el cormo hijo. La relación entre la concentración de hexosas y sacarosas decrece muy pronto y abruptamente en los cormos crecidos a elevadas temperaturas. Asimismo, las células alcanzan antes su tamaño definitivo. Teniendo en cuenta que las hexosas estimulan la división y la elongación celular, podría ocurrir que las células de cormos crecidos a temperaturas más bajas sean mantenidas un tiempo mayor en fase de crecimiento, mientras que aquellas de cormos crecidos a mayor temperatura entrarían antes en una fase de diferenciación, habiéndose alargado menos y teniendo una menor acumulación de almidón. En los cormos crecidos a mayores temperaturas se observa un incremento más rápido y temprano de la partición de C hacia la pared celular. Esta relación inversa entre crecimiento celular y mayor cantidad de C dirigido a la pared celular ha sido también observada en otras especies (Alonso *et al.*, 2007). La transición de crecimiento a diferenciación disminuiría la fuerza de sumidero de los cormos hijos que podría conducir a una disminución en la demanda de fotoasimilados y a un proceso de senescencia de la hoja que ocurriría antes en los cormos crecidos a elevadas temperaturas.

En otros trabajos se señala que el desarrollo a temperaturas altas conduce a una mayor tasa fotosintética y respiratoria, que da lugar a una rápida acumulación y saturación en el contenido en almidón de los órganos subterráneos. Esta limitación en la capacidad sumidero del cormo produciría una respuesta en *feedback* inhibitoria en la tasa fotosintética, que daría lugar al inicio de la senescencia, más temprana cuanto mayor es la temperatura de desarrollo (Gandin *et al.*, 2011).

Coincidiendo con los resultados obtenidos por Badri *et al.* (2007), Lundmark *et al.* (2009) y Gandin *et al.* (2011), en la mayoría de las especies, se observa que una mayor temperatura da lugar a un crecimiento más rápido, si bien la detención del desarrollo del cormo y la senescencia de las hojas se inicia antes dando lugar a cormos hijos de menor tamaño. La única excepción es la especie *C. nudiflorus* en que la hoja se desarrolla más rápidamente a 10°C y también alcanza un mayor tamaño. Hay que señalar que se trata de una especie que suele localizarse a elevadas altitudes. El régimen térmico de mayor temperatura también da lugar a un inicio de la senescencia de las raíces anterior.

En todas las especies, las raíces son el primer órgano en desarrollarse y en sufrir senescencia, emergiendo en octubre-noviembre y empezando a perder peso en diciembre - enero en las especies otoñales y en febrero - marzo en las primaverales. Excepto en la especie otoñal, *C. serotinus*, en que coincide la salida de la hoja con el inicio del crecimiento de las raíces, la salida de la hoja es siempre posterior al

desarrollo de las raíces. En las especies primaverales, ésta sucede entre diciembre y marzo, y en *C. nudiflorus*, que aunque es otoñal presenta histerantia, ocurre en febrero. Además del aporte de agua y nutrientes, que también podría llevarse a cabo a partir del cormo madre, la producción de citoquininas por las raíces puede ser un factor necesario para que se induzca la brotación. El inicio del desarrollo del cormo hijo es posterior o coincidente con la salida de la hoja, si bien su máxima tasa de crecimiento sólo ocurre cuando las hojas han alcanzado gran parte de su desarrollo o incluso su máxima longitud y se han agotado las reservas en el cormo madre. En general, con el declinar del cormo madre las hojas aceleran su crecimiento.

En la especie cultivada *C. sativus*, Renau-Morata *et al.*, (2012) señalan que el momento en que las hojas presentan una mayor tasa de crecimiento coincide con aquél en que el aporte de carbohidratos al cormo hijo depende ya únicamente de la fotosíntesis de las hojas por haberse agotado el cormo madre. Sin embargo, la capacidad fotosintética de la hoja no varía durante el desarrollo vegetativo, y el incremento de la demanda de carbohidratos, debido a tasas de crecimiento del cormo hijo mayores, se cubre con un incremento de la superficie foliar.

El desarrollo de la hoja se retrasa a temperaturas más bajas y también lo hace el cormo hijo. Sin embargo, en la especie *C. nudiflorus* en que la hoja tiene un desarrollo más rápido a 10°C, también el desarrollo del cormo se realiza más lentamente a temperaturas más bajas. A este hecho, además de la influencia de la temperatura en el crecimiento de los cormos hijos, también contribuye la mayor tasa de transporte de fotoasimilados desde el cormo madre hasta los cormos hijos a temperaturas elevadas. En esta especie, se presentan importantes diferencias que podrían contribuir a explicar este tipo de desarrollo. Estas diferencias no son tan acusadas en otras especies.

Cuando se estudia el efecto de un período de frío invernal sobre el desarrollo posterior de las hojas a la temperatura óptima de 10°C, se observa una respuesta diferente en función de la especie. Así, en *C. nevadensis* y *C. nudiflorus*, el período frío retrasa la salida de la hoja y, aunque posteriormente se cultiven a temperaturas más elevadas, la hoja nunca alcanza el tamaño de aquellas cultivadas a una temperatura constante de 10°C. Sin embargo en las especies *C. serotinus* y *C. vernus*, aunque el frío retrasa el crecimiento, la llegada de las temperaturas más elevadas hace que, en estas plantas sometidas a frío, las hojas alcancen mayor longitud. Un experimento más completo en la especie *C. serotinus* indica que las raíces de estas plantas no se ven afectadas de forma negativa por el frío invernal, sino que incrementan su crecimiento y alargan su vida a temperaturas más elevadas. El transporte de citoquininas desde las raíces, así como una mayor disponibilidad de agua y nutrientes podría incrementar la tasa fotosintética y el crecimiento de las hojas en estas plantas.

Hay que indicar que el crecimiento de los cormos hijos y la acumulación de almidón, que en las especies otoñales como *C. sativus*, *C. serotinus* o *C. nudiflorus* tiene lugar tras la floración, puede darse con anterioridad a la misma en las especies

primaverales. Así, en *C. vernus* y *C. nevadensis*, con salida de la hoja anterior a la floración, al inicio de la floración, ya existe una cierta acumulación de almidón en los nuevos cormos. Esta acumulación es mayor en la especie que florece más tarde. Este suceso está también descrito por Badri *et al.*, (2007) en la especie *C. vernus*.

Cuando se compara el crecimiento vegetativo de las especies a una temperatura constante de 10°C, se observa un escalonamiento de la brotación y crecimiento de la hoja, que ya se describió en el apartado de fenología donde las especies se cultivaban en régimen de temperaturas no controladas. Se dan diferencias genéticas para el proceso de brotación, que varía desde octubre hasta marzo, si bien el momento de la seca presenta menores diferencias temporales (de abril a mayo y alrededor de sólo 25 días), dando lugar a diferencias en la longitud del período de vida de las hojas. No obstante, esa diferencia, no siempre se traduce en que las plantas con una mayor duración del período de vida de las hojas tengan las hojas más largas, ni tampoco en la producción de cormos hijos de mayor tamaño en relación con el cormo madre (datos no mostrados). El incremento en la temperatura del cultivo, adelanta la senescencia de la hoja y el efecto es mucho más acusado en las especies que brotan primero, acortando más su ciclo de vida. Desconocemos si el mayor efecto sobre estas especies está mediado por un mayor efecto sobre el desarrollo del cormo hijo, sobre la tasa fotosintética o sobre otros procesos fisiológicos. La caracterización fisiológica de estos materiales nos permitirá un estudio posterior sobre la genética que controla estos procesos, que resulta de gran interés para optimizar la producción de cormos y obtener materiales mejorados.

Es preciso señalar que el conjunto de datos obtenidos sobre la fisiología del crecimiento vegetativo de estas especies de *Crocus* tiene tanto aplicaciones inmediatas como a más largo plazo. El conocimiento de las temperaturas más adecuadas para el desarrollo vegetativo y la obtención de cormos de mayor tamaño es interesante no sólo para manejar las especies en el banco de germoplasma de forma más eficaz, sino en relación con el uso de estas especies como ornamentales, ya que cormos más grandes significan un mayor número de flores. Por otra parte, un conocimiento en profundidad del fenómeno de retraso en la salida de la hoja en especies otoñales, como *C. nudiflorus*, tiene gran interés ya que podría incorporarse a la especie cultivada *C. sativus* facilitando la recogida de la flor. Se podrían obtener producciones de flores sin hojas, lo que facilitaría la recolección mecanizada y no dañaría la parte vegetativa de la planta. Por otra parte, hemos observado un escalonamiento tanto en la floración como en el desarrollo vegetativo de estas especies, lo que permitiría diseñar estrategias para una producción escalonada de flores y cormos.

#### **4.4 DESARROLLO DE CORMOS PROCEDENTES DE SEMILLA Y FORMACIÓN DE CORMOS ESTOLONÍFEROS**

La dependencia del proceso de floración del tamaño del cormo ha sido muy estudiada en la especie cultivada azafrán, donde distintos autores señalan que se

requiere un peso o tamaño mínimo para florecer (Benschop, 1993; Negbi *et al.*, 1989; Plessner *et al.*, 1989; Tamaro, 1999; De Juan *et al.*, 2009) y que está alrededor de los 2 cm de diámetro. La especie cultivada no produce semilla y los cormos siempre se obtienen de otros cormos madre.

En las especies silvestres, sí que es posible la reproducción sexual y la obtención de semilla pero, a pesar de que se requiere un tamaño de cormo menor que azafrán para florecer (aprox. un 1g), deben de pasar más de 3 años para obtener un cormo con capacidad de floración a partir de una semilla. En el segundo año de cultivo, los cormos de *C. nevadensis*, *C. carpetanus*, *C. serotinus* y *C. nudiflorus* alcanzan un peso aproximado de 0,1 g y *C. serotinus* el tercer año alcanza un peso de 0,3 g, lo que significa que requerirían un tiempo superior para obtener el material con capacidad de floración. Este hecho dificulta tanto los trabajos de identificación de especies a partir de semilla, como cualquier programa dirigido a la mejora genética que no sea una selección clonal. Hay que señalar que los cormos obtenidos de semilla alcanzan mayor tamaño cuanto antes germina la semilla. Esto tiene relación con la duración de la etapa vegetativa en estos cormos, ya que al brotar antes, están más tiempo produciendo fotoasimilados y, por tanto, el cormo podrá acumular más carbohidratos y tener mayor tamaño final. Así pues, una germinación más temprana sería un carácter de interés en un programa de mejora con vistas a obtener cormos de tamaño de floración lo más pronto posible.

La mayor producción de estolones en la especie *C. nudiflorus*, se da a temperaturas extremas (5°C y 30°C). La producción de propágulos subterráneos a partir de estolones, está influenciado por factores ambientales tales como la temperatura, los nutrientes disponibles o el fotoperíodo. Así, la formación de tubérculos en patata está favorecida por el fotoperíodo corto, las bajas temperaturas y la escasez de N (Jackson, 1999). En *C. nudiflorus*, Rukšāns (2010) ha observado una mayor formación de cormos estoloníferos en suelos pedregosos, y destaca la producción de estolones en *C. herbertii* como una posible estrategia para colonizar el suelo y luchar contra la competencia que ejercen especies herbáceas de las praderas, muy abundantes en zonas de montaña. Las temperaturas a las que *C. nudiflorus* forma estolones son aquellas en las que aborta el desarrollo floral, lo que podría llevarle a la estrategia alternativa de multiplicarse a través de estolones y colonizando un espacio más amplio, dado que no dispone de la semilla para su dispersión. Hay que señalar también que la formación de nuevos cormos con capacidad de florecer, a partir de cormos estoloníferos, requiere menos tiempo que los cormos procedentes de semillas.

### **4.5 FISIOLÓGÍA DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE LAS ESPECIES SILVESTRES DE CROCUS ESPAÑOLES.**

La reproducción a partir de semillas es una fase crítica en el ciclo de vida de las espermatofitas, que determina sus posibilidades de colonizar un nuevo hábitat o incluso su supervivencia (Harper, 1977; Westoby, 1981; Baskin y Baskin, 1998;

Donohue *et al.* 2010; citados por Grilli-Caiola *et al.*, 2014). El período más favorable para el desarrollo de las plántulas, puede variar en función de la distribución geográfica, las condiciones climáticas, la preferencia de hábitat y el ciclo de vida de la especie (Nikolaeva, 1999; Mattana *et al.*, 2012). Esta variación se refleja a menudo en los diferentes comportamientos de las semillas, incluyendo la latencia de las mismas.

La maduración, desecación y abandono de la planta materna pueden ser suficientes para eliminar los impedimentos de la germinación que, en este caso, sólo va a depender de que se den condiciones ambientales adecuadas. Sin embargo, muchas semillas, tras la separación de la planta madre, permanecen latentes durante cierto tiempo. Aunque se satisfagan los requerimientos de humedad y temperatura para la germinación esta no se produce. Este estado en el cual una semilla viable no germina, aunque se la coloque en condiciones de humedad, temperatura y concentración de oxígeno idóneas para hacerlo se denomina latencia o dormición (Hartmann y Kester, 1990; Hilhorst, 1995; Bewley, 1997; Li y Foley, 1997),

La latencia es una de las propiedades adaptativas más importantes que poseen los vegetales, que asegura la supervivencia de la especie frente a cambios ambientales adversos, permitiéndoles mantener su viabilidad durante largos períodos de tiempo, en condiciones desfavorables, aunque no indefinidamente (Hartmann y Kester, 1990; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Donohue *et al.*, 2010; Taiz y Zeiger, 2010 Fernández-Pascual *et al.*, 2013). Asimismo, permite una dispersión espacial y temporal de la germinación que disminuye la competencia y dispersa la especie.

El establecimiento de la latencia va a depender de factores genéticos, epigenéticos y ambientales, y su acción está mediada por hormonas como el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

Varios factores ambientales son capaces de romper o acelerar la salida del estado de latencia y, de forma bastante general, las semillas latentes responden a más de uno de estos factores (Hartmann y Kester, 1990; Lang, 1996; Viemont, y Crabbé, 2000). En condiciones naturales, la finalización de la latencia no está causada por un único factor, sino que varios factores pueden actuar simultáneamente. Además de la escarificación, entre los factores o condiciones que operan en la salida o rotura de la latencia se han utilizado el almacenamiento en seco y la estratificación fría. La latencia de algunas semillas desaparece después de un período de almacenamiento en seco a temperatura ambiente (*after-ripening*). Este período va desde algunas semanas, como en la cebada, hasta 60 meses, como en *Rumex crispus* (Ramson, 1935; Bewley, 1997; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Kucera *et al.*, 2005; Leubner-Metzger 2003, extraído de <http://www.seedbiology.de/afterripening.asp>, en 2015). La desaparición de la latencia es más rápida a temperaturas elevadas, propiedad que es explotada en especies tan importantes comercialmente, como el trigo o la cebada. Este tipo de latencia es típica de los cereales. El tratamiento debe realizarse a humedades bajas.

Contenidos de humedad medios pueden hacer que este tratamiento no sea efectivo y que la semilla pierda su viabilidad.

Un gran número de especies pueden perder la latencia si se mantienen en medio aerobio y embebidas en agua a temperaturas bajas, en el rango entre 1-10°C. Este proceso es conocido como *estratificación fría*. Las temperaturas óptimas se suelen situar alrededor de 5°C. El papel de este mecanismo como medio para controlar el momento de la germinación en condiciones naturales es obvio. La semilla pierde lentamente la latencia durante el invierno y se impide la germinación hasta que haya pasado esta estación. La aplicación de este conocimiento a la práctica agrícola se realiza hace mucho tiempo. Para que este tratamiento sea efectivo, las semillas deben estar hidratadas.

Teniendo en cuenta el tamaño de la semilla en las especies estudiadas, la permanencia en el suelo en verano sin germinar, y el hecho de que las especies primaverales parece que germinan tras la estación invernal, parece indicado ensayar tratamientos de almacenamiento en seco y de estratificación fría para romper la latencia en el género.

Son escasos los trabajos realizados sobre la rotura de la latencia y la germinación en el género *Crocus*. Estos trabajos se centran en la germinación de especies turcas o chinas (Vurdu, 2004; Fu *et al.*, 2013), o especies primaverales de la serie *Verni*, *C. neapolitanus*, *C. etruscus* y *C. ilvensis* (Carta *et al.*, 2014). Las especies de este género, en general, están bien adaptadas a los inviernos de la zona mediterránea, pero el crecimiento del cormo cesa durante la época estival, marcada por un periodo de sequía y temperaturas elevadas. Es de suponer que estas semillas presenten adaptaciones para evitar la germinación durante el verano (Copete *et al.* 2011; Herranz *et al.* 2013), que expondría a las plántulas a condiciones desfavorables para su supervivencia.

El presente estudio sobre la fisiología de la latencia de semillas de especies españolas de *Crocus*, se realiza sobre semillas tanto de especies otoñales y primaverales, y de hábitats muy diferentes, y se observa que todas ellas presentan latencia. La germinación de las semillas sin tratamiento previo, a temperaturas otoñales de 10°C o 17°C que permiten la germinación, no da buenos resultados en ningún caso. Las semillas silvestres tienen mecanismos que impiden su germinación rápida cuando se produce un periodo de condiciones favorables, que pondrían en serio peligro las futuras plántulas. En cambio, las semillas comerciales han sido sometidas a procesos de selección artificial justamente para permitir la germinación rápida en condiciones favorables, por ejemplo un simple aumento de temperatura, carácter que representaría una gran peligrosidad en especies silvestres (Raven *et al.*, 1992).

La mayor tasa de germinación se obtiene cuando se realiza un tratamiento previo de almacenamiento en seco o *after-ripening* a 23°C. Se observa que cuanto mayor es

el periodo de aplicación de las altas temperaturas (entre 30-60 días) mayor es la tasa de germinación, indicando que las altas temperaturas estivales podrían ser, al menos parcialmente, responsables de la rotura de latencia que presenta la semilla de estas especies. Fu *et al.*, (2013) y Carta *et al.*, (2014) observaron como las altas temperaturas promovían la emergencia de la radícula en semillas de especies de este género y se obtuvieron los mejores resultados de germinación en especies de floración primaveral de la serie *Verni* (Carta *et al.*, 2014). Leubner-Metzger (2002) sugiere que el almacenamiento en seco produce la disminución del nivel y de la sensibilidad al ácido abscísico e incrementa la sensibilidad a las giberelinas. Se ha descrito también un efecto de aceleración de la ruptura de la cubierta seminal por *after-ripening*, así como un incremento de la expresión génica de las enzimas que digieren las paredes del endospermo (Leubner-Metzger, 2005). Asimismo, han sido propuestos otros mecanismos implicados en la eliminación de la latencia tras el almacenamiento en seco: reacciones no enzimáticas que eliminan inhibidores de la germinación, especies oxígeno reactivas y antioxidantes, alteraciones de la membrana y degradación de proteínas específicas vía proteosoma (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Los resultados de nuestro trabajo, realizado con semillas de especies de diferentes hábitats y fenología, reflejan la existencia de mecanismos de latencia de semillas comunes en todas estas especies, sean cuales sean los requerimientos para la brotación, la floración y la salida de la hoja. No obstante, el tiempo requerido hasta la germinación tras el almacenamiento en seco varía entre especies y se sigue el mismo orden que sigue la brotación de estas especies.

*C. serotinus* germina tras 40 días a 10°C después del almacenamiento en seco, con independencia del período de almacenamiento en seco. Esto supone que en condiciones naturales podría germinar en otoño, coincidiendo con su brotación, y los porcentajes de germinación podrían ser elevados.

El resto de especies, en que el tratamiento ha sido muy efectivo y cuya hoja sale en primavera, tardarían entre 70 a 130 días a 10°C en germinar, tras el almacenamiento en seco. En los hábitats en que viven estas especies, el frío invernal llega antes de que se produzca esta germinación, pudiendo paralizar el proceso, y la semilla puede quedar protegida por las capas de nieve que evitan la congelación.

En *C. carpetanus* y *C. nudiflorus*, la aplicación de un tratamiento de estratificación fría durante 30-60 días, tras el almacenamiento en seco, disminuye de forma importante la tasa de germinación, lo que hace pensar que también en condiciones naturales podría darse una pérdida importante de semillas con capacidad de germinar.

Sin embargo, en *C. nevadensis* el tratamiento de estratificación fría no disminuye la tasa de germinación necesariamente y, asimismo acelera la germinación, de forma más acusada cuanto mayor sea el período de frío. Es posible que en esta especie se mantengan condiciones elevadas de germinación en sus hábitats naturales. Copete *et al.* (2011) observaron esta misma aceleración en la germinación de semillas de

*Narcissus hispanicus* Gouan debida al tratamiento en frío realizado tras un almacenamiento en seco. Varios autores han descrito los efectos de la estratificación fría en las semillas con latencia, y se dice que produce un descenso en el contenido de ácido abscísico (Nikolaeva, 1977; Lee y Looney, 1978; Pinfield *et al.*, 1987; Pawasut *et al.*, 2010), pero también puede inducir un descenso en la sensibilidad a esta hormona (Singh y Browning, 1991). Asimismo, este tratamiento induce la producción de altos niveles de giberelinas (Fernández, 1997) y/o un aumento de la sensibilidad a esta hormona (Karszen *et al.*, 1989; Bewley y Black, 1994).

En monocotiledóneas se ha indicado la existencia de un retraso entre la salida y crecimiento de la raíz primaria y la emergencia del tallo durante la germinación (Tillich, 1995 y 2007; extraído de Baskin y Baskin, 2001). Este tipo de latencia se ha descrito como latencia del epicotilo. En *N. hispanicus*, la raíz de la semilla emerge en otoño, y el sistema radicular se desarrolla, lentamente, hasta final del invierno. Con la llegada de la primavera y la subida de las temperaturas, emerge el brote de las plántulas con un avanzado desarrollo del sistema radicular. Estos autores sugieren que el tallo es sensible al tratamiento de rotura de latencia por bajas temperaturas cuando la raíz tiene una longitud determinada (Copete *et al.*, 2011). La presencia de un sistema radicular bien formado en primavera permitirá a la planta absorber más eficientemente el agua disponible en el suelo si llega un periodo de sequía (Kondo *et al.*, 2004).

No podemos descartar que este patrón de desarrollo se dé en algunas especies de *Crocus* primaverales como es el caso de *C. nevadensis*. Para ello, la raíz debería poder desarrollarse lo suficiente a 5°C para permitir que el brote pudiera ser sensible a las bajas temperaturas. No obstante, no es un requerimiento imprescindible, pues germina bien sin frío, aunque más tarde. En el caso de las especies *C. nudiflorus* y *C. carpetanus* podría ocurrir que la raíz no hubiera alcanzado un estado de desarrollo adecuado antes de que se diera un efecto del frío estimulador. Estas semillas también pueden germinar bien sin frío, pero podrían haberse visto dañadas por un período de frío previo. No se puede descartar un efecto perjudicial del frío sobre la germinación de las semillas embebidas.

La especie *C. vernus* muestra en todos los tratamientos una baja tasa de germinación.

La capacidad de germinación de las semillas de las diferentes especies de *Crocus* podría estar relacionada con la mayor dispersión de las especies *C. serotinus* y *C. nevadensis* que podrían germinar bien en los hábitats en que se encuentra este género.

En relación con la temperatura de germinación, tras la rotura de la latencia, se observa que es necesaria una bajada de la temperatura para que se dé la germinación. La germinación a 23°C constantes es nula en todas las especies, y tras bajar a 10°C germinan un alto porcentaje de semillas. Fu *et al.*, (2013), en su trabajo sobre la

fisiología de las semillas de la especie primaveral *C. alatavicus*, describe también la necesidad de bajar la temperatura, tras un tratamiento de temperaturas elevadas.

La temperatura óptima de germinación varía entre 10 y 17°C dependiendo de la especie y del tratamiento al que han sido sometidas las semillas, no pudiendo generalizarse una temperatura.

Es de destacar que la germinación tras un tratamiento uniforme (dos meses de almacenamiento en seco y temperaturas de germinación a 10°C) tiene lugar en el mismo orden cronológico en que brotan las especies: *C. serotinus*, *C. nudiflorus*, *C. nevadensis*, *C. carpetanus* y *C. vernus*. Este hecho indica diferencias genotípicas en el desarrollo del proceso de germinación entre las diferentes especies.

Nuestros resultados nos han permitido poner a punto métodos de rotura de latencia y de germinación que consiguen porcentajes de germinación de semillas entre el 81-95% en todas las especies silvestres españolas de *Crocus*, con la excepción de *C. vernus*, en que sólo hemos conseguido un 30% de germinación. El disponer de métodos eficaces de germinación de semillas es muy útil para el manejo de los recursos fitogenéticos de este género en el Banco de Germoplasma Vegetal de Cuenca. Hasta el momento, la conservación y la multiplicación de este material se realiza mediante cormos, con los problemas que conlleva por la transmisión de enfermedades, y la gran cantidad de material, personal y espacio necesarios para su mantenimiento. Además, no es posible iniciar programas de mejora de estos materiales sin disponer de buenos métodos para la germinación de la semilla procedente de cruces entre distintas entradas. Asimismo, esta caracterización fisiológica permite disponer de materiales adecuados para iniciar líneas de investigación dirigidas a conocer los mecanismos moleculares que están implicados en los procesos fisiológicos de la rotura de la latencia, que aún están por esclarecer en estas especies. Un conocimiento en profundidad de estos procesos puede tener aplicaciones importantes en la industria agrícola destinada a la multiplicación mediante semilla de entradas con interés ornamental, al permitir uniformizar el proceso de germinación.

#### 4.6 FRUCTIFICACIÓN

La fisiología de la fructificación en el género *Crocus* no se ha estudiado hasta el momento, si bien existen trabajos que describen el momento de la fructificación o describen las condiciones en las que esta se produce (Jiménez-Cortés *et al.*, 2014).

La temperatura de cultivo influye de manera diferente en el cuajado de los frutos en función de la especie. Así, en la especie otoñal, *C. serotinus*, el cuajado del fruto es mucho mayor a la temperatura más baja de 10°C, mientras que en las especies primaverales no hay una influencia significativa de la temperatura (10°C frente 17°C). El desarrollo del fruto, desde su salida hasta la senescencia del mismo, es mucho más prolongado en la especie otoñal, en la que puede durar 78-113 días, frente a la especie

## V. DISCUSIÓN

---

primaveral *C. nevadensis* en que puede durar 41-62 días. Los requerimientos de temperatura que optimizan el tamaño del fruto están relacionados con la duración del desarrollo del mismo. Los frutos que requieren un mayor tiempo de desarrollo, adquieren mayor tamaño a temperaturas más bajas. No obstante, quedaría por contrastar si se trata de una diferencia general entre especies primaverales y otoñales o son requerimientos específicos de los materiales estudiados.

## 5 VARIABILIDAD DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS* PARA EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES EN SUS ESTILOS

### 5.1 UTILIDAD DE LOS MÉTODOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS Y DE HPLC PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS*

La presencia de diferentes pigmentos biológicos que incluyen carotenoides y flavonoides da lugar a la gran variedad de colorido que muestran las flores y estilos del género *Crocus* (Ríos *et al.*, 1996; Abdullaev, 1993, 2002, 2004; Wintherhalter y Straubinger, 2002). La gran mayoría de los estudios sobre análisis químico realizado en el género *Crocus* se centran en los estigmas de la especie cultivada azafrán (*C. sativus*), si bien también se ha publicado algún trabajo sobre el contenido en carotenoides en los estilos y en los tépalos de otras especies (Castillo *et al.*, 2005; Moraga *et al.*, 2013) y en los flavonoides de los tépalos (Nørbæk *et al.*, 2002; Serrano-Díaz, 2014).

Los principales metabolitos secundarios que se acumulan en el estilo son derivados de carotenoides (*cis* y *trans* crocinas, la picrocrocina, y safranal), y son los responsables de las propiedades del azafrán (Tarantilis *et al.* 1995; Kanakis *et al.*, 2004; Carmona *et al.*, 2006a). Los flavonoides identificados en estigmas de azafrán pertenecen al grupo de los kaempferoles (Carmona *et al.*, 2007).

Trabajos llevados a cabo mediante espectrofotometría de UV-Vis, en particular el parámetro  $E^{1\%}$ , han indicado el escaso poder colorante, aromático y de sabor que tienen los estilos de las especies silvestres, que no pertenecen a la serie *Crocus*, en comparación con el azafrán (Castillo *et al.*, 2005; Datos no publicados del proyecto europeo CROCUSBANK, AGRI GEN RES 018, 2010), a pesar de que se piensa que algunas especies silvestres como *C. nudiflorus* fueron introducidas como sustitutivos del azafrán (Crump y Sledge, 1950, citados por Mathew, 1982). Nelson (1950) sugirió que los extractos de los estilos de *C. nudiflorus*, no podrían ser muy diferentes químicamente de los de *C. sativus*, porque tenían similar capacidad para teñir el agua. Otros autores de la misma época relatan que esta especie fue introducida con fines comerciales en países donde no es posible cultivar *C. sativus* por la climatología, como Inglaterra. Si bien, algunas especies podrían utilizarse como colorantes, tendrían mucho menor poder colorante que el azafrán. Castillo *et al.* (2005) mostraron que sólo presentan una composición similar, las especies que pertenecen a la serie *Crocus* y por tanto más próximas filogenéticamente a *C. sativus* (*C. cartwrightianus*, *C. hadriaticus* y *C. pallasii*). Los resultados previos del proyecto europeo CROCUSBANK (AGRI GEN RES 018, 2007-2011), añaden a esta lista las especies *C. thomasii* y *C. longiflorus*. Ésta última pertenece a otra serie dentro de la misma sección (comunicación personal del Laboratorio de Química y Tecnología de los Alimentos, de la Facultad de Química de la Universidad Aristotélica de Tesalónica, en Grecia).

Hay que señalar que si bien el parámetro  $E^{1\%}$  medido a 330nm y a 250nm se utiliza en la Norma I.S.O. 3632-1 y 2. como un indicador del contenido en safranal y

picrocrocina respectivamente, diversos estudios especializados han señalado la falta de adecuación de este parámetro para medir estos compuestos, si bien es adecuado para conocer la cantidad de crocinas de la muestra (Carmona *et al.*, 2006a)

En el presente trabajo, se ha querido estudiar el contenido en pigmentos de los estilos de las especies españolas de *Crocus*, no sólo para su uso como colorantes sino buscando una caracterización fitoquímica de estas especies y una diferenciación de las mismas por los pigmentos que poseen.

Los datos obtenidos mediante espectrofotometría de UV-Vis (espectro de orden cero, segunda derivada, valores del parámetro  $E^{1\%}$ ) no son de utilidad para separar las especies, y sólo permiten separar del resto *C. nevadensis* y *C. carpetanus*, por la ausencia de crocinas que se intuye en sus estilos blancos. El perfil UV-Vis no presenta un patrón claramente diferente entre las distintas especies que poseen carotenoides y las entradas dentro de una misma especie muestran grandes diferencias cuantitativas, lo que hace el método poco adecuado para la identificación de especies. Los resultados también sugieren la necesidad de observar no sólo crocinas sino también flavonoides para diferenciar entre especies. Cabe señalar la escasa utilidad del descriptor bioquímico  $E^{1\%}$ , presente en la lista de Descriptores de *Crocus spp.*, para separar estas especies silvestres.

El análisis de los estilos mediante cromatografía HPLC ha permitido separar casi todas las especies en base a la presencia de los principales picos que corresponden a crocinas y a flavonoides. El contenido en crocinas es similar en las especies que pertenecen a la misma serie, como es el caso de *C. serotinus* y *C. nudiflorus* o bien *C. nevadensis* y *C. carpetanus*. Moraga *et al.*, (2013) también observaron que, generalmente, también se da una mayor similitud en el contenido de crocinas entre especies de la misma serie. No obstante, el contenido en flavonoides, junto con el de crocinas, permite establecer una separación entre las especies de *Crocus* españoles que poseen crocinas. Las diferencias cualitativas en la fracción de flavonoides ha sido imprescindible para separarlas. Sin embargo, el contenido en flavonoides no permite diferenciar los estilos de las especies carentes de crocinas. Estudios con otras especies silvestres de *Crocus*, también han señalado la necesidad de identificar otros metabolitos distintos a los carotenoides para la identificación de las mismas (equipo de la Universidad de Tesalónica, comunicación personal).

Las diferencias cualitativas entre entradas dentro de especie, observadas mediante cromatografía HPLC para los principales picos de los compuestos flavonoides y carotenoides, son generalmente de poca importancia. Sí que se han observado diferencias cuantitativas dentro de especie. No obstante, hay que señalar una diferencia cualitativa importante entre entradas de la especie *C. vernus*. Se han identificado tentativamente compuestos únicos en una entrada de esta especie.

El análisis de los carotenoides basado en la observación del cromatograma de HPLC es también un descriptor para *Crocus* spp. En base a nuestros resultados, este descriptor es de gran utilidad siempre que se complemente con el análisis de los compuestos flavonoides. No obstante, para confirmar su utilidad sería imprescindible analizar más poblaciones.

## 5.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES MÁS ABUNDANTES MEDIANTE HPLC

En las especies silvestres españolas de *Crocus* se han identificado tentativamente hasta 6 crocinas diferentes, todas ellas presentes también en los estigmas de *C. sativus*, con la excepción de la crocina correspondiente al pico nº 4, Crocina *cis-x*, que sólo se ha identificado en *C. vernus* (Tarantilis *et al.*, 1994 y 1995; Straubinger *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Lozano *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2001; Carmona *et al.*, 2006a y Datos no publicados del proyecto europeo CROCUSBANK (AGRI GEN RES 018, 2012)).

Una diferencia a señalar con la especie cultivada, es la ausencia de la picrocrocina, glucósido responsable del sabor picante de azafrán. Dada la relación entre la producción de los precursores de la crocina y la picrocrocina, a partir de la zeaxantina, en la ruta de síntesis de apocarotenoides en azafrán, quizás habría que pensar en ciertas diferencias en estas rutas entre la especie cultivada y la silvestre. El contenido en picrocrocina es también un descriptor bioquímico, presente en la lista de Descriptores de *Crocus* spp., que no sería de utilidad para separar estas especies silvestres, porque parece no estar presente en sus estilos según nuestra identificación tentativa.

Existen diferencias cualitativas entre la especie cultivada y las silvestres en la abundancia relativa de las crocinas con alto grado de glicosilación. Las crocinas más abundantes en las especies silvestres, son aquellas con un mayor grado de glicosilación. Éstas crocinas son las más raramente identificadas en la especie cultivada, en que son más frecuentes aquellas menos glicosiladas (Carmona *et al.*, 2006c). El proceso de la glicosilación sucede en la última etapa de la síntesis de los carotenoides, y permite que estos se transformen en carotenoides más estables y solubles. La glicosilación de estas moléculas se debe a la actividad de enzimas glicosiltransferasas que han sido identificadas en azafrán (Moraga *et al.*, 2004). En base a nuestros resultados, cabría suponer una actividad diferente de estos enzimas en las especies silvestres.

Una mayor solubilidad de las crocinas es más interesante para una utilización comercial, y en este sentido las crocinas obtenidas de especies silvestres podrían tener interés, ya que dada la similitud con las observadas en azafrán, es de esperar que tengan las mismas propiedades antioxidantes y nutraceuticas descritas para la especie cultivada en la introducción.

En los estilos de las especies silvestres se encuentran también 9 tipos de kaempferoles distintos y un alcaloide. Se han identificado tentativamente cuatro de los nueve kaempferoles. Todos ellos están también presentes en los estigmas de azafrán (Tarantilis *et al.*, 1995; Lozano *et al.*, 1999; Nørbæk *et al.*, 2002; Carmona *et al.*, 2006a; Carmona *et al.*, 2007 y Datos no publicados del proyecto europeo CROCUSBANK (AGRI GEN RES 018, 2012)).

Los flavonoides son un tipo de compuestos fenólicos con importante actividad antioxidante y propiedades quelantes. Se encuentran altamente concentrados en frutas, verduras, vino, té y cacao. También tienen propiedades cardio-protectoras por su capacidad para evitar la oxidación de los lípidos. Pueden también formar quelatos con los metales y atenúan la capacidad oxidativa de los radicales libres (Kondo *et al.*, 1996; Mazur *et al.*, 1999; Facino *et al.*, 1999). En marrubio se ha visto que tienen actividad antibacteriana (Rigano *et al.*, 2007). Los flavonoides que se han identificado por el método del analito puro son el kaempferol-3-O-glucósido y kaempferol-3-O-rutinósido, en la entrada BCU003198 de la especie *C. vernus* y la entrada BCU003001 de *C. nudiflorus*, respectivamente. El compuesto Kaempferol-3-O-glucósido, también llamado astragalina, es muy abundante en los tépalos de *Crocus* (Nørbæk *et al.*, 2002), y también está presente en las judías verdes, en el brócoli, en las almendras, en el té (<http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/320>, en 2015), en el vino (Ghiselli *et al.*, 1998; Zamorano, 2004), en las hojas del ginkgo (Yuting *et al.*, 1990; Husain *et al.*, 1987; Bors *et al.*, 1990), en el arándano rojo (Puentenueva, 2014), o en el extracto metanólico de las frondas de los helechos (Klaus-Peter, 1999), entre otros. El kaempferol-3-O-rutinósido está también presente en el albaricoque (García-Viguera *et al.*, 1994), en el kiwi (Daves y Keene, 1999), en el té, en las almendras (<http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/320>, en 2015), en el marrubio (Rigano *et al.*, 2007), y en el hipérico (Silva *et al.*, 2005) entre otros.

### 5.3 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL EN CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES MEDIANTE HPLC-DAD

La cuantificación de las crocinas totales confirma la menor cantidad de este compuesto en los estilos de las especies silvestres españolas de *Crocus*, en comparación con la cantidad que contiene el azafrán (0,9 - 1,36 g de crocinas por 100 de estilos secos frente a 11,57 - 32,6 g), en muestras de azafrán españolas, perteneciendo algunas de ellas a la D. O. "Azafrán de La Mancha" (Sánchez *et al.*, 2009; Anastasaki *et al.*, 2010b). Hay que señalar que esta comparación es orientativa, debido a la mayor precisión en el cálculo de la concentración de crocina del azafrán por considerar el coeficiente de extinción molar de los dos isómeros de las crocinas.

Se ha descrito que todos los derivados de la crocina se isomerizan, como crocina *cis* y *trans*, excepto la crocina 1 (Dhingra *et al.*, 1975), siendo más bioactivas las crocinas *trans*. El trabajo de Speranza *et al.* (1984) indica que las crocinas *trans* sufren reacciones de fotoisomerización y se convierten en crocinas *cis*, dependiendo de las

condiciones ambientales y del manejo del cultivo. El contenido en crocinas *trans* totales en las especies silvestres españolas de *Crocus* se sitúa entre el 65-82% respecto del total de las crocinas, que equivale a un ratio de crocinas *trans/cis* de 1,89 a 4,6. En la especie *C. sativus*, este ratio toma unos valores de entre 8,28 y 14,10 (Carmona *et al.*, 2005; Datos no publicados del proyecto europeo CROCUSBANK, AGRI GEN RES 018, 2010; Kyriakoudi *et al.*, 2012). La luz UV produce la isomerización de los ésteres de crocina *trans* a la configuración *cis*, y el tostado a altas temperaturas podría producir el mismo efecto (Carmona *et al.*, 2006a). Una mayor exposición a la luz UV podría explicar, parcialmente, el menor contenido en crocinas *trans* en las especies silvestres, pero no se han realizado ensayos en estas especies que confirmen la influencia de los factores ambientales sobre la diversidad de las crocinas producidas.

En azafrán (*C. sativus*), los análogos de la crocina incluyen entre 1 y 4 isómeros *trans*, de los cuales los más abundantes son la crocina *trans*-4-GG y la crocina *trans*-3-Gg (Liakopoulou-Kyriakides y Kyriakidis, 2002), mientras que las crocinas-*cis* se presentan en menor cantidad (Li *et al.*, 1999). En extractos de estigmas de azafrán es destacable la elevada proporción de la crocina *trans*-4-GG, que se estima en el 60-65 % del contenido total de crocinas, y la crocina *trans*-3-Gg se encuentra en un 30% (Morimoto *et al.*, 1994; Carmona *et al.*, 2006a). Sin embargo, el contenido de crocina *trans*-4-GG en las especies silvestres de *Crocus* españolas se reduce a menos de la mitad en las especies *C. serotinus* y *C. nudiflorus* (17,4% y 20,1% respectivamente), y existe gran variabilidad intraespecífica. La crocina *trans*-3-Gg no ha sido identificada tentativamente en los estilos de estos *Crocus* silvestres. El contenido en crocina *trans*-4-GG es utilizado en un descriptor bioquímico presente en la lista de Descriptores de *Crocus* spp., que no sería de utilidad para separar estas especies silvestres, porque ambas presentan un contenido similar de esta crocina.

#### 5.4 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL PERFIL FITOQUÍMICO DE LAS ESPECIES SILVESTRES DE *CROCUS* MEDIANTE ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES

El análisis de coordenadas principales, así como el análisis clúster nos indica que es posible separar las especies silvestres españolas del género *Crocus* por la presencia o ausencia de los principales compuestos carotenoides y flavonoides, y su agrupación es similar a la observada al analizar los caracteres morfológicos, indicándonos el interés taxonómico y en el análisis filogenético de estos pigmentos estudiados.

Las especies *C. nevadensis* y *C. carpetanus*, pertenecientes a la misma serie, aparecen próximas entre si y alejadas del resto. La posición que ocupan dentro del dendrograma, respecto el resto de especies, es similar a aquella que ocupaban en el dendrograma realizado a partir de caracteres morfológicos. Estas especies se caracterizan por su ausencia de crocinas y en ambas están ausentes los flavonoides Kaempferol 3 y 5, Kaempferol 3-O-rutinósido, Kaempferol 3-O-soforósido-7-O-glucósido y Kaempferol-3-O-glucósido.

Asimismo, existe una relación próxima entre *C. serotinus* y *C. nudiflorus* que también pertenecen a la misma serie, y poseen las mismas crocinas. Además, hay una entrada de *C. serotinus* con perfil fitoquímico similar a *C. nudiflorus*.

No obstante, hay que señalar que al estudiar estos pigmentos, no siempre se encuentra una relación entre el perfil fitoquímico y la cercanía filogenética de las especies. Así, Moraga *et al.*, (2013) observaron que el perfil de carotenoides de otras especies del género *Crocus* no correspondía con las correlaciones filogenéticas existentes entre las mismas.

Los resultados obtenidos por Nørbæk *et al.* (2002) muestran que el perfil de flavonoides de los tépalos, de las 70 especies del género *Crocus* que analiza, facilita la separación de las mismas y apoya las relaciones filogenéticas descritas por Mathew (1982) excepto para la serie *Biflori*. En general, este perfil de flavonoides era más similar dentro de las series que entre las mismas, y dentro de especie era similar entre las subespecies analizadas. Sin embargo, hay que indicar que sólo trabajan con una entrada por especie o subespecie. Así, se plantea la necesidad de ampliar a un mayor número de poblaciones los estudios sobre la fitoquímica de las especies de este género, dada la posible variación intraespecífica existente.

## 6 ESTUDIO PRELIMINAR DEL USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS* EN ESTADO VEGETATIVO

Los caracteres morfológicos, fenológicos, bioquímicos y los relacionados con su ambiente, nos han permitido caracterizar las especies y encontrar rasgos que las identifican y separan del resto, consiguiendo una clasificación rápida y eficaz de las entradas. De todos estos caracteres, el rasgo más característico de cada especie es la flor, pero no siempre es posible encontrarlos durante su etapa de floración. El desarrollo de las flores requiere cormos de un tamaño que sólo se alcanza tras un largo período de tiempo, por lo general de dos a tres años. Otro rasgo distintivo que podíamos utilizar para identificar algunas especies en la etapa vegetativa es la morfología de la capa más externa de la túnica del cormo (Mathew, 1982). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la recuperación de esta última capa no es factible durante la recogida de muestras y las diferencias entre especies españolas pueden ser realmente sutiles. Las diferencias a partir de la morfología de la hoja requerirían, en algunos casos, estudios anatómicos de una duración entre 1 y 2 semanas si se conoce bien la metodología. Así, diferenciar las especies se puede complicar cuando éstas no han florecido y existe una gran similitud en su etapa vegetativa. Hay que añadir que, en nuestros trabajos de colectas, hemos encontrado que *C. serotinus* y *C. nevadensis*, *C. serotinus* y *C. carpetanus*, y *C. nudiflorus* y *C. vernus* comparten hábitat. Otros autores (Fernández y Sesé, 1989) describen que *C. nevadensis* y *C. vernus* también coinciden en hábitat, si bien nosotros nunca lo hemos observado. También, hay que tener en cuenta que en ocasiones el estado del material que llega a los bancos no permite ser identificado en base a los caracteres utilizados normalmente. En este punto, hay una necesidad de encontrar métodos alternativos que permitan una identificación rápida, sin tener que esperar hasta la floración, o depender de la tenencia de material con túnicas en perfecto estado.

En el presente trabajo, se han puesto a punto protocolos, y se han ensayado distintos tipos de marcadores con la finalidad de iniciar una línea de trabajo que tenga como objetivo la definición de marcadores moleculares para caracterizar de forma inequívoca especies del género *Crocus* en estado vegetativo. Se ha pretendido seleccionar algunos marcadores de interés para posteriores trabajos en profundidad sobre este tipo de marcadores.

Los marcadores RAPD han mostrado ser una herramienta útil para la diferenciación de 11 parejas de especies españolas de *Crocus* de las 21 posibles. Han permitido diferenciar especies que comparten nicho ecológico como *C. vernus* y *C. nudiflorus*, y *C. nevadensis* y *C. vernus*. También han diferenciado entre pares de especies con rasgos morfológicos vegetativos muy similares como *C. serotinus* y *C. vernus*, *C. vernus* y *C. cambessedesii* y por último, *C. nudiflorus* y *C. cambessedesii*. Para confirmar la utilidad de esta herramienta se requiere ampliar el estudio a un mayor número de plantas por

especie, y especialmente, aumentar el número de cebadores empleados. Para evitar los problemas de reproducibilidad que puede presentar esta técnica, podrían diseñarse marcadores de tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*- Regiones Amplificadas de Secuencia Caracterizada) que son codominantes y más específicos y generan amplificaciones más consistentes (Semagn *et al.*, 2006).

El dendrograma construido a partir de la matriz binaria procedente de la lectura de los marcadores RAPD da lugar a una buena agrupación de las entradas para todas las especies, excepto para *C. serotinus* y *C. clusii*, que muestran escasas bandas diferenciales. La utilización de un mayor número de cebadores mejoraría considerablemente los resultados, pero es destacable la agrupación de las entradas en sus respectivas especies, de cinco de las siete especies estudiadas.

El clúster obtenido no muestra la proximidad de las especies que muestran otros trabajos basados en marcadores moleculares o morfológicos, ya que este es un trabajo preliminar y realizado con un mínimo de marcadores.

Los resultados de la amplificación del gen *BCH* indican que no aparecen diferencias claras entre especies para poderlo utilizar como marcador. Para mejorar los resultados obtenidos a partir de los marcadores EPIC, una alternativa podría basarse en la amplificación de otras regiones del gen *BCH* buscando mayor variabilidad de secuencia.

Cuando se hizo un pequeño ensayo para explorar la posibilidad de utilizar marcadores tipo microsatélites para diferenciar especies, se observó que podría separar 7 parejas de especies, siendo de especial interés la separación entre *C. nevadensis* y *C. serotinus* y entre *C. carpetanus* y *C. serotinus* ya que estas parejas de especies comparten hábitat. No obstante, sería necesario hacer más amplio este trabajo, utilizando un mayor número de poblaciones para confirmar que esta metodología pueda ser de utilidad para la diferenciación de estas especies.

En definitiva, estos ensayos han permitido orientar líneas futuras para la obtención de marcadores moleculares que permitan caracterizar las especies españolas de *Crocus*, utilizando metodologías que no son excesivamente complicadas o caras para un Banco de Germoplasma Vegetal, y se han podido definir marcadores que separan todas las parejas de especies que cohabitan un mismo ecosistema, si bien se requerirán trabajos posteriores para confirmar su utilidad y mejorar la reproducibilidad de los métodos.

# **VI. CONCLUSIONES**



## 1. LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE FORESTAL DE LAS DIVERSAS ESPECIES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO *CROCUS*

1.1. Se ha conseguido una representación importante del germoplasma de las diferentes especies del género *Crocus* en España, para que sea conservado en el Banco de Germoplasma Vegetal del CIAF de Albaladejito (Cuenca) dentro de la Red de Colecciones del Programa Nacional de Conservación y Utilización de Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación del INIA. Según la especie se ha colectado material entre un 25% y un 70% de las zonas en las que se había descrito su presencia, y se ha ampliado la colecta a 7 localizaciones no descritas con anterioridad.

1.2. Las especies difieren en su distribución y tienen exigencias edafo-climáticas distintas, habiendo especies como *C. nevadensis* o *C. serotinus* menos exigentes, distribuidas en una gran parte del territorio nacional, mientras que las restantes especies se localizan en zonas más restringidas. Pueden tener exigencias específicas en relación al tipo de suelo, o la altitud (*C. carpetanus*, *C. vernus* y *C. nudiflorus*) o bien ser endemismos de las Islas Baleares (*C. cambessedesii*). En ocasiones, las especies comparten hábitat, y es importante destacar que cuando esto sucede, siempre coexisten especies con diferente fecha de floración.

1.3. El estudio realizado permite sentar las bases para una conservación tanto *ex situ* como *in situ*.

## 2. VARIABILIDAD PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS DE LAS ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO *CROCUS*

2.1. 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.

2.2. Las especies *C. nevadensis* y *C. serotinus*, con una distribución más amplia, presentan una mayor variabilidad intraespecífica para los caracteres relacionados con el tamaño de la flor, el desarrollo vegetativo, y el tamaño de fruto y semilla, que el resto de especies con una distribución más restringida.

2.3. Se da una correlación tanto genética como ambiental entre los caracteres relacionados con el tamaño de la flor, es decir el tamaño de los distintos verticilos florales. Asimismo, también aparece una correlación entre el desarrollo vegetativo y la producción de flores, que es de naturaleza tanto genética como ambiental. Sin embargo, sólo en 3 especies se observa una correlación entre el desarrollo vegetativo de las accesiones y el tamaño de la flor.

2.4. Los caracteres cuantitativos estudiados permiten agrupar las entradas en sus diferentes especies, si bien la agrupación está mejor definida al incorporar los caracteres cualitativos.

2.5. Los caracteres que describen la coloración y la forma de los tépalos son los que muestran una mayor variabilidad, siendo las especies *C. nevadensis* y *C. carpetanus* aquellas con mayor diversidad intraespecífica de interés ornamental.

2.6. Entre los caracteres cualitativos que muestran mayor uniformidad dentro de especies y que servirían para separar entre las mismas se encuentran: ramificación del estilo, color del estilo, aspecto de la túnica, sección de la hoja adulta, forma de la semilla, época de floración y desarrollo de la carúncula. A partir de estos caracteres es posible hacer una agrupación de las entradas en sus respectivas especies de forma que la relación entre especies es similar a la descrita utilizando herramientas moleculares.

### **3. FENOLOGÍA DE LAS ESPECIES SILVESTRES ESPAÑOLAS DEL GÉNERO *CROCUS***

3.1. 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. No obstante, las especies con una variada distribución en relación con la altitud muestran una mayor extensión del período de floración y la variación intraespecífica en el período de brotación es mayor que en el de floración. 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.

3.2. Las especies otoñales tienen un desarrollo más precoz en su ambiente natural y, contrariamente, las especies primaverales tienen una floración más temprana en cultivo controlado sin frío invernal, ya que el período frío no es necesario para la floración en especies primaverales, pero la bajada de temperaturas tras el verano favorece la salida de la flor.

3.3. Existe un tamaño crítico para la floración en las especies silvestres de *Crocus*, y está próximo a 1g. Éste es un peso considerablemente más pequeño que el requerido por la especie *C. sativus*. Además, como ocurre en azafrán, un mayor tamaño de cormo adelanta la brotación en aquella especie en que se ha estudiado.

### **4. FISIOLOGÍA DE LAS ESPECIES SILVESTRES DE *CROCUS***

4.1. La diferenciación floral de los meristemas de todas las especies silvestres de *Crocus* se induce durante la época estival, tras la seca de la hoja, y coincide con lo descrito para azafrán (23°C). Así, las especies primaverales no requieren de un período frío para que se de la inducción floral en la yema terminal. No obstante, su desarrollo es más lento y cuando baja la temperatura no han alcanzado el grado de desarrollo de las especies otoñales.

4.2. La influencia de la temperatura a la que se someten los cormos para florecer depende del estado de la yema. Si la yema está muy desarrollada, el cormo florecerá siempre que la temperatura sea menor que 17°C, mientras que yemas poco desarrolladas la temperatura más elevada adelanta la floración.

4.3. Las raíces son el primer órgano en desarrollarse y en sufrir senescencia. La salida de la hoja es siempre, en general, posterior al desarrollo de las raíces. El crecimiento de los cormos hijos en las especies otoñales tiene lugar tras la floración. En las especies primaverales al inicio de la floración ya existe una cierta acumulación de almidón en los nuevos cormos que se nutrirán inicialmente del cormo madre. Cuando las reservas del cormo madre se agotan, las hojas alcanzan su máximo crecimiento y el cormo comienza su crecimiento acelerado.

4.4. 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. El efecto de la temperatura sobre la senescencia de la hoja es mucho más acusado en las especies que brotan antes, acortando más su ciclo de vida.

4.5. La senescencia de la hoja *per se* no es el único factor que determina la finalización del ciclo de la planta. 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.

4.6. La aplicación de un período frío siempre retrasa el crecimiento de la hoja, pero el comportamiento tras este período invernal al elevarse la temperatura, varía entre especies. Mientras en unas favorece un mayor desarrollo de las hojas, en otras tiene un efecto negativo sobre el tamaño final. Este efecto podría estar relacionado con el crecimiento radicular.

4.7. La latencia de las semillas, en todas las especies, disminuye tras un almacenamiento en seco o *after-ripening* a 23°C previo a la aplicación de las temperaturas óptimas de germinación que se encuentran entre 10-17°C.

4.8. El efecto de la aplicación de un periodo de estratificación fría, tras el almacenamiento en seco, varía en función de la especie y su aplicación sólo acelera la germinación, sin disminuir la viabilidad de la semillas, en *C. nevadensis*

4.9. Se han puesto 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%.

4.10. El cormo obtenido a partir de semilla tarda más de tres años en adquirir el tamaño suficiente para florecer (aprox. 1g), y éstos alcanzan mayor tamaño cuanto antes germina la semilla.

4.11. La influencia de la temperatura sobre el cuajado y desarrollo del fruto depende de que la especie sea de floración otoñal o primaveral, siendo más estrictos los requerimientos para un mayor cuajado y desarrollo en las especies otoñales.

### 5. VARIABILIDAD DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS* PARA EL CONTENIDO EN CAROTENOIDES Y FLAVONOIDES EN SUS ESTIGMAS

5.1. El descriptor bioquímico  $E^{1\%}$  indica el escaso poder colorante, aromático y de sabor que tienen los estigmas de estas especies silvestres en comparación con el azafrán. La cuantificación de crocinas, realizada a partir de los cromatogramas, confirma la menor cuantía de éstas en las especies silvestres, y que sus extractos presentan menor bioactividad.

5.2. En estas especies silvestres se han identificado tentativamente 6 crocinas y 4 kaempferoles diferentes y presentes, generalmente, en todas ellas. Dos de éstos kaempferoles, el kaempferol-3-O-glucósido y el kaempferol-3-O-rutinósido, han sido claramente identificados en dos especies, *C. vernus* y *C. nudiflorus*. Todos estos compuestos se han identificado previamente en los estigmas de *C. sativus*, con la excepción de una crocina exclusiva de *C. vernus*. También se ha identificado tentativamente un compuesto que no se encuentra en azafrán y que parece ser un alcaloide.

5.3. La picrocrocina y la crocina *trans*-3-Gg no se ha identificado tentativamente en ninguna de estas especies. Algún enzima necesario para la síntesis de picrocrocina a partir de zeaxantina, presente en azafrán, podría estar ausente en estas especies silvestres.

5.4. Existen diferencias cualitativas entre la especie cultivada y las silvestres en la abundancia relativa de las crocinas con alto grado de glicosilación. Las crocinas más abundantes en las especies silvestres, son aquellas con un mayor grado de glicosilación. Éstas crocinas son las más raramente identificadas en la especie cultivada, en que son más frecuentes aquellas menos glicosiladas. En base a nuestros resultados, cabría suponer una actividad diferente de estos enzimas en las especies silvestres.

5.5. Los datos obtenidos mediante espectrofotometría de UV-Vis (espectro de orden cero, segunda derivada, valores del parámetro  $E^{1\%}$ ) sólo permiten separar *C. nevadensis* y *C. carpetanus* del resto de especies por la ausencia de crocinas.

5.6. El análisis de los estigmas mediante cromatografía HPLC, en base a 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*.

### 6. ESTUDIO PRELIMINAR DEL USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES ESPAÑOLAS DE *CROCUS* EN ESTADO VEGETATIVO

6.1. Los marcadores RAPD han permitido la diferenciación de 11 parejas de especies españolas de *Crocus* de las 21 posibles y permiten separar 2 parejas de especies que comparten nicho ecológico como *C. vernus* y *C. nudiflorus*, y *C. nevadensis* y *C. vernus*. También han diferenciado entre pares de especies con rasgos morfológicos vegetativos

muy similares como *C. serotinus* y *C. vernus*, *C. vernus* y *C. cambessedesii* y por último, *C. nudiflorus* y *C. cambessedesii*.

6.2. Los resultados de la amplificación del gen *BCH* indican que no aparecen diferencias claras entre especies para poderlo utilizar como marcador.

6.3. Los marcadores tipo microsatélites pueden separar 7 parejas de especies, siendo de especial interés la separación entre *C. nevadensis* y *C. serotinus* y entre *C. carpetanus* y *C. serotinus* ya que estas parejas de especies comparten hábitat.



# **VII. BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFIA**

- Aafi, A., El Kadmiri, A. A., Benabid, A. y Rochdi, M. (2005). Richesse et diversité floristique de la Suberaie de la Mamora (Maroc). Floristic richness and diversity of the Mamora's cork oak forest (Morocco). *Acta botánica malacitana*, (30), 127-138.
- Abdullaev, F.I y Frenkel, G.D. (1992). Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein synthesis. *Biofactors 3*: 201-204.
- Abdullaev, F.I. (1993). Biological effects of saffron. *Biofactors*, 4: 149-152.
- Abdullaev, F.I. (2002). Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.), *Exp. Biol. Med.* 227, 20–25.
- Abdullaev, F.I. y Espinosa-Aguirre, J.J. (2004). Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials, *Cancer Detect. Prev.* 28, 426–432.
- Aedo, C., Aldasoro, J. J., Argüelles, J. M., Crlón, L., Riol, A. D., del Valle, J. G., Laínz, M., ... y Pedraja, Ó. S. (2001). *Contribuciones al conocimiento de la flora cantábrica: V*. Real Instituto de estudios Asturianos.
- Agarwal, M., Shrivastava, N. y Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*, 27(4), 617-631.
- Agayev y.M.O. (2002). New features in karyotype structure and origin of saffron *Crocus sativus* L. *Cytologia* 67:245-252.
- Agayev y.M.O., Fernandez, J. y Zarifi, E. (2009). Clonal selection of saffron (*Crocus sativus* L.): the first optimistic experimental results. *Euphytica*, 169:81-99.
- Aghamohammadi Z (1977). An investigation of asexual reproduction, induction of variability of mutagens and sexual sterility of saffron (*Crocus sativus*) as measured by pollen stainability and pollen germination in relation to chromosome pairing. M.Sc. thesis, University of Tehran. Tehran, Iran.
- Ahrazem, O., Moraga, A.R, Lopez, R.C., and Gomez-Gomez, L. (2010). The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *J Exp Bot* 61, 105-119. doi: 10.1093/jxb/erp283
- Ahrazem, O., Moraga, A.R, Berman, J., Capell, T., Christou, P., Zhu, C. y Gómez-Gómez, L. (In press). The carotenoid cleavage dioxygenase CCD2 catalyzing the synthesis of crocetin in spring *Crocuses* and saffron is a plastidial enzyme. *New Phytologist*.
- Alavi-Kia, S. S., Mohammadi, S. A., Aharizad, S. y Moghaddam, M. (2008). Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in *Crocus* genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism. *Biotechnology y Biotechnological Equipment*, 22(3), 795-800.
- Alberini, M., (1990). Saffron: sapore e colore. Lo zafferano. *Proceedings of the International Conference on Saffron (Crocus sativus L.)*. L' Aquila, Italy: 39-46.
- Alcaraz, F. (1996). Fitosociología integrada, paisaje y Biogeografía. En: Loidi, J. (ed.) *Avances en Fitosociología: 59-94 Universidad del País Vasco. Zarautz*.
- Alcázar, A. (2013). Development of a molecular-based tool for the differentiation of Spanish *Crocus* species. Trabajo final de grado. ETSIAMN UPV (Valencia). Directores Rosa Victoria Molina Romero, Ana María Pérez de Castro y Begoña Renau Morata
- Al-Eisawi, D. (2001). Two new species of Iridaceae, *Crocus naqabensis* and *Romulea petraea*, from Jordan. *Arab Gulf J. Sci. Res.* 19: 167–169.
- Alomar, G. y Rita, J. i Rosselló, J.A. (1988). Notas florísticas de las Islas Baleares (III). *Boll. Soco Hist. Nat. Balears*, 32, 141-144.
- Alonso, A. P., Raymond, P., Hernould, M., Rondeau-Mouro, C., de Graaf, A., Chourey, P., ... y Dieuaide-Noubhani, M. (2007). A metabolic flux analysis to study the role of sucrose synthase in the regulation of the carbon partitioning in central metabolism in maize root tips. *Metabolic engineering*, 9(5), 419-432.
- Alonso, G. L., Salinas, M. R., Garijo, J. y Sánchez, M. A. (2001). Composition of crocins and picrocrocin from Spanish saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Food Quality* 24, 219-233.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

- Alonso, G. L., Salinas, M. R., Esteban-Infantes, F. J. y Sánchez, M. A. (1996). Determination of safranal from saffron (*Crocus sativus* L.) by thermal desorption-gas chromatography. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 44, 185–188.
- Alsayied, N. F., Fernández, J. A., Schwarzacher, T. y Heslop-Harrison, J. S. (2015). Diversity and relationships of *Crocus sativus* and its relatives analysed by inter-retroelement amplified polymorphism (IRAP). *Annals of botany*, mcv103.
- Amooaghaie, R. (2007). Low temperature storage of corms extends the flowering season of saffron (*Crocus sativus* L.). *Acta Hort.(ISHS)* 739:41-47.
- Anastasaki, E., Kanakis, C., Pappas, C., Maggi, L., Del Campo, C. P. y Carmona, M. (2010a). Differentiation of saffron from four countries by mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *European Food Research and Technology*, 230, 571–577.
- Anastasaki, E. G., Kanakis, C. D., Pappas, C., Maggi, L., Zalacain, A., Carmona, M., ... y Polissiou, M. G. (2010b). Quantification of crocetin esters in saffron (*Crocus sativus* L.) using Raman spectroscopy and chemometrics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 6011-6017.
- Andres, F. y Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat Rev Genet* 13: 627-639.
- Anthos. (2015). Sistema de información de las plantas de España. Real Jardín Botánico, CSIC-Fundación Biodiversidad. Recurso electrónico en [www.anthos.es](http://www.anthos.es). Consulta realizada en marzo de 2012.
- Badri, M.A., E. H. Minchinb, P. y Lapointe, L. (2007). Effects of temperature on the growth of spring ephemerals: *Crocus vernus*. *Physiologia Plantarum* 130: 67–76.
- Banovetz, S. J. y Scheiner, S. M. (1994). The effects of seed mass on the seed ecology of *Coreopsis lanceolata*. *American Midland Naturalist*, 65-74.
- Basker, D. y Negbi, M. (1983). The use of saffron. *Economic Botany*, 37, 228–236.
- Baghalian, K., Shabani Sheshtamand, M y Jamshidi, A.H. (2010). Genetic variation and heritability of agro-morphological and phytochemical traits in Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) populations. *Industrial Crops and Products*, 31:401-406.
- Barra, A. (1982). Sobre algunos *Crocus* españoles. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 39 (2): 541-543. Real Jardín Botánico.
- Barra, A. (1983). *Crocus nevadensis* Amo en Valencia. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 40 (1) p. 284. Real Jardín Botánico.
- Baskin, C. C. y Baskin, J. M. (2001). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Elsevier. 666 pp.
- Beiki, A. H., Keifi, F. y Mozafari, J. (2010). Genetic Differentiation of *Crocus* Species by Random Amplified Polymorphic DNA. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*. 18: 1-10.
- Benito Alonso, J. L. (2006). Vegetación del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido (Sobrarbe, Pirineo central aragonés). *Publicaciones del Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón, Zaragoza*.
- Benito Alonso, J. L. (2008) Base de datos de la flora y vegetación del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido. *JOLUBE, Consultoría ambiental*.
- Benschop, M., (1993). *Crocus*. In: De Hertog, A. y Le Nard, M. (Eds.), *The Physiology of Flower Bulbs*. Elsevier, Amsterdam, (Chapter 19), pp. 257–283.
- Bermejo-Barrera, J.C., González García, F.J. y Reboreda Morillo, S. (1996). Los orígenes de la mitología griega. *Akal. Madrid. Pág. 80*
- Bewley, J.D. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055–1066.
- Bewley, J.D. y Black, M. (1994). *Seeds: physiology of development and germination*. 2nd edn. Science y Business Media, 31 jul. 1994 - 445 páginas
- Bioversity International, Rome (Italy), Universitat Politècnica de Valencia, (Spain), Universidad de Castilla-La Mancha (Spain), Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Spain). (2015). Descriptors for *Crocus* (*Crocus* spp.). Bioversity International, Rome (Italy). 73 p.

- Boyle, T. H. y Stimart, D. P. (1987). Influence of irrigation interruptions on flowering of *Hippeastrum X hybridum*'Red Lion'. *HortScience (USA)*. 22:1290-1292.
- Braun - Blanquet, J., (1979). Fitosociología. Ed. Blume. Madrid.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. y Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 189: 342-355.
- Bose, T.K. yadav, L.P., Pal, P., Das, P. y Parthasarathy, V.A. (2003). *Commercial Flowers*, 2 (2): 164-165.
- Botella, O., De Juan A., Muñoz M.R., Moya A. y López, H. (2002). Descripción morfológica y ciclo anual del azafrán (*Crocus sativus L.*). *Cuadernos de Fitopatología* 71, 18–28.
- Bouvier, F., Suire, C., Muttener, J., Camara, B. (2003). Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: Identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CSZCD genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell*, 15, 47-62.
- Brown, A.C., Hairfield, M., Richards, D.G., McMillin, D.L., Mein, E.A. y Nelson, C.D. (2004). Medical nutrition therapy as a potential complementary treatment for psoriasis--five case reports. *Altern Med Rev*. 9(3):297-307.
- Caballero-Ortega, H., Pereda-Mirand, R. y Abdullaev, F.I. (2007). HPLC quantification of major active components from 11 different Saffron (*Crocus sativus L.*) sources. *Food Chem*. 100, 1126–1131.
- Camaño-Portela, J.L., Pino Pérez, J.J., Silva-Pando, F.J. y Pino Pérez, R. (2005). Asientos corológicos, LOU 2003. *Bol. BIGA*, 1: 3-138.
- Camaño-Portela, J.L., Silva-Pando, F.J., Pino Pérez, J.J. y Pino Pérez, R. (2008). Asientos corológicos LOU, (2005). *Boletín BIGA*, 4: 5-21
- Camaño-Portela, J. L., Pino Pérez, J.J., Silva-Pando, F. J. y Pino Pérez, R. (2009). Asientos corológicos LOU, (2008). *Boletín BIGA*, 6: 25-36.
- Candan, F. (2012). Seed Micromorphological Investigations On 7 New Taxa Of *Crocus chrysanthus* (Herbert) Herbert from Turkey. In: *3rd International Symposium on Sustainable Development, May 31 - June 01 2012, Sarajevo*.
- Candan, F. (2015). Morphological and Leaf Anatomical Investigations on 2 Yellow Flowered Endemic Taxa of *Crocus L.*(*Crocus ancycensis*, *Crocus siehenaus*) from Turkey. *International Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries*, 3(3), 93.
- Carmona, M., Zalacaín, A., Pardo, J.E., Lopez, E., Alvarruiz, A. y Alonso, G.L. (2005). Influence of different drying and aging conditions on saffron constituents. *J. Agr. Food Chem*. 53, 3974–3979.
- Carmona, M., Zalacaín, A. y Alonso, G.L. (2006a). The Chemical Composition of Saffron: color, taste and aroma. Ed: *Bomarzo*, 213 pp.
- Carmona, M., Zalacaín, A., Salinas, M.R. y Alonso, G. L. (2006b). Generation of saffron volatiles by thermal carotenoid degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 6825.
- Carmona, M., Zalacain, A., Sánchez, A. M., Novella, J. L., y Alonso, G. L. (2006c). Crocetin esters, picrocrocin and its related compounds present in *Crocus sativus* stigmas and *Gardenia jasminoides* fruits. Tentative identification of seven new compounds by LC-ESI-MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(3), 973-979.
- Carmona, M., Sánchez, A. M., Ferreres, F., Zalacaín, A., Tomás-Barberán, F. y Alonso, G. L. (2007). Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins. *Food Chem.*, 100, 445-450.
- Carreras i Raurell, J., Carrillo, E., Masalles i Saumell, R. M., Ninot i Sugrañes, J. M. y Vigo, J. (1993). El poblament vegetal de les valls de Barravés i Castanesa. I. Flora i vegetació. *Acta Botànica Barcinonensia*, 1993, vol. 42, p. 3-392.
- Carta, A., Probert, R., Moretti, M., Peruzzi, L. y Bedini, G. (2014). Seed dormancy and germination in three *Crocus ser.* Verni species (*Iridaceae*): implications for evolution of dormancy within the genus. *Plant Biology* 16: 1065–1074.
- Castro I., M. y Rosselló, J.A. (2006). New chromosome numbers for plant taxa endemic to the Balearic Islands. *Folia Geobotanica* 41: 433-451.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

- Castillo, R., Fernandez, J.A. y Gomez-Gomez, L. (2005). Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives. *Plant Physiol.* 139, 674–689.
- Çavuşoğlu, A. y Erkel, E.I. (2009). Saffron (*Crocus sativus* L.) growing without removing of mother corms under greenhouse condition. *Turkish Journal Of Field Crops*, 14(2), 170-180.
- Çavuşoğlu, A. (2010). The effects of cold storage of saffron (*Crocus sativus* L.) corms on morphology, stigma and corm yield. *African Journal of Agricultural Research Vol. 5(14)*, pp. 1812-1820.
- Cebolla-Lozano, C. y Rivas-Ponce, M. A. (1994). Atlas florae matritensis (Amaryllidaceae, Iridaceae, Liliaceae, Orchidaceae). *Fontqueria*, 41, 206p.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P., van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Cameron, K.M., Kress, J.W., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G., Richardson, J.E., Hollingsworth, M., Jørgensen, T., Kelly, L. y Wilkinson, M. (2007). A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295–299.
- Chichiricco, G. (1984). Karyotype and meiotic behaviour of the triploid *Crocus sativus* L. *Caryologia* 37:233-239.
- Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of analytical chemistry* (pp. 10815–10837). John Wiley and Sons Ltd.
- Coen, E.S. y Meyerowitz, E.M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353:31–7
- Cole-Rogers, P., Smith, D.W., Bosland, P.W. (1997). A novel statistical approach to analyze genetic resource evaluations usings *Capsicum* as an example. *Crop Sci.* 37:1000-1002.
- Copete, E., Herranz, J. M., Ferrandis, P., Baskin, C. C. y Baskin, J. M. (2011). Physiology, morphology and phenology of seed dormancy break and germination in the endemic Iberian species *Narcissus hispanicus* (Amaryllidaceae). *Annals of botany*.
- Corneanu, C.G., Corneanu, M., Niculescu, M. y Răduțoiu, D., (2003) The intraspecific and interspecific variability in *Crocus flavus* and *Crocus vernus* species. *Acta Horti Bot. Bucurestiensis*, 30, pp. 61-70, București
- Coté, F., Cormier, F., Dufresne, C., Willemont, C. (2001) A highly specific glucotransferase is involved in the synthesis of crocetin glycosylesteres in *Crocus sativus* cultured cells. *J. Plant Physiol.* 158, 553-560.
- Dawes, H. M. y Keene, J. B. (1999). Phenolic composition of kiwifruit juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(6), 2398-2403.
- Daymond, A.J., Wheeler, T.R., Hadley, P., Ellis, R.H. y Morison, J.I.L. (1997). The growth, development and yield of onion (*Allium cepa* L.) in response to temperature and CO<sub>2</sub>. *Journal of Horticultural Science* 72, 135–145.
- De Bolòs, O. y Vigo, J. (2001). 1984-2001. Flora dels Països Catalans. *Barcino. Barcelona*.
- De Mastro, G. y Ruta, C. (1993). Relation between corm size and saffron (*Crocus sativus* L.) flowering. *ACTA HORTICULTURAE* (344): 512-517.
- De Hertogh, A. D. (1996). *Holland bulb forcer's guide* (No. Ed. 5). International Flower Bulb Centre and Dutch Bulb Exporters Association.
- De Hertogh, A. y Le Nard, M. (1993). *Physiology of flower bulbs. A Comprehensive Treatise on the Physiology and Utilization of Ornamental Flowering Bulbous and Tuberous Plants*, Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherland. p. 812.
- De Juan, J.A., Moya, A. y López, S. (2003). Influencia del tamaño del cormo y la densidad de plantación en el rendimiento y la calidad de la producción de cormos de *Crocus sativus* L. *ITEA* 99(2):169-180.
- De Los Mozos-Pascual, M, Santana-Méridas, O, Rodríguez-Conde, M. F., Sánchez-Vioque, R., Pastor-Férriz, T., Fernández, J. A., Santaella, M., Sánchez, R. A., ... y Molina, R. V. (2009, May). A preliminary characterization of saffron germplasm from the CROCUSBANK collection. In *III International Symposium on Saffron: Forthcoming Challenges in Cultivation, Research and Economics* 850 (pp. 35-40).

- Di Benedetto, A. (2008). Fisiología de la floración. Curso de Ecofisiología de Hortalizas y Ornamentales, FCA-UN. Cuyo, Mendoza. 26pp.
- Dhingra, V., Seshadri, T. y Mukerjee, S., (1975). Minor carotenoid glycosides from saffron (*Crocus sativus*). *Ind. J. Chem.* 13, 339–341.
- Dole, J. M. y Wilkins, H. F. (1994). Interaction of Bulb Vernalization and Shoot Photoperiod on Nellie White Easter Lily. *HortScience*, 29(3), 143-145.
- Donohue K., Rubio de Casas R., Burghardt L., Kovach K. y Willis C.G. (2010) Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41, 293–319.
- Douglas, M. H., Smallfield, B. M., Wallace, A. R. y McGimpsey, J. A. (2014). Saffron (*Crocus sativus* L.): The effect of mother corm size on progeny multiplication, flower and stigma production. *Scientia Horticulturae*, 166, 50-58.
- Granzow, I. (1981). Dos geófitos de la sierra de Alcaraz. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 38, No. 1, p. 313). Real Jardín Botánico.
- Erol, O., Can, L. y Şik, L. (2012). *Crocus demirizianus* sp. nov. from northwestern Turkey. *Nordic Journal of Botany*, 30(6), 665-667.
- Erol, O., Kaya, H. B., Azik, L., Tuna, M., Can, L. y Tanyolac, M. B. (2014). The genus *Crocus*, series *Crocus* (Iridaceae) in Turkey and 2 East Aegean islands: a genetic approach. *Turkish Journal of Biology*, 38 (1).
- Espinosa-Jiménez, M.A., Alcántara-Gámez, J. y Fernández-López, C. (1994). Fenología de algunos geófitos de Jaén. *Blancoana*, 11, 14-20.
- Ehsanzadeh, P. yadollahi, A.A. y Maibodi, A.M.M. (2004). Productivity, growth and quality attributes of 10 Iranian Saffron accessions under climatic conditions of Chahar-Mahal Bakhtiari, Central Iran. *Proceedings of the 1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology*, 183-188.
- Escribano, J., Piqueras, A., Medina, J., Ríos, J. y Fernández, J. A. (1999a). Isolation and cytotoxic properties of novel glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.). *Biochem. Biophys. Acta* 1426: 217-222.
- Escribano, J., Piqueras, A., Medina, J., Rubio, A., Álvarez-Ortí, M. y Fernández, J.A. (1999b). Production of a cytotoxic proteoglycan using callus culture of saffron corms (*Crocus sativus* L.). *J. Biotechnol.* 73: 53-59.
- Escribano, J., Díaz-Guerra, M.J.M., Riese, H.H., Ontañón, J., García-Olmo, D., García-Olmo, D.C., Rubio, A. y Fernández, J.A. (1999c). In vitro activation of macrophages from corm of *Crocus sativus* L. *Cancer Lett.* 144: 107-114.
- Escribano, J., Díaz-Guerra, M.J.M., Riese, H.H., Álvarez, A., Proenza, R. y Fernández, J.A. 2000. The cytotoxic effect of glucoconjugate extracted from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) on human cell lines in culture. *Planta Med.* 66: 157-162.
- Facino, R. M., Carini, M., Aldini, G., Berti, F., Rossoni, G., Bombardelli, E. y Morazzoni, P. (1999). Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats. *Life sciences*, 64(8), 627-642.
- FAO Estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, 2015. <http://www.fao.org/statistics/es/>
- Fatehi, M., Rashidabady, T. y Fatehi-Hassanabad, Z. (2003). Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. *J. Ethnopharmacol.* 84, 199–203.
- Fernández, J. A., Banon, S., Franco, J. A., González, A. y Martínez, P. F. (1997). Effects of vernalization and exogenous gibberellins on curd induction and carbohydrate levels in the apex of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Scientia horticulturae*, 70(2), 223-230.
- Fernández-Pascual E., Jiménez-Alfaro B., Caujapé-Castells J., Jaén-Molina R., Díaz T.E. (2013) A local dormancy cline is related to the seed maturation environment, population genetic composition and climate. *Annals of Botany*, 112, 937–945.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

- Fekrat, H. (2004). The application of crocin and Saffron ethanol-extractable components in formulation of health care and beauty care products. *ISHS Acta Horticulturae 650: I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology*.
- Finch-Savage, W. E. y Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New phytologist*, 171(3), 501-523.
- Foerste, A.F. (1892). On the Relations of Certain Fall to Spring Blossoming Plants. *Botanical Gazette*, 1-8.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP: Phylogeny Inference Package, version 3.5p. *Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA*.
- Fenner, M. (1992) Environmental influences of seed size and composition. *Horticultural Reviews* 13, 183-213.
- Fernández, J.A. (2004). Biology, biotechnology and biomedicine of saffron, *Recent Res. Dev. Plant Sci.* 2, 127–159.
- Fernández, J.A. y Abdullaev, F. (2004). Molecular biological approach of the systematics of *Crocus sativus* L. and its allies. Proceedings of the First International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology. *Acta Horticulturae, ISHS, (650): 17-24*.
- Fernández, J.A., Escribano, J., Piqueras, A. y Medina, J. (2000). A glucoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) inhibits root growth and effects in vitro cell viability. *J. Exp. Bot.* 51: 731-737.
- Fernández, J. A., Santana, O., Guardiola, J. L., Molina, R. V., Heslop-Harrison, P., Borbely, G., ... y De-Los-Mozos-Pascual, M. (2011). The World Saffron and *Crocus* collection: strategies for establishment, management, characterisation and utilisation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58 (1), 125-137.
- Fernández, J.V. y Sesé, J.A. 1989. Notas sobre la flora de la Ribagorza, La Litera y Cinca medio (Alto Aragón Oriental). *Lucas Mallada: revista de ciencias*, 1: 37-50.
- Fernández García-Rojo, C. (2006). Flora de la sierra de San Andrés y cuenca del Fresneda (Ciudad Real, Centro-Sur de la península Ibérica). *Blancoana* 21: 22-101.
- Fernández-Liencre, J. y Fernández-López, C. (1996). Flórlula del rio Cañamares (Jaén). *Blancoana* 13: 69-80.
- Ferrence, S.C. (2004). Therapy with saffron and the Goddess at Thera. *Perspectives in Biology and Medicine* 47 (2).
- Flaishman, M.A. y Kamenetsky, R., (2006). Florogenesis in flower bulbs: classical and molecular approaches. In: Teixeira da Silva, J.A. (Ed.), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, vol. I. Global Science Books, Japan, pp. 33–43.
- Frello S y Heslop-Harrison JS. (2000). Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill 396 (*Iridaceae*) investigated by *in situ* hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. *Annals of Botany*, 86(2), 317-322
- Fluch, S., Hohl, K., Stierschneider, M., Kopecky, D. y Kaar, B. (2010). *Crocus sativus* l. – molecular evidence on its clonal origin. *Acta Hort. (ISHS)* 850:41-46
- Frusciante, S., Diretto, G., Bruno, M., Ferrante, P., Pietrella, M., Prado-Cabrero, A., ... y Giuliano, G. (2014). Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(33), 12246-12251.
- Font Quer, P. (1953). Diccionario de Botánica. *Editorial Labor, Barcelona*.
- Fu, Z., Tan, D., Baskin, J.M. y Baskin, C.C. (2013). Seed dormancy and germination of the subalpine geophyte *Crocus alatavicus* (*Iridaceae*). *Australian Journal of Botany* 61(5) 376-382
- Gandin, A., Gutjahr, S., Dizengremel, P. y Lapointe, L. (2011). Source-Sink imbalance increases with growth temperature in the spring geophyte *Erythronium americanum* *J. Exp. Bot.*, 62, 3467–3479.
- García-Olmo, D.C., Riese, H.H., Escribano, J., Ontañón, J., Fernández J.A., Atiénzar, M. y García-Olmo, D. (1999). Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a

- carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): an experimental study in the rats. *Nutr. Cancer* 35: 120-126.
- García-Río, R. (2004). Flora vascular de Sierra Madrona y su entorno (Sierra Morena, Ciudad Real, España). *Ecología*, 18: 147-214.
- García-Río, R. (2006). Flora y vegetación de interés conservacionista de Sierra Madrona y su entorno (Ciudad Real, Sierra Morena, España). *Revista Ecosistemas*, 16(1).
- García-Viguera C., Bridle P., Ferreres F. y Tomas-Barberan F.A. (1994) Influence of variety, maturity and processing on phenolic compounds of apricot juices and jams. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 199:433-436
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A. y Scaccini, C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 361-367.
- Gil, J. M., Arroyo, J. y Devesa, J. A. (1985). Contribución al conocimiento florístico de las Sierras de Algeciras (Cádiz, España). *Acta Bot. Malacitana*, 10, 97-122.
- Gola, G., Negri, G. y Capelletti, C. 1965. Tratado de Botánica. *Labor*. 1160 p.
- Goldblatt, P. y Takei, M. (1997). Chromosome cytology of *Iridaceae*: patterns of variation, determination of base number, and modes of karyotype change. *Ann Missouri Bot Gard* 84:285–304
- Gresta, F., Avola, G., Lombardo, G. M., Siracusa, L. y Ruberto, G. (2009). Analysis of flowering, stigmas yield and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.) as affected by environmental conditions. *Scientia horticulturae*, 119 (3), 320-324.
- Gresta, F., Lombardo, G.M., Ruberto, G. y Siracusa, L. (2008). Effect of mother corm dimension and sowing time on stigmas yields, daughter corms and qualitative aspects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Mediterranean environment. J. Sci. Food Agric.* 88:1144-1150.
- Grilli Caiola, M., Caputo, P. y Zanier, R. (2004). RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. *Biologia Plantarum*, 48(3), 375-380.
- Grilli Caiola, M. (2005). Embryo origin and development in *Crocus sativus* L. (*Iridaceae*). *Plant Byosystems*, 139(3) 335-343.
- Grilli Caiola, M. y Canini, A. (2010). Looking for saffron's (*Crocus sativus* L.) parents. In: *Husaini AM (Ed) Saffron. Functional Plant Science and Biotechnology*, 4, 1-14.
- Grilli Caiola, M., Leonardi, D. y Canini, A. (2010). Seed structure in *Crocus sativus* L. 3, *C. cartwrightianus* Herb., *C. thomasi* Ten., and *C. hadriaticus* Herb. at SEM. *Plant Syst Evol* (2010) 285:111–120
- Guillén, A. (2014). *Crocus* L. En: *Flora ibérica 20: 454-464. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid*.
- Grime, J.P. y Mowforth, M.A. (1982) Variation in genome size – an ecological interpretation. *Nature* 299: 151–153
- Gutiérrez- García, J. L. y Martín, C. S. (1999). *Estudio de la flora y vegetación de la cuenca alta del Río Castrón (Zamora)*. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal.
- Hadizadeh, F., Mahdavi, M., Emami, S.A., Khashayarmanesh, Z., Hassanzadeh, M., Asili, J., Seifi, M., Nassirli, H., Shariatimoghadam, A. y Noorbakhsh, R. (2007). Evaluation of iso method in saffron qualification. In: *II International Symposium on Saffron Biology and Technology. Acta Horticulturae, ISHS (739): 405-410*.
- Haggag, E.G., Abou-Moustafa, M.A., Boucher, W. y Theoharides, TC. (2003). The effect of a herbal water-extract on histamine release from mast cells and on allergic asthma. *J Herb Pharmacother.* 3(4):41-54.
- Hagiladi, A., Umiel, N., Ozeri y. y Elyasi, S. (1992). The effect of planting depth on emergence and development of some geophytic plants. In: *International Symposium on Flower Bulbs. Acta Horticulturae, ISHS (325): 131-137*.
- Halevy, A. H. (1989). Recent advances in control of flowering and growth habit of geophytes. In *V International Symposium on Flower Bulbs 266* (pp. 35-42).
- Harper, J. L., Lovell, P. H. y Moore, K. G. (1970). The shapes and sizes of seeds. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1,327-56.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

- Harper, J. L. (1977). Population biology of plants. Academic, Londres, 892 págs. (1977).
- Harpke, D., Meng, S., Kerndorff, H., Rutten, T. y Blattner, F.R. (2013). Phylogeny of *Crocus* (*Iridaceae*) based on one chloroplast and two nuclear loci: ancient hybridization and chromosome number evolution. *Mol Phylogenet Evol* 66:617–627.
- Harpke, D., Peruzzi, L., Kerndorff, H., Karamplianis, T., Constantinidis, T., Randelović, V., Randelović, N., Juković, M., Pasche, E. y Blattner, FR. (2014). Phylogeny, geographic distribution and new taxonomic circumscription of the *Crocus reticulatus* species group (*Iridaceae*). *Turkish Journal of Botany* 38: 1182-1198.
- Harpke, D., Carta, A., Tomović, G., Randelović, V., Randelović, N., Blattner, F. R. y Peruzzi, L. (2015). Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus series Verni* (*Iridaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 301(1), 309-325.
- Hartmann, H. T. y Kester, D. E. (1990). Plant Propagation: Principles and Practices. 1968 pp. 702 pp.
- Hartsema, A. M. (1961). Influence of temperatures on flower formation and flowering of bulbous and tuberous plants. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, 16, 123-167.
- Haspolat M., G., Özzambak, E. y Sik, L. (2013) Seed Germination of Some *Crocus* Species of Western Anatolia. *Anadolu, J. of Aari*. 23 (2), 21 – 26.
- Hemmati, K. y Rahimi, S.K. (1994). Searching and extracting antocyanin from saffron petals and study of its stability in a model drink. *Scientific and Industrial Research Organisation and Iranian Nutrition and Food Industry Research Institute*.
- Hendrix, S.D. (1984) Variation in seed weight and its effect on germination in *Pastinaca sativa* L. (*Umbelliferae*). *American Journal of Botany* 71, 795-802
- Hervás, J.L. y Fernández, C., (2000). Algunas monocotiledóneas del Alto Guadalquivir (sur de la península Ibérica) hasta 1.999. *Blancoana* 17: 71-76.
- Herranz J.M., Copete E. y Ferrandis P. (2013) Nondeep complex morphophysiological dormancy in *Narcissus longispathus* (*Amaryllidaceae*): implications for evolution of dormancy levels within section *Pseudonarcissi*. *Seed Science Research*, 23, 141–155.
- Himeno, H. y Sano, K. (1987). Synthesis of crocin, picrocrocín and safranal by saffron stigma-like structures proliferated in vitro. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2395-2400.
- Hilhorst, H.W.M. (1995). A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research* 5: 61–73.
- Hoagland DR y Arnon D. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347, 1–32.
- Horne, J., Carpino, S., Tumminello, L., Rapisarda, T., Corallo, L. y Licitra, G. (2005). Differences in volatiles, and chemical microbial and sensory characteristics between artisanal and industrial Piacentinu Ennese Cheeses, *Int. Dairy J.* 15, 605–617.
- Hosseinzadeh, H. y Khosravan, V. (2002). Anticonvulsant effects of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigmas in mice. *Arch Irn Med*, 5:44-47.
- Husain, S.R. y Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*. 26: 2489-2491.
- Iborra, J. L., Castellar, M. R., Canovas, M. y Manjón, A. (1992) TLC preparative purification of picrocrocín, HTCC and crocin from saffron. *J. Food Sci.* 1992, 57, 714–731.
- Imran, S., Nehvi, F.A., Wani, S.A., Zaffar, G., Khan, M.A. (2010). Studies in relation to molecular variability in saffron. *Acta Horticulturae*, 75-78.
- Instituto Técnico Agronómico de Albacete (ITAP). (1998). Especial azafrán. *Boletín nº 34 Diputación de Albacete, Albacete, Spain*.
- Instituto Técnico Agronómico de Albacete (ITAP). (2013). El cultivo de Azafrán en Castilla-La Mancha. *Boletín nº 88. Diputación de Albacete, Albacete, Spain*.
- ISO 3632.Saffron (*Crocus sativus* L.). ISO-3632 (2003) part 1: specifications, ISO 3632:(2003) part 2: test methods. *Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization*.
- ITIS (The Integrated Taxonomic Information System) Catalogue of life: (<http://www.itis.gov>) (2014)

- Izco, J Y Del Arco, M., (2003). Código Internacional de nomenclatura fotosociológica. *Colección de materiales didácticos universitarios. Serie botánica, 2. Servicio de Publicaciones Universidad de La Laguna. La Laguna. Tenerife.*
- Jackson, S. D. (1999). Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology*, 119(1), 1-8.
- Jacobsen N y Orgaard M (2004). *Crocus cartwrightianus* on the Attica Peninsula. *Acta Hort* 650:65–69.
- Jiménez Cortés, M. A., Cerdà, M. A. y Rita, J. (2014). The effect of the ambient conditions on the life cycle of a bulbous plant. *Tethys*, 11, 39–49
- Kafi M., Kakhki-Hemmati A. y Karbasi, A. (2006). Historical Background, Acreage, Production yield and Uses. Saffron (*Crocus sativus*). En: Kafi, M., Koocheki, A., Rashed, M.H., Nassiri, M. (eds.). *Saffron (Crocus sativus) Production and Processing. Science Publishers.*
- Kamenetsky, R., (2008). Florogenesis in geophytes: Classical and molecular approaches. P20. In Abstracts, 10<sup>th</sup> Int. Symp. On Flower bulbs and Herbaceous Perennials, Lisse, the Netherlands. 20-24 April 2008.
- Kamenetsky, R. (2009). Patterns of dormancy and florogenesis in herbaceous perennial plants: environmental and internal regulation. *Crop science*, 49(6), 2400-2404.
- Kanakis, C.D., Daferera, D.J., Tarantilis, P.A. y Polissiou, M.G. (2004). Qualitative Determination of Volatile Compounds and Quantitative Evaluation of Safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek Saffron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2004) 52 (14), 4515-4521
- Kandemir, N. (2010). A morphological and anatomical investigation about two rare and endemic *Crocus* taxa (Iridaceae) from Southern Anatolia. *Eurasia J. Biosci*, 4, 54-62.
- Kanou, M., Nakanishi, K., Hashimoto, A. y Kameoka, T. (2005). Influences of monosaccharides and its glycosidic linkage on infrared spectral characteristics of disaccharides in aqueous solutions. *Applied Spectroscopy*, 59, 885–892.
- Karssen, C.M., Zagorski, S., Kepczynski, J. y Groot, S.P.C. (1989). Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany* 63: 71±80.
- Katzer, G. (2001). Saffron (*Crocus sativus* L.). *Gernot Katzer's Spice Pages*, 10.
- Keify, F. y Beiki, A. H. (2012). Exploitation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for genetic diversity of saffron collection. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(14), 2761-2768.
- Kerndorff, H. (1993). Two new taxa in Turkish *Crocus* (Iridaceae). *Herbertia* 49:76–86
- Kerndorff, H. y Pasche, E. (1994). *Crocus mathewii*: a new autumn flowering *Crocus* from Turkey. *New Plantsman* 1:102–106
- Kerndorff, H. y Pasche, E. (1997). Zwei bemerkenswerte Taxa des *Crocus biflorus*-Komplexes (Iridaceae) aus der Nordosttürkei. *Linzer Biol Beitr* 29:591–600.
- Kerndorff, H. y Pasche, E. (2003). *Crocus biflorus* in Anatolia. *Plantsman*. 2:77–89
- Kerndorff, H. y Pasche, E. (2004a). Two new taxa of the *Crocus biflorus* aggregate (*Liliiflorae*, Iridaceae) from Turkey. *Linzer Biol Beitr* 36:5–10
- Kerndorff, H. y Pasche, E. (2004b). *Crocus biflorus* in Anatolia, Part Two. *Plantsman* 3:201–215
- Kerndorff, H. y Pasche, E. (2006). *Crocus biflorus* in Anatolia, Part Three. *Linzer Biol Beitr* 38:165–187
- Kerndorff, H. y Pasche, E. (2011). Two new taxa of *Crocus* (*Liliiflorae*, Iridaceae) from Turkey. *Stapfia* 95:2–5.
- Kerndorff, H., Pasche, E., Harpke, D. y Blattner, F.R. (2011). Three new species of *Crocus* (*Liliiflorae*, Iridaceae) from Turkey. *Stapfia* 95:99–105
- Kerndorff, H., Pasche, E., Harpke, D. y Blattner, F.R. (2012). Seven new species of *Crocus* (*Liliiflorae*, Iridaceae) from Turkey. *Stapfia* 97:3–16.
- Kerndorff, H., Pasche, E., Harpke, D. y Blattner, F.R. (2013a). A new species of *Crocus* (*Liliiflorae*, Iridaceae) from Turkey. *Stapfia* 99:141–144.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

- Kerndorff, H., Pasche, E., Harpke, D. y Blattner, F.R. (2013b). Fourteen new species of *Crocus* (*Liliiflorae*, *Iridaceae*) from West, South-west and South-Central Turkey. *Stapfia* 99:145–158.
- Kerndorff, H., Pasche, E., Harpke, D. y Blattner, F.R. (2013c). *Crocus biflorus* Miller (*Liliiflorae*, *Iridaceae*) in Anatolia—Part IV. *Stapfia* 99:159–186
- Khalesi, M., Behboodi, B. y Ebrahimzadeh. (2004a). Development and contraction of contractile roots in *Crocus sativus*. *First International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology. Acta Horticulturae, ISHS (650): 247-251.*
- Khalesi, M., Behboodi, B. y Ebrahimzadeh. (2004b). Modality of the contractile root formation in cultivated saffron, in the field condition and in tissue culture. *First International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology. Acta Horticulturae, ISHS (650): 55-58.*
- Khodorova, N. V. y Boitel-Conti, M. (2013). The Role of Temperature in the Growth and Flowering of Geophytes. *Plants*, 2(4), 699-711.
- Klaus-Peter, A. (1999). Phenolic constituents of the fern *Phegopteris connectilis*. *Phytochemistry*, 52(5), 929-934.
- Kondo, K., Hirano, R., Matsumoto, A., Igarashi, O. y Itakura, H. (1996) Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet* 348 1514–1518.
- Koocheki, A., Ganjeali, A. y Abbassi, F. (2006). The effect of duration of incubation and photoperiod on corm and shoot characteristics of saffron plant (*Crocus sativus* L.). In *II International Symposium on Saffron Biology and Technology* 739 (pp. 61-70).
- Koocheki, A., Alizadeh, A. y Ganjeali, A. (2010). The effect of increased temperature on flowering behaviour of saffron (*Crocus sativus* L.). *Iranian Journal of Field Crops Research*. 8(2):335-324.
- Körner C. y Larcher W (1988). *Plant life in cold climates*. In: Long SP, Woodward FI (eds) *Plants and Temperature*. The Company of Biologists Limited, Cambridge, pp 25–57.
- Kumar, R., Singh, V., Devi, K., Sharma, M., Singh, M.K. y Ahuja, P.S., (2009). State of art of saffron (*Crocus sativus* L.). *Agronomy: a comprehensive review. Food Rev. Int.* 25, 44–85.
- Lang, G. A. (1996). *Plant dormancy: physiology, biochemistry and molecular biology*. Cab International.
- Lage, M. y Cantrell, C. L. (2009). Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocins and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. *Scientia Horticulturae*, 121, 366–373.
- Laliga, L. S. (2007). *Estudio crítico de la flora vascular de la provincia de Alicante: aspectos nomenclaturales, biogeográficos y de conservación* (Vol. 19). Editorial CSIC-CSIC Press.
- Larsen, B., Orabi, J., Pedersen, C. y Ørgaard, M. (2015). Large intraspecific genetic variation within the Saffron-*Crocus* group (*Crocus* L., Series *Crocus*, Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution* 301: 425-437.
- Lapointe, L. (2001). How phenology influences physiology in deciduous forest spring ephemerals. *Physiologia Plantarum* 113, 151–157.
- Lapointe, L. y Lerat, S. (2006). Annual growth of the spring ephemeral *Erythronium americanum* as a function of temperature and mycorrhizal status. *Canadian Journal of Botany* 84, 39–48.
- Le Nard, M. y De Hertogh, A. A. (1993). Bulb growth and development and flowering. *The physiology of flower bulbs. Elsevier, Amsterdam*, 29-43.
- Lee JM y Looney NE. (1978). Changes in abscisic acid and gibberellin levels in apple seeds during stratification and their relationship to genetic composition. *Canadian Journal of Plant Science* 58: 761±767.
- Leung, A.Y. (1980). *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics*. New York, John Wiley.
- Leubner-Metzger, G. (2002). Seed after-ripening and over-expression of class I  $\beta$ -1, 3-glucanase confer maternal effects on tobacco testa rupture and dormancy release. *Planta*, 215(6), 959-968.

- Leubner-Metzger, G. (2005).  $\beta$ -1, 3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *The Plant Journal*, 41(1), 133-145.
- Li, N., Lin, G., Kwan y. W. y Min, Z. D. (1999) Simultaneous quantification of five major biologically active ingredients of saffron by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*: 849, 349-355.
- Li, B.L. y Foley, M.E. (1997). Genetic and molecular control of seed dormancy. *Trends in Plant Science* 2: 384–389.
- Liakopoulou-Kyriakides, M. y Kyriakidis, D., (2002). *Crocus sativus*-biological active constituents. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 26, 293–312.
- Libro Blanco del azafrán en Europa. Problemas y estrategias para valorizar la calidad y mejorar la competitividad (2007). 110 p. (On Line). Disponible en: [www.europeansaffron.eu/Libro\\_Blanco\\_espanol.pdf](http://www.europeansaffron.eu/Libro_Blanco_espanol.pdf)
- López, M. S., Remón, R. Y. C. y López, M. L. (2000). Azafrán: eco-histología foliar del "*Crocus sativus* L.". *Cuadernos de estudios manchegos*, (23), 319-328.
- López, G. B., Romero, M. C., Cabezudo, B., Torres, C. M. y Salazar, C. (Eds.). (2011). *Claves de la flora vascular de Andalucía oriental* (Vol. 49). Universidad Almería.
- Lorda López, M. (1989). Corología y ecología de las familias *Liliaceae* e *Iridaceae* en Navarra. *Príncipe de Viana. Suplemento de Ciencias*, (9), 197-258.
- Lorda López, M. (2001). Flora del Pirineo Navarro. *Guineana*. 7: 1-557
- Lozano, P., Castellar, M.R., Simancas, M.J. y Iborra, J. L. (1999). Quantitative highperformance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. *J. Chromatogr. A*: 830, 477-483.
- Luceño, M. (1999). Azafranes. Flores de otoño. *Revista biológica*, 36:44-52.
- Lundmark, M., Hurry, V. y Lapointe, L. (2009). Low temperature maximizes growth of *Crocus vernus* (L.) Hill via changes in carbon partitioning and corm development. *Journal of Experimental Botany*. 60 (7) 2203–2213.
- Macrae, R. (1983). Theory y practice of HPLC. En: *HPLC in food analysis*. ISBN 0-12-464781-2. Pp: 30-61
- MAGRAMA, (2015). Anuario de estadística agraria (2012). <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/>
- Maggi, L. Sánchez, A.M., Carmona, M., Kanakis, C.D., Anastasaki, E., Tarantilis, P.A., Polissiou, M. G. y Alonso, G.L. (2011). Rapid determination of safranal in the quality control of saffron spice (*Crocus sativus* L.). *Food Chemistry* 127: 369–373.
- Mattana E., Pritchard H.W., Porceddu M., Stuppy W.H. y Bacchetta G. (2012) Interchangeable effects of gibberellic acid and temperature on embryo growth, seed germination and epicotyl emergence in *Ribes multiflorum* ssp. *sandalioticum* (*Grossulariaceae*). *Plant Biology*, 14, 77–87.
- Martín-Blanco, C. J. y Carrasco, M. A. (2005). Catálogo de la flora vascular de la provincia de Ciudad Real. *Monografías de la Asociación de Herbarios Ibero-Macaronésicos*, 1, 581.
- Martínez Labarga, J.M. y Nogales Ruiz, I. (2011) Aportaciones a la flora vascular de Tielmes (Madrid) *Fl. Montiber*.
- Mathew, B. (1982). The *Crocus*. A revision of the genus *Crocus* (*Iridaceae*). *Timbel Press, Portland, OR, USA*.
- Mathew, B. (1995). An interesting new autumn-flowering *Crocus* from Turkey. *New Plantsman* 2: 183–183.
- Mathew, B. (2000) 4. *Crocus* L. Pp. 271–274 in: Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. y Başer, K.H.C. (eds.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 11. Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.
- Mathew, B., Petersen, G. y Seberg, O. (2009). A reassessment of *Crocus* based on molecular analysis, *The Plantsman (N.S.)* 8 (1), 50–57.
- Maw, G. (1886). Monograph of the Genus *Crocus*. London.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

- Mazur, A., Bayle, D., Rock, E. y Rayssiguier y. (1999). Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 145(2), 421-422.
- McConnell Davis, T. W., G. Farmilo, Ch. y Genest, K. (1962). Analysis of an impure heroin seizure. *8th annual meeting of the Canadian. Society of Forensic Sciences, Montreal University, Montreal, Quebec, 7 and 8 November 1960.*
- McGimpsey, J.A., Douglas, M.H. y Wallace, A.R. (1997). Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) production in New Zeland. *New Zeland J. of Crop and Horticultural Sci.* 25:159-168.
- Medrano Moreno, L. M. (1987). Flora de La Rioja, II: Sierra de la Demanda. *Zubía*, (5), 7-61.
- Michaels, H. J., Benner, B., Hartgerink, A. P., Lee, T. D., Rice, S., Willson, M. F. y Bertin, R. I. (1988). Seed size variation: magnitude, distribution, and ecological correlates. *Evolutionary Ecology*, 2(2), 157-166.
- Mihaly, A. y Kricsfalusy, V. (1997). Population biology and ecology of *Crocus heuffelianus* Herb.(Iridaceae) in Ukraine. *Linz. Biol. Beitr*, 29(2), 641-681.
- Milberg, P., Andersson, L., Elfverson, C. y Regner, S. (1996). Germination characteristics of seeds differing in mass. *Seed Science Research*, 6(04), 191-198.
- Molina, R.V., García-Luis, A., Coll, V., Campos, C., Valero, M., Navarro y. y Guardiola, J. L. (2004a). Flower formation in the saffron *Crocus* (*Crocus sativus* L.). The role of temperature. *Acta Horticulturae*, 650, 39–47.
- Molina, R.V., García-Luis, A., Valero, M., Navarro y. y Guardiola, J.L. (2004b). Extending the harvest period of saffron. *Acta Horticulturae*, 650, 219–25.
- Molina, R.V., Valero, M., Navarro y., García-Luis, A. y Guardiola, J.L. (2004c). The effect of time of corm lifting and duration of incubation at inductive temperature on flowering in the saffron plant (*Crocus sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, 103, 79–91.
- Molina, R.V., Valero M., Navarro Y., Guardiola J.L. y García-Luis A., (2005a). Temperature effects on flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, 103, 361–79.
- Molina, R.V., Valero M, Navarro Y, Garcia-Luis A y Guardiola JL (2005b). Low temperature storage of corms extends the flowering season of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Horticultural Science y Biotechnology* 80, 319-26.
- Molina, R.V., Renau-Morata, B., Nebauer, S.G., García-Luis, A. y Guardiola, J.L. (2010). Greenhouse Saffron Culture. Temperature Effects on Flower Emergence and Vegetative Growth of the Plants. *Proc. 3<sup>rd</sup> IS on Saffron. Eds.: M.Z. Tsimidou et al. Acta Hort. 850, ISHS (2010)*
- Montserrat Martí, J.M. (1981). Números cromosómicos de plantas occidentales. *Anales Jardín Botánico de Madrid*. 38 (1): 77-83
- Moraga, A.R., Nohales, P. F., Fernández-Pérez, J. A., Gómez-Gómez, L. (2004). Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucotransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas. *Planta*, 219 (6), 955-66.
- Moraga, AR., Castillo-Lopez, R, Gomez-Gomez, L. y Ahrazem, O. (2009). Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. *BMC Res Notes* 2: 189.
- Moraga, A.R., Trapero, A., Ahrazem, O. y Gómez-Gómez, L. (2010). Crocins transport in *Crocus sativus*: The long road from a senescent stigma to a newborn corm. *Phytochemistry* 71: 1506–1513.
- Moraga, A.R., Ahrazem, O., Rambla, J. L., Granell, A. y Gómez Gómez, L. (2013). Crocins with High Levels of Sugar Conjugation Contribute to the Yellow Colours of Early-Spring Flowering *Crocus* Tepals. *PloS one*, 8(9), e71946.
- Moreno Saiz, J. C. y Sainz Ollero, H. (1992). Atlas corológico de las monocotiledóneas endémicas de la Península Ibérica y Baleares.
- Moreno Saiz, J. C. y Sainz Ollero, H. (1997). Nuevo ensayo fitogeográfico a partir de las monocotiledóneas endémicas ibero. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 55, No. 2, pp. 351-366). Real Jardín Botánico.
- Morimoto, S., Umezaki y., Shouama y., Saito, H., Nishi, K. y Irino, N. (1994). Post-harvest degradation of carotenoids glucose esters in saffron. *Planta Med.*, 60, 438–440.

- Moya, A., De Juan Valero, J.A., Botella, O., Muñoz, R. y López, H. (2003). *La incidencia del riego en el fenómeno de histerantia en "Crocus sativus L."* IX Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas Pontevedra. Actas de Horticultura nº 39 416-418.
- Mousavi, S. Z. Y Bathaie, S. Z., (2011). Historical uses of saffron: identifying potential new avenues for modern research. *Avicenna J Phytomed.* 1:57-66.
- Munshi, A.M. (1992). Genetic variability for important traits in saffron (*Crocus sativus L.*). *Crop Research (Hisar)*, pp: 326-332
- Nagatoshi, M., Terasaka, K., Owaki, M., Sota, M., Inukai, T., Nagatsu, A. y Mizukami, H. (2012). UGT75L6 and UGT94E5 mediate sequential glucosylation of crocetin to crocin in *Gardenia jasminoides*. *FEBS letters*, 586(7), 1055-1061.
- Nakanishi, K. y Solomon, P.A. (1977). Infrared absorption spectroscopy. *Holden-Day, San Francisco*.
- Nair, S.C., Salomi, M.J., Panikkar, B. y Pannikar, K.R. (1991). Modulatory effects of *Crocus-sativus* and *Nigella-sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in mice. *J Ethnopharmacol.* 31:75-84.
- Nault, A. y Gagnon, D. (1993) Ramet demography of *Allium tricoccum*, a spring ephemeral, perennial forest herb. *J Ecol* 81: 101–119
- Nava, H. (1988). *Flora y vegetación orófila de los Picos de Europa* (Vol. 6). Editorial CSIC-CSIC Press.
- Navarro, A. (1998). Azafrán (*Crocus sativus*). *Comunicación de INTA Agencia Extensión Rural La Consulta, Mendoza, Argentina. Mimeografiado.* 20 p.
- Navarro Sánchez, G. (1986). Vegetación y flora de las sierras de Urbión, Neila y Cabrejas. *Th. Doc. Univ. Com. Madrid*.
- Navarro, F. B. y Jiménez, M. N. (2009). *Iridaceae* Juss. En: G. Blanca, B. Cabezudo, M. Cueto, C. Fernández López y C. Morales Torres (eds.), *Flora Vascular de Andalucía Oriental* 1: 182–186. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Nemati, Z., Zeinalabedini, M., Mardi, M., Pirseyediand, S. M., Marashi, S. H. y Nekoui, S. M. K. (2012). Isolation and characterization of a first set of polymorphic microsatellite markers in saffron, *Crocus sativus (Iridaceae)*. *American journal of botany*, 99(9): 340-343.
- Negbi, M. (1990). Physiological research on the saffron *Crocus (Crocus sativus L.)*. En: *Lo Zafferano: Proceedings of the International Conference on Saffron (Crocus sativus L.)*. F. Tammara, L. Marra (eds.). Italia: Università Degli Studi, L' Aquila e Accademia Italiana della Cucina, L' Aquila. pp. 183-207.
- Negbi, M., Dagan, B., Dror, A. y Basker, D. (1989). Growth, flowering, vegetative reproduction, and dormancy in the saffron (*Crocus sativus L.*). *Israel journal of botany*, 38(2-3), 95-113.
- Negbi, M. (1999). Saffron cultivation: past, present and future prospects. In: *Negbi M. (Ed.), Saffron: Crocus sativus L. Harwood Academic Publishers, Australia*, pp. 1–18.
- Nehvi, F.A., Wani, S.A., Dar S.A., Makhdoomi M.I., Allie B.A. y Mir Z.A. (2007). Biological interventions for enhancing saffron productivity in Kashmir. *Acta Horti* 739:25–31.
- Nelson, G.A. (1950). *The Naturalist.* 141-142.
- Nieto-Feliner, G. (1985). *Estudio crítico de la flora orófila del suroeste de León: Montes Aquilianos, Sierra del Teleno y Sierra de la Cabrera* (Vol. 2). Editorial CSIC-CSIC Press.
- Nielson, T.H., Deiting, U. y Stitt, M. (1997) A  $\beta$ -amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. *Plant Physiol* 113: 503–510.
- Nikolaeva, M.G. (1999). Patterns of seed dormancy and germination as related to plant phylogeny and ecological and geographical conditions of their habitats. *Russian Journal of Plant Physiology*, 46, 369–373.
- Nikonenko, N.A., Buslov, D.K., Sushko, N.I. y Zhabankov, R.G. (2005). Spectroscopic manifestation of stretching vibrations of glycosidic linkage in polysaccharides. *Journal of Molecular Structure*, 752, 20–24.
- Noy-Porat, T., Eshel, A., Golobovitch, S., Sandler-Ziv, D., Kamenetsky, R. y Flaishman, M. (2007). The transition of the meristem from vegetative to reproductive development in *Narcissus tazetta*: Physiological and biochemical aspects. In *Botany y Plant Biology 2007 Joint*

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

- Congress. American Society of Plant Biologists, Botanical Society of America, American Fern Society, American Society of Plant Taxonomists, Chicago, IL (p. 171).*
- Nørbæk, R., Brandt, K., Nielsen, J.K., Ørgaard, M. y Jacobsen, N. (2002). Flower pigment composition of *Crocus* species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 763–791.
- Ordoudi, E. y Tsimidou, M.Z. (2004). Detection of Artificial Red Colorants in Saffron Using UV-Vis Spectrometry and Tristimulus Colorimetry. *Proc. 1st IS on Saffron. Eds: J.-A. Fernández y F. Abdullaev. Acta Hort 650, ISHS (2004).*
- Ordoudi, S. A., de los Mozos Pascual, M. y Tsimidou, M. Z. (2014). On the quality control of traded saffron by means of transmission Fourier-transform mid-infrared (FT-MIR) spectroscopy and chemometrics. *Food chemistry*,150, 414-421.
- Orfanou, O. y Tsimidou, M. (1996). Evaluation of the coloring strength of saffron spice by UV-Vis spectrometry. *Food Chemistry*, 57, 463–469.
- Ortiz, A. (1979). Algunas plantas de la Sierra de Mojantes (Murcia). *Anales del Jardín Botánico de Madrid. Pp 412-415.*
- Özdemir, C. y Kiliç, M. (2008). Morphology and anatomy of three subsp. of *Crocus speciosus* Bieb. *Bangladesh Journal of Botany*, 37(2), 97-103.
- Özdemir, C., Baran, P. y Akyol y. (2006). The morphology and anatomy of *Crocus flavus* Weston subsp. *flavus* (Iridaceae). *Turkish Journal of Botany*, 30(3), 175-180.
- Pablos Alcázar, L. (2004). *Plantas silvestres de Ciudad Real (La Atalaya)*. ISBN: 84-609-0829-1
- Pandy, D. and Srivastava, R.P. (1979). A note on the effect of the size of corms on the sprouting and flowering of saffron. *Prog. Hort.* 6 (23):89 - 92.
- Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C. y Polissiou, M.G. (2003). New method for pollen identification by FT-IR spectroscopy. *Appl Spectrosc* 57:23–27
- Pappas, C.S., Kanakis, C.D., Anastasaki, E.G., Tarantilis, P.A. y Polissiou, M.G. (2007). Determination of safranal percentage content in saffron (*Crocus sativus* L.) extracts using FT-IR spectroscopy. *Applications*, 30 September – 4 October, Rio, Patras, Greece.
- Pardo, J. E., Zalacáin, A., Carmona, M., Lopez, E., Alvaruiz, A. y Alonso, G. L. (2002). Influence of the type of dehydration process on the sensory properties of saffron spice. *Ital. J. Food Sci.*4, 413-422.
- Pasche, E. (1993). A new *Crocus* (Iridaceae) from Turkey. *Herbertia* 49:67–75
- Pastor-Férriz, M.T. (2011). *Caracterización morfológica y agronómica de Germoplasma de azafrán (Crocus sativus L.) procedentes de la colección mundial de Crocus spp* Memoria de DEA. JCCLM-UPV- INIA. Directores Rosa Victoria Molina Romero y Marcelino De los Mozos Pascual.
- Paul, M.J., Lawlor, D.W. y Driscoll, S. (1990). The effect of temperature on photosynthesis and carbon fluxes in sunflower and rape. *Journal of Experimental Botany* 41, 547–555.
- Pawasut, A. Yamane, K., Fujishige, N. Yoneyama, K. Yamaki y. T. y Honjo, H. (2010). Influence of seed coat removal and chilling on abscisic acid content and germination in ornamental peach (*Prunus persica* Batsch) seeds. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(3), 248-252.
- Pérez-Bueno, M. (1989). El azafrán. *Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.*
- Pérez, E. y Pastor, J. (1994). Contribución al estudio cariológico de la familia *Iridaceae* en Andalucía occidental. *Lagasalia* 17(2): 257-272.
- Pérez Latorre, A.V., De Mera, A. G. y Orellana, J. A. V. (2003). Relaciones fitogeográficas entre el suroccidente de la Península Ibérica y el noroeste de Africa: una propuesta de sectorización. *Lagasalia*, 23(1), 27-51.
- Pérez Latorre, A. V., Caballero, G., Casimiro-Soriguer Solanas, F., Gavira Romero, O. y Cabezudo, B. (2009). Vegetación de la cordillera antequerana oriental (Subsector Torcalense). Málaga-Granada (España).
- Petersen, G., Seberg, O., Thorsøe, S., Jørgensen, T. y Mathew, B. (2008). A phylogeny of the genus *Crocus* (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions. *Taxon* 57, 487-499.

- Peruzzi, L. y Carta, A. (2011). *Crocus ilvensis* sp. nov. (sect. *Crocus*, Iridaceae), endemic to Elba Island (Tuscan Archipelago, Italy). *Nordic Journal of Botany*, 29: 6-13.
- Peruzzi, L. y Altınordu, A. (2014). A proposal for a multivariate quantitative approach to infer karyological relationships among taxa. *CompCytogen* 8(4): 337–349.
- Pfister, S., Meyer, P., Steck, A. y Pfander, H. (1996). Isolation and structure elucidation of carotenoid-glycosyl esters in *Gardenia* fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 44, 2612–2615.
- Pino Pérez, J.J., Camaño, J.L. y Pino Pérez, R. (2007). Asientos corológicos LOU, 2004. *Boletín BIGA*, 2: 35-109
- Pino Pérez, R., Camaño Portela, J. L., Pino Pérez, J.J. y Silva-Pando, F. J. (2009). Asientos corológicos LOU, 2009. *Boletín BIGA*, 6: 109-124.
- Pinfield NJ, Stutchbury PA y Bazaid SM. (1987). Seed dormancy in *Acer*: is there a common mechanism for all *Acer* species and what part is played in it by abscisic acid? *Physiologia Plantarum* 71: 365±371.
- Plessner, O., Negbi, M., Ziv, M. y Basber, D., (1989). Effects of temperature on the flowering of the saffron *Crocus* (*Crocus sativus* L.): induction of hysteranthly. *Isr. J. Bot.* 38, 1–7.
- Pollock, C.J. y Eagles, C.F. (1988) Low temperature and the growth of plants. In: Long SP, Woodward FI (eds) *Plants and Temperature. The Company of Biologists Limited, Cambridge, pp 157–180*
- Premkumar, K., Abraham, S.K., Santhiya, S.T., Gopinath, P.M. y Ramesh, A. (2001). Inhibition of genotoxicity by saffron (*Crocus sativus* L.) in mice. *Drug Chem. Toxicol.* 24: 421-428.
- Premkumar, K., Abraham, S.K., Santhiya, S.T. y Ramesh, A. (2003). Protective effects of saffron (*Crocus sativus* L.) on genotoxin-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Phytother. Res.* 17: 614-617.
- Puentenueva-Murillo, S. (2014). Extracción de flavonoides de arándano rojo. Trabajo Fin de Grado Grado en Química. Facultad de ciencias experimentales. Universidad de Jaén
- Quattrocchi, O.A., De Andruzzi, A. y Laba, S.A. (1992). Análisis Cuantitativo. En: *Introducción al HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro. Argentina. Pp Cap. 10. 241-267.*
- Ransom, E. R. (1935). The inter-relations of catalase, respiration, after-ripening, and germination in some dormant seeds of the Polygonaceae. *American Journal of Botany*, 815-825.
- Randelović, N., Randelović, V. y Hristovski, N. (2012). *Crocus jablanicensis* (Iridaceae), a new species from the Republic of Macedonia, Balkan peninsula. *Ann Bot Fenn* 49:99–102.
- Rashed-Mohassel, M. H. (2006). Saffron from Wild to the Field. In *II International Symposium on Saffron Biology and Technology* 739 (pp. 187-193).
- Raven, P. H., Evert, R. F. y Eichhorn, S. E. (1992). *Biología de las plantas* (Vol. 2). Reverté.
- Renau-Morata, B., Moyá, L., Nebauer, S. G., Seguí-Simarro, J. M., Parra-Vega, V., Gómez, M. D. y Molina, R. V. (2013). The use of corms produced under storage at low temperatures as a source of explants for the in vitro propagation of saffron reduces contamination levels and increases multiplication rates. *Industrial Crops and Products*, 46, 97-104.
- Rees, A. R. (1972). *The growth of bulbs*. Academic Press. London. 311 pp.
- Rees, T. A. P., Burrell, M.M., Entwistle, T.G., Hammond, J.B.W., Kirk, D. y Kruger, N.J. (1988) Effects of low temperature on the respiration metabolism of carbohydrates by plants. In: Long SP, Woodward FI (eds) *Plants and Temperature. The Company of Biologists Limited, Cambridge, pp 377–394.*
- Rigano, D., Formisano, C., Basile, A., Lavitola, A., Senatore, F., Rosselli, S. y Bruno, M. (2007). Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. *Phytotherapy Research*, 21(4), 395-397.
- Ríos, J.L., Recio, M.C., Giner, R.M. y Manez, S. (1996). An update review of Saffron and its active constituents. *Phytother. Res.*, 10:189-193.
- Ríos, J. L., Recio, M. C., Giner, R. M. y Manez, S. (1998). An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research*, (10), 189-193.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

- Rivas-Martínez, S., Costa, M., Castroviejo, S., y Valdes, E. (1980). Vegetación de Doñana (Huelva, España). *Lazaroa*, 2, 5-189.
- Riverón-Negrete, L., Camacho-Carranza, R., Caballero-Ortega, H., Hernández, J.M., Medécigo-Ríos, M., Castillo-Villanueva, A., Pérez-López, I., Espinosa-Aguirre, J.J. y Abdullaev, F.I. (2004). Additive inhibitory effect of saffron in combination with sodium selenite on tumor cells. *Acta Hort.* 477-484.
- Rivera, J. y Cabezudo, B. (1985). Aportaciones al conocimiento florístico de la Sierra de Aracena (Huelva, España). *Acta Botánica Malacitana*. 10:61-78.
- Rohlf, F. J. (1996). NTSYS: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, v. 2.0. *Exeter Software, Setauket, NY*
- Romesburg, HC. (2004). Cluster analysis for researchers. *Lulu press, North Carolina*
- Royal Horticultural Society (1966c, 1986, 2001). R.H.S. Colour Chart. Royal Horticultural Society, London.
- Romero, C. M. (1983). Flora y vegetación de la cuenca alta del río Luna (León). *Monografías ICONA*, 29.
- Roselló, J. A. y Sáez, L. (2000). Index Balearicum: An annotated check-list of the vascular plants described from the Balearic Islands. *Collectanea botanica*, 25, 3-192.
- Rubio, P. (1997). El azafrán y la comarca del Jiloca. Centro de estudios del Jiloca, Calamocha, Teruel, España.
- Rudall, P.J., Owens, S.J. y Kenton, A.Y. (1984). Embryology and breeding systems in *Crocus* (*Iridaceae*): a study in causes of chromosome variation. *Plant Syst Evol* 148:119–134
- Rukšāns, J. (2010). *Crocuses*, A complete Guide to the genus, *Timber Press, Portland, London*, (2010). pp 216.
- Ryszard, K. y Rafifiski, J.N. (1978). Seed coat Structure of *Crocus vernus* agg. (*Iridaceae*). *Syst. Evol.* 129, 255-260.
- Sánchez, A.M. (2009). Avances en el estudio de los ésteres de crocetina, picrocrocina y flavonoides del azafrán especia. *Tesis doctoral. UCLM (Albacete)*. Directores: Dr. Gonzalo L. Alonso Díaz-Marta y Dr. Manuel Carmona Delgado
- Sánchez, C. y Valdeolivas, G. (1995). *Guía de la fauna y flora de un municipio cantábrico: Camargo*. Ed: Elabra. 283 pp. Camargo.
- Sánchez, A. M., Carmona, M., Ordoudi, S. A., Tsimidou, M. Z. y Alonso, G. L. (2008a). Kinetics of individual crocetin ester degradation in aqueous extracts of saffron (*Crocus sativus* L.) upon thermal treatment in the dark. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1627-1637.
- Sánchez, A. M., Carmona, M., Zalacaín, A., Carot, T. M., Jabaloyes, J. M. y Alonso, G. (2008b). L. Rapid determination of crocetin esters and picrocrocic acid from saffron spice (*Crocus sativus* L.) using UV-visible spectrophotometry for quality control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3167–3175.
- Sánchez, A. M., Carmona, M., del Campo, C. P. y Alonso, G. L. (2009). Solid-phase extraction for picrocrocic acid determination in the quality control of saffron spice (*Crocus sativus* L.). *Food Chemistry*, 116, 792–798.
- Santana, O., De los Mozos Pascual, M., Astraka, K., Tarantili, P.A., Daferera, D., Roldán, M., Fernández, J.A., Sánchez Vioque, R. y Polissiou, M. (2012). Bioprospection of *Crocus* leaves microextracts based on their chemical profile. *COST Action FA 1101 "Saffronomics: Omics Technologies for Crop Improvement, Traceability, Determination of Authenticity, Adulteration and Origin in Saffron"* (Cuenca, Spain, November 7-9, 2012). ISBN-13: 978-84-616-0964-2
- Sanz, G. M. y Redó, V. J. A. (1998). Nuevos datos sobre la flora de la provincia de Cuenca VI. *Flora Montiberica*, (9), 28-36.
- Schneider, I., Kerndorff, H. y Pasche, E. (2013). Chromosome numbers of Turkish *Crocus* (*Liliiflorae, Iridaceae*) and their geographical distribution. *Feddes Repert* 123:73–79.
- Seberg, O. y Petersen, G. (2009). How Many Loci Does it Take to DNA Barcode a *Crocus*? *PLoS ONE* 4(2): e4598.

- Semagn, K., Bjørnstad, Å., y Ndjiondjop, M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(25).
- Serrano-Díaz, J., Sánchez, A. M., Maggi, L., Martínez-Tomé, M., García-Diz, L., Murcia, M. A. y Alonso, G. L. (2012). Increasing the applications of *Crocus sativus* flowers as natural antioxidants. *Journal of food science*, 77(11), C1162-C1168.
- Sharma, J.R. y Gupta, R.B (2003) Effect of corm size and spacing on growth, flowering and corm production in gladiolus. *Journal of Ornamental Horticulture* (6) 4: 352-356.
- Sik, L., Candan, F., Soya, S., Karamenderes, C., Kesercioglu, T. y Tanyyolc, B. (2008). Genetic variation among *Crocus* L. species from western Turkey as revealed by RAPD and ISSR marker. *Journal of Applied Biological Science*, 2: 73-78.
- Silva, B. A., Ferreres, F., Malva, J. O. y Dias, A. C. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food chemistry*, 90(1), 157-167.
- Singh Z y Browning G. (1991). The role of ABA in the control of apple seed dormancy re-appraised by combined gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Experimental Botany* 42: 269±275.
- Skrubis, B. (1990). The cultivation in Greece of *Crocus sativus* L., in: Tammaro F., Marra L. (Eds.), *Proceedings of the international conference on saffron (Crocus sativus L.)*, L'Aquila, pp. 171-182.
- Sneath, P.H.A. y Soakal RR. (1973). Numerical taxonomy. *WH Freeman and Co. San Francisco (USA)*.
- Socrates, G. (1997). Infrared characteristic group frequencies. *Wiley, Chichester*
- Soheilvand, S., Agayev y. M., Shakib, A. M., Fathi, M. y Rezvani, E. (2007). Comparison of diversity in flowering rate of two saffron (*Crocus sativus*) populations of Iran. In *II International Symposium on Saffron Biology and Technology 739* (pp. 303-306).
- Sotomayor, S. P. (1979). Notas de flora seguraña (Jaén: Sierra de Segura). In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 36, No. 1, pp. 421-423). Real Jardín Botánico.
- Speranza, G., Dada, G., Manitto, P., Monti, D. y Grammatica, P. (1984). 13-cis crocin: a new crocinoid of saffron. *Gazz. Chim. Ital.* 114, 189-192.
- Straubinger, M., Jezussek M., Waibel R., Winterhalter, P. (1997) Novel glycosidic constituents from saffron. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1678-1681.
- Straubinger, M., Bau, B., Eckestein, S., Fink, M., Winterhalter, P. (1998). Identification of novel glycosidic aroma precursors in saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 46, 3238-3243.
- Sun, D.W. (2009). Infrared spectroscopy for food quality analysis and control (1st ed.). *New York: Elsevier (chap. 4)*.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2010). *Plant physiology* (5th ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Talavera, S., Ortiz, P. L., Arista, M. y Bastida, F. (1995). Estudio cariosistemático de algunas monocotiledóneas bulbosas de Marruecos. *Lagascalia*, 18(1), 83-105.
- Tammaro, F. (1987).: Notizie storico-colturali sullo zafferano (*Crocus sativus* L., *Iridaceae*) nell'area mediterranea. *Micol. Veget. Medit.* 2: 44-59.
- Tammaro, F., (1999). Saffron (*Crocus sativus* L.) in Italy. In: Negbi, M. (Ed.), *Saffron: Crocus sativus* L. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 53-61.
- Tarantilis, P. A. y Polissiou, M. G. (1997). Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 45, 459-462.
- Tarantilis P.A. y Polissiou M.G. (2004). Chemical analysis and antitumor activity of natural and semi-natural carotenoids of saffron. *Acta Hort.*, 650, 447-461 (*Proceedings of the 1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology (2003)*).
- Tarantilis, P. A., Polissiou, M. y Manfait, M. (1994). Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 664, 55-61.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---

- Tarantilis, P.A., Tsoupras, G. y Polissiou, M. (1995). Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high -performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection mass spectrometry. *J. Chrom. A.* 699, 107-117.
- Tarantilis P.A., Beljebbar A., Manfait M. y Polissiou M. (1998). FT-IR, FT-Raman spectroscopic study of carotenoids from saffron (*Crocus sativus* L.) and some derivatives. *Spectrochim. Acta part A*, 54,651-657.
- Trujillo- Jiménez, F., García- López, P., García- Carranca, A. y Abdullaev, F.I. (2004). Effect of saffron on the viability of normal and malignant human cells in vitro. *Acta Hort.* 650:463-470.
- Thompson, J. N. (1984) Variation among individual seed masses in *Lornatium grayi* (Umbelliferae) under controlled conditions: magnitude and partitioning of the variance. *Ecology* 65, 626-31.
- Uddin FM, Rahman MM, Rabbani MG, Mannan MA. (2002). Effect of corm size and depth of planting on the growth and flowering of gladiolus. *Pakistan. J. Biol. Sci.*, 5 (5): 553–555.
- Uslu, E., M., Babaç, T., y Yılmaz, A. (2012). Karyological studies on some *Crocus* L. taxa from Turkey, *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 65:1, 7-10.
- Valcárcel, M., Gómez, A. (1994). “Técnicas Analíticas de Separación”, Ed. Reverté, Barcelona, pág. 655–676.
- Vafabakhsh, J., Mokhtarian, A., Rahimi, H. y Ahmadian, J. (2009). Investigation of Correlations between Saffron Flowering Pattern and Climatological Parameters under Different Levels of Irrigation and Planting Depth. In *III International Symposium on Saffron: Forthcoming Challenges in Cultivation, Research and Economics 850* (pp. 145-148).
- Valero, M., Molina, R.V., Navarro y., García, A. y Guardiola, J.L. (2004a). El cultivo del azafrán. Con larga tradición, pero. ¿con futuro?. *Cuadernos de fitopatología. Revista de Fitopatología y entomología*, nº 80, p. 47-61
- Valero, M., Molina, R. V., Navarro y., García-Luis, A. y Guardiola, J. L. (2004b). El cultivo de Azafrán. *Cuadernos de Fitopatología*, 47, 61.
- Valdés, B., Talavera, S. Y Fernández-Galiano, E. (1987) *Flora Vascular de Andalucía Occidental*, Ed. Ketres. Vol. 3, 477 pp.
- Valizadeh, R. (1988). Leaf usage as feeding animal. *Iran science research*, Khorasan, Iran.
- Vaquero, J. (1990). Fragmenta chorologica occidentalia 4846. En: Garillti, R., García, F. L. y Mazimpaka, V. (1993). Fragmenta chorologica occidentalia, 4803-4822. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 51, No. 2, pp. 286-287). Real Jardín Botánico.
- Van Calsteren, M. R., Bissonnette, M. C., Cormier, F., Dufresne, Ch., Ichi, T. yves Le Blanc, J. C., Perreault, D. y Roewer, I. (1997) Spectroscopic characterization of crocetin derivates from *Crocus sativus* L. and *Gardenia jasminoides*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1055-1061.
- Verma, S.K., Bordia, A. (1998). Antioxidant property of saffron in man. *Indian Jour. Med Sci*, 53:205-207.
- Víemont, J. D. y Crabbé, J. (Eds.). (2000). *Dormancy in plants: from whole plant behaviour to cellular control*. CABI.
- Vurdu, H., Guney, K. y Cicek, F.F. (2004). Biology of *Crocus olivieri*, subsp. *olivieri*. *Acta horticulturae*.71-84
- Wingler, A., Purdy, S., MacLean, J.A. y Portau, N. (2006). The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 57, 391–399.
- Winterhalter, P., Straubinger, M. (2000). Saffron: Renewed interest in an ancient spice. *Food Rev. Int.* 16:39-59.
- Wilkins, H.F., (1985). *Crocus vernus: Crocus sativus*. In: Halevy, A.H. (Ed.), *Handbook of Flowering*, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 350–355.
- Yau, S.K., Nimah, M. y Toufeili, I. (2006). Yield and quality of red stigmas from different saffron strains at contrasting Mediterranean sites. *Experimental Agriculture*, 42:399-409.

- Yera Posa, J. y Ascaso Martorell, J. (2009). De plantis vascularibus praesertim ibericis (V). En: *Flora Montiberica, 2009, No. 43: 10-18*
- Yetişen, K., Şen, U. yildirim, T. y Özdemir, C. (2013). Morphological and Anatomical Study on Endemic *Crocus olivieri* Gay subsp. *istanbulensis* Mathew Subspecies (Iridaceae). *ANADOLU UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY–C Life Sciences and Biotechnology*, 3(1), 31-37.
- Yıldırım, H. y Erol, O. (2013). *Crocus yakarianus* sp. nov. from eastern Turkey. *Nordic Journal of Botany*, 31(4), 426-429.
- Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian, J. y Yong, J. (1990): Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Rad Biol Med* 9: 19-21.
- Yüzbaşıoğlu, S. y Varol, O. (2004). A new autumn-flowering *Crocus* from SW Turkey. *Plantsman* 3:104–106.
- Weryszko-Chmielewska, E. y Chwil, M. (2011). Structure of the floral parts of *Crocus vernus* (L.) Hill. *Acta Agrobotanica*, 64(4), 35-46.
- Wiersema, J. H. y Leon, B. (2013). *World economic plants: a standard reference*. CRC press.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- Winterhalter, P. y Straubinger, M. (2000). Saffron: Renewed interest in an ancient spice. *Food Rev. Int.* 16:39-59.
- Zaffar, G., Wani, S.A., Anjum, T. y Zeerak, N.A. (2004). Colchicine induced variability in saffron. *Proceedings of the 1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology*, 277-280.
- Zhang y, Shoyama y, Sugiura, M y Saito, H. (1994). Effects of *Crocus sativus* L. on the ethanol-induced impairment of passive avoidance performances in mice. *Biol Pharm Bull.* 17(2):217-21.
- Zamorano, A. R. (2004). Efecto de distintos momentos de cosecha de uva cv. Cabernet Sauvignon sobre la composición química y sensorial de los vinos en el Valle del Maipo. Tesis Doctoral. Universidad de Chile.
- Zougagh, M., Ríos, A. y Valcárcel, M. (2005). An automated screening method for the fast, simple discrimination between natural and artificial colorants in commercial saffron products. *Analytica chimica acta*, 535(1), 133-138.
- Zubizarreta, A. S., Sanz, G. M. y Alonso, J. L. B. (2000). *Catálogo florístico de la provincia de Soria*. Diputación provincial de Soria.

**Páginas web consultadas:**

- <http://www.alpinegardensociety.net/plants/Crocus/botany/Taxonomy/136/> (2014)
- <http://www.azafranesjiloca.com/el-azafran> (2014)
- <http://www.floraiberica.es> (2014)
- <http://www.Crocusbank.org/> (2014)
- <http://www.mapa.es/> (2014)
- <http://www.saffron.com/> (2014)
- <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html> (2014)
- <http://www.plantbreeding.wur.nl> (2014)
- <http://www.anthos.es> [diciembre (2014)]
- <http://www.floraiberica.org/> [diciembre (2014)]
- <http://www.Crocusbank.org> [diciembre (2014)]
- <http://bibdigital.rjb.csic.es/ing/index.php> [diciembre (2014)]
- <http://ec.europa.eu/eurostat> [agosto (2015)]
- <http://www.bkd.eu/over-de-bkd> [agosto (2015)]
- <http://www.bancomundial.org/> [enero (2015)]
- <http://www.seedbiology.de/afterripening.asp> [octubre (2015)]



# **VIII. ANEJOS**



ANEJO 1. Lista de entradas conservadas en el BGV del CIAF utilizadas en el ensayo de caracterización morfológica

Entrada	Especie	Fecha de recolección	Comunidad	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Elevación (msnm)
BCU001680	<i>cambessedesii</i> J. Gay	20061107	Islas Baleares	Mallorca	Es Repla (Arta)	39° 43' 33,8" N	3° 18' 31,6" E	164
BCU001682	<i>cambessedesii</i> J. Gay	20061107	Islas Baleares	Mallorca	Partida de Fuster (Capdepera)	39° 42' 32,3" N	3° 26' 36,1" E	30
BCU001683	<i>cambessedesii</i> J. Gay		Islas Baleares	Mallorca	Tunel de Formentor	39° 54' 46,2" N	3° 04' 16,1" E	170
BCU001685	<i>cambessedesii</i> J. Gay	20061108	Islas Baleares	Mallorca	Cami de Can Mameta (Caimari)	39° 46' 57,3" N	2° 53' 58,2" E	250
BCU003130	<i>cambessedesii</i> J. Gay	20110901	VIVERO	VIVERO	VIVEROS			
BCU002835	<i>carpetanus</i> Boiss. & Reut.	20100426	Castilla-León	Ávila	Puerto de la Peña Negra	40° 24' 18,6" N	5° 15' 31,6" O"	1779
BCU002836	<i>carpetanus</i> Boiss. & Reut.	20100426	Castilla-León	Ávila	Puerto de la Peña Negra	40° 24' 7,5" N	5° 15' 52,1" O	1652
BCU002837	<i>carpetanus</i> Boiss. & Reut.	20100426	Castilla-León	Ávila	Puerto de la Peña Negra	40° 24' 0,07" N	5° 10' 5,2" O	1674
BCU002838	<i>carpetanus</i> Boiss. & Reut.	20100426	Castilla-León	Ávila	San Martín de la Vega de Alberche	40° 27' 23,15" N	5° 8' 5,81" O	1690
BCU002971	<i>carpetanus</i> Boiss. & Reut.	20110224	Comunidad de Madrid	Madrid	Montejo de la Sierra (Hayedo)	41° 04' 16,4" N	3° 31' 38,2" O	1242
BCU002972	<i>carpetanus</i> Boiss. & Reut.	20110224	Comunidad de Madrid	Madrid	Robregordo	41° 06' 52,8" N	3° 35' 38,3" O	1356
BCU002973	<i>carpetanus</i> Boiss. & Reut.	20110224	Comunidad de Madrid	Madrid	Robregordo	41° 07' 34,2" N	3° 36' 12,2" O	1468
BCU002974	<i>carpetanus</i> Boiss. & Reut.	20110224	Comunidad de Madrid	Madrid	Robregordo	41° 07' 11,9" N	3° 36' 11,7" O	1446
BCU002696	<i>carpetanus</i> Boiss. & Reut.	20090314	Galicia	Ourense	Muinos (Requias, Serra do Xures)	41° 53' 16" N	7° 56' 37" O	1100
BCU002960	<i>clusii</i> J. Gay	20110110	Andalucía	Huelva	Doñana	37° 10' 21" N	6° 38' 57" O	30
BCU002961	<i>clusii</i> J. Gay	20110110	Andalucía	Huelva	Doñana	37° 10' 21" N	6° 38' 18" O	31
BCU002962	<i>clusii</i> J. Gay	20110110	Andalucía	Huelva	Hinojos	37° 16' 11" N	6° 25' 32" O	88
BCU002963	<i>clusii</i> J. Gay	20110110	Andalucía	Huelva	Hinojos	37° 16' 52" N	6° 23' 57" O	84

Entrada	Especie	Fecha de recolección	Comunidad	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Elevación (msnm)
BCU002964	<i>clusii</i> J. Gay	20110110	Andalucía	Cádiz	Chipiona	36° 42' 45" N	6° 25' 4" O	14
BCU002965	<i>clusii</i> J. Gay	20110110	Andalucía	Cádiz	Puerto Real	36° 31' 22" N	6° 9' 5" O	27
BCU002966	<i>clusii</i> J. Gay	20110110	Andalucía	Cádiz	Laguna de la Paja	36° 23' 25" N	6° 7' 20" O	27
BCU002967	<i>clusii</i> J. Gay	20110110	Andalucía	Cádiz	Laguna de la Paja	36° 23' 26" N	6° 7' 50" O	25
BCU002871	<i>nevadensis</i> Amo	20100526	Castilla-La Mancha	Cuenca	Olmeda del Rey	39° 45' 52,4" N	2° 01' 36,91" O	1100
BCU002976	<i>nevadensis</i> Amo	20110302	Andalucía	Granada	Güejar Sierra	37° 07' 47" N	3° 26' 57,7" O	1610
BCU002979	<i>nevadensis</i> Amo	20110303	Andalucía	Granada	Monachil	37° 07' 37,6" N	3° 27' 05,5" O	1688
BCU002980	<i>nevadensis</i> Amo	20110303	Andalucía	Jaén	Quesada	37° 52' 04,08" N	3° 00' 58,7" O	1172
BCU002981	<i>nevadensis</i> Amo	20110304	Andalucía	Jaén	Cazorla	37° 53' 50,7" N	2° 59' 17,8" O	1145
BCU002982	<i>nevadensis</i> Amo	20110302	Andalucía	Jaén	Quesada	37° 52' 18,3" N	3° 00' 15,9" O	1333
BCU002988	<i>nevadensis</i> Amo	20110315	Cataluña	Lérida	Camarasa	41° 51' 48,4" N	0° 54' 54,3" E	386
BCU002989	<i>nevadensis</i> Amo	20110316	Cataluña	Lérida	Ager	41° 57' 23,4" N	0° 45' 25,5" E	786
BCU002990	<i>nevadensis</i> Amo	20110316	Cataluña	Lérida	Vilanova Meià	42° 00' 30,5" N	1° 01' 18,6" E	882
BCU002992	<i>nevadensis</i> Amo	20110317	Aragón	Huesca	Biasaurri	42° 31' 54" N	0° 33' 29,6" O	1018
BCU002993	<i>nevadensis</i> Amo	20110317	Aragón	Huesca	Jaca	42° 33' 18,9" N	0° 37' 59,3" O	719
BCU002994	<i>nevadensis</i> Amo	20110317	Aragón	Huesca	Jaca	42° 33' 16,8" N	0° 37' 50,7" O	713
BCU002999	<i>nevadensis</i> Amo	20110425	Aragón	Huesca	Boltaña	42° 24' 38" N	0° 0' 11,63" O	1299
BCU001652	<i>nevadensis</i> Amo	20060323	Aragón	Huesca	Jaca (Pista Parador de Orel)	-	-	1100
BCU001653	<i>nevadensis</i> Amo	20060323	Aragón	Huesca	Jaca (Puerto de Orel)	-	-	1080
BCU001742	<i>nevadensis</i> Amo	20070507	Comunidad Valenciana	Valencia	Cofrentes (Termino de Cofrentes)	39° 14' 19" N	1° 09' 08" O	735
BCU001743	<i>nevadensis</i> Amo	20070507	Comunidad Valenciana	Valencia	Utiel (Sierra Negrete)	39° 38' 05" N	1° 08' 45" O	1180
BCU002359	<i>nevadensis</i> Amo	20080227	Castilla-La Mancha	Cuenca	Motilla del Palancar	-	-	822
BCU002689	<i>nevadensis</i> Amo	20090119	Castilla-La Mancha	Cuenca	Motilla del Palancar	-	-	822
BCU002380	<i>nevadensis</i> Amo	20080219	Andalucía	Jaén	Sierra de Cazorla (Riogaza)	37° 53' 30,5" N	3° 0' 0" O	1000
BCU002689	<i>nevadensis</i> Amo	20090119	Castilla-La Mancha	Cuenca	Motilla del Palancar	-	-	822

Entrada	Especie	Fecha de recolección	Comunidad	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Elevación (msnm)
BCU002694	<i>nevadensis</i> Amo	20090223	Castilla-La Mancha	Cuenca	Altomira	40° 10' 52,47" N	2° 49' 34,14 O	1150
BCU002697	<i>nevadensis</i> Amo	20090304	Navarra	Pamplona	Lazagurria	42° 29' 23,2" N	2° 12' 59,9" O	700
BCU002698	<i>nevadensis</i> Amo	20090304	Navarra	Pamplona	Tafalla	42° 34' 47,1' N	1° 42' 09,7" O	600
BCU003123	<i>nudiflorus</i> S.M.	20110923	La Rioja	La Rioja	Villoslada de cameros	42° 02' 49,47" N	2° 40' 44,13" O	1415
BCU003176	<i>nudiflorus</i> S.M.	20110919	Castilla y Leon	Burgos	Los Altos	42° 45' 22,84" N	3° 42' 5,4" O	1080
BCU002944	<i>nudiflorus</i> S.M.	20101023	Aragón	Huesca	Benasque (Banos de Benasque)	42° 40' 1,11" N	0° 35' 00,51" E	1535
BCU003001	<i>nudiflorus</i> S.M.	20110425	Aragón	Huesca	Boltaña (Sierra de Guara)	42° 24' 8,41" N	0° 1' 4,6" E	1340
BCU003003	<i>nudiflorus</i> S.M.	20110427	Aragón	Huesca	Plan	42° 33' 5,36" N	0° 2' 35,61" E	1801
BCU003005	<i>nudiflorus</i> S.M.	20110427	Cataluña	Lérida	Vall de Boi	42° 29' 1,29" N	0° 48' 9,27" E	1829
BCU003006	<i>nudiflorus</i> S.M.	20110427	Cataluña	Lérida	Durro	42° 3' 4,95" N	0° 51' 0,75" E	1998
BCU003007	<i>nudiflorus</i> S.M.	20110427	Cataluña	Lérida	Vielha	42° 3' 4,68" N	0° 51' 0,68" E	1635
BCU002556	<i>nudiflorus</i> S.M.	20081005	Aragon	Huesca	Benasque	42° 40' 0,93" N	0° 3' 7,65" E	1800
BCU002557	<i>nudiflorus</i> S.M.	20081005	Aragon	Huesca	Benasque	42° 40' 6,89" N	0° 3' 9" E	2000
BCU002558	<i>nudiflorus</i> S.M.	20081005	Aragon	Huesca	Benasque	42° 40' 87" N	0° 3' 6,26" E	1700
BCU002559	<i>nudiflorus</i> S.M.	20081005	Aragon	Huesca	Benasque	42° 36' 87" N	0° 3' 1,85" E	1200
BCU002777	<i>nudiflorus</i> S.M.	-						
BCU002737	<i>nudiflorus</i> S.M.	20090929	Cataluña	Lerida	Valle de Boi	42° 29' 12,95" N	0° 52' 26,40" E	2100
BCU002738	<i>nudiflorus</i> S.M.	20090929	Cataluña	Lerida	Valle de Boi	42° 29' 9,07" N	0° 52' 23,68" E	2095
BCU002739	<i>nudiflorus</i> S.M.	20090929	Cataluña	Lerida	Valle de Boi	42° 28' 58,56" N	0° 52' 23,21" E	2095
BCU002959	<i>serotinus</i> Salisb.	20110110	Andalucia	Huelva	Aracena	37° 53' 0,35" O	6° 46' 38,6" O	880
BCU002978	<i>serotinus</i> Salisb.	20110302	Andalucia	Granada	Güejar Sierra	37° 8' 19" N	3° 25' 45,5" O	1600
BCU003172	<i>serotinus</i> Salisb.	20110918	Castilla y Leon	León	Villamanín	42° 55' 57,3"N	5° 39' 19,8" O	1204

Entrada	Especie	Fecha de recolección	Comunidad	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Elevación (msnm)
BCU003173	<i>serotinus</i> Salisb.	20110917	Castilla y Leon	León	Barrios de Luna	42° 52' 21,3"N	5° 55' 7,9" O	1395
BCU003174	<i>serotinus</i> Salisb.	20110917	Castilla y Leon	León	Soto y Amío	42° 44' 55,"N	5° 54' 0,27" O	1181
BCU003175	<i>serotinus</i> Salisb.	20110919	Castilla y Leon	Burgos	Las Cañadillas	42° 38' 49,9"N	3° 40' 27,4" O	1032
BCU003178	<i>serotinus</i> Salisb.	20110918	Castilla y Leon	León	Valdelugeros	42° 55' 34,7"N	5° 25' 14,2" O	1235
BCU003179	<i>serotinus</i> Salisb.	20110917	Castilla y Leon	León	Barrios de Luna	42° 49' 38,2"N	5° 50' 22" O	1108
BCU003180	<i>serotinus</i> Salisb.	20110918	Castilla y Leon	León	Valdelugeros	42° 59' 42,7"N	5° 24' 53,4" O	1252
BCU003181	<i>serotinus</i> Salisb.	20110918	Castilla y Leon	León	Pola de Gordon	42° 54' 1,11"N	5° 37' 14,6" O	1234
BCU001655	<i>serotinus</i> Salisb.	20060427	Andalucia	Jaén	Cazorla (Sierra de Cazorla, Juanfria)	37° 51' 32,63" N	2° 55' 43,99" O	1705
BCU001657	<i>serotinus</i> Salisb.	20060427	Andalucia	Jaén	Cazorla (Sierra de Cazorla, Puertollano)	37° 49' 06,82" N	3° 00' 23,92" O	1800
BCU002367	<i>serotinus</i> Salisb.	20080330	Castilla-La Mancha	Ciudad Real	Almagro	-	-	-
BCU002550	<i>serotinus</i> Salisb.	20080808	Castilla-La Mancha	Albacete	-	-	-	-
BCU002618	<i>serotinus</i> Salisb.	20081028	Comunidad Valenciana	Valencia	Caroche (Vertice Geo)	-	-	-

Entrada	Especie	Fecha de recolección	Comunidad	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Elevación (msnm)
BCU002619	<i>serotinus</i> Salisb.	20081028	Comunidad Valenciana	Valencia	Caroche (Balsa)		-	-
BCU002685	<i>serotinus</i> Salisb.	20081019	Castilla-La Mancha	Ciudad Real	Almagro	-	-	-
BCU002686	<i>serotinus</i> Salisb.	20081019	Castilla-La Mancha	Ciudad Real	Almagro	-	-	-
BCU002741	<i>serotinus</i> Salisb.	200910--	Galicia	A Coruña	Mazaricos	42° 54' 33,26" N	9° 06' 16,97" O	320
BCU002742	<i>serotinus</i> Salisb.	200910--	Castilla-La Mancha	Albacete	Tus, Sierra de Segura	38° 24' 01,3" N	2° 24' 07,9" O	1454
BCU002743	<i>serotinus</i> Salisb.	20091013	Castilla-La Mancha	Cuenca	Huete (Sierra de Altomira)	-	-	-
BCU002775	<i>serotinus</i> Salisb.	20090226	Castilla-La Mancha	Cuenca	Altomira	40' 10' 52,47" N	2° 49' 34,14" O	1150
BCU002998	<i>vernus</i> (L.) Hill	VIVERO	VIVERO	VIVERO	VIVERO			
BCU003018	<i>vernus</i> (L.) Hill	VIVERO	VIVERO	VIVERO	VIVERO			
BCU001822	<i>vernus</i> (L.) Hill	VIVERO	VIVERO	VIVERO	-	-	-	-
BCU003198	<i>vernus</i> (L.) Hill	20120312	Aragón	Huesca	Jaca (Refugio de Boyeros)	42° 45' 49" N	0° 37' 23" O	1581

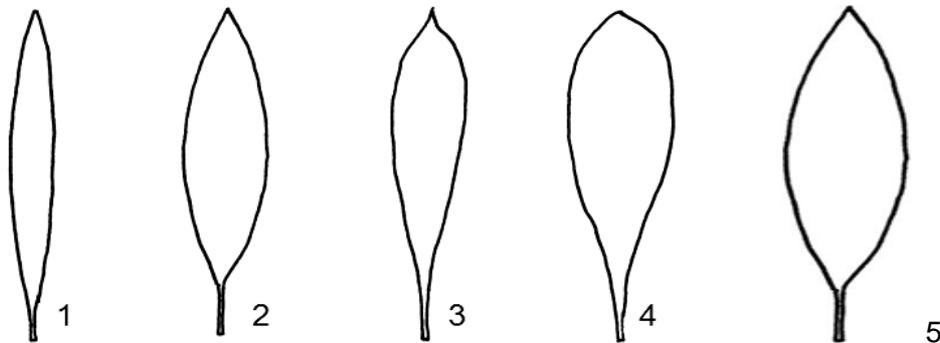
**ANEJO 2. Lista de descriptores para las especies españolas del género *Crocus* spp.**

La lista de descriptores que se refleja a continuación contiene los caracteres cualitativos y cuantitativos, y los distintos niveles observados para cada carácter, utilizados en la caracterización morfológica realizada en el presente trabajo. Esta lista de descriptores está basada principalmente los parámetros incluidos en *Descriptors for Crocus (Crocus spp.) publicada por Bioversity International, UPV, UCLM y JCCM (2015)*. De este mismo trabajo se han extraído todas las figuras que ilustran los diferentes rasgos morfológicos. Los descriptores relacionados con el color de los diferentes órganos están referidos a los colores estándar proporcionados por las tablas de publicadas por la *Royal Horticultural Society (RHS, 2001)*.

**1.1. DESCRIPTORES RELACIONADOS CON LA MORFOLOGÍA FLORAL**

**1.1.1. Forma del tépalo externo e interno (Fig. 1Figura 1)**

1. Lineal
2. Elíptica
3. Oblanceolada
4. Obovada
5. Elíptica amplia



*Figura 1 Formas del tépalo externo e interno*

**1.1.2. Forma del ápice del tépalo externo e interno (Fig. 2)**

1. Agudo
2. Acuminado
3. Obtuso
4. Redondeado
5. Emarginado



*Figura 2 Forma del ápice de los tépalos*

**1.1.3. Patrón de coloración de fondo de los tépalos externos e interno** (Sin tener en cuenta la presencia de manchas, venas o pequeños puntos).

1. Coloración uniforme
2. Coloración no uniforme (Gradualmente de un color pasa a otro color)

**1.1.4. Color general de los tépalos externos e internos** (Color con referencia RHS. Si hay gradación se anotan todos los colores, desde el ápice a la base del tépalo)

1. Blanco
2. Crema
3. Amarillo
4. Violeta claro
5. Violeta
6. Violeta oscuro
7. Púrpura
8. Gradación de violeta a blanco

**1.1.5. Patrón de venación del tépalo externo e interno**

1. Sin venas
2. Venación uniforme y continua
3. Sólo las principales
4. Sólo en la base
5. Discontinua

**1.1.6. Tipo de venación del tépalo externo e interno**

1. Mal definidas
2. Bien definidas
3. Plumosas
4. Plumosas, que se funden dando grandes manchas de color

**1.1.7. Patrón de coloración de la venación del tépalo externo e interno**

1. Coloración uniforme
2. Coloración no uniforme (Gradualmente de un color pasa a otro color)

**1.1.8. Coloración de la venación del tépalo externo** (Color con referencia RHS. Si hay gradación se anotan todos los colores, desde el ápice a la base del tépalo)

1. Violeta
2. Púrpura
3. Azul
4. Negro
5. Gradación de violeta a púrpura
6. Gradación de violeta a azul
7. Gradación de púrpura oscuro a azul

**1.1.9. Continuación de las venas hacia el tubo floral**

1. Ausente
2. Presente

**1.1.10. Localización de las manchas en el tépalo externo e interno**

1. Ausente
2. En la base
3. En la base y continua por la garganta

**1.1.11. Color de la mancha del tépalo externo e interno** (Color con referencia RHS).

1. Sin manchas
2. Blanca
3. Crema
4. Amarillo
5. Violeta
6. Violeta oscuro
7. Púrpura

**1.1.12. Color de inicio del tubo floral** (Con referencia de la RHS).

1. Blanco-crema

2. Violeta-púrpura
3. Amarillo
4. Azul-verde

**1.1.13. Color de la garganta floral** (Con referencia de la RHS).

1. Blanco-crema
2. Amarillo

**1.1.14. Pubescencia de la garganta floral**

1. Glabra
2. Pilosa
3. Papilosa

**1.1.15. Color del filamento del estambre** (Con referencia de la RHS).

1. Blanca
2. Amarillo claro
3. Amarillo-naranja

**1.1.16. Ramificación del estilo**

1. Tres ramificaciones
2. Muchas ramificaciones

**1.1.17. Color del estigma** (Con referencia de la RHS).

1. Blanco-crema
2. Amarillo
3. Naranja

**1.1.18. Fragancia de la flor**

1. Ausente
2. Presente

**1.1.19. Hojas en el periodo floral**

1. Ausente
2. Presente

**1.1.20. Longitud de los tépalos externos e internos** [mm] Media de 10 tépalos de 10 flores

**1.1.21. Anchura de los tépalos externos e internos**[mm] Media de 10 tépalos de 10 flores

**1.1.22. Longitud de la antera** [mm] Media de 10 anteras de 10 flores

**1.1.23. Longitud del filamento** [mm] Media de 10 filamentos de 10 flores

**1.1.24. Longitud del estilo** [mm] Medido a 1 cm de la garganta. Media de 10 estilos de 10 flores

**1.1.25. Número de flores por brote** [mm] Media de 10 tépalos de 10 flores

**1.1.26. Altura de la flor desde el suelo** [mm] Medida desde el ápice de los tépalos hasta el nivel del suelo. Media de 10 flores de 10 plantas

## **2. DESCRIPTORES VEGETATIVOS**

Es conveniente utilizar cormos de tamaño uniforme y con capacidad para formar flores. Se tiene que tomar nota del tamaño inicial de estos cormos.

### **2.1. CARACTERES RELACIONADOS CON LA BRÁCTEA Y BRACTÉOLA**

#### **2.1.1. Textura de la bráctea**

1. Flácida
2. Rígida

#### **2.1.2. Color de la bráctea** (Con referencia de la RHS).

1. Blanca
2. Verde
3. Marrón

#### **2.1.3. Visibilidad de la bractéola**

1. Presente
2. Ausente

#### **2.1.4. Textura de la bractéola**

1. Flácida
2. Rígida

#### **2.1.5. Color de la bractéola** (Con referencia de la RHS).

1. Crema
2. Verde
3. Marrón

#### **2.1.6. Tamaño de la bractéola respecto la bráctea**

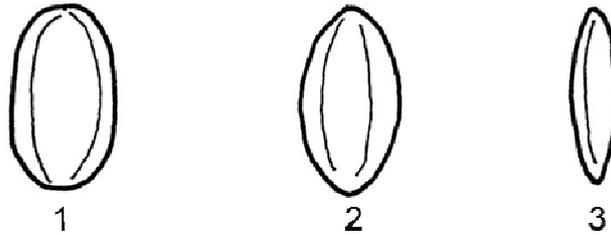
1. Igual
2. Casi igual

3. Más pequeña

## 2.2. CARACTERES RELACIONADOS CON EL FRUTO

### 2.2.1. Forma de la cápsula (Ver Fig. 3)

1. Oblonga
2. Elipsoide
3. Fusiforme



*Figura 3 Forma de la cápsula*

### 2.2.2. Color de la cápsula (Con referencia de la RHS).

1. Verde uniformemente coloreado
2. Verde con rayas moradas
3. Amarillas con rayas verdes
4. Morada clara con rayas moradas oscuras
5. Amarilla
6. Verde claro con rayas verde oscuro

**2.2.3. Altura del fruto [mm]** (Medida desde el ápice de la cápsula hasta el nivel del suelo. Media de 10 frutos de 10 plantas).

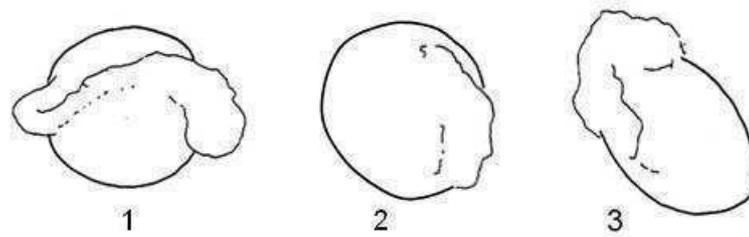
**2.2.4. Longitud de la cápsula [mm]** (Media de 10 frutos de 10 plantas).

**2.2.5. Anchura de la cápsula [mm]** (Media de 10 frutos de 10 plantas).

## 2.3. CARACTERES RELACIONADOS CON LA SEMILLA

### 2.3.1. Forma de la semilla (Ver Fig 4)

1. Subglobosa
2. Globosa
3. Elipsoide



*Figura 4 Forma de la semilla*

**2.3.2. Superficie de la semilla**

1. Muy rugosa
2. Algo rugosa
3. Lisa

**2.3.3. Color de la superficie de la semilla (Con referencia de la RHS).**

1. Marrón rojizo claro
2. Marrón rojizo oscuro
3. Marrón pálido
4. Marrón oscuro

**2.3.4. Desarrollo de la carúncula**

1. Poco desarrollado
2. Prominente
3. Muy prominente

**2.3.5. Desarrollo del rafe**

1. No desarrollado
2. Desarrollado

**2.3.6. Forma de las excrescencias de la superficie (Observación de la superficie de las semillas mediante microscopía electrónica de barrido)**

1. Ausencia
2. Papilas
3. Escamas de forma triangular
4. Escamas con base triangular y ápice distal cilíndrico

**2.3.7. Presencia de ceras (Observación de la superficie de las semillas mediante microscopía electrónica de barrido)**

1. No aparentes
2. Muy aparentes

**2.3.8. Longitud de la semilla** [mm] (Media de 50 semillas de 10 plantas).

**2.3.9. Anchura de la semilla** [mm] (Medida en la parte más amplia. Media de 10 frutos de 10 plantas).

**2.3.10. Peso de las semillas** [mg] (Media de 20 semillas tomadas de diferentes plantas)

**2.3.11. Número de semillas por fruto** (Media de 10 frutos de 10 plantas).

## 2.4. CARACTERES CUALITATIVOS RELACIONADOS CON LA HOJA

**2.4.1. Forma de la sección transversal de la hoja** (Ver Fig. 5)

1. Forma de T (el limbo de la hoja alcanza una anchura superior a la que tiene la quilla).
2. Semicilíndrica.
3. Forma de doble T (el limbo tiene una anchura inferior al doble de anchura que tiene la quilla).



*Figura 5 Sección transversal de la hoja*

**2.4.2. Longitud de las hojas al final del desarrollo** [cm] (Medida desde el nivel de suelo hasta el ápice de la hoja al final del desarrollo vegetativo. Medida de las 10 hojas más largas de 10 plantas diferentes).

**2.4.3. Anchura de la hoja** (Medida de la anchura de la hoja en su altura media, observada en 10 hojas de 10 plantas diferentes)

**2.4.4. Número de hojas en el brote principal**

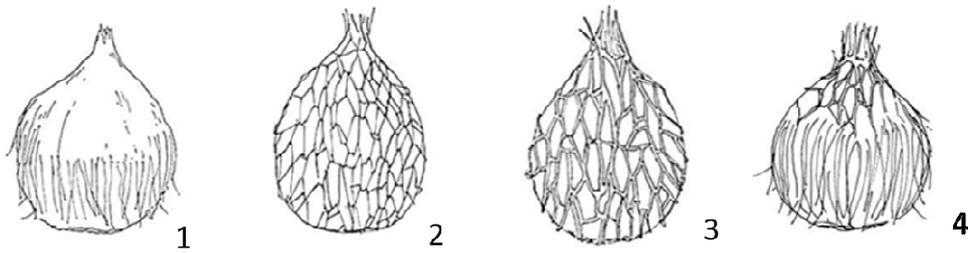
**2.4.5. Número de brotes por cormo**

## 2.5. CARACTERES RELACIONADOS CON LA TÚNICA

**2.5.1. Textura y aspecto de las túnicas** (Ver Fig.6).

1. Membranosa, con fibras paralelas en la base
2. Retícula fina
3. Retícula gruesa

4. Fibrosa, con fibras paralelas en la base y ligeramente reticuladas en el ápice



*Figura 6 Textura y aspecto de las túnicas*

**2.5.2. Color de la túnica** (Observado en la capa más externa y más recientemente formada de las túnicas. Se adjunta la referencia de la tabla de colores RHS).

1. Crema
2. Bronceada
3. Marrón claro
4. Marrón oscuro

**2.5.3. Persistencia de la túnica**

1. Persistencia (Gran acumulación de túnicas viejas (común en especies de regiones secas))
2. No persistente (Pocas capas de túnicas que fácilmente se desprenden del cormo, común en especies de climas húmedos)

**2.5.4. Presencia de estolones**

1. Ausencia
2. Presencia

**ANEJO 3. Correlación de los caracteres cualitativos con cada una de las coordenadas principales (valores de los vectores)**

Caracteres cualitativos	Coordenadas principales		
	1	2	3
Patrón de coloración de fondo uniforme	0,7109	0,4645	0,0748
Patrón de coloración de fondo no uniforme	-0,2906	-0,1415	0,2110
Patrón de color de venación uniforme	0,6094	0,3912	0,0202
Patrón de color de venación no uniforme	-0,2960	-0,0327	0,1422
Patrón de venación ausente	-0,2249	-0,1520	-0,2704
Patrón de venación uniforme y continuo	0,4159	0,4558	0,1041
Patrón de venación solo las principales	-0,3358	-0,3150	0,0299
Patrón de venación solo en la base	-0,1783	-0,2219	-0,0975
Patrón de venación discontinuo	-0,3765	-0,2375	-0,0767
Color de la venación violeta	0,4661	0,0780	0,0849
Color de la venación púrpura	-0,0622	0,0623	-0,3237
Color de la venación azul	-0,4434	-0,1872	-0,0825
Color de la venación negro	-0,4179	-0,3066	-0,0593
Color de la venación violeta en el ápice y púrpura en la base	-0,4453	-0,2778	-0,0455
Color de la venación violeta en el ápice y azul en la base	-0,4454	-0,0508	0,0787
Color de la venación púrpura oscuro en el ápice y azul en la base	-0,3055	-0,3560	-0,0621
Garganta floral glabra	-0,2539	-0,1277	0,3668
Garganta floral pilosa	0,4623	0,2794	-0,4588
Garganta floral papilosa	-0,3131	-0,1952	0,3300
Filamento del estambre blanco	-0,1791	0,0640	0,2785
Filamento del estambre amarillo claro	0,2198	0,4849	-0,0573
Filamento del estambre amarillo naranja	0,2153	-0,3997	-0,1824
Estigma con tres ramificaciones	-0,0858	0,6363	0,1057
Estigma con muchas ramificaciones	0,4983	-0,4614	-0,1060
Color del estigma blanco-crema	-0,3337	0,6183	0,0425
Color del estigma amarillo	0,1653	-0,4324	-0,0413
Color del estigma naranja	0,4410	-0,4139	-0,0892
Hojas ausentes en el periodo de floración	-0,3008	-0,3746	0,0867
Hojas presentes en el período de floración	0,5521	0,5563	-0,0450
Túnica membranosa con fibras paralelas en la base	0,3183	-0,3659	-0,0549
Túnica con retícula fina	-0,4149	-0,0811	0,2443
Túnica con retícula gruesa	-0,2180	-0,3422	-0,0766
Túnica fibrosa, con fibras paralelas en la base y ligeramente reticuladas en el ápice	-0,2887	0,3651	-0,3044

## VIII.ANEJOS

Túnica persistente	-0,3281	0,5899	0,0012
Túnica no persistente	0,5794	-0,4082	0,0405
Superficie de la semilla muy rugosa	0,6361	-0,3257	0,0123
Superficie de la semilla algo rugosa	-0,4145	0,2808	-0,3050
Superficie de la semilla lisa	-0,4780	0,0223	0,1123
Rafe de la semilla no desarrollado	-0,4589	-0,1791	-0,0413
Rafe de la semilla desarrollado	0,7103	0,3607	0,0831
Forma subglobosa de la semilla	-0,1932	0,4046	0,3040
Forma globosa de la semilla	0,4320	-0,1847	-0,2992
Forma elipsoide de la semilla	-0,4736	-0,0873	0,0341
Ceras no aparentes en la superficie de la semilla	0,7018	-0,0917	0,3218
Ceras aparentes en la superficie de la semilla	-0,4504	0,2733	-0,2800
Ausencia de estructuras en la superficie de la semilla	-0,3281	0,5899	0,0012
Presencia de papilas en la superficie de la semilla	-0,3651	-0,2587	-0,0808
Presencia de escamas de forma triangular en la superficie de la semilla	-0,3755	-0,3058	-0,0614
Presencia de escamas con base triangular y ápice distal cilíndrico en la superficie de la semilla	0,4655	-0,4495	-0,0506
Carúncula de la semilla poco desarrollada	0,4419	-0,4402	-0,0629
Carúncula de la semilla prominente	0,0693	-0,4329	0,1506
Carúncula de la semilla muy prominente	-0,2696	0,6425	-0,0129
Cápsula oblonga	-0,4352	-0,0010	-0,0018
Cápsula elipsoide	0,6141	0,4317	0,1168
Cápsula fusiforme	0,4221	-0,3422	0,2435
Forma en T de la sección transversal de la hoja	-0,2490	-0,3776	0,1421
Forma semicilíndrica de la sección transversal de la hoja	-0,4149	-0,0811	0,2443
Forma en doble T de la sección transversal de la hoja	0,4879	0,3374	-0,4613
Bráctea flácida	0,6932	0,3536	0,1463
Bráctea rígida	-0,3896	-0,0173	0,1562
Bráctea de color blanco	-0,1832	-0,0183	-0,3050
Bráctea de color verde	0,6659	0,1507	0,2747
Bráctea de color marrón	-0,3021	0,3719	0,0269
Bractéola ausente	0,5021	-0,4623	0,0089
Bractéola visible	-0,2043	0,6417	0,0037
Floración primaveral	-0,2763	0,5869	0,0565
Floración otoñal	0,5276	-0,4053	-0,0148

**ANEJO 4. Lista de entradas ensayadas en el estudio de fenología**

Especies	Nº de entrada	Provincia	Localidad
<b><i>C. cambessedesii</i> J. Gay</b>	BCU001685	Mallorca	Cami de Can Mameta (Caimari)
	BCU001680	Mallorca	Es Repla (Arta)
	BCU001682	Mallorca	Partida de Fuster (Capdepera)
	BCU001683	Mallorca	Tunel de Formentor
	BCU003130	VIVERO	-
<b><i>C. carpetanus</i> Boiss. &amp; Reut.</b>	BCU002835	Ávila	Puerto de la Peña Negra
	BCU002836	Ávila	Puerto de la Peña Negra
	BCU002837	Ávila	Puerto de la Peña Negra
	BCU002838	Ávila	San Martín de la Vega
	BCU002971	Madrid	Montejo de la Sierra (Hayedo)
	BCU002987	Madrid	Montejo de la Sierra (Hayedo)
	BCU002972	Madrid	Robregordo
	BCU002973	Madrid	Robregordo
	BCU002974	Madrid	Robregordo
	BCU002696	Ourense	Muinos (Requias, Serra do Xures)
	<b><i>C. clusii</i> J.Gay</b>	BCU002966	Cádiz
BCU002967		Cádiz	Laguna de la Paja
BCU002965		Cádiz	Puerto Real
BCU002964		Cádiz	Rota
BCU002960		Huelva	Doñana
BCU002961		Huelva	Doñana
BCU002962		Huelva	Hinojos
BCU002963		Huelva	Hinojos

## VIII.ANEJOS

Especies	Nº de entrada	Provincia	Localidad
<i>C. nevadensis</i> Amo	BCU002693	Cuenca	Altomira
	BCU002694	Cuenca	Altomira
	BCU002355	Cuenca	Motilla del Palancar
	BCU002356	Cuenca	Motilla del Palancar
	BCU002687	Cuenca	Motilla del Palancar
	BCU002689	Cuenca	Motilla del Palancar
	BCU002690	Cuenca	Motilla del Palancar
	BCU002695	Cuenca	Olmeda del Rey
	BCU002871	Cuenca	Olmeda del Rey
	BCU002969	Cuenca	Olmeda del Rey
	BCU003012	Cuenca	Olmeda del Rey
	BCU002976	Granada	Güejar Sierra
	BCU002977	Granada	Monachil
	BCU002979	Granada	Monachil
	BCU002980	Granada	Quesada
	BCU002387	Granada	Sierra Nevada (Collado de las Sabinas)
	BCU002386	Granada	Sierra Nevada (Falda del Dornajo)
	BCU002388	Granada	Sierra Nevada. (Collado del Alguacil o de la Gitana)
	BCU002993	Huesca	Benasque
	BCU002994	Huesca	Benasque
	BCU002992	Huesca	Biasaurri
	BCU002999	Huesca	Boltaña
	BCU002981	Jaén	Cazorla
	BCU002982	Jaén	Quesada
	BCU002383	Jaén	Sierra de Cazorla
	BCU002384	Jaén	Sierra de Cazorla
	BCU002385	Jaén	Sierra de Cazorla (Cinarejo)
	BCU002381	Jaén	Sierra de Cazorla (El Chorro)
	BCU002382	Jaén	Sierra de Cazorla (Prado de las Ubillas)
	BCU002380	Jaén	Sierra de Cazorla (Riogaza)
	BCU002989	Lérida	Ager
	BCU002988	Lérida	Camarsa
	BCU002990	Lérida	Vilanova Meià
BCU002697	Pamplona	Lazagurria	
BCU002698	Pamplona	Tafalla	
BCU001742	Valencia	Cofrentes	
<i>C. vernus</i> subsp. <i>vernus</i> (Ker Gawl.)	BCU001822	VIVERO	-
	BCU002998	VIVERO	
	BCU003018	VIVERO	

Especies	Nº de entrada	Provincia	Localidad
<i>C. nudiflorus</i> S.M.	BCU003176	Burgos	Los Altos
	BCU002556	Huesca	Benasque
	BCU002557	Huesca	Benasque
	BCU002558	Huesca	Benasque
	BCU002559	Huesca	Benasque
	BCU002944	Huesca	Benasque
	BCU003004	Huesca	Benasque
	BCU003015	Huesca	Benasque
	BCU003002	Huesca	Bielsa
	BCU003000	Huesca	Boltaña
	BCU003001	Huesca	Boltaña
	BCU003003	Huesca	Plan
	BCU002779	La Rioja	Manzanares de Rioja
	BCU002776	La Rioja	San Millan de la Cogola
	BCU003123	La Rioja	Villoslada de cameros
	BCU003006	Lérida	Durro
	BCU003005	Lérida	Vall de Boi
	BCU003007	Lérida	Vielha
<i>C. serotinus</i> Salisb.	BCU002741	A Coruña	Mazaricos
	BCU002550	Albacete	-
	BCU002740	Albacete	Tus. Sierra de Segura
	BCU002742	Albacete	Tus. Sierra de Segura
	BCU003177	Burgos	La Revuelta
	BCU003175	Burgos	Las Cañadillas
	BCU002366	Ciudad Real	Almagro
	BCU002367	Ciudad Real	Almagro
	BCU002685	Ciudad Real	Almagro
	BCU002686	Ciudad Real	Almagro
	BCU002775	Cuenca	Altomira
	BCU002970	Cuenca	Altomira
	BCU003013	Cuenca	Altomira
	BCU002743	Cuenca	Huete (Sierra de Altomira)
	BCU002873	Cuenca	Huete (Sierra de Altomira)
	BCU002978	Granada	Güejar Sierra
	BCU002959	Huelva	Aracena
	BCU001655	Jaén	Cazorla (Sierra de Cazorla, Juanfria)
	BCU001657	Jaén	Cazorla (Sierra de Cazorla, Puertollano)
	BCU003173	León	Barrios de Luna
	BCU003179	León	Barrios de Luna
	BCU003181	León	Pola de Gordon
	BCU003174	León	Soto y Amío
	BCU003178	León	Valdelugeros
	BCU003180	León	Valdelugeros
	BCU003172	León	Villamanín
	BCU001704	Toledo	Villarrubia de Santiago
	BCU001705	Toledo	Villarrubia de Santiago
	BCU002619	Valencia	Caroche (Balsa)
	BCU002618	Valencia	Caroche (Vertice Geo)

ANEJO 5. Nombre y características de los cebadores descritos por Moraga et al. (2009).  
 Todos los cebadores forward incorporan en su secuencia una cola M13

Nombre	Secuencia del cebador (5'-3')	Tª de anillado (°C)	Rango del tamaño de los alelos	Motivo repetido
<b>13M13F</b>	TGTAAAACGACGGCCAGTTGGC ATTAGATTACGGGTTTGT	57	195	(CT) <sub>14</sub>
<b>13R</b>	GAATCACGTTGTTGGGATTGAT			
<b>36M13F</b>	TGTAAAACGACGGCCAGTGCTA GCAGAATCACATGATCCA	50	292	(CAC) <sub>5</sub>
<b>36R</b>	AGTGCATTCATCTCACCTCTCA			
<b>47M13F</b>	TGTAAAACGACGGCCAGTACCA GGTCAGTTGATGCCTCAT	48	253	(CTT) <sub>9</sub> (TTCCT) <sub>6</sub> (CTT) <sub>9</sub>
<b>47R</b>	CAGTGTAGCTACTTAGACAGT			
<b>50M13F</b>	TGTAAAACGACGGCCAGTTAACC TCGTCGGAGCGGTGGA	60	239	(AG) <sub>21</sub>
<b>50R</b>	GGAGCAACAATGGCGGTGGAA			
<b>55M13F</b>	TGTAAAACGACGGCCAGTAGCA ACAGAGGCACACATTCA	60	268	(CTAT) <sub>9</sub>
<b>55R</b>	AGCTGTCAGTCCAATCATCAAC			
<b>62M13F</b>	TGTAAAACGACGGCCAGTCCAAT CTGAGGACGGGCT	55	325	(GA) <sub>8</sub> (AG) <sub>7</sub>
<b>62R</b>	AGAAGCGTGATGAAGTGA			

ANEJO 6. Nombre y características de los cebadores descritos por Nemati et al. (2012).

Nombre	Secuencia del cebador (5'-3')	Tª de anillado (°C)	Rango del tamaño de los alelos	Motivo repetido
ABRII/Cs8	F: GTGTAATGAATGGGATATATGGC	55	150-205	(AG) <sub>12</sub>
	R: CCTTCCAACGTGAAATAATTCC			
ABRII/Cs11	F: CCCAACTGACCTTCCAACCTG	55	270-350	(CT) <sub>15</sub>
	R: GTTGTTATGATGGTCTGGCC			
ABRII/Cs20	F: CAATCTTTACATAGTGAGGC	55	200-250	(AAG) <sub>7</sub> (GAA) <sub>10</sub>
	R: GTATTCTGGTCAGTTCAGTG			
ABRII/Cs28	F: AACCACTGAGGAAGGAC	55	200-240	(ACCGCG) <sub>2</sub>
	R: GGTAGAATACCTTATCGGTT			
ABRII/Cs39	F: CTTTAGCTGTTATGATGGTC	50	240-280	(GA) <sub>16</sub>
	R: TCCCGGTATGTAACCTATGTA			
ABRII/Cs42	F: ATTAACACCGGTCCTACTAGA	50	190-230	(GAA) <sub>14</sub>
	R: GAAGGTATCTCTCTTCGTTT			

***ANEJO 7. Tampones utilizados en la electroforesis de los geles de agarosa***

Tampón de electroforesis (TBE 10X)

0,9 M Tris (tris (hidroximetil) aminometano)

0,9 M ácido bórico

20 mM EDTA (ácido etilendiaminotetracético)

Ajuste a pH 8

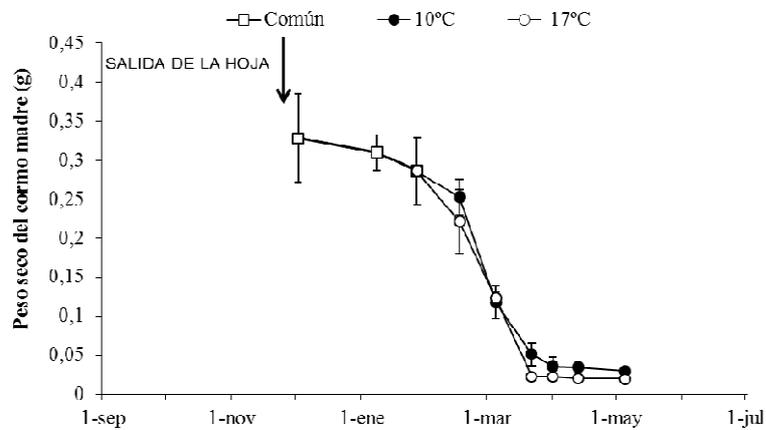
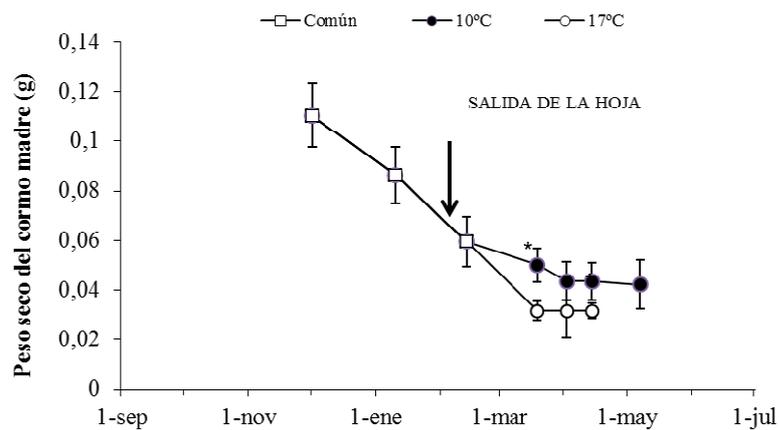
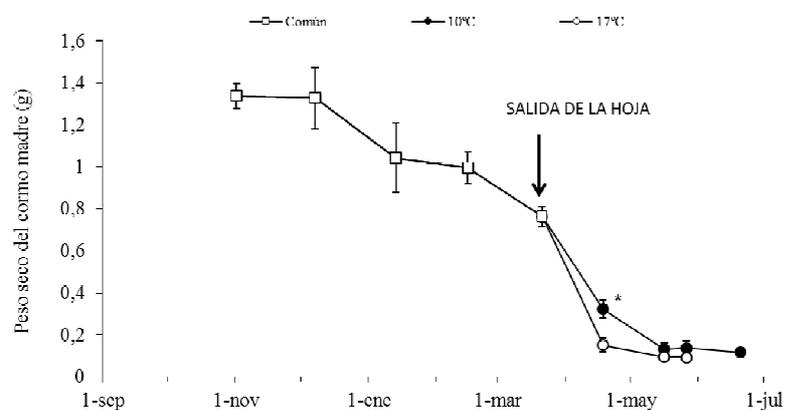
Tampón de carga (6X)

40% (peso/volumen) de sacarosa

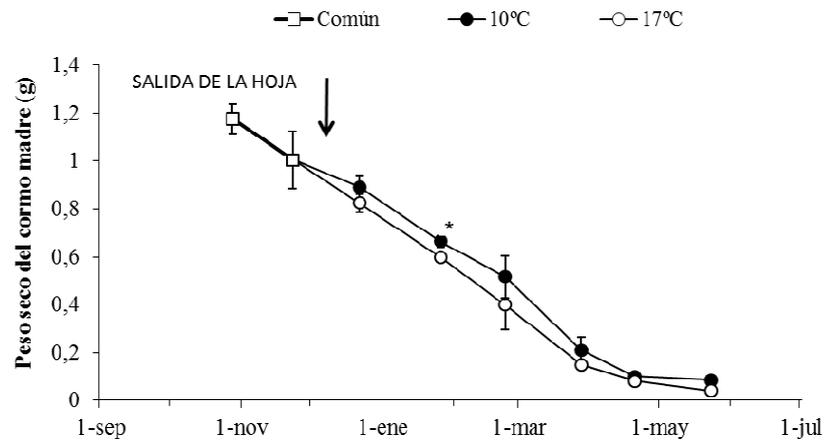
0,25% bromofenol azul

0,1 M EDTA

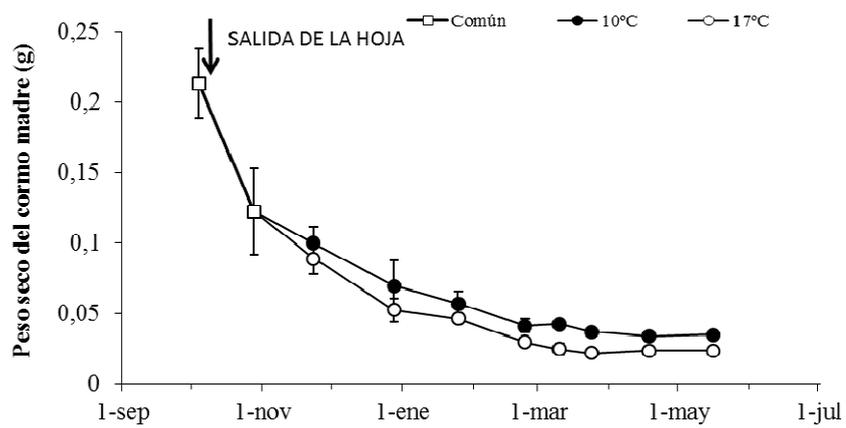
## ANEJO 8. Gráficas de evolución del peso seco del corno madre

*C. nevadensis**C. carpetanus**C. vernus*

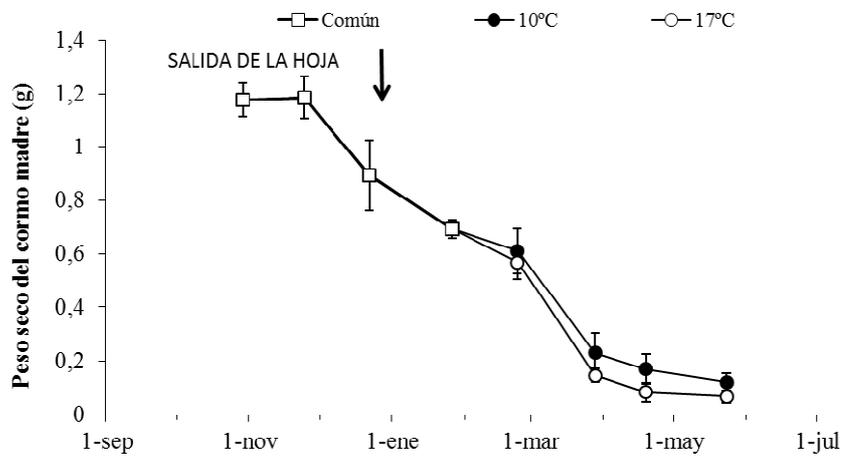
***C. serotinus* entrada de vivero. Sin aplicación de frío**



***C. serotinus* entrada silvestre. Sin aplicación de frío**



***C. serotinus* entrada de vivero. Aplicación de frío**



*C. nudiflorus*

