

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE GANDÍA

Grado en Ciencias Ambientales



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



**“Estudio de la viabilidad del método de emasculación
y la formación de híbridos triploides en el tetraploide
Centaurea seridis L. (Asteraceae) con polen del
diploide *Centaurea aspera* L.”**

TRABAJO FINAL DE GRADO

Autora: Nereida Gamón Guillamón

Tutor: Hugo Basilio Merle Farinós

GANDÍA, 2017

Resumen

Muchas especies vegetales de forma natural han evolucionado gracias a mecanismos de duplicación de su contenido genético (poliploidización). Estos procesos juegan un papel importante en la evolución adaptativa y de especiación. El género *Centaurea* L. (Asteraceae) es un género moderno y con altos niveles de diversidad. En él, es frecuente la aparición de híbridos entre especies distintas y poliploides con diferentes niveles de ploidía. Conocer los mecanismos naturales de generación de diversidad puede ayudar, por ejemplo: al manejo de poblaciones de especies amenazadas, o en diferentes procesos de mejora vegetal.

El complejo poliploide que se va a estudiar en el presente trabajo está formado por el diploide *C. aspera* L. y el tetraploide *C. seridis* L. En este caso, se va a evaluar la viabilidad del polen de *C. aspera* (2x) sobre las flores de *C. seridis* (4x) para ver si *C. seridis* puede actuar como parental femenino en la formación de híbridos triploides (3x). Las flores de *C. seridis* son hermafroditas y autógamas, por lo que será necesario la puesta a punto de un método de emasculación. Esta técnica consistirá en la retirada de las anteras de cada una de las flores de *C. seridis* reunidas en capítulos para posteriormente realizar la polinización forzada mediante frotación con capítulos de *C. aspera*.

Palabras clave

Centaurea seridis, *Centaurea aspera*, poliploidía, emasculación, polinización cruzada.

Resum

Moltes espècies vegetals han evolucionat de forma vegetal gràcies a mecanismes de duplicació del seu contingut genètic (poliploidització). Aquests processos juguen un paper important en la evolució adaptativa i d'especiació. El gènere *Centaurea* L. (Asteraceae) és un gènere modern i amb nivells alts de diversitat. En ell, és freqüent l'aparició d'híbrids entre espècies distintes i poliploides amb diferents nivells de ploïdia. Conèixer els mecanismes naturals de generació de diversitat pot ajudar, per exemple: al maneig de poblacions d'espècies amenaçades, o en diferents processos de millora vegetal.

El complex poliploide que es va a estudiar en el present treball està format pel diploide *C. aspera* L. i el tetraploide *C. seridis* L. En aquest cas, es va a avaluar la viabilitat del pol·len de *C. aspera* (2x) sobre les flors de *C. seridis* (4x) per a veure si *C. seridis* pot actuar com parental femení en la formació d'híbrids triploides (3x). Les flors de *C. seridis* són hermafrodites i autògames, per lo que serà necessari la posada a punt d'un mètode d'emasculació. Aquesta tècnica consistirà en la retirada de les anteres de cada una de les flors de *C. seridis* reunides en capítols per a posteriorment realitzar la pol·linització forçada mitjançant frotació amb capítols de *C. aspera*.

Paraules clau

Centaurea seridis, *Centaurea aspera*, poliploïdia, emasculació, pol·linització creuada.

Abstrac

Many naturally occurring plant species have evolved through mechanisms of duplication of their genetic content (polyploidization). These processes play an important role in adaptive and speciation evolution. The genus *Centaurea* L. (Asteraceae) is a modern genus with high levels of diversity. In it, the emergence of hybrids between different species and polyploids with different levels of ploidy is frequent. Knowing the natural mechanisms of diversity generation could help, for example: in the management of populations of threatened species, or in different processes of plant improvement.

The polyploid complex to be studied in the present work is formed by the diploid *C. aspera* L. and the tetraploid *C. seridis* L. In this case, the viability of *C. aspera* pollen (2x) is evaluated the flowers of *C. seridis* (4x) to see if *C. seridis* can act as a female parent in the formation of triploid hybrids (3x). The flowers of *C. seridis* are hermaphrodite and autogamous, so it will be necessary to develop a method of emasculación. This technique will consist of the removal of the anthers of each of the flowers of *C. seridis* collected in flower head to later carry out the forced pollination by rubbing with flower head of *C. aspera*.

Key words

Centaurea seridis, *Centaurea aspera*, polyploidy, emasculación, cross pollination.

Agradecimientos

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, por su amor incondicional, todos y cada uno de mis éxitos son más vuestros que míos. Gracias por los valores, los consejos, el apoyo y por guiarme a cada paso que doy.

A mi tutor Hugo, por su esfuerzo, dedicación y entusiasmo. Nada de esto habría sido posible sin él.

A mi compañero Jordi, por el apoyo y las duras jornadas tanto en campo como en laboratorio.

A M^aPilar Donat, por brindarme su ayuda durante todo el grado y por descubrir mi verdadera vocación, la botánica.

A Maica y a Juan, por ser los mejores amigos que todo el mundo desearía tener. Gracias por todo lo vivido.

Y, por último, pero no por ello menos importante: Rubén, mi luz al final del túnel. Gracias por estar siempre a mi lado, por no dejar que me hundiera en ningún momento y por sacarme sonrisas en los peores momentos.

Índice

1. Introducción	4
1.1. Importancia de la poliploidía en plantas	4
1.2. Complejo poliploide formado por <i>C. aspera</i> L. y <i>C. seridis</i> L.	5
1.2.1. Taxonomía.....	5
1.2.2. Descripción de los taxones del complejo	6
1.3. Evolución en el género <i>Centaurea</i>	9
2. Objetivos.....	10
3. Material y métodos	10
3.1. Diseño experimental	11
3.2. Zona de experimentación.....	12
3.3. Tratamientos	14
3.4. Trabajo de campo.....	15
3.4.1. Emasculación	15
3.4.2. Polinización.....	18
3.4.3. Recolección de capítulos.....	21
3.4.4. Cronograma.....	22
3.5. Trabajo de laboratorio.....	22
3.5.1. Conteo de capítulos	23
3.5.2. Citometrías	24
3.5.3. Germinaciones.....	25
3.6. Tratamiento estadístico de los datos	26
3.6.1. Estadística descriptiva.....	26
3.6.2. Análisis de los datos.....	26
4. Resultados y discusión.....	27
4.1. Ensayos previos	27
4.2. Evaluación de la descendencia.....	28
4.3. Comparación de los tratamientos: viabilidad de polen de <i>Centaurea aspera</i> L. (2x) sobre las flores de <i>Centaurea seridis</i> L. (4x).....	29
4.3.1. Comparación global entre tratamientos.....	29
4.3.2. Comparación entre repeticiones	32
4.3.3. Comparación de los tratamientos en la repetición 3	34
5. Conclusiones.....	35
6. Bibliografía	35

Índice de figuras

Figura 1. Eventos de paleopoliploidización en el reino Plantae. Fuente: Conceptcours, 2013.	4
Figura 2. Capítulo de <i>Centaurea seridis</i> subsp. <i>maritima</i> (Dufour) Dostál.	7
Figura 3. Capítulo de <i>Centaurea aspera</i> subsp. <i>stenophylla</i> (Dufour).....	8
Figura 4. Mapa distribución <i>C. aspera</i> L.	9
Figura 5. Mapa distribución <i>C. seridis</i> L.	9
Figura 6. Localización en campo de las especies utilizadas en el experimento: <i>C. aspera</i> L. (rojo) y <i>C. seridis</i> L. (azul).	11
Figura 7. Localización de las distintas repeticiones realizadas en el ensayo: repetición 1 (rosa); repetición 2 (amarilla); repetición 3 (azul); repetición 4 (rojo).	12
Figura 8. Localización de los tratamientos llevados a cabo en campo sobre <i>C. seridis</i> : tratamiento A (rojo); tratamiento B (verde); tratamiento C (morado).	12
Figura 9. Localización del estudio. Foto global del Parque Natural de la Albufera y de la ciudad de Valencia (izquierda) y foto aérea de la zona donde se realizó el experimento (derecha).	13
Figura 10. Reconstrucción de la vegetación natural primitiva de la Dehesa de Valencia.	13
Figura 11. Estado actual de la vegetación en la Dehesa. A. paseo marítimo. B. Resto de dunas. C. Carreteras y aparcamientos. D. Sistema dunar estabilizado. E. Urbanizaciones.	14
Figura 12. Estado óptimo para la realización de la emasculación en <i>C. seridis</i> L. (izquierda) y <i>C. aspera</i> L. (derecha).	15
Figura 13. Técnica de emasculación en <i>C. aspera</i> L.	16
Figura 14. Técnica de emasculación en <i>C. seridis</i> L.	17
Figura 15. Muestra de dos capítulos de <i>C. aspera</i> L, uno emasculado (izquierda: solo rosa), y otro sin emascular (derecha: rosa y violeta).	17
Figura 16. Material utilizado para emasculación y embolsar en el experimento.	18
Figura 17. Botes utilizados para almacenar los capítulos donantes.	19
Figura 18. Rotulación del material empleado para la rotulación; GPS GARMIN utilizado para la localización de los individuos.	20
Figura 19. Polinización forzada en <i>C. aspera</i> L. con capítulo donante de <i>C. seridis</i> L.	20
Figura 20. Embolsamiento del capítulo polinizado (<i>C. aspera</i> L.).	21
Figura 21. Proceso de recolección de los individuos en campo.	21
Figura 22. Cronograma del experimento perteneciente a <i>Centaurea seridis</i>	22
Figura 23. Cronograma del experimento relativo a <i>Centaurea aspera</i>	22
Figura 24. Material utilizado para la extracción y recuento de aquenios.	23
Figura 25. Extracción de los aquenios en un capítulo de <i>C. seridis</i> L.	24
Figura 26. Técnica utilizada para la extracción del cotiledón (técnica completa) (González, 2014).	24

Figura 27. Preparación de la solución final listas para el análisis en el citómetro de flujo.	25
Figura 28. Colocación de los cotiledones en placas Petri para su germinación.	26
Figura 29. Corte temprano en la parte apical del capítulo.....	28
Figura 30. Distribución de los datos en el tratamiento A: emasculación sin polinización. Shapiro-W=0,901; p-valor= 0,642. Los datos NO presentan una distribución normal..	30
Figura 31. Distribución de los datos en el tratamiento B: emasculación y polinización con polen de <i>C. seridis</i> . Shapiro-W=0,968; p-valor= 0,6422. Los datos presentan una distribución normal.....	30
Figura 32. Distribución de los datos en el tratamiento C: emasculación y polinización con polen de <i>C. aspera</i> . Shapiro-W=0,932; p-valor= 0,121. Los datos presentan una distribución normal.....	30
Figura 33. Gráfico de cajas y bigotes del número de aquenios por tratamientos. La línea central representa la mediana, el punto “+” representa la media, las cajas muestran los percentiles 25 y 75. Las letras “a” y “b” muestran los grupos homogéneos.	31
Figura 34. Gráfico de cajas y bigotes del número de aquenios por repetición en el tratamiento A.	33
Figura 35. Gráfico de cajas y bigotes del número de aquenios por repetición en el tratamiento C.	33
Figura 36. Gráfico de cajas y bigotes del número de aquenios por repetición en el tratamiento B.	34
Figura 37. Gráfico de cajas y bigotes del número de aquenios por tratamiento en la repetición 3.	34

Índice de tablas

Tabla 1. Asignación taxonómica de la sección Seridia del género <i>Centaurea</i>	5
Tabla 2. Clasificación en secciones de <i>Centaurea</i> según tipos polínicos, biogeografía y características morfológicas.	6
Tabla 3. Número de capítulos por tratamiento y especie.....	11
Tabla 4. Total de flores emasculadas en ambas especies.	16
Tabla 5. Total de aquenios recontados en <i>C. seridis</i> L.	29
Tabla 6. Estadística descriptiva para los tratamientos en <i>C. seridis</i>	32

1. Introducción

1.1. Importancia de la poliploidía en plantas

La poliploidía es el proceso de multiplicación del número completo de cromosomas de una especie y puede producirse en células, tejidos u organismos. Cuando los juegos de cromosomas provienen de una única especie parental se denominan autopoliploides (e.g. AAAA), cuando los juegos de cromosomas provienen de dos o más especies se denominan alopoliploides (e.g. AABB). Según el número de juegos cromosómicos completos tenemos: triploides (3X; AAA), tetraploides (4X; AAAA), pentaploides (5X; AAAAA), y así sucesivamente. La poliploidía suele ser frecuente en grupos con altas tasas de hibridación, debido a la posible fusión de gametos no reducidos (Otto, 2007).

La poliploidía es una importante fuerza impulsora de la evolución de las plantas (Otto, 2007; Soltis & Soltis, 2009). Se tienen evidencias de que la mayoría de angiospermas han sufrido algún proceso de poliploidización durante su proceso evolutivo (Figura 1), además, un tercio de ellas son poliploides recientes y se estima que el 15% de los procesos de especiación son producidos por poliploidización (Wood et al., 2009).

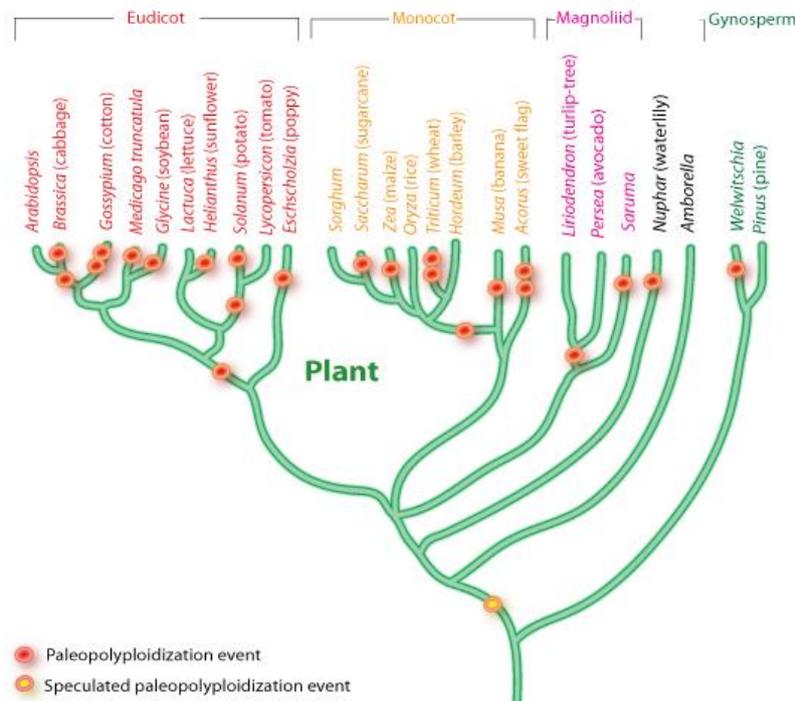


Figura 1. Eventos de paleopoliploidización en el reino Plantae. Fuente: Conceptcours, 2013.

Existen tanto especies silvestres (e.g. *Rubus*, *Centaurea*, etc.) como agrícolas que poseen un incremento del número cromosómico. En cuanto a las especies agrícolas encontramos plantas tan importantes como el trigo (*Triticum aestivum* L. (hexaploide AABBDD)), la caña de azúcar que es el cultivo de mayor producción mundial con 1900 MT al año (*Saccharum officinarum* L.) o los plátanos (*Musa x paradisiaca* (mayoritariamente triploides del tipo AAB, ABB)) (DeWet et al., 1981).

También encontramos el caso del género *Citrus*. Generalmente son diploides con un número básico de 9x cromosomas (Krug, 1943). Pero, se han encontrado especies con

genotipos triploides y tetraploides (Longley, 1925; Lapin, 1937; Iwasaki, 1943). En el caso de especies agrícolas hay algunas donde la hibridación-poliploidización se ha producido de forma natural y otras donde ha sido inducida, como es el caso de algunas mandarinas triploides (Aleza et al. 2012c, 2012d).

En el caso de las especies silvestres, muchas han evolucionado de forma natural gracias a mecanismos de duplicación de su contenido genético. Estos procesos, por lo tanto, juegan un papel importante en la evolución adaptativa y de especiación. Conocer los mecanismos naturales que generan la aparición de poliploides y sus posteriores interacciones puede ayudar, por ejemplo: al manejo de poblaciones de especies poliploides amenazadas, o en diferentes procesos de mejora vegetal.

1.2. Complejo poliploide formado por *C. aspera* L. y *C. seridis* L.

1.2.1. Taxonomía

La familia Compositae (*Asteraceae*) es la más extensa, con 1.300 géneros y 21.000 especies. Pertenece al orden *Asterales*, subclase *Asteridae*, clase *Magnoliopsida* (eudicotiledóneas), división *Magnoliophyta* (angiosperma) y reino *Plantae*. En la tabla 1 se muestra la taxonomía del género *Centaurea*.

Tabla 1. Asignación taxonómica de la sección **Seridia** del género **Centaurea**.

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Carduoideae
Tribus	Cynareae
Subtribu	Centaureinae
Género	Centaurea
Sección	Seridia
Especies	Centaurea aspera Centaurea seridis
Subespecie	C. aspera subsp stenophylla C. seridis subsp maritima

Dentro de la familia *Asteraceae* existen 12 subfamilias, la más extensa es la subfamilia *Carduoideae* Sweet que comprende 82 géneros y 2.700 especies, de origen africano (Susanna & García-Jacas, 2009). Se caracterizan por ser plantas herbáceas anuales, presentan flores agrupadas en capítulos, este se comporta como una flor. Las flores son hermafroditas, unisexuales o estériles, el fruto se denomina aquenio. Se distribuyen entre Eurasia y el norte de África.

Dentro de la subfamilia *Carduoideae* Sweet se encuentran 4 tribus siendo la más extensa la tribu *Cynareae* Lam. & DC. (sinónimo de *Cardueae* Cass.) incluye 72 géneros y 2.600

especies (Susanna & García-Jacas, 2009). Es la única que se encuentra en el territorio español, su mayor distribución es sobre Eurasia, norte de África y norte de América, en el hemisferio sur se encuentra de manera escasa. Dentro de la tribu *Cynareae* se reconocen 5 subtribus. Siendo la Subtribu *Centaureinae* la que mayor representación tiene en la Región Mediterránea.

Dentro de la Subtribu se encuentra el género *Centaurea* L. que comprende, en su delimitación actual, unas 250 especies (Susanna & García-Jacas, 2009), distribuidas mayoritariamente en la Región Mediterránea y el suroeste de Asia, aunque también se encuentra representado en Europa y África, y en Australia y en el continente americano como invasora (Scott, 1990; Wagenitz y Hellwig, 1996).

Por otra parte, la sección Seridia, está situada dentro del género *Centaurea* y del clado (tipo polínico) *Jacea*. Esta sección está compuesta por 22 especies a nivel mundial, siete de ellas distribuidas por el mediterráneo occidental (Tutin et al, 1976). Todas son hierbas anuales, con hojas caulinares superiores decurrentes y con el apéndice de las brácteas involucreales palmeado - espinoso (Trabaud et al, 1980). Su fitogeografía es mediterránea, pudiendo llegar a Marruecos y Portugal.

Tabla 2. Clasificación en secciones de *Centaurea* según tipos polínicos, biogeografía y características morfológicas.

Género <i>Centaurea</i>			
Tipo polínico y biogeografía		Secciones	
Serratula y <i>Centaurea centaurium</i>		Plectocephalus y <i>Centaurea</i>	
Cyanus y Montana		Plectocephalus	
Scabiosa		Acrocentron	
Dealbata		Psephellus	
Jacea	Circunmediterránea y eurosiberiana	Acrolophus	Willkomia
		Ammocyanus	<i>Jacea</i> - <i>Lepteranthus</i>
		Phalolepis	<i>Ptosimopappus</i>
		Calcitrapa	<i>Phaeopappus</i>
		<i>Cynaroides</i>	
	Mediterránea oriental	<i>Microlophus</i>	<i>Chartolepis</i>
		<i>Rhizocalathium</i>	<i>Grossheimia</i>
		<i>Cheirolepis</i>	<i>Pseudophaeopappoides</i>
	Mediterránea occidental	<i>Hymenocentron</i>	<i>Melanoloma</i>
		<i>Mesocentron</i>	<u>Seridia</u>

1.2.2. Descripción de los taxones del complejo

Un complejo poliploide es un grupo de poblaciones de plantas interrelacionadas que tienen la capacidad de hibridar entre si y que, además, presentan niveles distintos de ploidía (Babcock & Stebbins, 1938).

En el presente trabajo se estudiará el complejo poliploide formado por el diploide *C. aspera* L. y el tetraploide *C. seridis* L., a continuación, se describirán las especies a estudiar.

Centaurea aspera L, conocida como travalera, está representada en el levante peninsular por dos subespecies: *C. aspera* L. *subsp aspera* y *C. aspera subsp. stenophylla* (Dufour) Nyman (Tutin et al. 1976; Bolos & Vigo, 1995; Mateo & Crespo, 2009). *Centaurea seridis* L, conocida como Bracera marina, se encuentra representada en la costa levantina por *C. seridis subsp. maritima* (Dufour) Dostál y más hacia los valles de interior por *C. seridis subsp. cruenta* (Willd.) Dostál (Magallón, 1972; Tutin et al., 1976; Bolos & Vigo, 1984; Arnaiz, 1987; Laguna Lumbreras & Atienza Tamarit, 1998; Gil 1999).

El presente trabajo se centra en los complejos poliploides formados en el Saler (Valencia) entre las subespecies *C. aspera subsp. stenophylla* (Dufour) y *C. seridis subsp. maritima* (Dufour) Dostál.

Las diferencias morfológicas entre ambos taxones son patentes en campo. *C. aspera subsp. stenophylla* tiene las hojas finas, y posee un involucre estrecho, de 1 a 5 espinas en las brácteas involucrales. *C. seridis subsp. maritima* presenta hojas más suculentas y tomentosas y de 7 a 13 espinas en las brácteas del involucre. *C. seridis* presenta un fenotipo giga, en comparación con *C. aspera*, es decir que presenta un aumento de tamaño, seguramente causado por su condición de poliploide. El fenotipo “giga” es frecuente en poliploides de angiospermas.



Figura 2. Capítulo de *Centaurea seridis subsp. maritima* (Dufour) Dostál.



Figura 3. Capítulo de *Centaurea aspera subsp. stenophylla* (Dufour)

Centaurea aspera L. es alógama (Suárez, 2014), esto quiere decir que la planta depende de polinización cruzada y de polinizadores, necesita el polen de otras especies para poder dar lugar a nuevas especies. *Centaurea seridis* L. es autógama (González, 2014), es decir, que ellas mismas pueden polinizarse a sí mismas puesto que tiene tanto órganos masculinos como femeninos. Ambas especies han dado lugar a un híbrido estéril (Ferriol et al 2015) triploide, *C x subdecurrens*, en este caso el parental femenino *C. aspera* y *C. seridis* como parental masculino. El híbrido se distribuye en las zonas cercanas a los parentales (Garmendia et al., 2009).

En cuanto a la distribución, ambas se encuentran en el territorio levantino, *C. aspera subsp. stenophylla* está distribuida por el este de España y al sur de Portugal. Se encuentra en territorios del sur de Castellón, Valencia y Alicante, donde ocupa zonas dunares, no obstante, también se introduce unos 200 kilómetros al interior (Willkomm y Lange, 1870; Magallón, 1972; Tutin et al., 1976; Bolos & Vigo, 1995; Lagunas Lumbreras & Atienza Tamarit, 1998; Mateo & Crespo, 2009). *C. seridis subsp. maritima* se distribuye en zonas próximas a la costa, donde ocupa áreas de dunas o cantos rodados, está dispuesta desde Almería hasta el norte de Castellón.

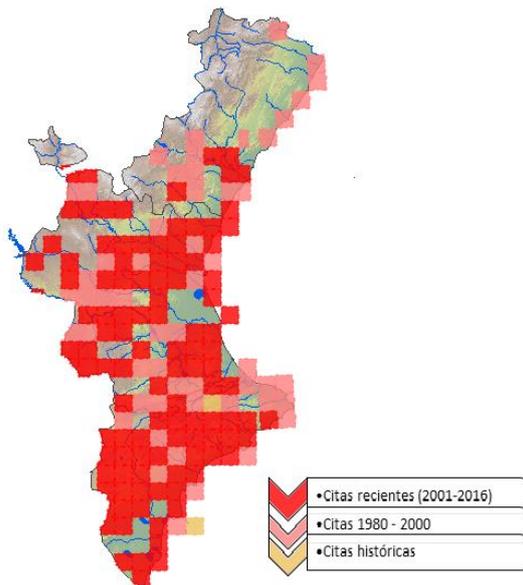


Figura 4. Mapa distribución *C. aspera* L.

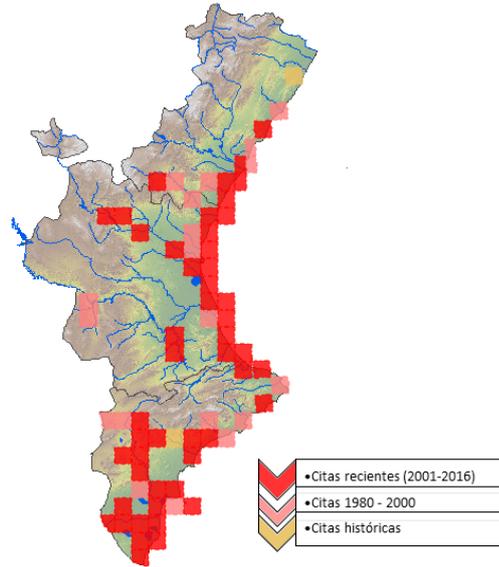


Figura 5. Mapa distribución *C. seridis* L.

Fuente: Conselleria de Medi Ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge, 1911-2016.

1.3. Evolución en el género *Centaurea*

La lucha por el espacio y los recursos genera competencia entre los individuos y las especies. La competencia conlleva la selección del fenotipo mejor adaptado, es decir, aquel con mayor probabilidad de sobrevivir y seguir reproduciéndose. Cuanta mayor sea la selección mayor será la adaptación al medio (Murray et al. 2006).

El género *Centaurea* posee una gran diversidad (Mateo & Crespo, 2009). La generación de esta diversidad está causada fundamentalmente por tres procesos:

La **disploidía** es el proceso de alteración en el número de cromosomas de una especie sin que existan variaciones en el contenido de ADN total. El género *Centaurea* muestra una disploidía compleja, desde $x=16$ a $x=7$ (Susanna et al., 1995; García-Jacas et al., 1996) y un incremento de la asimetría en el cariotipo (Fernández Casas & Fernández Morales, 1976; Siljak-Yakovlev, 1986). Generalmente, los números cromosómicos altos corresponden a secciones con tipos de polen primitivos, mientras que los más evolucionados poseen números más bajos.

La **hibridación**, es el proceso de cruce entre diferentes taxones, ya sea de forma natural o artificial, para dar lugar a descendencia híbrida. El género *Centaurea*, es una de las causas más conocidas ya que afecta a especies cercanas o de la misma sección (Mateo & Crespo, 2009). En las secciones *Seridia* y *Jacea*, la hibridación es uno de los factores principales de evolución dado que produce híbridos muy a menudo entre las distintas especies (García-Jacas et al., 2006; Ferriol et al., 2012). En las secciones situadas en el Mediterráneo oriental y occidental, *Seridia* y *Melanoloma*, la hibridación y la poliploidía predominan en las especies perennes, mientras que en las anuales muestran mayor disploidia y menor poliploidía e hibridación (Hellwig, 2004).

Por último, la **poliploidía**, es el proceso de multiplicación del número completo de cromosomas de una especie y puede producirse en células, tejidos u organismos. Para el género *Centaurea* la poliploidía es muy importante en la evolución de determinados taxones (Otto, 2007; Soltis & Soltis, 2009). Este éxito puede ser debido a la adquisición de ventajas evolutivas como fenotipos más grandes, o ventajas derivadas de una posible mayor diversidad genética (Soltis et al., 2004a, 2004b). Por otro lado, la poliploidía puede ser una forma de especiación simpátrica en angiospermas, ya que puede provocar aislamiento reproductivo inmediato (Coyne & Orr, 2004; Seo et al., 2010).

2. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar la viabilidad del polen de *Centaurea aspera* (2x) sobre las flores de *Centaurea seridis* (4x), y así analizar la posible formación de un híbrido triploide (3x) siendo *C. seridis* el parental femenino. En estudios previos se ha demostrado que *C. seridis* es autógama, por lo tanto, para evitar la competencia polínica será necesario emasculación las flores de *C. seridis*.

Para alcanzar el objetivo principal se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto de la técnica de emasculación. La emasculación en asteráceas resulta una técnica difícil debido al elevado número y densidad de flores en los capítulos y al reducido tamaño de la misma. Los capítulos de *C. seridis* además presentan una maduración progresiva de sus flores, siendo las flores exteriores las que primero maduran. Se probarán diferentes técnicas de emasculación y se evaluará su idoneidad.
- Realización de un ensayo de polinización forzada entre *C. seridis* y *C. aspera*. Para ello se utiliza un diseño experimental aleatorizado con los siguientes tratamientos: Tratamiento A (*C. seridis* emasculada y sin polinizar: para poder medir la eficiencia de la emasculación y las posibles contaminaciones). Tratamiento B (*C. seridis* emasculada y polinizada con polen de *C. seridis*). Tratamiento C (*C. seridis* emasculada y polinizada con polen de *C. aspera*).
- Evaluación de la descendencia: para ello se recolectarán los capítulos tratados y se contará el número de aquenios en cada capítulo. Además, se estudiará mediante citometría de flujo el nivel de ploidía de cada aquenio y se estudiará la germinación de los mismos.

3. Material y métodos

Los ensayos realizados para el presente trabajo se desarrollaron de forma conjunta y paralela a otros ensayos donde *C. aspera* era el parental femenino. De esta forma, en el trabajo de campo siempre había dos personas presentes, lo que facilitaba la aplicación de los tratamientos. En el siguiente apartado se expone la ejecución de los dos ensayos en paralelo: *C. aspera* como parental femenino, y *C. seridis* como parental femenino. Los resultados de ambos ensayos son analizados en dos trabajos independientes. Para la consecución de los objetivos del presente trabajo únicamente se analizaron los datos obtenidos de *C. seridis* como parental femenino.

3.1. Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental con 3 tratamientos sobre 2 taxones. Los tratamientos fueron: A (1): emascular y embolsar sin polinizar; B (2): emascular y polinizar con polen de la misma especie; C (3): emascular y polinizar con polen de la otra especie. Las especies seleccionadas fueron: *Centaurea seridis* y *Centaurea aspera*. Se realizaron 4 repeticiones del experimento (r1, r2, r3 y r4) (Figuras 6, 7, 8). En cada repetición se seleccionaron 6 capítulos por tratamiento y especie. Los capítulos fueron seleccionados aleatoriamente sobre varios individuos. De tal forma que en cada repetición se trató 18 (6x3) capítulos por especie y 36 (18x2) capítulos en total. En el total de las cuatro repeticiones se trataron 72 (18x4) capítulos por especie, y un total de 144 (72x2) capítulos en el conjunto de las repeticiones. El número de capítulos por tratamiento y especie fue de 24 (6 capítulos por 4 repeticiones), (Tabla 3).

Tabla 3. Número de capítulos por tratamiento y especie.

	A (1)	B (2)	C (3)	Total x repetición
<i>C. aspera</i> r1	6	6	6	18
<i>C. seridis</i> r1	6	6	6	18
<i>C. aspera</i> r2	6	6	6	18
<i>C. seridis</i> r2	6	6	6	18
<i>C. aspera</i> r3	6	6	6	18
<i>C. seridis</i> r3	6	6	6	18
<i>C. aspera</i> r4	6	6	6	18
<i>C. seridis</i> r4	6	6	6	18
Total x tratamiento <i>C. aspera</i>	24	24	24	72
Total x tratamiento <i>C. seridis</i>	24	24	24	72
Total ensayo				144



Figura 6. Localización en campo de las especies utilizadas en el experimento: *C. aspera* L. (rojo) y *C. seridis* L. (azul).



Figura 7. Localización de las distintas repeticiones realizadas en el ensayo: repetición 1 (rosa); repetición 2 (amarilla); repetición 3 (azul); repetición 4 (rojo).



Figura 8. Localización de los tratamientos llevados a cabo en campo sobre *C. seridis*: tratamiento A (rojo); tratamiento B (verde); tratamiento C (morado).

3.2. Zona de experimentación

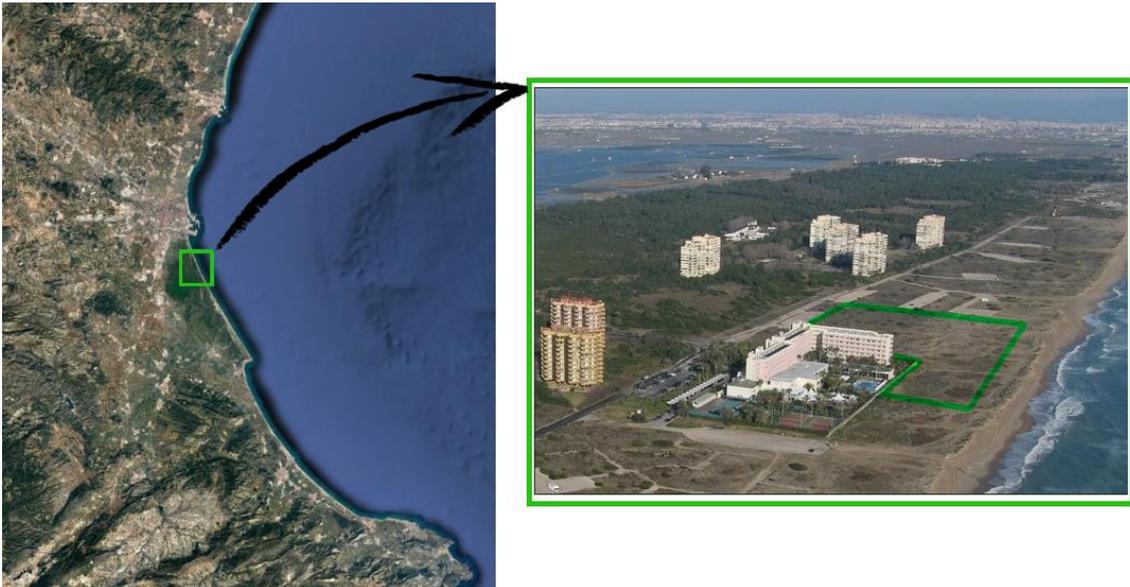


Figura 9. Localización del estudio. Foto global del Parque Natural de la Albufera y de la ciudad de Valencia (izquierda) y foto aérea de la zona donde se realizó el experimento (derecha).

El experimento se realizó en la zona de las dunas del Saler donde se encontraban ambas especies: *Centaurea aspera subsp. stenophylla* y *Centaurea seridis subsp. marítima*. También se encontró el híbrido *Centaurea x subdecurrens nothosubsp. subdecurrens*, aunque no se utilizó para el presente experimento puesto que es completamente estéril.

Las dunas se encuentran en el Parque Natural de la Albufera de Valencia, el hábitat tiene una amplitud de 1 a 1,5 kilómetros. Está enclavado en el piso termomediterráneo del sector Valenciano-Tarraconense de la provincia de vegetación Valenciano-Catalano-Provenzal-Balear (Rivas-Martínez, 1977), se fue formando por los materiales detríticos depositados por corrientes marinas y por los aportes de barrancos y ríos de la zona, que de este modo fueron cerrando casi por completo la Albufera (Costa y Mansanet, 1981).

En las siguientes figuras se observa tanto el estado actual como la reconstrucción de la vegetación natural primitiva de la Dehesa de Valencia.

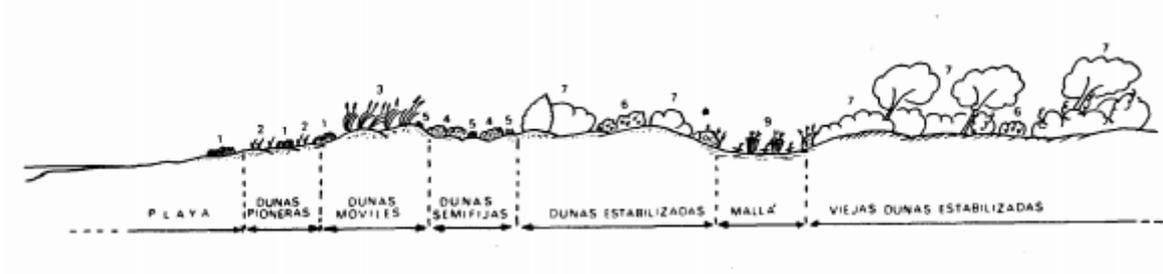


Figura 10. Reconstrucción de la vegetación natural primitiva de la Dehesa de Valencia.

En el complejo encontramos cinco subambientes diferenciados que se describirán en orden ascendente:

- Playa.
- Cordón de dunas delanteras: compuesto por las dunas pioneras y las móviles; la primera línea son las pioneras y las móviles es el hábitat óptimo para *C. seridis*.
- Sistema dunar estabilizado: constituido por dunas semifijas y estabilizadas, en esta zona conviven ambas especies, *C. aspera* y *C. seridis*.
- Malladas: saladares deprimidos que se inundan periódicamente.
- Dehesa: son las dunas ya estabilizadas más antiguas, en esta zona se desarrolla una vegetación que constituye el bosque litoral del mediterráneo occidental, esta zona es óptima para *C. aspera*.

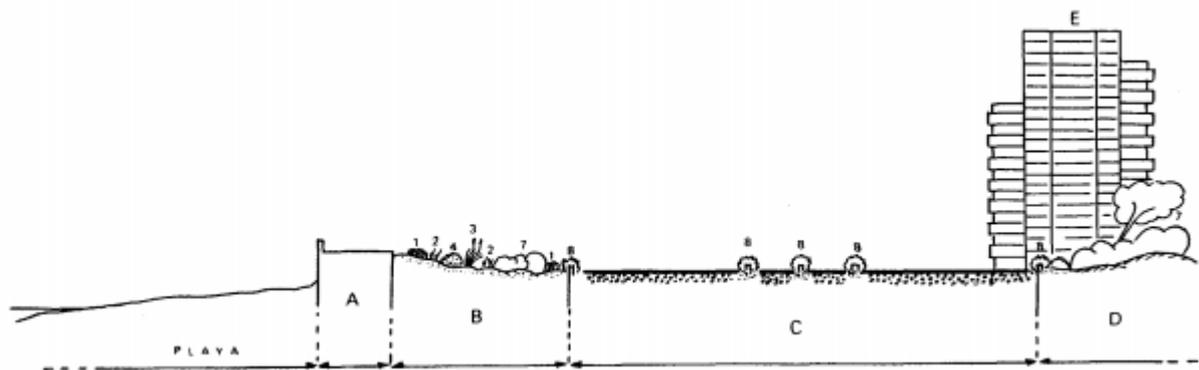


Figura 11. Estado actual de la vegetación en la Dehesa. A. paseo marítimo. B. Resto de dunas. C. Carreteras y aparcamientos. D. Sistema dunar estabilizado. E. Urbanizaciones.

La parcela donde se llevó a cabo el experimento tiene una extensión aproximada de 400 m² y se encuentra dentro de los límites del Parque Natural de la Albufera, por lo que se tuvieron que pedir los permisos necesarios a las administraciones competentes (Anejo 1).

3.3. Tratamientos

El tratamiento A consiste en emasculación y embolsar, este tratamiento también se denominó control ya que el número de aquenios previsto es de cero, debido a la ausencia de polen. Permitted evaluar el grado de contaminación causada por la manipulación al emasculación. En caso de obtener aquenios podrían ser debidos a contaminación polínica, o bien a una formación partenocarpia de los aquenios.

En el tratamiento B, se emasculación y se polinizará con polen de la misma especie, pero con capítulos de individuos diferentes al tratado, denominados “donantes machos”. Este tratamiento sirvió para evaluar la producción de aquenios teniendo en cuenta los daños que pueda provocar la técnica de emasculación sobre las flores. El resultado previsto es que el número de aquenios sea similar al de un capítulo no emasculación y en polinización abierta.

Y, por último, el tratamiento C, en el que se emasculará y se polinizará con polen de la otra especie, es decir, *C. aspera* con polen de *C. seridis* y, al contrario, se polinizará *C. seridis* emasculada y polinizada con polen de *C. aspera*. En este tratamiento lo que se pretende estudiar es la formación de híbridos.

3.4. Trabajo de campo

3.4.1. Emasculación

La técnica utilizada en el presente trabajo ha sido la emasculación. Esta técnica consiste en retirar las anteras con pinzas para posteriormente poder realizar el método de polinización forzada mediante frotación con un capítulo donante. La extracción de las anteras se debe realizar cuando el estado de la flor, tanto del androceo como del gineceo es aún inmaduro (Figura 12).

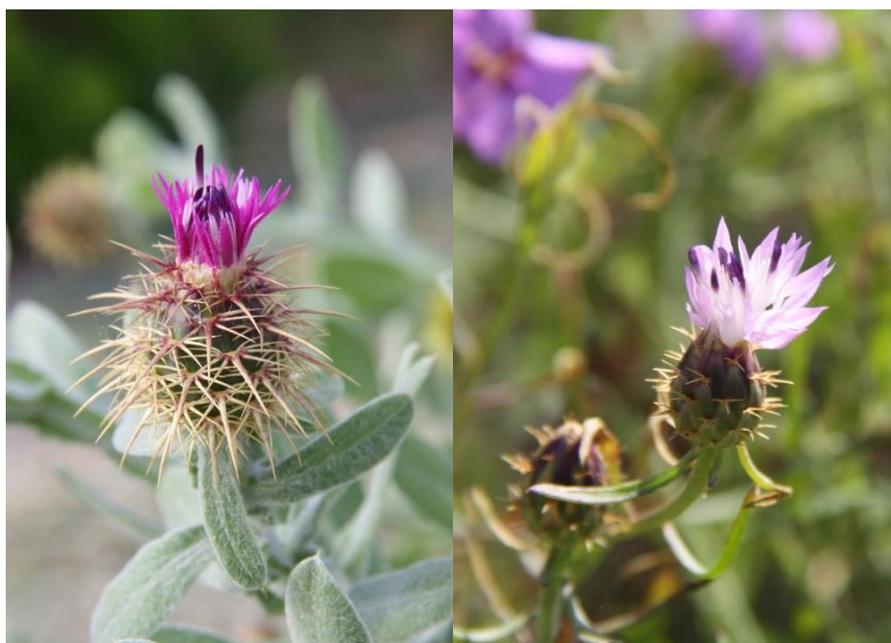


Figura 12. Estado óptimo para la realización de la emasculación en *C. seridis* L. (izquierda) y *C. aspera* L. (derecha).

Cabe destacar que la emasculación en asteráceas es una técnica compleja debido al elevado número y densidad de flores en los capítulos y al reducido tamaño de la misma. Los capítulos además presentan una maduración progresiva de las flores, siendo las flores exteriores las que primero maduran. Este fue el motivo por el cual se tuvo que repetir la técnica durante varios días.

En primer lugar, se eligieron los capítulos que presentan un estado de desarrollo correcto. El estado idóneo (Figura 12) es cuando apenas presentan algunas flores asomando y además las anteras de esas flores aún no están maduras. Posteriormente, con unas pinzas se retirarán las anteras de todas las flores que están en el momento de desarrollo adecuado y posteriormente, se embolsó el capítulo (Figuras 13; Figura 14). Al día siguiente se volvió sobre el mismo capítulo, se retiró la bolsa, y se emascularon las nuevas flores que maduraron durante las 24h, y se volvió a embolsar el capítulo. Se repitió esta operación al menos durante 5 días, hasta que dejaron de aparecer nuevas flores en el capítulo. En todo el experimento se emasculó un total de 4860 flores (Tabla 4). En las siguientes imágenes se muestra el proceso de emasculación en *C. aspera* y *C. seridis*.

Tabla 4. Total de flores emasculadas en ambas especies.

	Tratamiento A	Tratamiento B	Tratamiento C	Total
<i>C. aspera</i>	496	493	483	1473
<i>C. seridis</i>	1160	1117	1110	3387
Total	1656	1610	1593	4860



Figura 13. Técnica de emasculación en *C. aspera* L.



Figura 14. Técnica de emasculación en *C. seridis* L.



Figura 15. Muestra de dos capítulos de *C. aspera* L, uno emasculado (izquierda: solo rosa), y otro sin emasculado (derecha: rosa y violeta).



Figura 16. Material utilizado para emasculación y embolsar en el experimento.

3.4.2. Polinización

El método utilizado fue la polinización por frotación, en un trabajo previo se observó que esta técnica resultaba adecuada para estas especies (Castelló, 2014). La técnica consiste en frotar un capítulo sobre otro. De este modo entran en contacto las anteras y los estigmas.

En primer lugar, se recolectaron, al inicio de cada jornada, capítulos donantes mediante tijeras y se introdujeron dentro de botes (Figura 17) donde quedaron aislados de posibles contaminaciones. Para la extracción de los capítulos donantes se utilizaron pinzas.



Figura 17. Botes utilizados para almacenar los capítulos donantes.

Para la realización de la polinización se extrajo el capítulo del bote, y se destapó la bolsa que contenía el capítulo emasculado, esto solo se realizó en los tratamientos B y C, y se frotaron ambos durante unos segundos (Figura 19). Para la realización de la operación se tenía que actuar con rapidez para no causar contaminación en los capítulos. Una vez polinizado, el capítulo se volvía a embolsar, todas las bolsas utilizadas en el experimento estaban rotuladas con un código y localizadas mediante coordenadas GPS para su identificación (Figura 18).

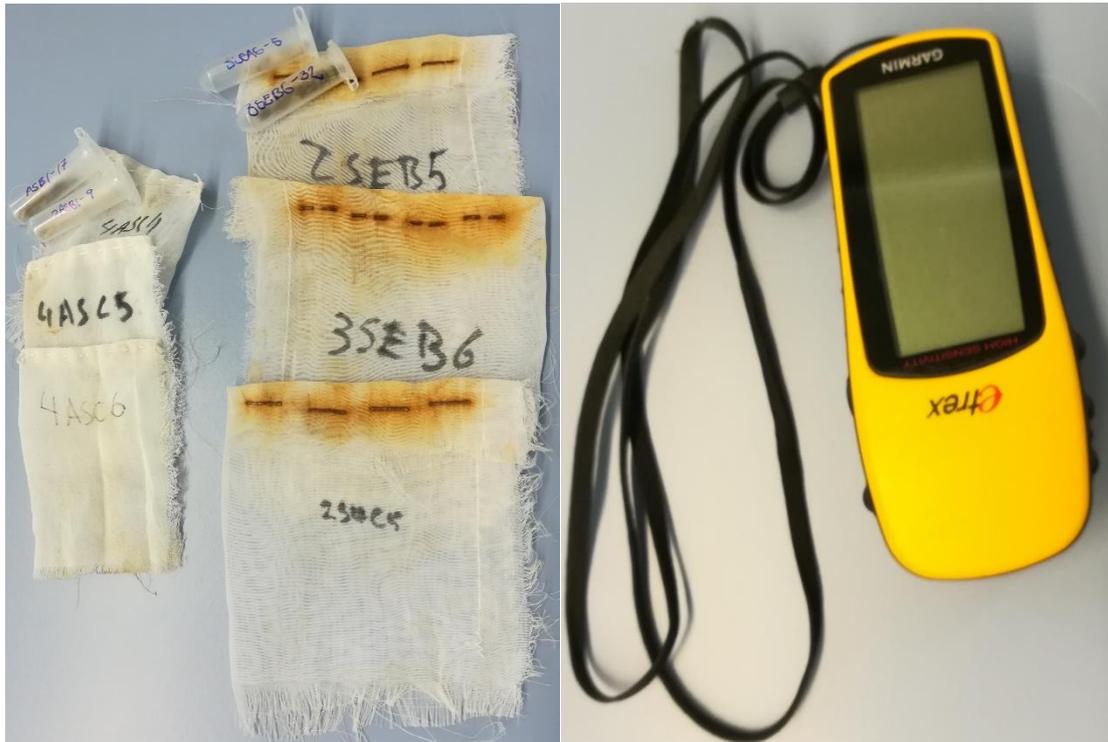


Figura 18. Rotulación del material empleado para la rotulación; GPS GARMIN utilizado para la localización de los individuos.



Figura 19. Polinización forzada en *C. aspera* L. con capítulo donante de *C. seridis* L.



Figura 20. Embolsamiento del capítulo polinizado (*C. aspera* L.).

3.4.3. Recolección de capítulos

Pasados aproximadamente 20 días desde que se comenzó a realizar el experimento se procedió a la recolección de las dos primeras repeticiones (31 de mayo), lo mismo se hizo con las siguientes repeticiones (7 de mayo). Para llevarlo a cabo se cortaron los capítulos, incluyendo la bolsa de tela y usando tijeras. Además, se comprobó en cada caso que ningún aquenio podría salirse de la bolsa (Figura 21).



Figura 21. Proceso de recolección de los individuos en campo.

Se debe destacar la importancia de determinar el momento óptimo de recogida de los capítulos puesto que si se recolectaban muy pronto se corría el riesgo de que los aquenios no estuvieran formados y por el contrario si se recogían demasiado tarde aumentaban las posibilidades de vandalismo. Como ya se ha dicho anteriormente en el apartado 3.2, el experimento se llevó a cabo en la zona de la playa del Saler, donde la afluencia de usuarios es alta.

3.4.4. Cronograma

El trabajo de campo se realizó según los siguientes cronogramas. En la figura 22, perteneciente a *C. seridis*, se observan las tres operaciones principales: emasculación (en azul); polinización controladas (en verde) y la recolección de aquenios (en rojo).

	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	08-may	09-may	10-may	11-may	12-may	13-may	14-may
1ª REP		EMASC	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	
2ª REP			EMASC	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	15-may	16-may	17-may	18-may	19-may	20-may	21-may
3ª REP	EMASC	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN		
4ª REP	EMASC	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	
			31-may				
1ª Y 2ª REP			RECOL				
			07-jun				
3ª Y 4ª REP			RECOL				

Figura 22. Cronograma del experimento perteneciente a *Centaurea seridis*.

En la siguiente figura se observa el cronograma relativo a *C. aspera*, el cual es similar al anterior, pero difiere en la duración de los pasos puesto que el ciclo de este taxón es menor.

	08-may	09-may	10-may	11-may	12-may
1ª REP		EMASC	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	
2ª REP			EMASC	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
	15-may	16-may	17-may	18-may	19-may
3ª REP	EMASC	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN
4ª REP	EMASC	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	EMASC/POLIN	
			31-may		
1ª Y 2ª REP			RECOL		
			07-jun		
3ª Y 4ª REP			RECOL		

Figura 23. Cronograma del experimento relativo a *Centaurea aspera*.

3.5. Trabajo de laboratorio

3.5.1. Conteo de aquenios

El recuento de aquenios se llevó a cabo en el laboratorio, la extracción se hizo sobre papel de fieltro mediante un corte basal en el involucre del capítulo hecho con un bisturí. Con unas pinzas se extrajeron todos los aquenios de los respectivos capítulos, y se conservaron en tubos Eppendorf de 1'5 ml rotulados con el código del individuo.

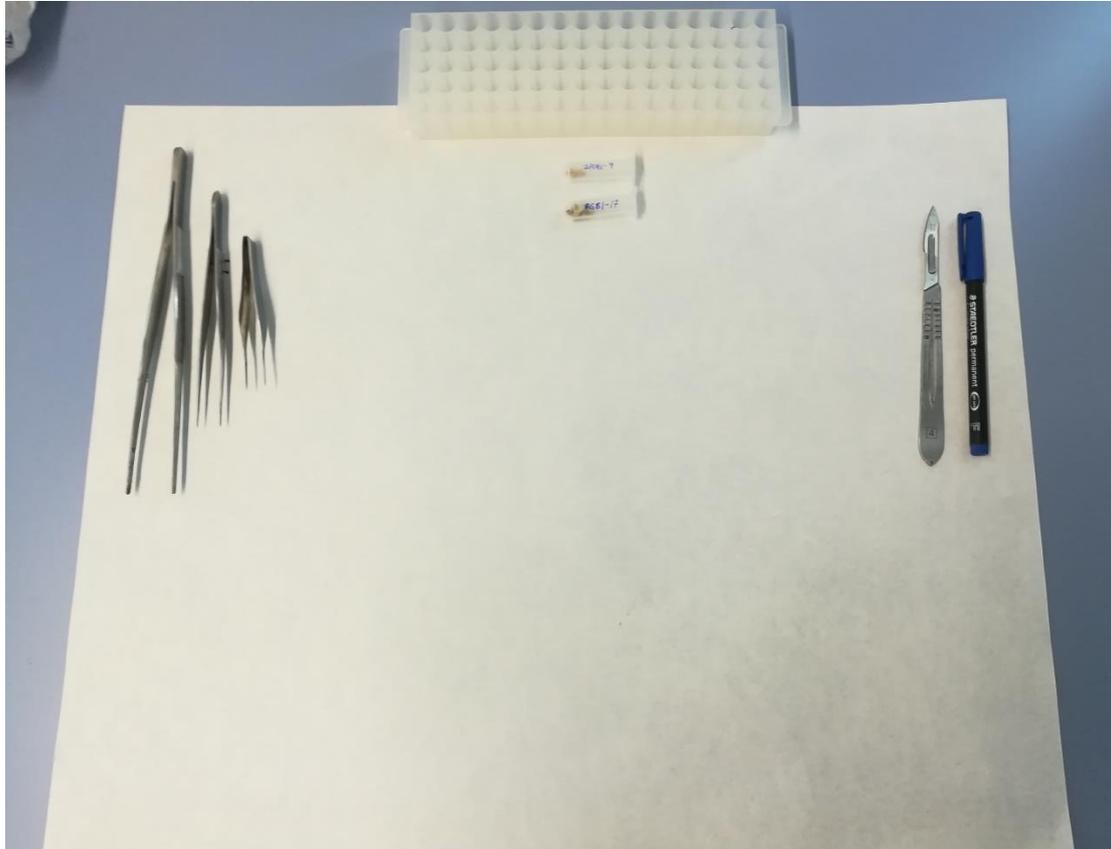


Figura 24. Material utilizado para la extracción y recuento de aquenios.



Figura 25. Extracción de los achenios en un capítulo de *C. seridis* L.

3.5.2. Citometrías

Para analizar el nivel de ploidía se utilizó la citometría de flujo. La técnica de análisis celular mide las características de dispersión de luz y fluorescencia que tienen las células cuando se les hace fluir por el interior del fino tubo cuando se cruzan con un láser.

Para llevar a cabo las mediciones, los achenios se tenían que hidratar durante 24h. Cuando los achenios estaban preparados se realizaba el corte para la extracción del cotiledón, el tamaño de este es aproximado a 1 mm (Figura 26). Con la muestra ya extraída se troceó muy fino junto con un fragmento de hoja control de ploidía conocida (*C. aspera* 2n), para trocear se utilizó una cuchilla y unas gotas de tampón de extracción de núcleos (High resolution DNA kit type P, solution A; Partec®).



Figura 26. Técnica utilizada para la extracción del cotiledón (técnica completa) (González, 2014).

Cuando ya se hubo troceado se añadió 1ml del tampón de extracción de núcleos, y se filtraron a través de una malla, a continuación, se añadió la quinta parte aproximada del volumen de muestra con 4-6-diamidino-2-fenil idol (DAPI) (High resolution DNA kit type P, solution B; Partec®).

Por último, se añadieron 2 ml, aproximadamente, de la solución final en un tubo y se procedió al análisis en el citómetro de flujo CyFlow® Ploidy Analyzer (Partec®) (Figura 27).



Figura 27. Preparación de la solución final listas para el análisis en el citómetro de flujo.

3.5.3. Germinaciones

Para la realización de las germinaciones en primer lugar se lavaron los aquenios con una proporción de 20 ml de agua de bucle con 1 ml de lejía, se dejaban reposar durante 5 minutos y se aclaraban con abundante agua de bucle y se volvían a dejar en reposo.

El siguiente paso fue la extracción del embrión, para ello se trabajó en campana de flujo laminar, esto requirió unas condiciones adecuadas de esterilidad, se limpió la bancada y el material utilizado con alcohol de 96°. También se colocó un papel estéril sobre la bancada de la cabina.

Para la extracción se utilizaron pinzas y bisturí, con esto se cortó la parte del aquenio que contiene los cotiledones. Cuando estos se extrajeron se colocaron en una placa Petri con 3 discos de papel y 6 ml de agua para su conservación (Figura 28).

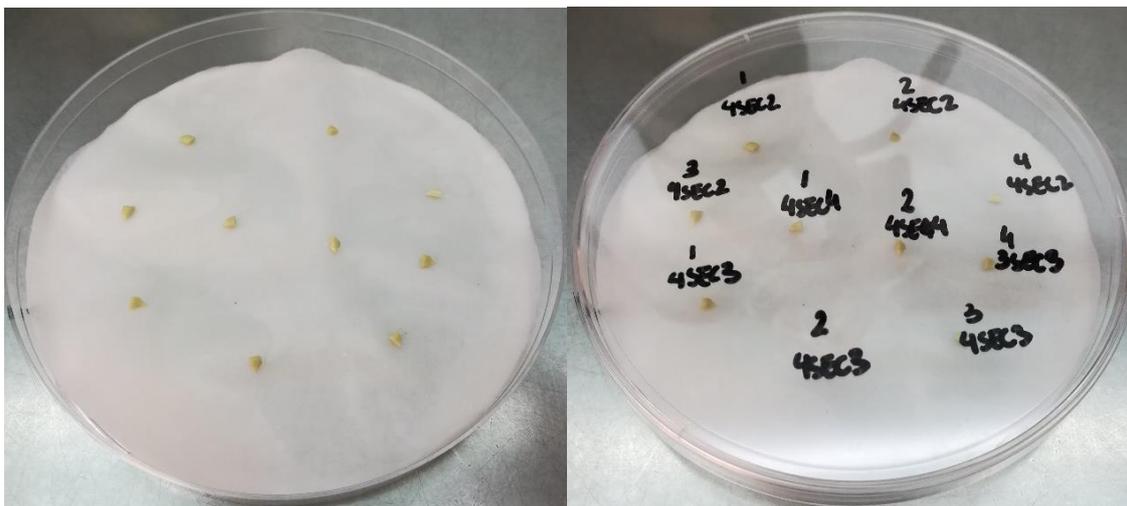


Figura 28. Colocación de los cotiledones en placas Petri para su germinación.

Para la germinación se evaluaron dos modalidades: la extracción completa del embrión, eliminando el pericarpio, y la extracción parcial, manteniendo el pericarpio. Se observó que la extracción completa da mejores resultados en el proceso de germinación, siendo del 100% la tasa de germinación al contrario que con la técnica parcial que se observaba la presencia de hongos.

Cabe destacar que las citometrías y las germinaciones se llevaron a cabo en los laboratorios del IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias), para mejorar y facilitar el trabajo. El número de muestras analizado tanto en el citómetro como en la germinación fue de 60 achenios.

3.6. Tratamiento estadístico de los datos

Para la realización de los análisis estadísticos de los datos se utilizó Statgraphics, que permite utilizar gran variedad de métodos estadísticos y gráficos.

3.6.1. Estadística descriptiva

La estadística descriptiva es el paso previo al análisis de los datos. Se calcularon estadísticos descriptivos de las medidas de tendencia central, como son la media y desviación estándar, y medidas de variabilidad, como varianza y error estándar.

3.6.2. Análisis de los datos

Para analizar los datos, en primer lugar, se realizó un estudio de la normalidad. La normalidad permite saber si se puede utilizar ANOVAS para la comparación de las medidas, o, en caso contrario, usar test Kruskal-Wallis. Mediante el ANOVA se medirá si los datos aportan variabilidad, de ese modo se estudiará que variable es significativa de acuerdo con la variabilidad que aporta al factor, si aporta variabilidad quiere decir que es significativa. En cuanto al test Kruskal-Wallis, es un método no paramétrico, que se utiliza cuando los datos no se distribuyen como una normal, ambos parámetros usan el p-valor, que mide la significación.

4. Resultados y discusión

4.1. Ensayos previos

En el mes de febrero se realizó un ensayo preliminar para evaluar la eficacia e idoneidad de diferentes métodos de emasculación en *Centaurea seridis*, y así, realizar una puesta a punto para el ensayo final. De este modo, se pretendía familiarizar al equipo con la metodología y los materiales que posteriormente se aplicarían en el ensayo definitivo.

Para conocer la viabilidad de la emasculación se estudiaron ciertos parámetros de manipulación como son los siguientes:

- Corte temprano en la parte apical del capítulo para facilitar el acceso a las flores (Figura 29). Se realizó el corte en 25 capítulos, de los cuales 15 de ellos se embolsaron para evitar contaminaciones. Los otros 10, permanecieron sin embolsar, para comprobar si las bolsas afectaban el crecimiento de las flores.
- Número de veces consecutivas que se debían realizar la emasculación ya que, la maduración de las flores no es sincrónica en el tiempo.
- Posible eliminación de las flores demasiado maduras o inmaduras en el momento de emasculación.

Como resultado del estudio de los parámetros de manipulación se llegó a las siguientes conclusiones: (i) respecto al corte apical, se pudo observar que los primeros días todo funcionaba correctamente e incluso se encontraron capítulos listos para emasculación. Los siguientes días se comenzó a ver que se producía un aborto completo del capítulo por parte de las plantas; (ii) para la realización de la emasculación se observó que las flores maduraban durante varios días consecutivos; (iii) en cuanto a la eliminación de las flores demasiado maduras o inmaduras, se decidió dejar las flores perimetrales por ser estériles y seleccionar los capítulos en un estado óptimo.

Se debe tener en cuenta para futuros ensayos, la realización de un ensayo preliminar más extenso donde el equipo se adapte a la técnica y pueda tener más práctica para el ensayo final. De ese modo se podrían reducir las contaminaciones durante la realización del ensayo definitivo.



Figura 29. Corte temprano en la parte apical del capítulo.

4.2. Evaluación de la descendencia

Tras la aplicación de los tratamientos, y después de 15 días de maduración de los achenios en campo (Figura 22), se procedió a la recolección de los capítulos tratados. Se contó el número de achenios en cada capítulo, realizando una anotación detallada del código de cada capítulo y el número de achenios correspondiente (Anejo 4). Posteriormente se analizó el nivel de ploidía de la descendencia del cruce *C. seridis* parental femenino x *C. aspera* parental masculino, ya que es en este cruce donde se podrían producir individuos triploides (híbridos) o tetraploides (debidos a contaminación polínica en la manipulación).

La tabla 5 recoge el número de achenios por tratamiento y repetición. Comparando los tratamientos se observa que el tratamiento B tiene mayor número de achenios que el resto de tratamientos. El tratamiento B corresponde al cruce de *C. seridis* parental femenino x *C. seridis* parental masculino, por lo tanto, emula el proceso de polinización abierta donde únicamente se han emasculado las flores, pero luego se ha vuelto a añadir polen de la propia especie. Comparando estos resultados con capítulos recolectados en polinización abierta se observa que el tratamiento B se aproxima a los procesos naturales de la especie. Se recolectaron 18 capítulos en polinización abierta, sobre los cuales no se había realizado ningún tratamiento, y el recuento total de achenios fue de 270. Es decir, se obtuvo una media de 15 achenios por capítulo (270/18). En el tratamiento B la media fue de 7,5 (180/24).

En cuanto a las repeticiones (Tabla 5), el recuento de achenios es menor en la 3 repetición, mientras que en la 4 repetición encontramos el mayor número de achenios. Este mayor número de achenios en la repetición 4, pudo ser debido a la localización de esta repetición. En este caso, los individuos se encontraban cerca de un muro orientado al SE, característica que acentuaba las condiciones de termicidad. Esta mayor temperatura provocaba una maduración más rápida de las flores del capítulo, de tal forma que muchas veces al realiza las re-emasculaciones en los días consecutivos, algunas flores ya se

encontraban excesivamente maduras liberando polen fértil. Al ser *C. seridis* autógama, este polen fértil pudo haber contaminado flores del propio capítulo aumentando así la formación total de aquenios.

La repetición 3 se ubicó sobre las dunas sin infraestructuras cercanas (Figura 7). El menor número de aquenios en esta repetición pudo ser debido a una menor tasa de contaminación por autogámia motivada por un elevado dominio de la técnica de emasculación, en este caso se contaba con la práctica de la repetición 1 y 2, junto con una localización neutra de los individuos.

Tabla 5. Total de aquenios recontados en *C. seridis* L.

	1ªRepetición	2ªRepetición	3ªRepetición	4ªRepetición	Total
Tratamiento A	127	124	12	170	433
Tratamiento B	190	180	158	202	730
Tratamiento C	167	142	33	156	498
Total	484	446	203	528	1661

Las citometrías que se llevaron a cabo en el IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias). Se realizó la citometría de un total de 60 aquenios, todos ellos pertenecientes al tratamiento C (*C. seridis* femenino x *C. aspera* masculino). Todos los aquenios analizados mediante citometría de flujo resultaron ser tetraploides (4x) (Anejo 5).

Se evaluó la germinación de todos los individuos sobre los que se había analizado la ploidía. Utilizando la metodología descrita (Apartado 3.5.3) el 100% de los individuos germinaron al día siguiente.

4.3. Comparación de los tratamientos: viabilidad del polen de *Centaurea aspera* L. (2x) sobre las flores de *Centaurea seridis* L. (4x)

4.3.1. Comparación global entre tratamientos

A continuación, se muestra la distribución de los datos por tratamientos (Figura 30, 31, 32). Para ello se utiliza un histograma de frecuencias donde el eje “x” representa el número de aquenios y el eje “y” representa el número de capítulos que contienen ese determinado número de aquenios. La línea roja representa la hipotética distribución normal de los datos. Además, se calcula el test de normalidad Shapiro-Wilk y su p-valor para analizar como encajan los datos de una distribución normal. Si el p-valor el test es inferior a 0,05 se considera que los datos NO siguen una distribución normal.

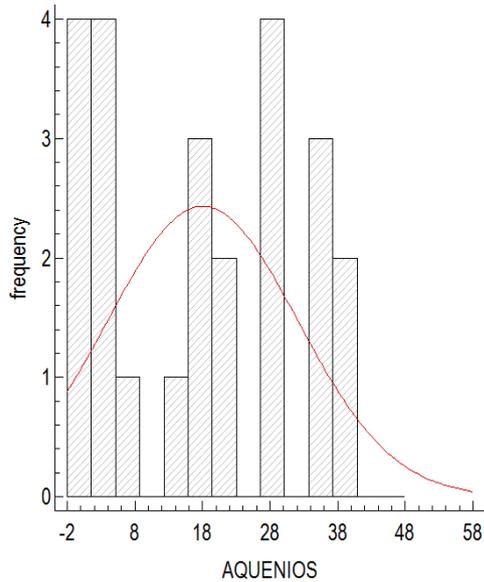


Figura 30. Distribución de los datos en el **tratamiento A**: emasculación sin polinización. Shapiro-W=0,901; p-valor= 0,022. Los datos **NO presentan** una distribución normal.

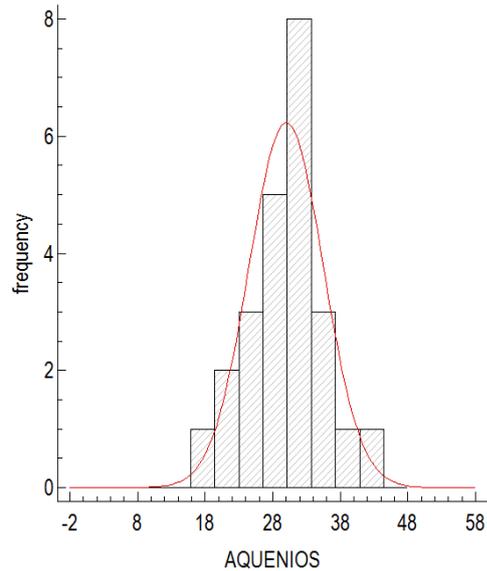


Figura 31. Distribución de los datos en el **tratamiento B**: emasculación y polinización con polen de *C. seridis*. Shapiro-W=0,969; p-valor= 0,642. Los datos **presentan** una distribución normal.

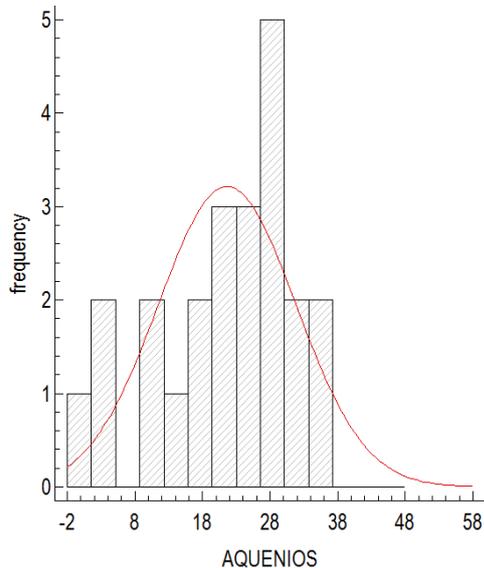


Figura 32. Distribución de los datos en el **tratamiento C**: emasculación y polinización con polen de *C. aspera*. Shapiro-W=0,932; p-valor= 0,121. Los datos **presentan** una distribución normal.

Los tratamientos B y C presentan una distribución normal de los datos, mientras que el tratamiento A no presenta una distribución normal de los datos debido al elevado número de capítulos con cero aquenios. Por ello, para la comparación de las medias vamos a

utilizar el test Kruskal- Wallis indicado cuando comparamos medias que provienen de grupos de datos con distribución No normal.

Cuando se comparan las medidas (Figura 33) observamos que hay diferencias significativas entre el tratamiento B (polen de *C. seridis*) y los tratamientos A y C (A: sin polen y C: polen de *C. aspera*). (p-valor=0,0024 del test Kruskal – W).

Centaurea seridis emasculada y polinizada con polen de *C. seridis* (tratamiento B) produce significativamente más aquenios ($30 \pm 5,48$) que *C. seridis* emasculada sin polen ($18 \pm 14,06$) y que *C. seridis* con polen de *C. aspera* ($21,6 \pm 10,19$) (Tabla 6). En general, en el tratamiento A y en el tratamiento C se produce una reducción del 40 y el 28% del número de aquenios respectivamente.

Cabe destacar que el número de aquenios esperado en el tratamiento A es de cero, ya que se emascula y luego no se poliniza. Por lo tanto, los aquenios obtenidos en este tratamiento se deben a procesos de contaminación durante las manipulaciones. Al ser *C. seridis* autógama, poseer tantas flores por capítulo y de tamaño tan reducido, es prácticamente imposible evitar en algunos capítulos contaminación con polen del propio capítulo. De igual forma, el número de aquenios esperado en el tratamiento C, con polen de *C. aspera*, es reducido y además estos deberían ser triploides. Todos los aquenios de este tratamiento C están analizados mediante citometría de flujo y han resultado ser tetraploides (Apartado 4.2) lo que indica que los aquenios encontrados en los capítulos de este tratamiento también son debidos a procesos de contaminación.

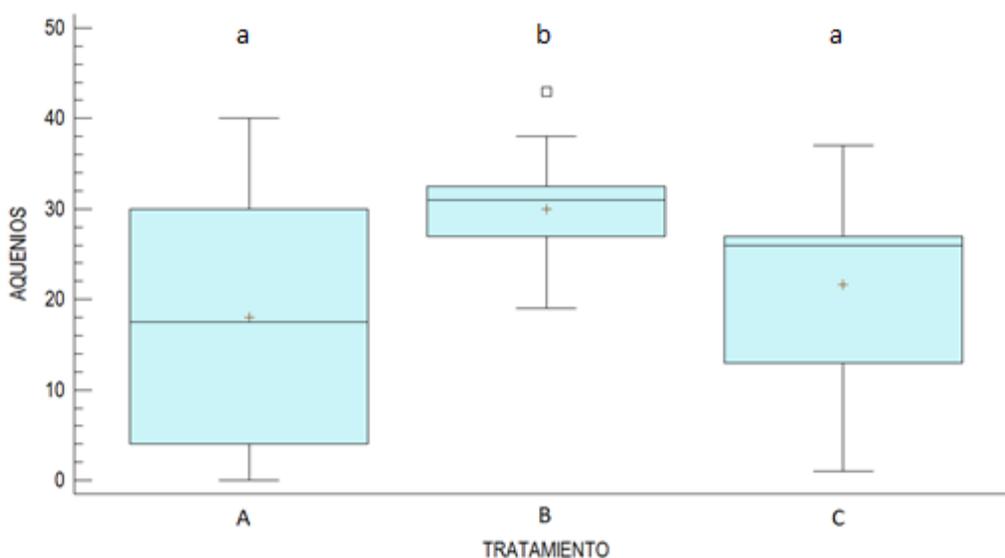


Figura 33. Gráfico de cajas y bigotes del número de aquenios por tratamientos. La línea central representa la mediana, el punto “+” representa la media, las cajas muestran los percentiles 25 y 75. Las letras “a” y “b” muestran los grupos homogéneos.

Con independencia de la comparación de las medias entre tratamientos, en este caso la distribución de los datos aporta mucha información (Figura 33). Si se observa el tratamiento B, los datos son más compactos, es decir muestran menos variabilidad: todos los capítulos generan un elevado número de aquenios. Mientras que en el tratamiento A y C los datos presentan una mayor dispersión. Observando los máximos y los mínimos

(Tabla 6) el tratamiento B tiene una mínima producción de 19 aquenios por capítulo. Mientras que los tratamientos A y C tienen varios capítulos con cero aquenios.

Tabla 6. Estadística descriptiva para los tratamientos en *C. seridis*.

	Datos	Media	Desviación Estándar	Coefficiente variación	Mínimo	Máximo	Rango	Coefficiente skewness	Coefficiente kurtosis
Tratamiento A	24	18,04	14,06	77,93%	0,00	40,00	40,00	0,12	-1,54
Tratamiento B	24	30,00	5,49	18,28%	19,00	43,00	24,00	-0,04	0,61
Tratamiento C	24	20,75	10,89	52,52%	0,00	37,00	37,00	-1,17	-0,56
Total	72	22,93	11,78	51,38%	0,00	43,00	43,00	-2,34	-1,05

En los tratamientos A y C debido a la manipulación, algunos capítulos están contaminados con polen del propio capítulo, aquellos que presentan un elevado número de aquenios, mientras que otros no se han contaminado, los que presentan cero o un número reducido de aquenios. Este hecho, es el que provoca la amplia dispersión en los datos de estos tratamientos. Por lo tanto, según cómo se manipule el capítulo se está contaminando o no. Este resultado pone de manifiesto que el proceso de emasculación en asteráceas autógamas es un proceso muy sensible, que se pueden contaminar con facilidad, pero que, en un determinado porcentaje de capítulos, sí que es posible evitar la autofecundación.

Estos resultados invitan a un análisis capítulo por capítulo. Los capítulos del tratamiento C (*C. seridis* con polen de *C. aspera*) que han producido pocos aquenios 0,1,2,3 y que se les ha frotado con polen de *C. aspera*, debería, si hay compatibilidad reproductiva, haber producido híbridos triploides 3x, ya que había en esos capítulos muchas flores emasculadas y disponibles para ello. Si no se han producido triploides en esos capítulos, tal y como se ha comprobado en el análisis de la descendencia, es seguramente porque no hay compatibilidad reproductiva.

4.3.2. Comparación entre repeticiones

Si se analiza el efecto de las repeticiones sobre el número de aquenios dentro de cada tratamiento, se observa que en el tratamiento A, *C. seridis* emasculada y sin polinizar, la repetición que menos se ha contaminado es la repetición 3 (Figura 34). El análisis de varianza muestra diferencias significativas entre la repetición 3 y el resto de repeticiones (p-valor: 0,0026).

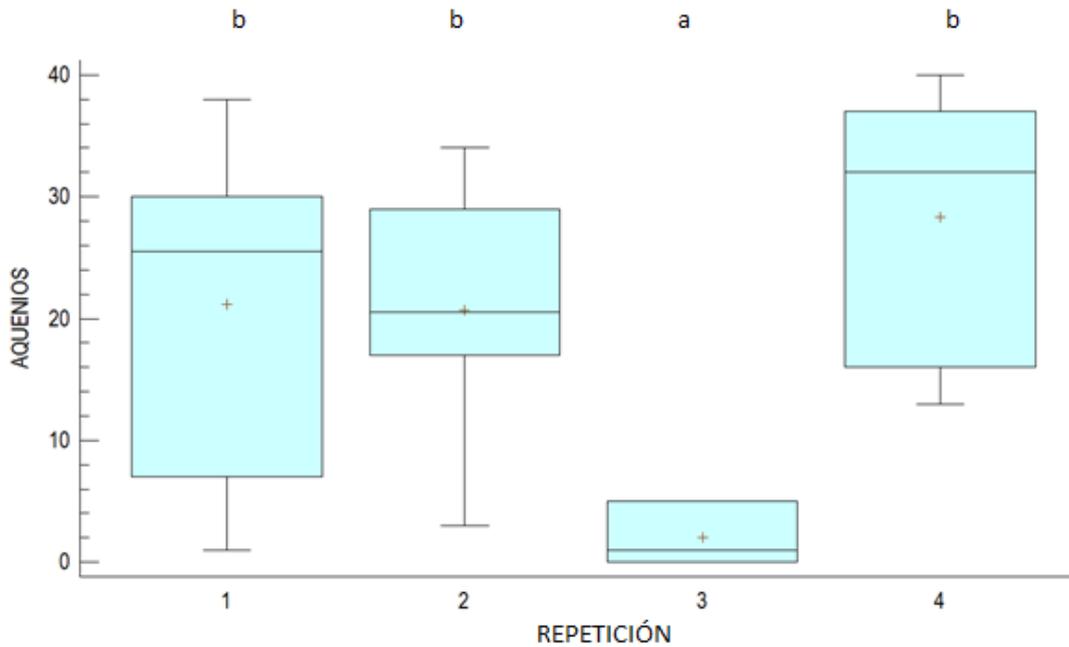


Figura 34. Gráfico de cajas y bigotes del número de aquenios por repetición en el tratamiento A.

Lo mismo ocurre en el tratamiento C donde la repetición 3 vuelve a ser la que menos aquenios produce y por lo tanto la menos contaminada (Figura 35). El análisis de la varianza establece que hay diferencias significativas entre la repetición 3 y el resto de repeticiones (p-valor: 0,0001).

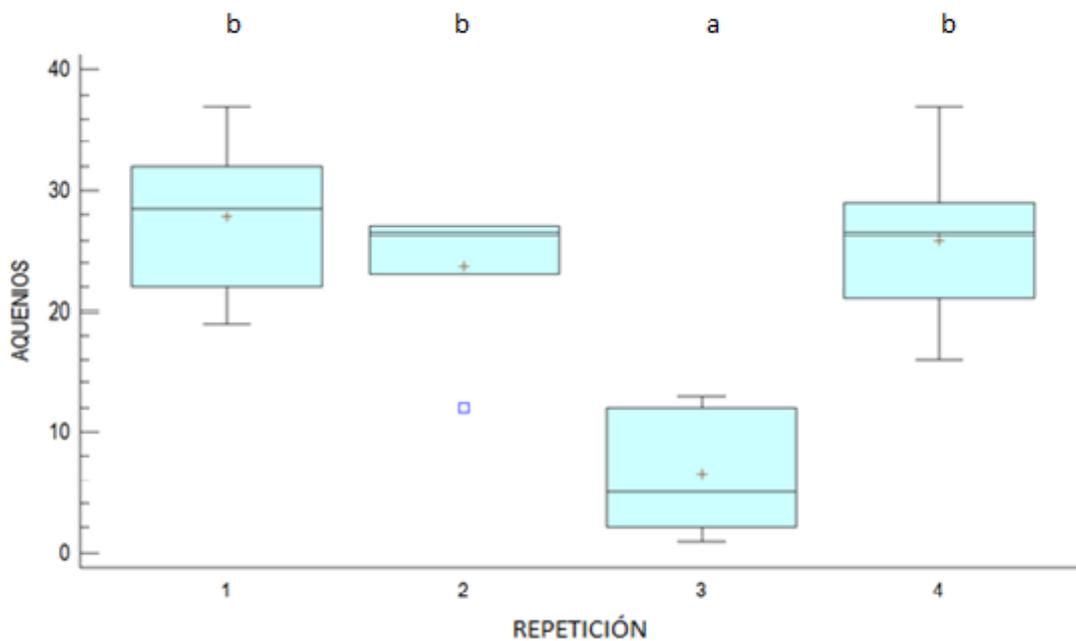


Figura 35. Gráfico de cajas y bigotes del número de aquenios por repetición en el tratamiento C.

Sin embargo, en el tratamiento B no encontramos diferencias significativas entre las repeticiones (Figura 36, p-valor: 0,1452). Este resultado es coherente ya que en este tratamiento después de emascularse se ha vuelto a polinizar con polen de *C. seridis*, por lo

tanto, el número de aquenios producidos siempre es elevado con independencia de la repetición.

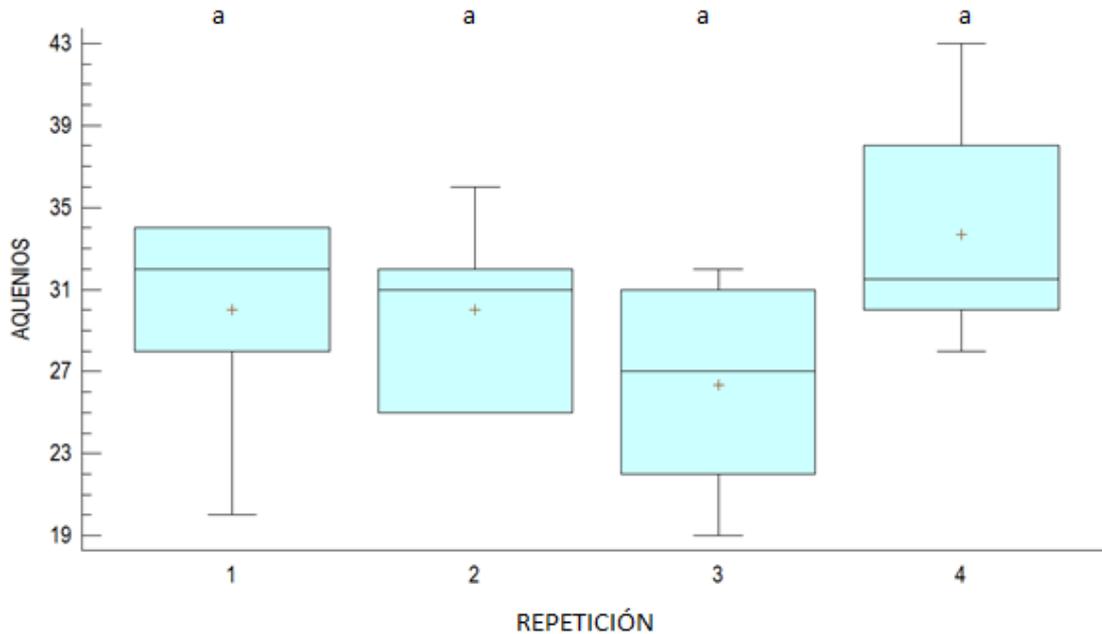


Figura 36. Gráfico de cajas y bigotes del número de aquenios por repetición en el tratamiento B.

4.3.3. Comparación de los tratamientos en la repetición 3

Tal y como se desprende del análisis del número de aquenios en las repeticiones, la repetición 3 es la que mejor resultados ha dado. Si se analizan las diferencias entre los tratamientos dentro de la repetición 3, el análisis de la varianza muestra diferencias significativas entre el tratamiento B y los tratamientos A y C (Figura 37; p-valor: 0,000001).

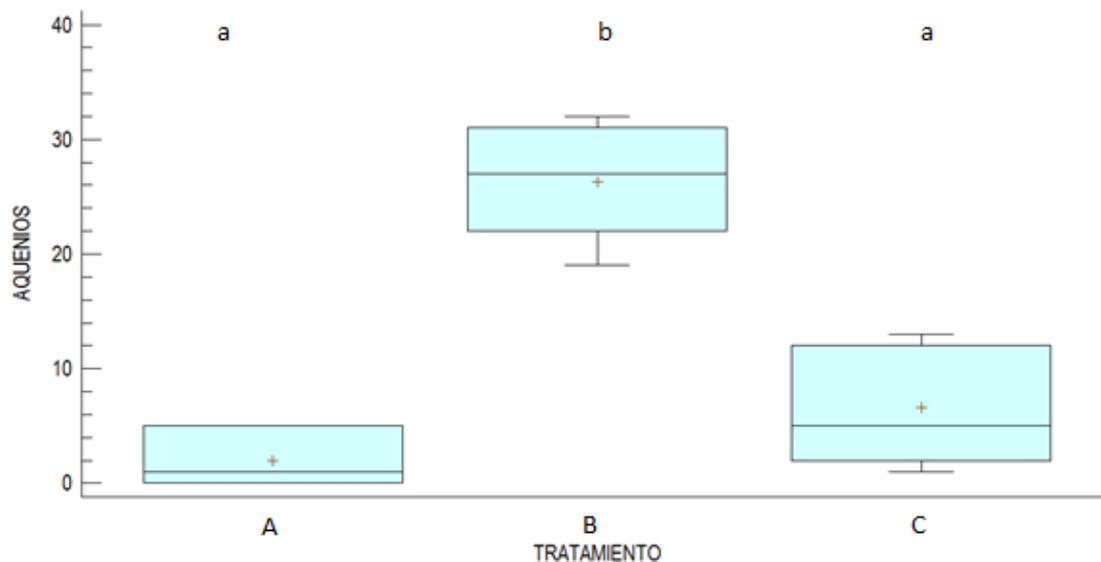


Figura 37. Gráfico de cajas y bigotes del número de aquenios por tratamiento en la repetición 3.

En la figura 37 se observa que el tratamiento A, sin polinizar, es el que menor número de aquenios produce ($2 \pm 1,84$). Estos aquenios representan el porcentaje mínimo de

contaminación. En este tratamiento hay un gran número de capítulos con 0 aquenios, por lo tanto, sin contaminar. Se produce un incremento del número de aquenios entre el tratamiento A y C (aumenta de $2 \pm 1,84$ a $6,6 \pm 2,01$). Este incremento se podría deber a la producción de híbridos triploides si estos hubiesen resultado $3x$, pero como en el análisis de ploidía ha resultado todo tetraploides $4x$, este incremento es debido a un incremento de la contaminación debido al proceso de frotación. El tratamiento B siempre se mantiene con una producción elevada de aquenios.

5. Conclusiones

En primer lugar, en el ensayo preliminar se observó que la realización del corte apical provocó el aborto de los capítulos. Se estableció que uno de los parámetros claves para la emasculación era la correcta elección del momento de maduración del capítulo y emasculación en varios días consecutivos.

Toda la descendencia analizada ha resultado tetraploide ($4x$). Todos los aquenios prehidratados y puesto a germinar, germinaron al siguiente día de su colocación.

El proceso de emasculación en asteráceas autógamas es extremadamente sensible a las contaminaciones, aun así, es posible disminuir la contaminación considerablemente y esta contaminación puede ser cuantificada.

La repetición con menor problemas de contaminación ha sido la repetición 3.

En la repetición 3 y el tratamiento C se tienen varios capítulos con un bajo número de aquenios (2,5,1). Es de suponer que en estos capítulos habían “flores disponibles” para que el polen de *C. aspera* hubiese fecundado alguna flor y formado triploides ($3x$). Por lo tanto, se confirma que el polen de *Centaurea aspera* no es capaz de fecundar a *Centaurea seridis*, de este modo no es capaz de formar híbridos.

6. Bibliografía

Aleza, P., Juárez, J., Cuenca, J., Ollitrault, P., Navarro, L. 2012. Extensive citrus triploid hybrid production by $2x \times 4x$ sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Reports* 31(9): 1723-1735.

Arnaiz, R.S. 1987. Flora de Almería: plantas vasculares de la provincia. Instituto de Estudios Almerienses.

Babcock, E., Stebbins J.R., G.L. 1938. The American species of *Crepis*: their interrelationships and distribution as affected by polyploidy and apomixis. Carnegie Institution Washington Publication Number 504.

Bolòs, O., Vigo, J. 1984. Flora dels països catalans. Editor. Barcino Barc. 2002.

Bolòs, O., Vigo, J. 1995. *Centaurea* L. Flora Països Catalans 3, 912–945.

Costa, M., Mansanet, J. 1981. Los ecosistemas dunares levantinos: La Dehesa de la Albufera de Valencia. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 37 (2): 277-299.

- Coyne J. A., Orr H. A.** 2004. Speciation. Sunderland: *Sinauer Associates*.
- DeWet, J.M., Timothy, D.H., Hilu, K.W., Fletcher. G.B.** 1981. Systematics of South American Tripsacum (*Gramineae*). *Am. J Bot.* 68. 269-276.
- Fernández Casas, F.J., Fernández Morales, M.J.** 1979. *Centaurea lainzii*, un triploide natural. *Mémoires de la Société Botanique de Genève* 1: 115-122.
- Ferriol M., Garmendia A., Ruiz, J.J., Merle, H., Boira, H.** 2012. Morphological and molecular analysis of natural hybrids between the diploid *Centaurea aspera* L. and the tetraploid *C. seridis* L. (Compositae). *Plant Biosystems* 146: 86-100.
- García-Jacas, N., Susanna, A., Ilarsan, R.** 1996. *Aneuploidy in the Centaureinae (Compositae): is n=7 the end of the series?* *Taxon*, Vol. 45 1: 39-42.
- García-Jacas, N., Uysal, T., Romaschenko, K., Suárez-Santiago, V.N., Ertuğrul, K., Susanna, A.** 2006. *Centaurea* revisited: a molecular survey of the Jacea group. *Annals of Botany* (London) 98: 741-753.
- García-Jacas, N., Soltis, P.S., Font, M., Soltis, D.E., Vilatersana, R., Susanna, A.** 2009. The polyploid series of *Centaurea toletana*: Glacial migrations and introgression revealed by nrDNA and cpDNA sequence analyzes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 377–394.
- Garmendia, A., Merle, H., Ferriol, M.** 2009. *Diversity generation in Centaurea: a new Seridia hybrid and polyploid complex.* 45 International Congress of SISV & FIP. Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Area: species, communities and landscape level. Cagliari, Cerdeña. 22 a 29 de junio de 2009. Book of Abstracts: 71.
- Gil, F.T.M.** 1999. Notas sobre la flora vascular endémica de Sax (Alicante). *Blancoana* 16, 3–21.
- González, A.** 2014. Nivel de ploidía y viabilidad de la descendencia del tetraploide *Centaurea seridis* y el diploide *C. aspera* y los cruces entre ambos. Trabajo final de Grado. Grado en ingeniería forestal y del medio natural. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Valencia.
- Hellwig, F. H.** 2004. *Centaureinae (Asteraceae) in the Mediterranean-History of ecogeographical radiation.* *Plant Systematics and Evolution* 246: 137-162.
- Iwasaki, T.** 1943. On the big leaf and small leaf strain of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). *Journal of the Horticultural Association of Japan* 14: 302-305.
- Krug, C.** 1943. Chromosome number in the subfamily *Aurantioideae* with special reference to the genus *Citrus*. *Botanical Gazette* 104: 602-611.
- Laguna Lumbreras, E., Atienza Tamarit, V.** 1998. Flora endémica, rara o amenazada de la Comunidad Valenciana. Generalitat Valenciana, Conselleria de Medio Ambiente.
- Lapin, W.K.** 1937. Investigation on polyploidy in *Citrus*. *USSR All Union Scientific Research Institute* 1(4): 1-68.

Longley, A.E. 1925. Polycarpy, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 15: 347-357.

Magallón, A.R. 1972. Flora y vegetación de la provincia de Alicante (el paisaje vegetal alicantino). Alicante Inst Estud Alicant. Xx 403p Illus. Coloured Illus. Map Geog 1.

Mateo, G., Crespo, M. 2009. Sobre algunos híbridos ibéricos del genero *Centaurea* L. (Compositae). *Flora Montiberica* 41: 28-34.

Murray, W., González, P., García, M., Moreno, J.C. *Introducción a la Botánica*. Pearson Education, cop. 2006. Madrid.

Otto, S.P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*. 131, 452-462.

Scott, R.W. 1990. The genera of Cardueae (Compositae; Asteraceae) in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 71: 391-451

Seo, M.N., Sanso, A.M., Xifreda, C.C. 2010. Chromosome numbers and meiotic behaviour in South American species of *Hybanthus* Jacq. and *Anchietea* A. St.-Hil. (Violaceae). *Plant Biosyst* 144 (2): 340-347.

Siljak-Yakovlev, S. 1986. *Étude cytogenétique et palynologique de Compositae endemiques ou reliques de la flore Yugoslave*. Thèse Doctorale, Université de Paris-Sud (Centre d'Orsay), Paris.

Soltis, D.E., Soltis, P.S., Pires, J.C., Kovarik, A., Tate, J.A., Mavrodiev, E. 2004a. Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 485-501.

Soltis, D.E., Soltis, P.S., Tate, J.A. 2004b. Advances in the study of polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 485-501.

Soltis, D.E., Soltis, P.S. 2009. The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology*. 60: 561-588.

Suárez, A. 2014. *Estudio del grado de autogamia / alogamia de los taxones, Centaurea aspera (2n), C. seridis (4n), y sus híbridos (3n), en el ecosistema dunar de la Devesa de El Saler*. Trabajo final de Carrera. Ingeniería de Montes. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.

Susanna, A., García-Jacas, N., Soltis, D.E., Soltis, P.S. 1995. Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences. *American Journal of Botany* 82: 1056-1068.

Susanna, A., García-Jacas, N. 2007. Tribe Cardueae. In: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (eds.), *The families and genera of vascular plants*, 123-147. Springer. Berlin, Heildeberg & New York

Trabaud, L., Sánchez, J.M., Ferrandis, P., González-Ochoa, A.I., Herranz, J.M.,1980. TG Tutin, VH Heywood, NA Burges, DH Valentine, DM Moore, SM Walters, DA Webb. *Flora Eur. Camb. Univ. Press Camb.* 1964–1980.

Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. 1976., *Flora europaea* Vol. 4, Cambridge University. Press.

Wagenitz, G., Hellwig, F.H. 1996. Evolution of characters and phylogeny of the Centaureinae. In: Hind, D.J. & Beentje, H.G. (eds.), *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994*, 1: 491-510. Royal Botanical Garden. Kew

Willkomm, H.M., Lange, J. 1870. Orobanchaceae. *Prodromus Florae Hisp.* 2, 620–632.