

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

**Trabajo Final de Grado: INGENIERÍA FORESTAL Y DEL
MEDIO NATURAL.**

**INFORME SOBRE LA EFICACIA DE LOS MÉTODOS DE
EMASCULACIÓN Y GERMINACIÓN DE AQUENIOS EN
ESPECIES DUNARES DE LA FAMILIA ASTERÁCEAS.**

Autor:

Torrijos Sánchez, Jordi.

Tutores:

Merle Farinós, Hugo Basilio.

Valencia, Curso 2017-2018.

Título: Informe sobre la eficacia de los métodos de emasculación y germinación de aquenios en especies dunares de la familia Asteráceas.

Autor: Jordi Torrijos Sánchez.

Tutor: Hugo Basilio Merle Farinós.

Valencia a Febrero de 2018 Curso 2017-2018.

Resumen.

El presente trabajo se centra en determinar los parámetros que pueden influir en la obtención de semilla y el establecimiento de las plántulas de especies vegetales de la familia *Compositae* (*Asteraceae*). Para ello se probarán y aplicarán técnicas como son la emasculación y la polinización forzada para comprobar las posibilidades de hibridación entre diferentes especies del mismo género. En la realización del trabajo se emplearán dos especies del género *Centaurea* L. La metodología consistirá en la eliminación del androceo y el posterior embolsado de los capítulos de *C. aspera* ssp. *stenophylla* y *C. seridis* ssp. *maritima* sobre los que se aplicará la polinización forzada. Se realizarán dos tratamientos por especie: control (sin polinizar) y polinización forzada (con polen de la misma especie) con tres repeticiones por tratamiento y especie. En cada una de las repeticiones se tratarán 5 capítulos, obteniéndose un total de 60 capítulos tratados.

Para completar la información sobre estas especies, se estudiará la germinación de parte de las cipselas recolectadas, para conocer si requieren de un periodo de latencia tanto con periodo de frío como sin frío. Para ello se tomarán 7 lotes de cipselas de ambas especies y se les aplicará un protocolo de desinfección. El protocolo de germinación se les aplicará en diferentes momentos: el momento 0 (nada más ser recolectadas), el momento 10 (pasados 10 días de su recolección) con y sin frío, momento 20 (después de 20 días de su recolección) con y sin frío y momento 30 de igual manera.

Palabras clave:

Centaurea aspera, *Centaurea seridis*, emasculación, polinización forzada, autopolinización, germinación, latencia.

Abstract.

The aim of the present work is to determine the parameters that can influence the establishment of seedlings and seed set procurement in the Asteraceae family. Therefore, techniques such as emasculation and forced pollination will be tested and applied. Two species of *Centaurea* L. will be used for the assay. The androecium will be removed and subsequently capitula will be bagged from *C. aspera* ssp. *stenophylla* and *C. seridis* ssp. *maritima*. Afterwards forced pollination will be applied. Two treatments by specie will be made: control (without pollination) and forced pollination (with pollen of the same species) with three replicates per treatment and species. In each repetitions 5 capitula will be treated, obtaining a total of 60 treated capitula.

To know if latency or cold period is required, we will studied the germination of part of the collected cypselae. Seven batches of the two species will be collected and a disinfection protocol will be applied. The germination protocol will be applied at time 0 (immediately after collection), and then at time 10 (after 10 days after collection) with and without cold, moment 20 (after 20 days after collection) with and without cold and moment 30 in the same manner.

Key words:

Centaurea aspera, *Centaurea seridis*, emasculation, forced pollination, self-pollination, germination, latency.

Agradecimientos.

Agradecer antes de nada a Hugo, tutor de este trabajo, toda la dedicación y ayuda prestada desde la idea inicial del trabajo hasta la última corrección del mismo, también los buenos momentos vividos en la fase experimental y durante toda la Beca.

A María por la paciencia y dedicación en esas mañanas dejándonos la vista leyendo micros.

A Alfonso por ayudarme a indagar más en los Sistemas de Información Geográfica y obligarme a abrir la puerta de Rstudio.

Y en general a los tres por la experiencia inolvidable de un viaje en busca de la *Centaurea gentilii*. (*Per aspera ad astra*)

No olvidarme de mi compañera de batallas Nereida, cuántas flores arrancadas a pleno sol.

Y por último a mi familia por darme la oportunidad de estudiar un grado a estas alturas y a mi pareja por haber sido un gran apoyo durante esta etapa.

Índice del documento.

1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	3
2.1 Taxonomía.....	3
2.1.1. <i>Centaurea aspera</i> L. subsp. <i>stenophylla</i> (Dufour) Nyman.....	4
2.1.2. <i>Centaurea seridis</i> L. subsp. <i>maritima</i> (Dufour) Dostál.....	6
2.2. Técnicas.....	8
2.2.1. Emasculación.....	8
2.2.2. Polinización.....	9
2.2.3. La emasculación en la autogamia y la alogamia.....	9
2.2.4. Germinación.....	10
3. Justificación y objetivos.....	11
4. Material y métodos.....	12
4.1 Diseño experimental.....	12
4.2 Zona de estudio.....	15
4.3 Tratamientos.....	16
4.4 Trabajos en campo “in situ”.....	17
4.4.1 Emasculación.....	17
4.4.2 Polinización.....	19
4.4.3 Proceso del trabajo completo.....	20
4.4.4 Recolección de capítulos.....	20
4.4.5 Cronología de los trabajos.....	21
4.5 Trabajos en laboratorio “ex situ”.....	22
4.5.1 Recuento de aquenios.....	22
4.5.2 Germinaciones.....	22
4.5.3 Cronología de las germinaciones.....	23
5. Resultados y discusión de los resultados.....	23
6. Conclusiones.....	23
7. Referencias Bibliográficas.....	24
8. Anexos.....	26

Índice de figuras.

Figura 1: Taxonomía de la sección <i>seridia</i>	2
Figura 2: Ilustración <i>C. aspera</i> subsp. <i>stenophylla</i> (Invernon & Devesa, 2013).....	3
Figura 3: Distribución geográfica de <i>C. aspera</i> subsp. <i>stenophylla</i> (Modificación de Invernon & Devesa, 2013).....	4
Figura 4: Ilustración <i>C. seridis</i> subsp. <i>maritima</i> . (Invernon & Devesa, 2013).....	5
Figura 5: Distribución geográfica de <i>C. seridis</i> subsp. <i>maritima</i> . (Modificación de Invernon & Devesa, 2013).....	5
Figura 6: Detalle de estigma bifurcado en <i>Centaurea aspera</i> L.	6
Figura 7: Distribución de las dos especies, <i>C. aspera</i> y <i>C. seridis</i> dentro de la parcela.....	12
Figura 8: Distribución de los tratamientos A y B aplicados a los dos taxones.....	12
Figura 9: Distribución de las repeticiones realizadas en la parcela.....	13
Figura 10: Distribución zonal de la vegetación de la Albufera de Valencia según asociaciones. (Collado <i>et al.</i>).....	14
Figura 11: Detalle de capítulo de <i>C. seridis</i> y <i>C. aspera</i> en el estado juvenil idóneo para comenzar el proceso de emasculación.....	16
Figura 12: Capítulo emasculado de <i>C. seridis</i> la derecha y comparativa entre capítulo emasculado frente a no emasculado de <i>C. aspera</i>	16
Figura 13: Utilillaje empleado para la emasculación.....	17
Figura 14: Frotación del capítulo donante sobre el receptor.....	18
Figura 15: Botes empleados para la recolección, curado y transporte de los machos donantes.....	18
Figura 16: Capítulo recolectado. (1ª Repetición, <i>C. seridis</i> , tratamiento B, 3 ^{er} capítulo).....	19
Figura 17: Asegurando que la bolsa queda bien cerrada.....	20
Figura 18: Seccionado y extracción de aquenios para hacer recuento.....	22
Figura 19: Almacenaje de los aquenios obtenidos en el recuento.....	22
Figura 20: útiles y preparación de los primeros lotes. <i>C. seridis</i>	23
Figura 21: detalle de recorte de brácteas y punta del capítulo.....	25
Figura 22: Histogramas y test de normalidad Shapiro-wilk.....	27
Figura 23: Gráfico Box whisker tratamientos A y B para <i>C. aspera</i>	27
Figura 24: Gráfico Box whisker tratamientos B y D para <i>C. aspera</i>	28
Figura 25: Gráfico Box whisker para las repeticiones del tratamiento B.....	29
Figura 26: Histogramas test de normalidad Shapiro-wilk.....	29
Figura 27: Gráfico Box whisker tratamientos A y B para <i>C. seridis</i>	30
Figura 28: Gráfico Box whisker tratamientos B y D para <i>C. seridis</i>	31
Figura 29: Gráfico Box whisker para las repeticiones del tratamiento B.....	32
Figura 30: Gráfico Box whisker para las repeticiones del tratamiento A.....	33
Figura 31: Gráfico Box whisker para los tratamientos de las germinaciones.....	34

Índice de tablas.

Tabla 1: Sección <i>seridia</i> , distribución y tipo polínico.....	2
Tabla 2: Análisis de los tratamientos a realizar.....	10
Tabla 3: Tratamientos y recuento de capítulos tratados.....	10
Tabla 4: tratamiento y número de aquenios puestos a germinar.....	11
Tabla 5: Recuento de flores emasculadas en los diferentes tratamientos y repeticiones sobre <i>C. aspera</i>	16
Tabla 6: Recuento de flores emasculadas en los diferentes tratamientos y repeticiones sobre <i>C. seridis</i>	17
Tabla 7: Cronología de los trabajos realizados sobre <i>Centaurea aspera</i> L.....	20
Tabla 8: Cronología de los trabajos realizados sobre <i>Centaurea seridis</i> L.....	21
Tabla 9: Número de aquenios por lote.....	22
Tabla 10: Cronología de las germinaciones.....	24
Tabla 11: Recuento de aquenios en <i>C. aspera</i>	26
Tabla 12: Recuento de aquenios en <i>C. seridis</i>	26
Tabla 13: Recuento de aquenios obtenidos de polinización abierta.....	26
Tabla 14: Test de normalidad Shapiro-wilk del número de aquenios en <i>C. aspera</i>	26
Tabla 15: Estadístico KRUSKAL-WALLIS para los tratamientos A y B.....	27
Tabla 16: Estadístico ANOVA para los tratamientos B y D.....	28
Tabla 17: Estadístico ANOVA para las repeticiones para <i>C. aspera</i>	28
Tabla 18: Test de normalidad Shapiro-wilk del número de aquenios en <i>C. seridis</i>	30
Tabla 19: Estadístico KRUSKAL-WALLIS para los tratamientos A y B.....	30
Tabla 20: Estadístico ANOVA para tratamientos B y D.....	31
Tabla 21: Estadístico ANOVA para las repeticiones del tratamiento B de <i>C. seridis</i>	31
Tabla 22: Estadístico ANOVA para las repeticiones del tratamiento B de <i>C. seridis</i>	32
Tabla 23: Medias para las repeticiones de los ensayos.....	33
Tabla 24: Resumen de resultados de las pruebas de germinación.....	34
Tabla 25: Resultados de las germinaciones para cada una de tiempos de estratificado.....	35



1. Introducción.

La obtención y germinación de semilla siempre es un proceso complejo en el que intervienen muchos factores. Si además se desea obtener semilla de especies que están catalogadas como amenazadas o para realizar una repoblación de un Espacio Natural Protegido existe la dificultad añadida de que el germoplasma con el cual se está trabajando es muy valioso.

Las especies que se van a tratar en este trabajo son *Centaurea aspera* L. ssp *stenophylla* y *Centaurea seridis* L. ssp *maritima*. Los dos taxones son propios de ambientes dunares como puede ser el Parque Natural de l'Albufera en Valencia o la Marjal dels Moros en Sagunto y entre ambos existe una alta frecuencia de hibridación como muy bien explicaron Merle *et al.* (2010) y Ferriol *et al.* (2012) con análisis moleculares realizados sobre ambos taxones.

Centaurea aspera es una especie alógama mientras que *C. seridis* es autógama. Al encontrarse ambas en el mismo espacio físico como ocurre por ejemplo en la Devesa del Saler, se demostró que *C. seridis* estaba produciendo un alto número de polinizaciones sobre individuos de *C. aspera*, de las cuales se formaban híbridos (*C. x subdecurrens*) comportándose siempre como el parental femenino *C. aspera* (Ferriol *et al.* 2015).

La hibridación entre taxones próximos influye marcadamente en las dinámicas y la estabilidad de las poblaciones. La sección *Seridia* (Figura 1) a la cual pertenecen *C. aspera* y *C. seridis*, es una sección en continuo proceso de diversificación y que presenta varios taxones catalogados como amenazados. Por ello, el presente trabajo estudia los factores implicados en la obtención de semilla no híbrida, y los procesos de germinación de los aquenios obtenidos.

2. Antecedentes.

2.1 Taxonomía.

La familia asteraceae es una de las más diversas y cosmopolita de las eucotiledoneas (Jeffrey, 2007), conteniendo un total de 12 subfamilias y 38 tribus (Panero & Funk, 2008). Tanto es así que la podemos encontrar tanto en ambientes tropicales como en regiones boreales, pero donde realmente encuentra su lugar idóneo, es en regiones áridas o semiáridas (Watson & Dallwitz, 1992). Sus miembros, casi 23.000 especies, son fácilmente reconocibles por sus inflorescencias en forma de capítulo, formadas por un receptáculo generalmente plano, rodeado por un involucro de brácteas donde normalmente se disponen un gran número de flores liguladas, tubulosas o ambas a la vez (Sitte *et al.* 2008).

Las técnicas aplicadas en el presente trabajo se van a realizar sobre el género *Centaurea* L. Este género comprende un total aproximado de 250 especies (Susanna & García-Jacas, 2007) distribuidas sobre todo por Europa, la región mediterránea y el suroeste asiático. En la península Ibérica encontramos casi 94 especies de las cuales, 8 de ellas son pertenecientes a la sección *Seridia* (4 endemismos peninsulares).

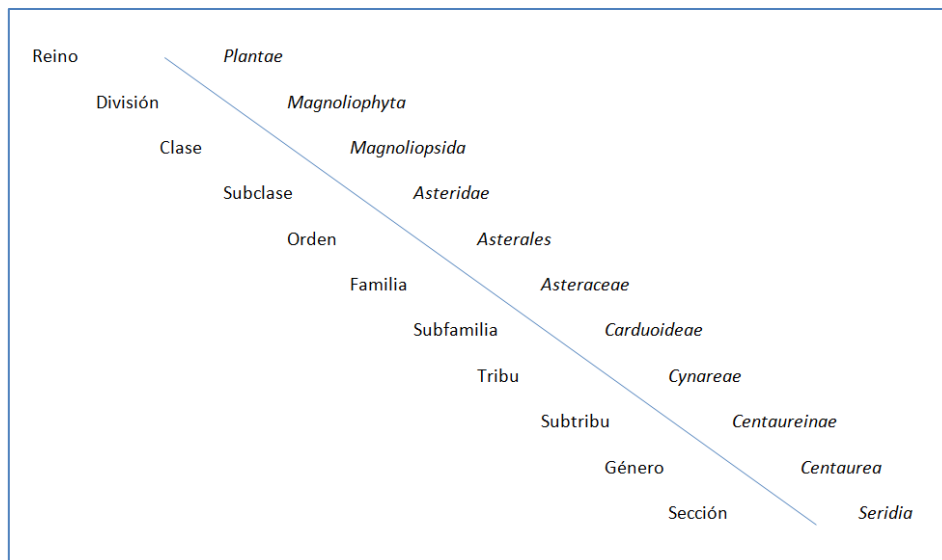


Figura 1: Taxonomía de la sección seridia.

El género lo podemos encontrar distribuido en 7 tipos polínicos y 25 secciones. El clado *Jacea* (tabla 1) ($\chi = 15, 14, 12, 11, 10, 9, 8, 7$) es uno de los tres grandes linajes que se reconocen en el género (García-Jacas *et al.*, 2001) y este se divide en 3 regiones geográficas o subclados; Circunmediterránea y Eurosiberiana, Mediterránea Oriental y Mediterránea Occidental, en donde encontramos entre otras, la sect. *Seridia* (Invernon *et al.*, 2013).

Tabla 1: Sección *seridia*, distribución y tipo polínico (elaboración a partir de García-Jacas *et al.*, 2009)

Tipo polínico.	Distribución.	Sección.
<i>Jacea</i> .	Circunmediterránea y Eurosiberiana	
	Mediterránea Oriental.	
	Mediterránea Occidental.	<i>Seridia</i>

Su variada morfología engloba hierbas anuales, bienales o perennes, normalmente espinosas y de porte arbustivo o sufruticoso, con un crecimiento basal muy pronunciado en los primeros estadios. Los capítulos pueden aparecer terminales o axilares, solitarios o en inflorescencias paniculiformes o corimbiformes. Las flores son muy llamativas con colores que pueden ser rosadas, rojas, purpúreas, lilas, azules, amarillas o blancas. Los aquenios son ovoides o cilíndricos, glabros o escasamente pelosos con vilano generalmente doble y escamoso cuando aparece, pero inexistente en muchos de los casos (Font, 2007; Invernon&Devesa, 2013).

2.1.1. *Centaurea aspera* L. subsp. *stenophylla* (Dufour) Nyman.

Se trata de una especie herbácea de porte mediano y de tallo fino pero con una longitud de hasta 70 cm, con hojas basales lobuladas y caulinares enteras de 22 a 25 mm de longitud (López, 2011). Los capítulos generalmente apicales están formados por un involucre de 1 cm

de tamaño máximo (Figura 2), en el que alberga tanto flores neutras, por toda la periferia, como hermafroditas, estas últimas en mayor número. Los achenios son aproximadamente de 3,5 mm de largas, con un vilano de 0.1 a 2 mm dispuesto de escamas. Número cromosómico $n=11$ ($2n=22$) (Invernon & Devesa, 2013).

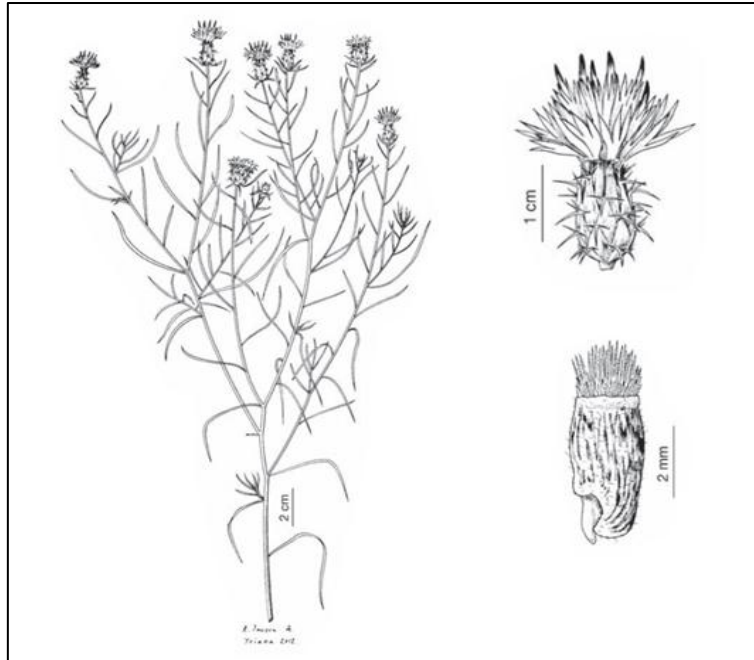


Figura 2: Ilustración *C. aspera* subsp. *stenophylla* (Invernon & Devesa, 2013).

Las flores hermafroditas están formadas por una corola tubulosa que contiene en su interior cinco estambres. El gineceo es por lo general de mayor tamaño que la corola y sobrepasa la medida de ésta en 1 mm como máximo, en el momento de máxima madurez de la flor, es también en este momento cuando mejor se puede observar el estigma bifido (Figura 6). La floración se realiza en los meses de primavera y verano dependiendo también de la zona geográfica en que se encuentre, pero centrada entre abril y agosto (*Flora Ibérica, 2017*).

El taxón es alógamo, esto significa que la polinización es obligatoriamente cruzada con otros individuos de la misma especie. Esta polinización es producida generalmente por insectos de los órdenes díptera, hemíptera y lepidóptera (Mateo & Crespo, 2008), lo que también propicia a que se produzcan híbridos como suele ocurrir en las zonas del levante peninsular donde comparte hábitat con *C. seridis* (Ferriol *et al*, 2012).

La distribución del taxón no es demasiado amplia pero abundante en su zona de distribución, se puede encontrar fácilmente en la costa mediterránea desde el termomediterráneo inferior hasta el mesomediterráneo superior (Anthos, 2017) y puede llegar a alcanzar un nivel altitudinal de aproximadamente 1100 m s.n.m. Generalmente aparece acompañando comunidades nitrófilas de terrenos baldíos, claros de matorral o arenales marítimos y formando parte del catálogo florístico de alianzas como *Ammophillion-australis* y *Oleo-ceratonion*. Tiene la mayor representación en toda la costa valenciano-murciana (Figura 3), pero también se encuentra al adentrarse en el interior de la península (Anthos, 2017; *Flora Ibérica, 2016*) y en la isla de Menorca (Fraga i García, 2004).

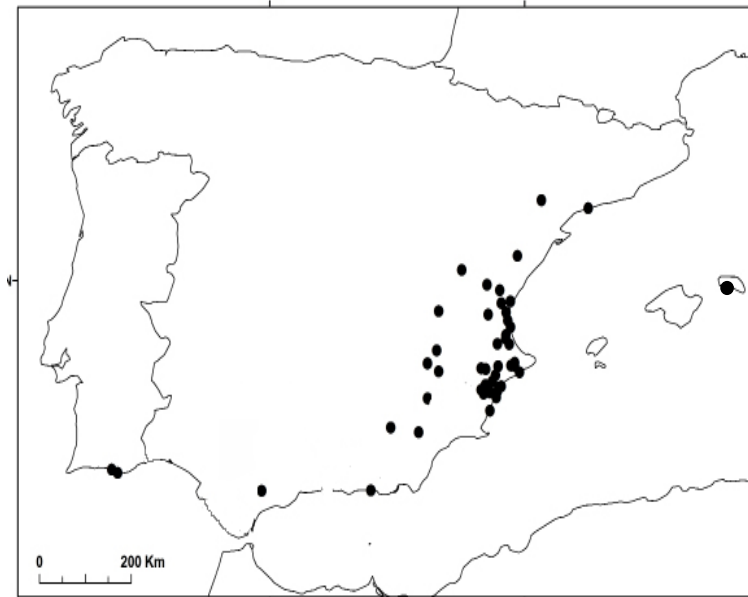


Figura 3: Distribución geográfica de *C. aspera* subsp. *stenophylla* (Modificación de Invernon & Devesa, 2013).

2.1.2. *Centaurea seridis* L. subsp. *maritima* (Dufour) Dostál.

Hierba perenne, sufruticosa y multicaule, con unos tallos que alcanzan hasta los 70 cm de largo, foliosos en casi toda la longitud y por lo general ramificados y ligeramente acostillados. Las hojas basales son oblongo-lanceoladas con 2-5 pares de lóbulos terminados en una espínula cónica no pinchuda de hasta 1 cm (Figura 4), las caulinares son sésiles y enteras con algunos lóbulos que van desapareciendo a medida que se acercan al ápice del tallo y con gran cantidad de pilosidad tanto en el haz como en el envés, mucho más abundantes en el nervio medio (Invernon & Devesa, 2013).

Los capítulos son radiantes con las flores del disco tubulares y hermafroditas y las de la periferia neutras. La corola de las flores neutras tiene un tamaño de 17 a 32 mm con el tubo blanquecino y limbo de rosáceo a púrpúreo. Las hermafroditas no alcanzan tan grandes tamaños ya que son de entre 17 y 25 mm en donde se albergan los estambres de filamento peloso. El estilo sobresale por encima de la corola y está dotado de ramas estilares en el extremo. La floración se produce sobre todo en los meses de más calor del año, pero esta puede alargarse e incluso verse en todos los meses del año, comenzando desde febrero o marzo y finalizando en agosto o noviembre, claro está que dependerá en gran medida del área geográfica.

Los estudios cariológicos realizados sobre esta especie establecen el Nº cromosómico en $n=22$; ($2n=44$). Y en cuanto a la reproducción se refiere, cabe destacar que es una especie autógena, aunque se trata de una gran polinizadora de *C. aspera*, en las zonas de contacto (Ferriol *et al.* 2015).



Figura 4: Ilustración *C. seridis* subsp. *maritima*. (Invernon & Devesa, 2013)

Observando el mapa de distribución en la península Ibérica podemos determinar que la especie no llega a sobrepasar el mesomediterráneo, ya que se encuentra desde Tarragona hasta Granada o Málaga, pero encuentra su mejor lugar cercana a la costa en arenales antropizados y nitrófilos, poblando las zonas más cercanas a la orilla del mar pero siempre a sotavento del primer cordón dunar (Figura 4) (Gómez, 2016). Por su temperamento robusto se puede también encontrar en paseos marítimos y en ruderales o bordes de cultivos con suelos duros, pobres y pedregosos.

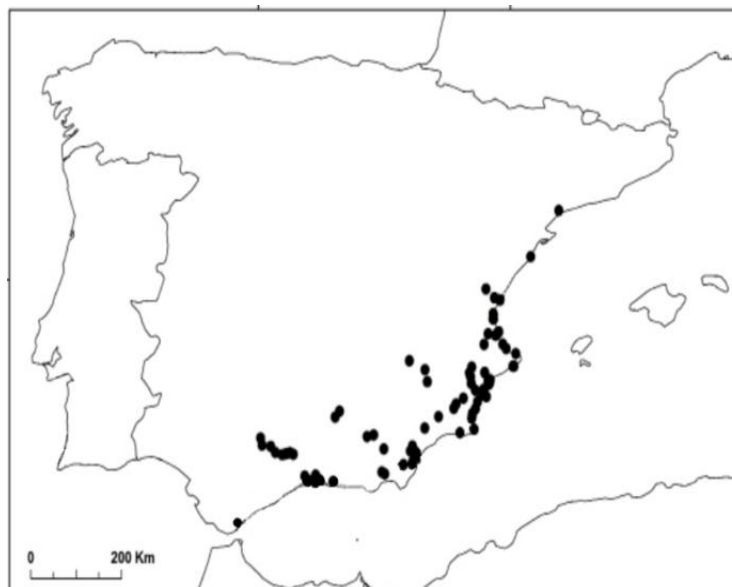


Figura 5: Distribución geográfica de *C. seridis* subsp. *maritima*. (Modificación de Invernon & Devesa, 2013).

2.2. Técnicas.

2.2.1. Emasculación.

Las técnicas de emasculación se usan en todo tipo de cultivos ya sean hortícolas, frutales y ornamentales para multitud de fines, como por ejemplo conseguir una mejora genética al realizar los cruzamientos con otros individuos. Esta mejora genética se puede traducir en un mejor fruto, una variedad con mayor tamaño de planta o de floración o simplemente en una variación en el tiempo de maduración de dichos frutos. En ocasiones, se puede dar que estas emasculaciones puedan hacer que el cuajado de las flores se vea deteriorado (Okie y Weinberger, 1996).

La mejora genética, no siempre persigue la obtención de productos agrícolas, sino que también se puede centrar en la obtención de semillas y plantas que estén mejor adaptadas a una región de origen. En la actualidad los cambios en el ambiente, y la adaptación de las plantas a esos cambios, centran gran parte de los recursos destinados a la mejora y conservación de la biodiversidad.

Las técnicas de emasculación en plantas a priori resultan sencillas, ya que se basan en algo tan simple como la eliminación del androceo, ya sea, la eliminación de las anteras o de todo el conjunto de estambres. En muchas ocasiones no solamente se elimina del androceo, sino que también se extirpa los pétalos e incluso los sépalos, para evitar de esta forma posibles contaminaciones por entomofilia. Para evitar la contaminación polínica lo más común es realizar un embolsado de las flores o inflorescencias emasculadas y así evitar polinizaciones accidentales. El material más empleado para realizar el embolsado es tela o papel, ya que es importante que la flor respire y que no se produzcan pudriciones y posibles abortos.

La emasculación en asteráceas resulta más complicada de lo normal, debido al alto número de flores que contiene un capítulo y al tamaño de las mismas. Además, la maduración de estas flores no es sincrónica, sino que se produce del exterior al interior del capítulo a lo largo de varios días. La formación y maduración de las flores dentro del capítulo se puede prolongar o acortar en el tiempo dependiendo de las condiciones de clima de la zona (especialmente la temperatura). Cabe destacar que la maduración del gineceo es diferida con respecto al androceo. Este desfase entre la parte masculina y femenina, debería posibilitar la eliminación de los estambres antes de que el gineceo esté maduro, facilitando así el proceso de emasculación.



Figura 6: Detalle de estigma bifurcado en *Centaurea aspera* L.



2.2.2. Polinización.

Esta técnica en general presenta menos dificultades que la anterior, ya que no requiere de la precisión de no dañar la flor. El objetivo de la técnica es realizar una transferencia de polen de una nueva flor o inflorescencia a la flor o inflorescencia tratada.

Para realizar la polinización se puede emplear varios métodos tradicionales como puede ser la colocación de antera sobre estigma. El más sencillo, pero no por ello menos eficiente, es el de frotación, donde flores o inflorescencias cargadas de polen donante se frotan por el o los estigmas que se desean fecundar. Otras técnicas emplean una recolección masal de polen de otros individuos para poder aplicarlo posteriormente en la flor que se desea polinizar, utilizando para ello una espátula, un pincel o simplemente espolvoreándolo. Otra técnica muy empleada en umbráculos o invernaderos es la suelta de polinizadores vivos con movilidad libre.

2.2.3. La emasculación en la autogamia y la alogamia.

La emasculación puede resultar útil como técnica, en la conservación de la biodiversidad y el aumento de la variabilidad genética cuanto se trata de aplicarla en especies autógamas, ya que estas no disponen de mecanismos para evitar que el polen generado en los estambres provoque la fecundación del ovario de la misma flor.

Estos mecanismos para evitar la autopolinización se dan siempre en las plantas alógamas. Se puede tratar desde una simple autoincompatibilidad del genotipo hasta que se produzca por dicogamia o hercogamia (Sitte *et al*, 2003). En el caso de las especies de este trabajo se trata de autoincompatibilidad polínica.

En este trabajo se va a realizar la emasculación de una especie que es alógama y de otra autógama, ambas ellas con diferente fin, pero de la misma manera y procedimiento. En *C. seridis* la emasculación servirá para evaluar si la técnica sirve para evitar la autofecundación. En *C. aspera* las emasculaciones se realizan también para poder comparar cómo afecta la técnica en ambas especies, a la viabilidad de las flores emasculadas y por lo tanto a la producción de achenios.

Centaurea aspera ssp. stenophilla, es una especie alógama que se encuentra en una situación delicada, ya que en la mayor parte de los casos que encontramos en la costa levantina sufre hibridaciones de mano de *C. seridis* (Merle *et al*, 2010; Ferriol *et al*, 2012). Esto no quiere decir que únicamente se produzca la fecundación de híbridos entre estas dos, pero sí que el grado en que esto ocurre es alto. Por este motivo se cree que es interesante conocer cómo obtener material forestal de reproducción de esta especie, por si en una hipotética situación se produjera un deterioro de las poblaciones.

Centaurea seridis ssp. marítima por el contrario, es una especie autógama y no se ve polinizada por otras especies, esto quiere decir que no forma parte de la creación de híbridos como parental femenino, pero sí como masculino. Pero esta falta de cruzabilidad entre individuos acarrea otra problemática diferente, los individuos de *C. seridis* prácticamente no disponen de variabilidad genética. Esto se traduce en mayor facilidad para reproducirse y aumentar las



poblaciones, pero no disponen de una genética que evolucione con los cambios que se van dando en su hábitat de origen.

2.2.4. Germinación.

La germinación de material forestal es una parte crucial en la conservación de especies amenazadas. En este caso y como ya se ha nombrado con anterioridad en este trabajo, ninguna de las especies tratadas se encuentra catalogada como amenazada ni forma parte de listas rojas, pero sí que existen especies dentro de la sección *Seridia* que se podrían ver beneficiadas con el conocimiento de un protocolo de germinación que proporcione una tasa de germinación satisfactoria.

Las técnicas de germinación son muy amplias y variadas y casi todas ellas van íntimamente ligadas a la inhibición de latencias o letargos que las propias semillas disponen para germinar. En el presente trabajo se persigue evaluar si existe alguna latencia por temperatura, que inhiba la germinación.

En estudios realizados con anterioridad por González, A. (2014), en el que se germinaron achenios de *C. seridis* y *C. aspera*, se tomaron achenios que habían pasado un largo periodo en refrigeración para garantizar su conservación. No se conoce la importancia que tuvo esta estratificación en frío en los resultados obtenidos de los ensayos para la determinación del protocolo de germinación. Los protocolos que González, A (2014) determinó en su trabajo y que serán aplicados en este son los siguientes:

Protocolo de desinfección.

- Lavado de los achenios en 10 ml de agua destilada durante 5 minutos.
- Inmersión de los achenios en disolución de lejía al 0,5% durante 20 minutos.
- Lavado de los achenios en 10 ml de agua destilada durante 5 minutos, repetir 3 veces.

Protocolo de germinación.

- Después de aplicar el protocolo de desinfección.
- Hidratar los achenios durante 24 horas.
- Pasadas las 24 horas, realizar una sección en el pericarpio del achenio para que libere las hojas cotiledonares.
- Colocar los achenios en una placa Petri con tres discos de papel y 6 ml de agua destilada.
- Colocar las placas Petri en luz natural y temperatura ambiente.

Aplicando este procedimiento se tratará de determinar si la estratificación en frío es crucial o no para la tasa de germinación de estas especies. Esta característica será importante para determinar si los achenios recolectados en un periodo dado, pueden ser viables para su cultivo en ese mismo momento por el contrario deben ser conservados en frío para aumentar su viabilidad.



3. Justificación y objetivos.

La hibridación tiene un importante papel en la generación de biodiversidad (García, 2013). La familia *Asteraceae* es una de las más diversas y complejas dentro de las angiospermas. Dentro de ésta, el género *Centaurea* L. es un género moderno y complejo en el que la disploidía, hibridación y poliploidía han tenido un papel importante en la diversificación y aparición de un alto número de taxones (Hellwig, 2004). Dentro de esta diversidad encontramos taxones endémicos, que están incluidos en el Catálogo Valenciano de especies de Flora Amenazada y forman parte de listas rojas. Por ello establecer y conocer las técnicas de gestión, obtención, conservación y germinación del material forestal de reproducción, es uno de los principales objetivos en la protección y conservación de la biodiversidad.

Son objetivos comunes en las líneas de conservación de la biodiversidad:

- Conocer técnicas de obtención de semilla.
- Obtener semilla con elevada variabilidad genética y una elevada adaptación a la región de origen.
- Analizar y evaluar la capacidad germinativa, además de establecer un protocolo de germinación que garantice el mejor resultado.

Consecuentemente, el **objetivo principal** del presente trabajo es evaluar la técnica de emasculación en las especies *C. aspera* y *C. seridis*, analizar la formación de achenios mediante polinización forzada posterior a la emasculación, y medir la capacidad germinativa de los achenios.

Para la consecución de objetivo principal se va a plantear varios secundarios en los que se basará el trabajo de campo y laboratorio.

- Emasculación de flores sobre lotes de plantas seleccionados al azar, para analizar la viabilidad e idoneidad de la técnica.
- Realizar polinización forzada de los capítulos emasculados con anterioridad, usando individuos de la misma especie.
- Recolectar los capítulos y contar el número de achenios producidos por cada uno de los capítulos.
- Conocer si existe periodo de latencia de la semilla desde el momento de la recolección hasta pasados 30 días de reposo tanto en cámara frigorífica como fuera de ella.

Mediante estos objetivos sobre la capacidad reproductiva de estas especies, se definirá la técnica para poder conseguir semilla de manera forzada y controlada, además se ampliarán los conocimientos sobre las diferentes técnicas empleadas como son la emasculación en asteráceas o la polinización forzada.

4. Material y métodos.

Los trabajos de campo que se detallan en el presente documento, recaban información sobre el proceso de emasculación y las diferentes variaciones que se pueden dar en la polinización de estos dos taxones.



En el trabajo de campo se aplicó un tercer tratamiento (tratamiento C) además de los que se exponen a continuación. Dada la extensión de los datos y el análisis de los mismos, los resultados del tratamiento C forma parte de otro trabajo final de grado independiente. A continuación, se expone la ejecución de los trabajos realizados en paralelo sobre los dos taxones.

4.1 Diseño experimental.

Para determinar el tamaño de la muestra, se cuantificó la carga de trabajo necesaria que permitiera ejecutar todos los tratamientos en campo, y que a su vez tuviese suficiente robustez estadística. A continuación se describen las tareas para cada uno de los tratamientos.

Tabla 2: Análisis de los tratamientos a realizar.

Tratamiento	Tarea	Resultado esperado
Tratamiento A:	Emascular + embolsar:	No se debería de obtener ningún aquenioya que no se poliniza.
Tratamiento B:	Emascular + polinizar + embolsar.	Se busca que el capítulo proporcione el máximo número de aquenios que es capaz de producir, o por lo menos proporcionar un dato de producción tras la aplicación de la técnica de emasculación. Con este ensayo se espera cuantificar el daño que se produce al capítulo al realizar la técnica. Nº de aquenios → Polinización forzada ≈ Polinización abierta.
Germinaciones	Tarea	Resultado esperado
Tratamiento 1	Germinación en el momento de la recolección	Con estos tratamientos se pretende conocer si el estratificado en frío hace que la tasa de germinación varíe, tanto favorable como desfavorablemente.
Tratamiento 2	Pasados 10 días	
Tratamiento 3	Pasados 20 días	
Tratamiento 4	Pasados 30 días	

Se trataron 6 capítulos por tratamiento, especie y repetición, realizando un total de 4 repeticiones. El número total de capítulos tratados por especie y tratamiento es de 24 (tabla 3)

Tabla 3: Tratamientos y recuento de capítulos tratados.

Código	Repetición	Especie	Tratamiento	Nº capítulos
1ASA	1	<i>C. aspera</i>	A	6
1ASB	1	<i>C. aspera</i>	B	6
1SEA	1	<i>C. seridis</i>	A	6
1SEB	1	<i>C. seridis</i>	B	6
2ASA	2	<i>C. aspera</i>	A	6



2ASB	2	<i>C. aspera</i>	B	6
2SEA	2	<i>C. seridis</i>	A	6
2SEB	2	<i>C. seridis</i>	B	6
3ASA	3	<i>C. aspera</i>	A	6
3ASB	3	<i>C. aspera</i>	B	6
3SEA	3	<i>C. seridis</i>	A	6
3SEB	3	<i>C. seridis</i>	B	6
4ASA	4	<i>C. aspera</i>	A	6
4ASB	4	<i>C. aspera</i>	B	6
4SEA	4	<i>C. seridis</i>	A	6
4SEB	4	<i>C. seridis</i>	B	6
TOTAL				96

Para las germinaciones se realizaron lotes de 15 achenios por especie, tratamiento y repetición (tabla 4).

Tabla 4: tratamiento y número de achenios puestos a germinar.

Código	Tratamiento	Frío	Especie	Nº achenios
1SASP	1	S	<i>C. aspera</i>	15
2SASP	2	S	<i>C. aspera</i>	15
2FASP	2	F	<i>C. aspera</i>	15
3SASP	3	S	<i>C. aspera</i>	15
3FASP	3	F	<i>C. aspera</i>	15
4SASP	4	S	<i>C. aspera</i>	15
4FASP	4	F	<i>C. aspera</i>	15
1SSER	1	S	<i>C. Seridis</i>	15
2SSER	2	S	<i>C. Seridis</i>	15
2FSER	2	F	<i>C. Seridis</i>	15
3SSER	3	S	<i>C. Seridis</i>	15
3FSER	3	F	<i>C. Seridis</i>	15
4SSER	4	S	<i>C. Seridis</i>	15
4FSER	4	F	<i>C. Seridis</i>	15
TOTAL				210

(S hace referencia al tratamiento sin frío y F con frío).

Los individuos fueron seleccionados al azar (Figura 7). La distribución de los tratamientos en los capítulos de las plantas seleccionadas también se realizó aleatoriamente (Figura 8). Las repeticiones se distanciaron geográficamente unas de otras (Figura 9)

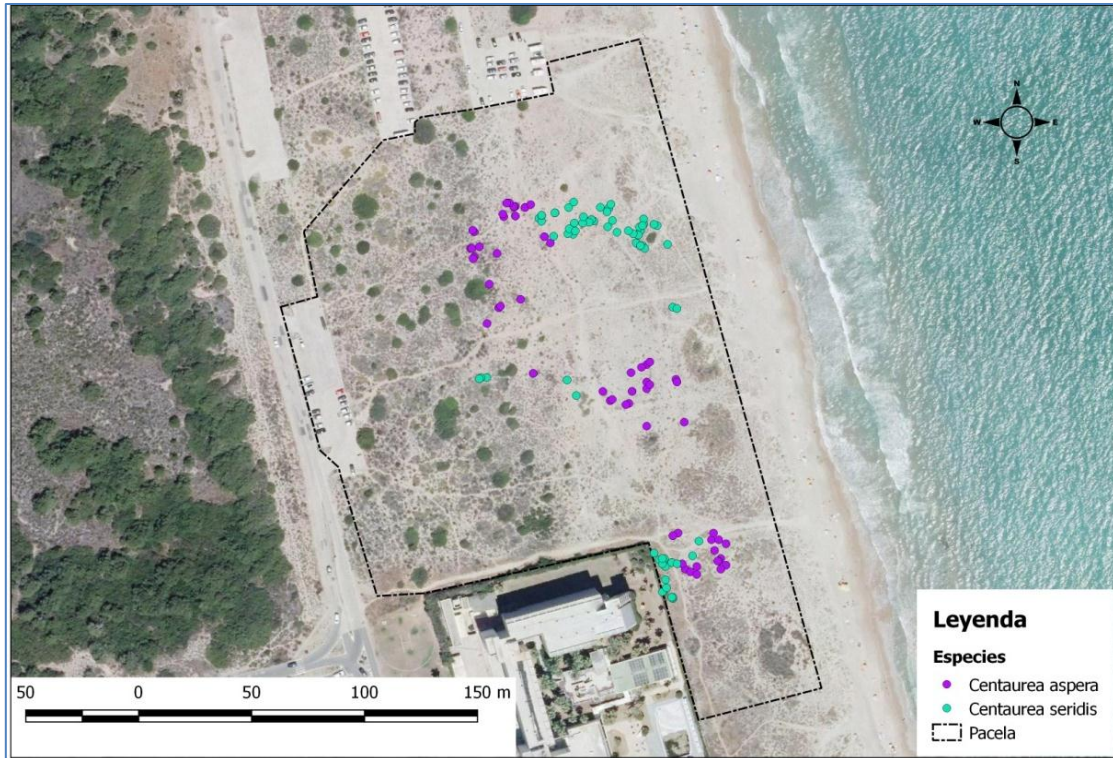


Figura 7: Distribución de las dos especies, *C. aspera* y *C. seridis* dentro de la parcela.

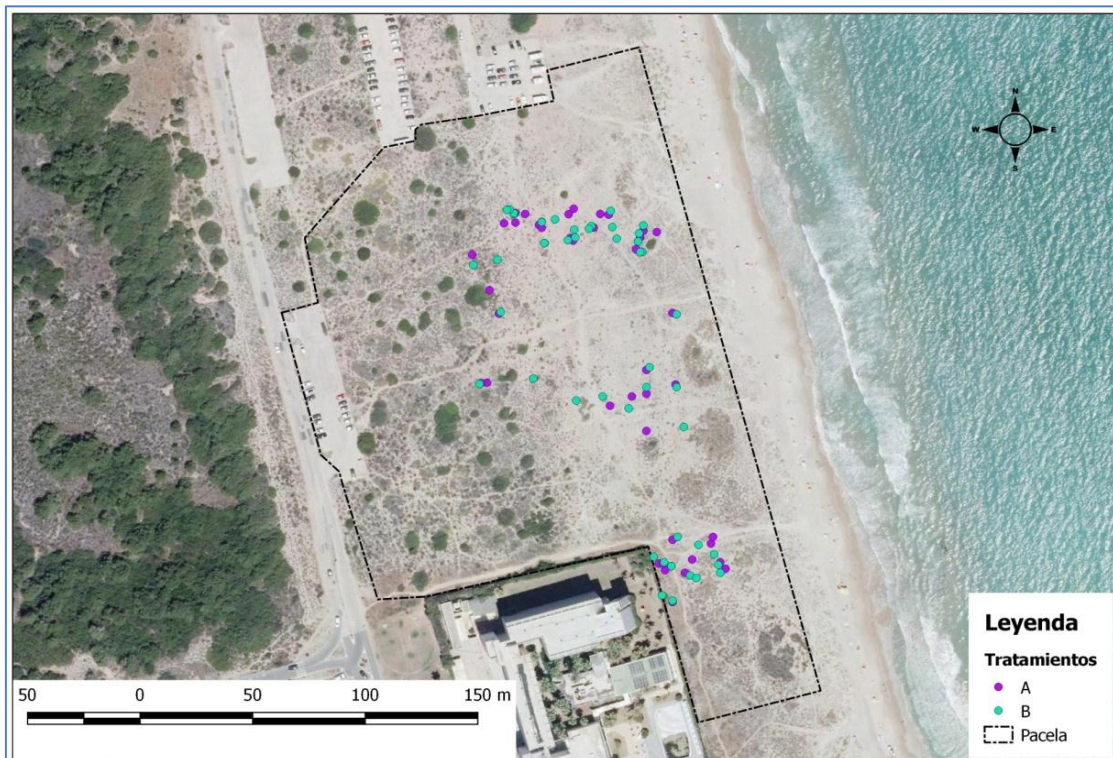


Figura 8: Distribución de los tratamientos A y B aplicados a los dos taxones.

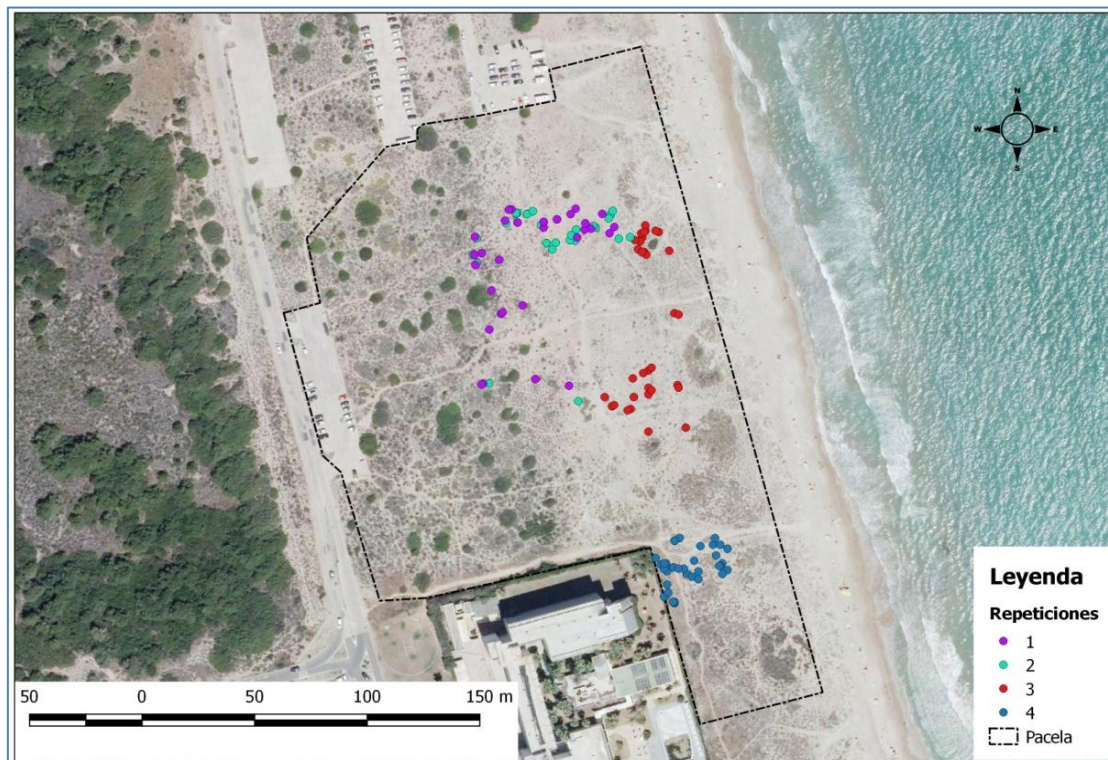


Figura 9: Distribución de las repeticiones realizadas en la parcela.

4.2 Zona de estudio.

Los trabajos de campo “in situ” han sido realizados en el interior del Parque Natural de la Albufera de Valencia sobre terrenos cercanos a la alcaldía de El Saler. En esta zona se ve representada toda la catena de la restinga formada por dunas embrionarias, fósiles y semiestabilizadas donde en estas últimas se puede encontrar ambos taxones a sotavento resguardándose de los vientos salinos procedentes del mar.

Estos hábitats forman parte de los hábitats que recoge la directiva europea 92/43/CEE relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestre y que según su anexo 1 reciben la catalogación que se explica a continuación.

2110	Dunas móviles embrionarias.
2120	Dunas móviles de litoral con <i>Ammophilla arenaria</i> .
2190	Depresiones intradunales húmedas
2240	Dunas con céspedes de <i>Brachypodietalia</i> y plantas anuales

La parcela de estudio tiene una extensión aproximada de 40.000 m² y se encuentra en el piso termomediterráneo inferior en el sector biogeográfico Valenciano-Tarraconense en la provincia 19a Valenciano-Catalana representada por geoseries edafófilas (Rivas-Martínez, 1977). La estación más cercana tiene un balance pluviométrico medio anual de 560 mm con un índice de continentalidad euoceánico inferior y un ombrotipo seco inferior, según la serie de los últimos 30 años (Globalbioclimatics, 2017).

La restinga de la Albufera de Valencia es un complejo sistema homeostático creado sobre materiales detríticos arrastrados por las corrientes del golfo de Valencia y sedimentos aportados de los barrancos y torrentes que finalizan en ella, como es el barranco de Chiva.

Se compone de zonas claramente diferenciadas con características específicas. Se pueden agrupar en cinco bloques basándose en la vegetación que encontramos (Figura 10).

- Playa. Se caracteriza por un suelo muy lavado y con alta salinidad, compuestos por vegetación psamófila
- Duna embrionaria. Ésta se compone de dunas primarias y dunas móviles, donde encontramos lastonares de duna. Aquí se puede encontrar los primeros individuos de *Centaurea seridis*.
- Dunas estabilizadas. Suelen tener aspecto de llano con pequeños montículos de arena y están formadas por dunas semifijas y estabilizadas. En esta zona es donde ambos taxones conviven en pastizales terófitos.
- Malladas. Son depresiones interdunales y se caracterizan por presentar suelos solonchak donde aparecen juncales halófilos y salicorniales.
- Dunas fósiles. Son las más viejas y es donde encontramos el bosque propio de la Devesa acompañado de lentiscos y aladiernos acompañados de labiérnagos.

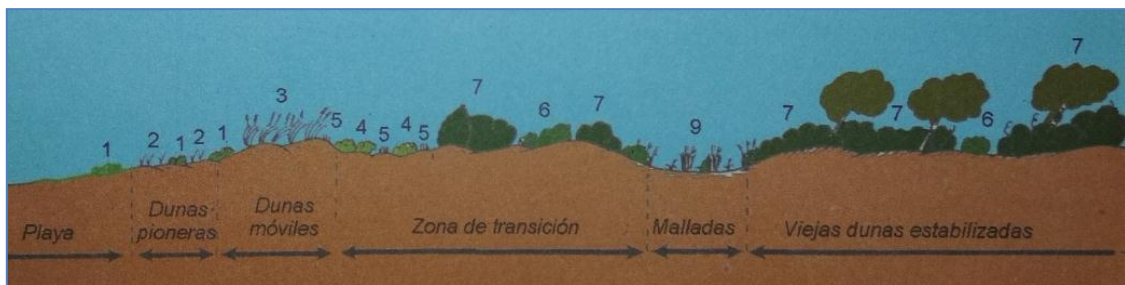


Figura 10: Distribución zonal de la vegetación de la Albufera de Valencia según asociaciones. (Collado *et al.*)

4.3 Tratamientos.

Se aplicaron tres tratamientos “in situ” sobre los capítulos de ambos taxones.

El tratamiento A corresponde con el tratamiento control, en el cual únicamente se va a aplicar la técnica de emasculación sin polinización posterior. Mediante este tratamiento se pretende poder comprobar varias cosas:

- La técnica de emasculación funciona sin causar demasiados daños al capítulo y este no es abortado por la planta.
- La técnica de emasculación se está aplicando sobre lo previsto y no se producen contaminaciones polínicas y el número de aquenios obtenido por cada capítulo es cero o cercano a cero.
 - Sobre *C. aspera* se evalúan contaminaciones exteriores de la manipulación.
 - Sobre *C. seridis* se evalúan contaminaciones con el polen del propio capítulo.



Si en este tratamiento se encontraran achenios en algunos de los capítulos habría que tratar de determinar si es por contaminaciones en la manipulación o por una posible formación partenocárpica de los achenios.

En el tratamiento B además de la técnica de emasculación, también se aplicará la polinización forzada haciendo uso de polen de la misma especie, es decir, polen de *C. aspera* sobre flores emasculadas de *C. aspera* y de la misma forma sobre *C. seridis*.

Por medio de este tratamiento se pretende evaluar la producción de semilla después de la manipulación del capítulo frente a la producción que podría tener otro capítulo en polinización abierta (mediante agentes polinizadores).

El tratamiento C, en cual se procede de la misma manera que en el tratamiento B pero haciendo uso de polen del otro taxón. Polen de *C. aspera* sobre capítulo emasculado de *C. seridis* y viceversa.

Este tratamiento está más centrado en las líneas de experimentación de otro trabajo desarrollado en paralelo, basado en la obtención de híbridos. Por lo que en este documento no se analizan los resultados obtenidos en el tratamiento C.

Y por último, **el tratamiento D** en el cual únicamente se tomaron capítulos que estuvieron expuestos a una polinización abierta como se da sin que haya ninguna manipulación. Está claro que esto no se puede tomar como un control en positivo, puramente hablando pero en este caso hará las veces.

4.4 Trabajos en campo “in situ”.

4.4.1 Emasculación.

La técnica consiste en la eliminación de la parte masculina de la flor hermafrodita. Esto en principio puede resultar fácil en plantas que dispongan de un tipo de inflorescencia simple y de tamaño medio o grande, pero debido al reducido tamaño y al alto número de flores presentes en un capítulo, la técnica presenta dificultades en asteráceas. Otro factor que dificulta la aplicación es que el crecimiento de las flores en el interior del capítulo no es sincrónico, sino que se produce durante 4 o 5 días dependiendo de la temperatura ambiental.

La emasculación se realiza empleando capítulos juveniles (Figura 11), se seleccionan en este momento y se comienza la primera emasculación de las flores que ya sobresalen las brácteas de capítulo (Figura 12). Se embolsan y se dejan pasar 24 horas hasta la siguiente revisión, en la cual se volverá a emasculas las flores que hayan madurado durante esas 24 horas. El proceso se alarga durante 3 o 4 días. En este ensayo en concreto se emascularon un total de 4.893 flores considerando los tres tratamientos, las 4 repeticiones y las 2 especies.



Figura 11: Detalle de capítulo de *C. seridis* (izquierda) y *C. aspera* (derecha) en el estado juvenil idóneo para comenzar el proceso de emasculación.



Figura 12: Capítulo emasculado de *C. seridis* a la izquierda y comparativa entre capítulo emasculado frente a no emasculado de *C. aspera* a la derecha.

Tabla 5: Recuento de flores emasculadas en los diferentes tratamientos y repeticiones sobre *C. aspera* L.

<i>Centaurea aspera</i> L.	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Total tratamientos
Tratamiento A	235	226	55		516
Tratamiento B	198	226	68	2	494
Tratamiento C	205	221	70		496
	638	673	193	2	1506

Tabla 6: Recuento de flores emasculadas en los diferentes tratamientos y repeticiones sobre *C. seridis* L.

<i>Centaurea seridis</i> L.	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Total tratamientos
Tratamiento A	309	462	318	71	1160
Tratamiento B	293	450	307	67	1117
Tratamiento C	261	404	338	107	1110
	863	1316	963	245	3387



Figura 13: Utillaje empleado para la emasculación.

4.4.2 Polinización.

De entre todas las técnicas que se pueden utilizar para la polinización forzada, en este trabajo se ha empleado la frotación, ya que en trabajos anteriores se observó que los resultados sobre asteráceas eran favorables (Castell, 2014).

El método consiste en hacer coincidir mediante el contacto físico las anteras de una flor donante de polen con los estigmas de la flor emasculada en ese mismo momento. Para ello se hizo una selección exhaustiva de los machos donantes dentro de la misma parcela de estudio, ya que era interesante que las cantidades de polen fueran lo más altas posibles.

La recolección de machos resultó complicada, ya que los capítulos que estaban totalmente formados y que debían tener las anteras adultas y repletas de polen, no se encontraban en dicho estado. Por lo tanto, se optó por la recolección temprana y la maduración de los capítulos una vez cortados en el interior de un recipiente adecuado para tal fin.

Los capítulos donantes se recolectaron el día anterior a su uso, a ser posible en un estado bastante avanzado, pero sin que todas las flores hubieran emergido. Se guardaron en un recipiente durante 24 horas, hasta que a la mañana siguiente fueran usados. De esta manera la

emergencia del polen por la parte superior de la flor era máxima, asegurando la polinización y evitando contaminaciones cruzadas de los capítulos donantes.

La polinización se retrasó en un día con respecto a la emasculación, debido a que en el momento de realizar las primeras emasculaciones el estigma de la flor extirpada aun estaba en estado juvenil y no receptivo. La primera frotación se realizó pasadas 24 horas aproximadamente. La última polinización se realizó un día después de finalizar el proceso de emasculación.



Figura 14: Frotación del capítulo donante sobre el receptor.

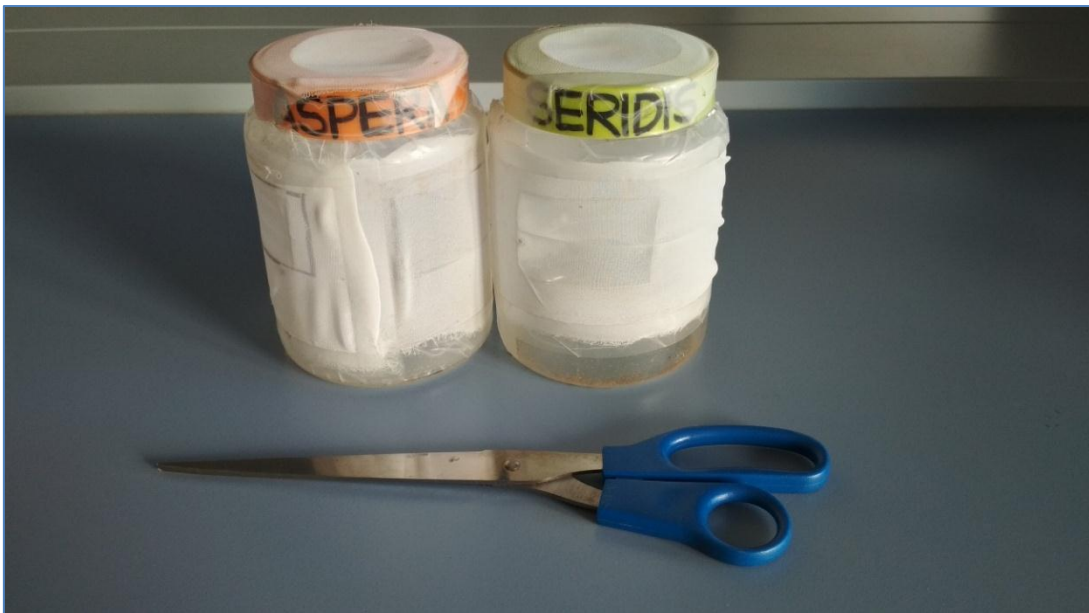


Figura 15: Botes empleados para la recolección, curado y transporte de los machos donantes.

4.4.3 Secuencia de trabajo en campo.

Todos los capítulos fueron tratados de la misma forma y bajo el mismo protocolo, que consistió en los siguientes pasos:

Día 1:

1. Elección del capítulo en la planta en base a su estado de maduración y el número inicial de flores de que disponga.
2. Realización de una primera emasculación de todas las flores y embolsado del capítulo. En este punto es donde se le asigna el código identificativo que va a llevar en todo el proceso.
3. Recolección de capítulos donantes para emplearlos en la polinización al día siguiente.

Día 2:

4. Desembolsado, emasculación, polinización de los capítulos susceptibles y embolsado.

Día 3 y sucesivos:

Repetición de los pasos anteriores hasta que dejen de emerger flores del capítulo. El último día únicamente se realiza la polinización.

4.4.4 Recolección de capítulos.

Para la recolección de los capítulos se esperó aproximadamente 20 días contados a partir de la fecha de la última polinización (Figura 16). Es el tiempo necesario para que los aquenios estén totalmente formados y sean capaces de germinar.

A cada capítulo con su código, le corresponde un número concreto de aquenios. Por ello, la tarea de recolección se realizó de manera cuidadosa (Figura 17), evitando que pudiesen salirse aquenios de cada capítulo tratado. Los capítulos fueron cortados con tijera directamente desde la planta y uno por uno fueron revisados para que las bolsas de tela permanecieran bien cerradas hasta el momento de realizar el recuento de los aquenios en laboratorio.



Figura 16: Capítulo recolectado. (1ª Repetición, *C. seridis*, tratamiento B, 3^{er} capítulo)



Figura 17: Asegurando que la bolsa queda bien cerrada.

4.4.5 Cronología de los trabajos.

En la siguiente tabla se representa la planificación y la cronología que se llevó a cabo para realizar los trabajos in situ, teniendo en cuenta las diferentes repeticiones y tareas realizadas (Tabla 7 y 8).

Tabla 7: Cronología de los trabajos realizados sobre *Centaurea aspera*L.

	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	08-may	09-may	10-may	11-may	12-may	13-may	14-may
1ª Rep.		E	E+P	E+P	P		
2ª Rep.			E	E+P	P		
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	15-may	16-may	17-may	18-may	19-may	20-may	21-may
3ª Rep.	E	E+P	E+P	E+P	P		
4ª Rep.	E	E+P	E+P	P			
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	29-may	30-may	31-may	01-jun	02-jun	03-jun	04-jun
1ª y 2ª Rep.			R				
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	05-jun	06-jun	07-jun	08-jun	09-jun	10-jun	11-jun
3ª y 4ª Rep.			R				

(E: emasculación; P: polinización; R: recolección)



Tabla 8: Cronología de los trabajos realizados sobre *Centaurea seridis*L.

	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	08-may	09-may	10-may	11-may	12-may	13-may	14-may
1ª Rep.		E	E+P	E+P	E+P	E+P	
2ª Rep.			E	E+P	E+P	E+P	E+P
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	15-may	16-may	17-may	18-may	19-may	20-may	21-may
3ª Rep.	E	E+P	E+P	E+P	E+P		
4ª Rep.	E	E+P	E+P	E+P	E+P	E+P	P
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	29-may	30-may	31-may	01-jun	02-jun	03-jun	04-jun
1ª y 2ª Rep.			R				
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	05-jun	06-jun	07-jun	08-jun	09-jun	10-jun	11-jun
3ª y 4ª Rep.			R				

(E: emasculación; P: polinización; R: recolección)

4.5 Trabajos en laboratorio “ex situ”.

4.5.1 Recuento de achenios.

Para realizar el recuento de achenios de cada capítulo, se preparó una bancada del laboratorio para que el trabajo se realizara meticulosamente y bajo la mayor asepsia posible.

Se colocó un par de hojas de papel de filtro en las cuales se depositaría uno por uno los capítulos para manipularlos sin que se mezclaran los achenios de uno con los demás.

La mejor manera de extraer los achenios es realizar un corte en la base del involucre y sirviéndose de unas pinzas separar las dos partes para dejar al descubierto el interior del capítulo. Usando unas pinzas más pequeñas se rebusca entre los pelos que protegen a los achenios mientras estos van cayendo en sobre el papel (Figura 18).

Una vez vaciado y revisado el capítulo se depositaron los achenios en tubos Eppendorf de 1,5 ml marcados todos ellos con el código de cada uno de los individuos y en el cual se conservan para posteriores recuentos y estudios (Figura 19).

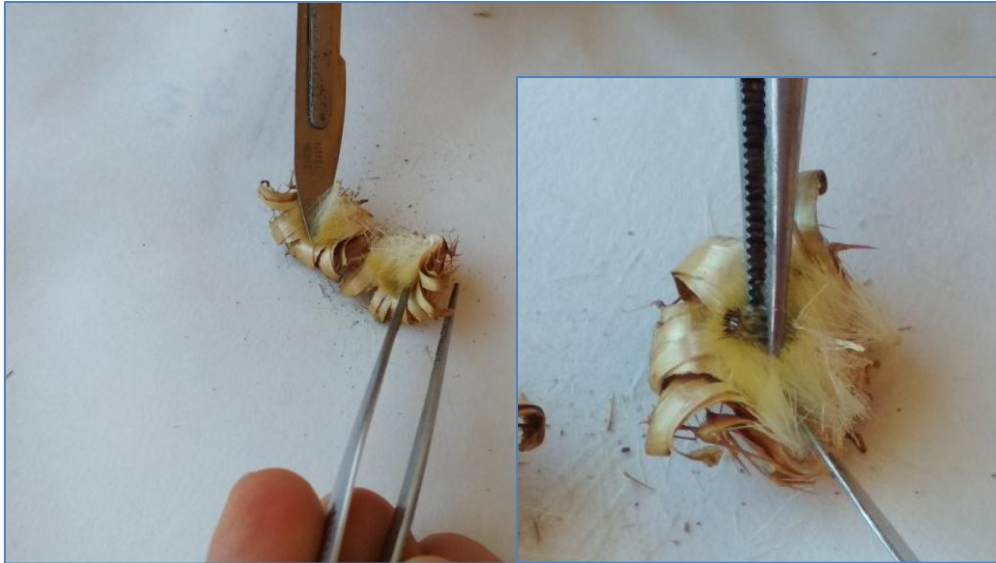


Figura 18: Seccionado y extracción de aquenios para hacer recuento.

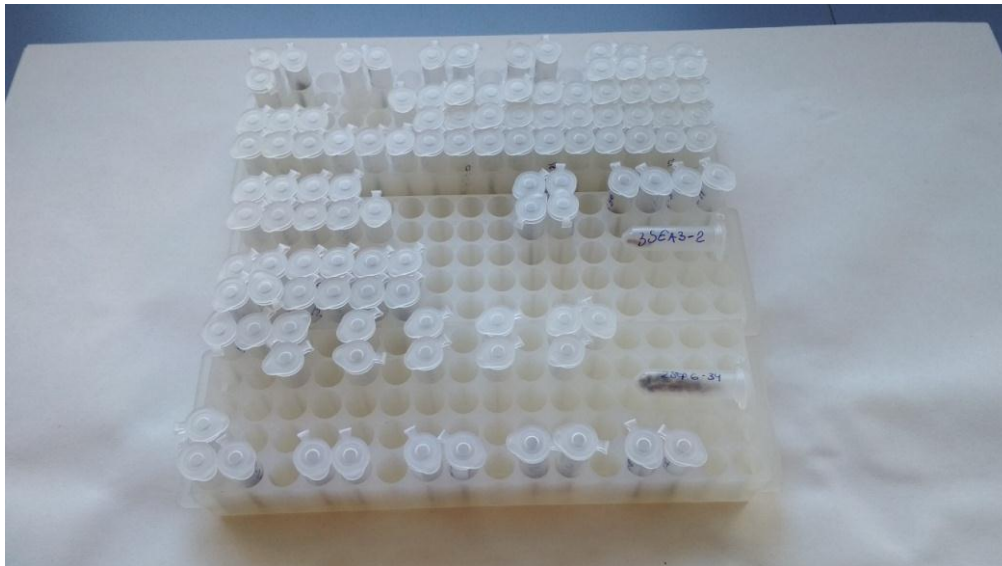


Figura 19: Almacenaje de los aquenios obtenidos en el recuento.

4.5.2 Germinaciones.

El objetivo de este grupo de ensayos fue analizar si los aquenios de *C. aspera* y *C. seridis* requieren o no periodo de latencia con frío antes de su germinación.

Para el experimento se realizaron para cada una de las especies, 7 lotes de 15 aquenios (tabla 4) usando tubos Eppendorf de 1,5 ml de volumen, con lo que se obtiene un total de 14 tubos y 210 aquenios.

Tabla 9: Número de aquenios por lote.

<i>C.aspera</i>	T0	T1	T2	T3
A (Sin frío)	15	15	15	15
B (Con frío)		15	15	15

<i>C. seridis</i>	T0	T1	T2	T3
A (Sin frío)	15	15	15	15
B (Con frío)		15	15	15

Como se puede observar en la tabla 9, se realiza la germinación en cuatro momentos diferentes, T0, T1, T2 Y T3.

- T0. Se germinan los achenios en el mismo momento de la recolección.
- T1. Se germinan los achenios después de pasar 10 días en frío.
- T2. Se germinan pasados 20 días.
- T3. Se germinan los achenios en frío a los 30 días de la recolección.

Aplicando los protocolos de limpieza y germinación que ya se conocían de trabajos anteriores (González, 2014) se fueron colocando a germinar todos los lotes (Figura 20).

Protocolo de desinfección.

1. Enjuague por inmersión en 20 ml de agua destilada durante 10 minutos.
2. Inmersión en 20 ml de agua destilada con disolución de un 1 ml de Lejía (Hipoclorito sódico) durante 5 minutos.
3. Aclarado por inmersión en 20 ml de agua destilada durante 10 minutos.

Protocolo de germinación.

1. Hidratación de los achenios durante 24 horas en 20 ml de agua destilada.
2. Seccionado del achenio por la mitad para facilitar el crecimiento del embrión y los cotiledones.
3. Colocación en placas Petri con tres discos de papel de fieltro y 6 ml de agua destilada.
4. Colocar a temperatura ambiente y luz natural.



Figura 20: útiles y preparación de los primeros lotes. *C. seridis*.



4.5.3 Cronología de las germinaciones.

Las germinaciones de los lotes se realizaron siguiendo el protocolo marcado y tratando de no variar los días que cada lote tenía que permanecer en frío, con lo que los días que se realizaron las germinaciones se pueden ver a continuación.

Tabla 10: Cronología de las germinaciones

	30-may	31-may
<i>C. aspera</i>	Hidratación	germinación
<i>C. seridis</i>	Hidratación	germinación
	08-jun	09-jun
<i>C. aspera</i>	Hidratación	germinación
<i>C. seridis</i>	Hidratación	germinación
	19-jun	20-jun
<i>C. aspera</i>	Hidratación	germinación
<i>C. seridis</i>	Hidratación	germinación
	29-jun	30-jun
<i>C. aspera</i>	Hidratación	germinación
<i>C. seridis</i>	Hidratación	germinación

4.6 Tratamiento estadístico de los datos.

Para la realización del análisis estadístico de los datos, se empleó el software *Statgraphics Centurion*, que permite utilizar muchas herramientas de manera sencilla.

4.6.1 Estadística descriptiva.

Un paso previo al cálculo estadístico es la estadística descriptiva. Para esto se calculó medias y desviaciones estándar para estadísticos de tendencia central y varianza y error estándar para medidas de variabilidad.

4.6.2 Análisis de los datos.

Para realizar el análisis de los datos, se determinó en primer lugar la normalidad de los datos empleando el test de Shapirowilk. Este test permite saber si se puede aplicar un análisis multivariante tipo ANOVA o se debe aplicar otro tipo de análisis más restrictivo con los datos, como sería Kruskal-Wallis. Ambos análisis se emplean para ayudar a interpretar los datos basándose en si la variación de los tratamientos con respecto a los resultados hay significación o por el contrario no existe una variabilidad marcada.

5. Resultados y discusión de los resultados.

5.1 Ensayos previos.

Para llegar a encontrar un método de emasculación que no causara daños en los capítulos y fuera asumible el volumen de trabajo, se hicieron varias pruebas fuera de la zona protegida del Parque Natural antes de realizar los trabajos de campo experimentales.

- 1º. Se recortaron las brácteas del involucreo del capítulo para comprobar si el crecimiento era más rápido y se podía emasculación más flores en una sola vez.
- 2º. Se extirpó la punta de los capítulos para, de esta forma las primeras flores ya nacieran sin estambres (Figura 21).
- 3º. Se seleccionaron capítulos que se encontraban en un estadio juvenil y en los cuales apenas habían crecido 5 ó 6 flores para empezar a emasculación.



Figura 21: detalle de recorte de brácteas y punta del capítulo.

La técnica más efectiva se vio que era la 3ª ya que en las anteriores muchos de los capítulos se deterioraban demasiado, expulsaban grandes cantidades de calosa o directamente eran abortados. También se observó en las pruebas que mediante la extirpación de la flor en un estado juvenil (figura 11) se conseguía quitar de una manera relativamente fácil los estambres mientras que el estigma y estilo todavía no estaba totalmente formado ni maduro. Una vez que al capítulo se le han extirpado todas las flores que en ese día están crecidas, se embolsa para evitar la contaminación mediante agentes polinizadores de cualquier índole.

5.2 Evaluación de la descendencia.

Después de realizar todos los tratamientos y de dejar pasar un periodo de cuajado de las polinizaciones, se recolectaron los capítulos y se realizó el recuento de la descendencia. Meticulosamente se abrió uno a uno anotando el número exacto de achenios que se obtenían y se anotó cuidadosamente los datos en el tubo Eppendorf en que eran guardados para conservar (código del capítulo y Nº de achenios).



Tabla 11: Recuento de achenios en *C. aspera*.

<i>C. aspera</i>	1ª Rep.	2ª Rep.	3ª Rep.	4ª Rep.	TOTAL
Tratamiento A	1	0	0	0	1
Tratamiento B	86	43	17	65	211

Tabla 12: Recuento de achenios en *C. seridis*.

<i>C. seridis</i> .	1ª Rep.	2ª Rep.	3ª Rep.	4ª Rep.	TOTAL
Tratamiento A	127	124	12	170	433
Tratamiento B	190	180	158	202	730

Tabla 13: Recuento de achenios obtenidos de polinización abierta.

Especie	Nº Capítulos	Nº achenios.
<i>C. aspera</i>	24	228
<i>C. seridis</i>	19	307

5.3 Centaurea aspera L.

C. aspera, es una especie con carácter alógamo, con lo que únicamente se va a poder determinar la posible contaminación polínica que provenga desde el exterior, ya sea por manipulación o por agentes polinizadores.

5.3.1 Tratamiento A.

El primer paso para empezar a ver los resultados es realizar el estudio de la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-wilk.

Tabla 14: Test de normalidad Shapiro-wilk del número de achenios en *C. aspera*.

Prueba	Tratamiento.	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	A	0,210792	2,58E-12
Estadístico W de Shapiro-Wilk	B	0,94289	0,209141

Como se puede ver en la Tabla, los valores de tratamiento A indican que no son normales, pero en cambio en el tratamiento B sí. A continuación, se pueden ver los histogramas donde se describe la curva de normalidad para cada serie de datos (Fig. 22).

En 24 capítulos emasculados y sin polinizar (Tratamiento A) de *C. aspera* solo se obtuvo un único achenio (Tabla 11). Este resultado nos indica que la contaminación polínica con polen externo al capítulo manipulado es muy baja en *C. aspera*.

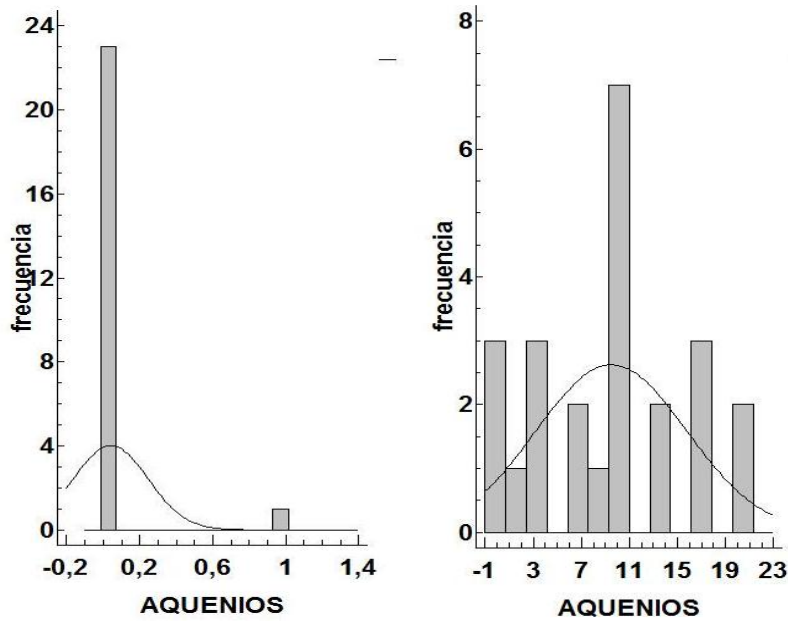


Figura 22: Histogramas y test de normalidad Shapiro-wilk (izda. Tratamiento A, Dcha. Tratamiento B).

5.3.2 Comparación entre tratamientos.

Tabla 15: Estadístico KRUSKAL-WALLIS para los tratamientos A y B.

Trat.	N	Media	Desv. St.	Sesgo	Curtosis	LSD	P-Shapiro	F-ratio	P-value
A	24	0,04167	0,204124	9,79796	24	a	2,58E-12	51,21	2,50E-08
B	23	9,17391	6,19129	0,17081	-0,846529	b	0,209141		
Total	47	4,51064	6,29656	3,1545	-0,029868				

Existe una marcada diferencia significativa entre el número de capítulos obtenidos en el tratamiento A (0.0417) y el tratamiento B (9.17391) (p valor = 2.5×10^{-8}) (Tabla 15, Fig. 23). Este resultado nos está indicando que, en flores previamente emasculadas, si posteriormente se añade polen de la misma especie, pero de otro individuo, se produce la fecundación y consecuentemente la formación de achenios. Es decir, la técnica de emasculación no inhabilita las flores.

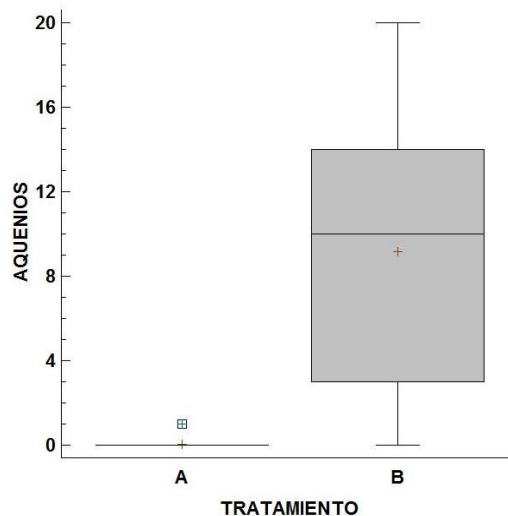


Figura 23: Gráfico Box whisker tratamientos A y B para *C. aspera*.



5.3.3 Polinización abierta.

Tabla 16: Estadístico ANOVA para los tratamientos B y D.

Trat.	N	Media	Desv. St.	Sesgo	Curtosis	LSD	F-ratio	P-value
B	23	9,17391	6,19129	0,17081	-0,846529	a	0,04	0,8463
D	24	9,5	5,25853	1,15666	-0,568058	a		
Total	47	9,34043	5,67327	0,721125	-1,01749			

El tratamiento D (polinización abierta sin manipulación) sirve para comparar el número de aquenios obtenidos mediante emasculación y polinización forzada, con el número de aquenios que se obtienen naturalmente mediante los polinizadores en polinización abierta.

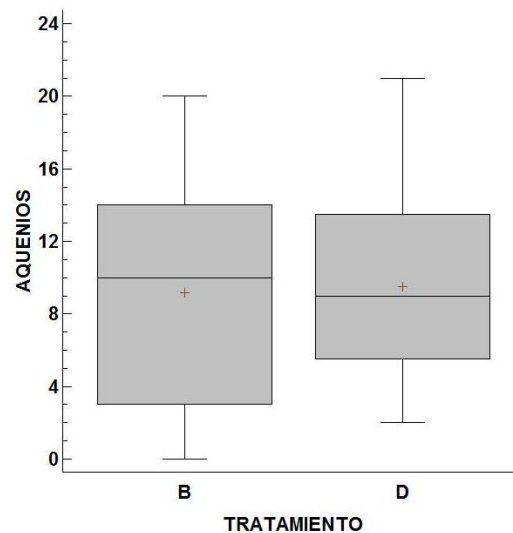


Figura 24: Gráfico Box whisker tratamientos B y D para *C. aspera*.

No se encuentran diferencias significativas entre el tratamiento B (9,17 aquenios) con el tratamiento D (9,5 aquenios) (p valor = 0.85) (tabla 15, Fig. 24). Por lo tanto la técnica de emasculación y posterior polinización produce un número de aquenios similar al que se produciría mediante polinización abierta. Este resultado nos está indicando que la técnica de emasculación no disminuye la viabilidad de las flores en porcentaje significativo.

5.3.4 Comparación entre repeticiones.

Tabla 17: Estadístico ANOVA para las repeticiones para *C. aspera*.

Trat.	N	Media	Desv. St.	Sesgo	Curtosis	LSD	F-ratio	P-value
1	6	14,3333	3,7238	0,478988	-0,289502	c	4,64	0,0143
2	6	7,16667	3,71035	-0,16119	-1,18993	ab		
3	5	3,4	4,5607	1,4348	1,10585	a		
4	5	11	7,96869	-0,33826	-0,4319	bc		
Total	22	9,13636	6,3343	0,20137	-0,926293			

Encontramos diferencias significativas entre las diferentes repeticiones (p valor = 0.0143) (tabla 17, Fig. 25). La reducción del número de aquenios en la repetición 3 pudo ser debida a un incorrecto manejo de los machos donantes. En este caso los machos se conservaron a temperatura ambiente durante 24 horas, ya recolectados de la planta origen. Esta recolección

previa parecíamejorar la cantidad de polen disponible, pero pudo alterar la capacidad germinativa del mismo.

Por lo tanto, es muy posible que la disminución que se observa en las repeticiones 2 y 3 en las fecundaciones pudiera ser debida a que el polen en esta repetición no fuera fértil.

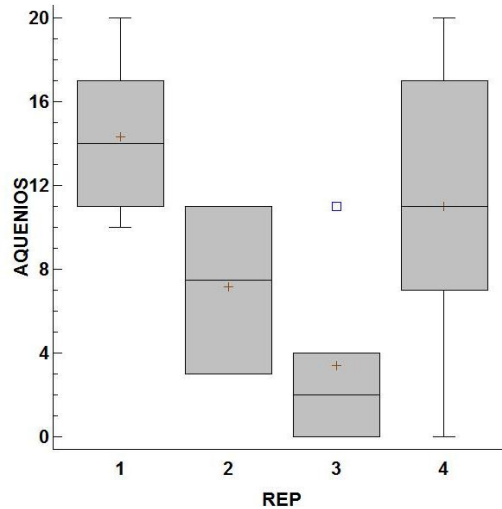


Figura 25: Gráfico Box whisker para las repeticiones del tratamiento B.

5.4 *Centaurea seridis* L.

La condición de esta especie es totalmente diferente a la anterior, ya que ésta al ser autógama se puede medir un parámetro más, que es la contaminación interna que se pueda producir.

5.4.1 Resultados del tratamiento A.

Al igual que se ha hecho sobre *C. aspera* se realizará el test de normalidad para las series de datos tanto del tratamiento A como del B.

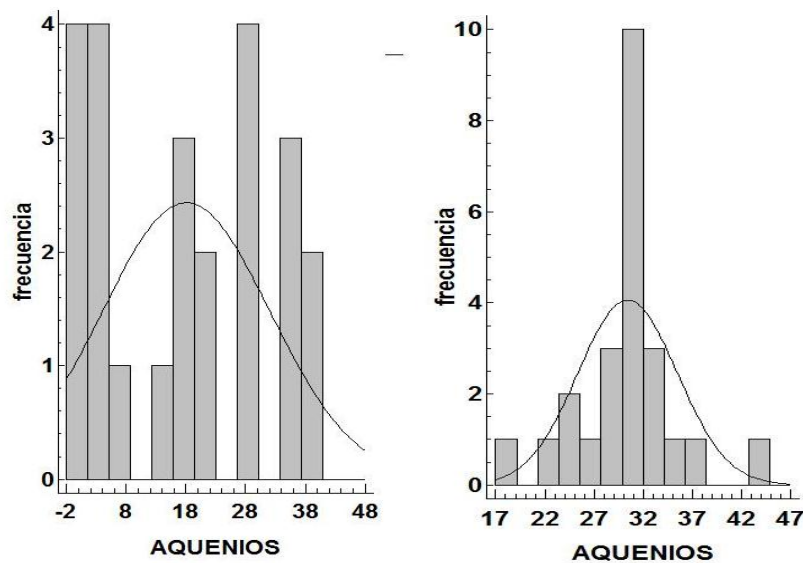


Figura 26: Histogramas test de normalidad Shapiro-wilk (izda. Tratamiento A, Dcha. Tratamiento B).



Como se puede observar en el gráfico, los datos del tratamiento a no corresponden con una distribución normal al contrario de lo que se puede ver en el tratamiento B.

Tabla 18: Test de normalidad Shapiro-wilk del número de achenios en *C. seridis*.

Prueba	Tratamiento	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	A	0,901442	0,022169
Estadístico W de Shapiro-Wilk	B	0,969563	0,656192

El tratamiento A, emasculación sin polinización, en *C. seridis* produjo un total de 433 achenios en 24 capítulos (tabla 12). El resultado esperado era de cero achenios. Este resultado pone de manifiesto que en esta especie autógena es prácticamente imposible evitar la contaminación polínica proveniente del polen del mismo capítulo en el momento de la manipulación.

5.4.2 Comparación entre tratamientos.

Tabla 19: Estadístico KRUSKAL-WALLIS para los tratamientos A y B.

Trat.	N	Media	Desv. St.	Sesgo	Curtosis	LSD	P-Shapiro	F-ratio	P-value
A	24	18,0417	14,0604	0,11701	-1,54329	a	0,022169	16,46	3,14E-03
B	24	30,4167	5,05549	0,14498	1,22955	b	0,656192		
Total	48	24,2292	12,1799	-2,4280	-0,59214				

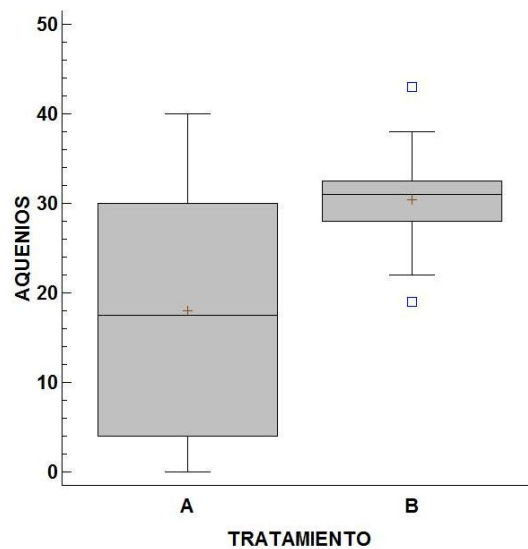


Figura 27: Gráfico Box whisker tratamientos A y B para *C. seridis*.

Existen diferencias significativas entre el tratamiento A y el tratamiento B (p valor = 3,14 e-3) (Tabla 19, Fig. 27). Mientras que en el tratamiento B todos los capítulos presentan un elevado número de achenios (Fig. 27), en el tratamiento A hay una mayor dispersión de los datos, esto se traduce en que hay capítulos con pocos achenios y capítulos con muchos achenios (Fig. 27). Este resultado indica que dependiendo de cómo manejemos los capítulos al emascularse se podrá evitar en mayor o menor medida la contaminación polínica causada por el polen del propio capítulo manipulado (dispersión del número de achenios en el tratamiento A).

5.4.3 Comparación con la polinización abierta (Tratamiento D).

Tabla 20: Estadístico ANOVA para tratamientos B y D.

Trat.	N	Media	Desv. St.	Sesgo	Curtosis	LSD	F-ratio	P-value
B	24	30,4167	5,05549	0,14498	1,22955	a	2,12465	0,107
D	19	16,1579	3,46832	-0,10498	-0,81168	b		
Total	43	24,1163	8,3956	0,285146	-1,34812			

Comparando los datos que se tienen del tratamiento B frente a los datos de una polinización natural y abierta, se puede interpretar los siguientes resultados.

- Después de haber realizado la emasculación y la posterior polinización, se obtiene un número muy elevado de aquenios, incluso superior a los obtenidos por polinización abierta.
- El capítulo no se ve dañado después de realizar la emasculación de las flores.
- Existen diferencias significativas entre los dos tratamientos (p valor = 0.107) (Tabla 20, Fig. 28). Se puede decir que en la polinización abierta quedan flores sin polinizar o todas las polinizaciones no llegan a formar aquenio.

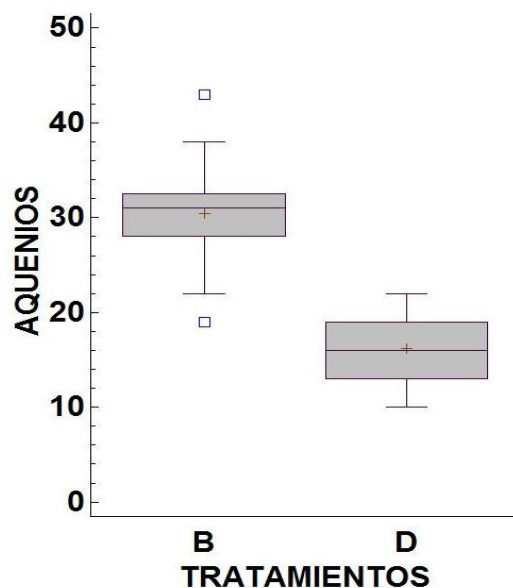


Figura 28: Gráfico Box whisker tratamientos B y D para *C. seridis*.

5.4.4 Comparación entre repeticiones en el tratamiento B

Tabla 21: Estadístico ANOVA para las repeticiones del tratamiento B de *C. seridis*.

Rep.	N	Media	Desv. St.	Sesgo	Curtosis	LSD	F-ratio	P-value
1	6	31,6667	2,42212	-0,5583	-0,57141	ab	2,8	0,0664
2	6	30	4,3359	-0,06625	-0,572091	ab		
3	6	26,3333	5,08593	-0,4277	-0,636193	a		
4	6	33,6667	5,68038	1,04681	-0,028494	b		
Total	24	30,4167	5,05549	0,14498	1,22955			



En este apartado se analiza las diferencias del número de aquenios obtenidos en el tratamiento B para cada una de las repeticiones (Tabla 21, Fig. 29). La repetición 1 y 2 mantienen unas medias muy cercanas entre si y entre las cuales no hay diferencias significativas. Por el contrario sí que se observa diferencias significativas entre la repetición 3 y la 4, siendo la 3 la que menor número de aquenios ha producido y la 4 la que mayor.

La repetición 4 es la más productiva y esto pudo ser debido a la localización. Las plantas que se usaron en ésta repetición, estaban muy cercanas al muro del hotel "Sidi Saler". Esta localización, que las dejaba protegidas del viento y orientadas al sureste pudo acentuar las condiciones de termicidad.

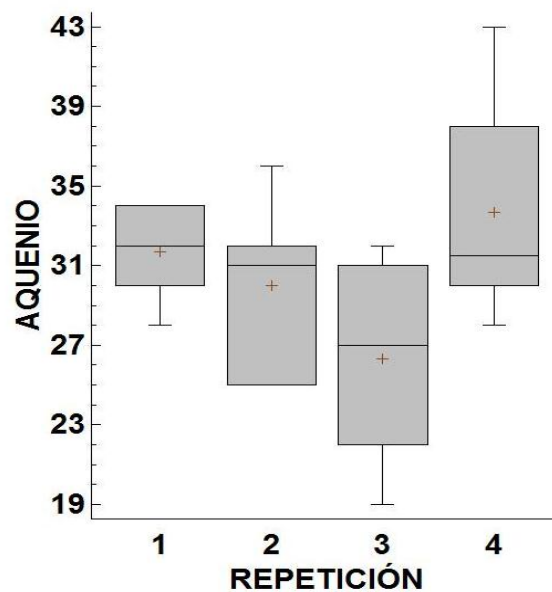


Figura 29: Gráfico Box whisker para las repeticiones del tratamiento B.

La repetición 3 es la que menor número de aquenios ha obtenido y con mayor dispersión.

5.4.4 Comparación entre repeticiones en el tratamiento A

Tabla 22: Estadístico ANOVA para las repeticiones del tratamiento B de *C. seridis*.

Rep.	N	Media	Desv. St.	Sesgo	Curtosis	LSD	F-ratio	P-value
1	6	21,1667	14,2747	-0,54256	-0,644602	a	6,7	0,026
2	6	20,6667	10,8197	-0,62065	0,299807	b		
3	6	2	2,44949	0,612372	-1,08333	b		
4	6	28,3333	11,2546	-0,64301	-0,864553	b		
Total	24	18,0417	14,0604	0,11701	-1,54329			

Al comparar las repeticiones en el tratamiento A se observandiferencias significativas (p valor = 0.026) (Tabla 22, Fig. 30).De nuevo la repetición 3 es la repetición con menor número de aquenios. .

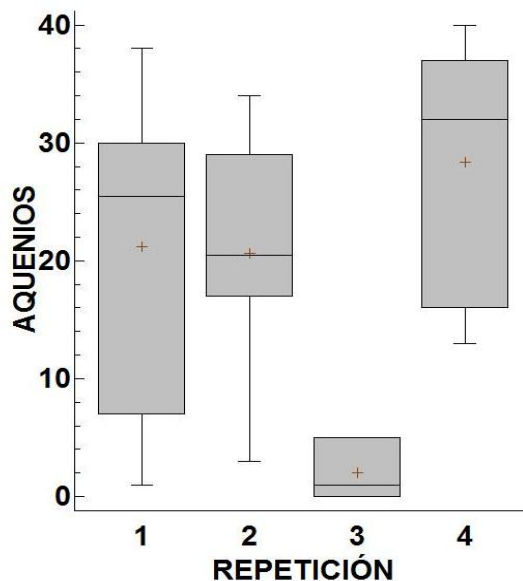


Figura 30: Gráfico Box whisker para las repeticiones del tratamiento A.

En este caso (tratamiento A) el número de aquenios esperado es de cero ya que se emascula y no se poliniza, por lo tanto, la aparición de aquenios indica contaminación polínica. Por ello, la repetición 3 es la menos contaminada. En este caso la disminución del número de aquenios no se puede relacionar al manejo de los capítulos donantes, ya que en este tratamiento no se realizan polinizaciones forzadas. Posiblemente esta disminución de la contaminación en la repetición 3 está relacionada a que es la primera repetición que se realizaba por la mañana, y factores como la presencia de rocío, temperaturas suaves, y ausencia de cansancio de los manipuladores realizando una emasculación cuidadosa que disminuyó el porcentaje de contaminación.

Tabla 23: Medias para las repeticiones de los ensayos.

Tratamiento A			Tratamiento B		
REPETICIÓN	Casos	Media	REPETICIÓN	Recuento	Promedio
1	6	21,17	1	6	31,67
2	6	20,67	2	6	30
3	6	2	3	6	26,33
4	6	28,33	4	6	33,67
Total	24	18,04	Total	24	30,42

Al observar el número medio de capítulos formados en cada caso (Tabla 20), vemos que se producen 30 capítulos de media con polinización forzada (B) y 18 capítulos de media solo emasculando (A). Por lo tanto, tenemos un porcentaje de contaminación medio del 60% de las flores, con fuertes oscilaciones entre repeticiones.

5.5 Evaluación de las germinaciones.

En este apartado se puede realizar dos posibles comparaciones, la primera entre tratamientos y la segunda observando si existe variación alguna al dejar transcurrir los tiempos establecidos para el estratificado en frío.



5.5.1 Comparación entre tratamientos.

Para ambas especies se tienen dos tratamientos: sin frío (tratamiento A) y con frío (tratamiento B).

Tabla 24: Resumen de resultados de las pruebas de germinación.

<i>C. aspera</i> L.				<i>C. seridis</i> L.			
ID. Placa Petri	Trat.	Tiempo	Germinación	ID Placa Petri	Trat	Tiempo	Germinación
1SASP	A	T0	14	1SSER	A	T0	13
2SASP	A	T1	13	2SSER	A	T1	14
3SASP	A	T2	12	3SSER	A	T2	12
4SASP	A	T3	15	4SSER	A	T3	14
2FASP	B	T1	13	2FSER	B	T1	15
3FASP	B	T2	14	3FSER	B	T2	12
4FASP	B	T3	15	4FSER	B	T3	13

Como se puede ver en la tabla y los gráficos LSD, no existendiferencias significativas entre las medias de los tratamientos (con y sin frio). Este resultado indica que las especies no presentan dormancia ni necesidades de frio para poder germinar. Los aquenios recolectados en una temporada se pueden germinar en esa misma temporada sin necesidad de ningún tratamiento.

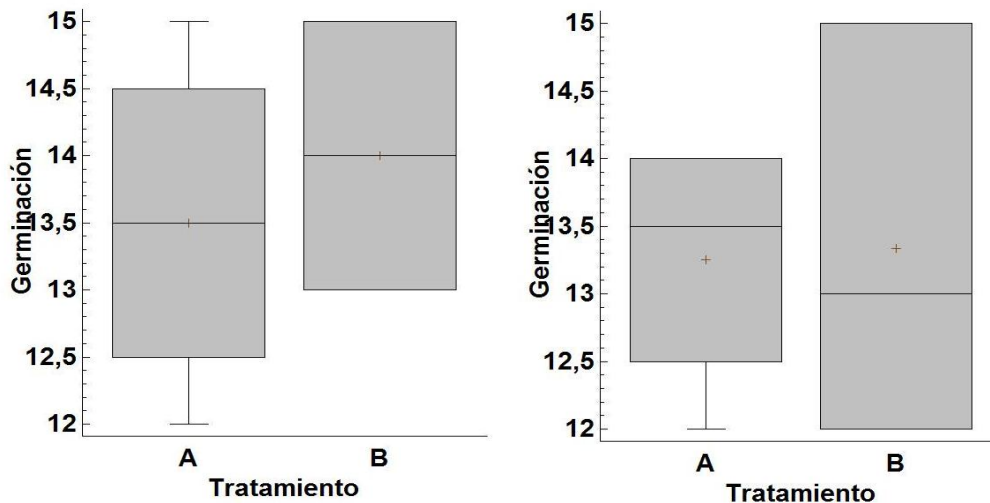


Figura 31: Gráfico Box whisker para los tratamientos de las germinaciones (izda. *C. aspera* y dcha. *C. seridis*).

5.5.2 Tiempos de estratificado.

Observando simplemente los datos obtenidos que se muestran en la tabla 22 se puede determinar que el tiempo que transcurren las semillas en la cámara refrigerada, no es determinante para la viabilidad de la germinación. Este resultado refuerza que los aquenios de las especies estudiadas no presentan dormancia.



Tabla 25: Resultados de las germinaciones para cada una de tiempos de estratificado.

	<i>C. aspera</i> L.		<i>C. seridis</i> L.	
	A	B	A	B
T0	14		13	
T1	13	13	14	15
T2	12	14	12	12
T3	15	15	14	13

6. Conclusiones

Para *C. aspera* la técnica de emasculación es totalmente válida, ya que no se producen contaminaciones externas y el número de achenios obtenidos en la polinización forzada (tratamiento B) es similar al de la polinización abierta. La técnica de emasculación no daña las flores.

En el caso de *C. seridis*, la emasculación de nuevo no daña las flores obteniéndose numerosos achenios. Pero en este caso al ser autógama, el nivel de contaminación debida a polen del propio capítulo es muy alto (60% de media). En algunas repeticiones se han conseguido niveles de contaminaciones bajos, lo que nos indica que se necesita levada destreza y cuidado en la realización de la emasculación para reducir al máximo la contaminación polínica. En este caso las operaciones deben realizarse de la manera más cuidadosa posible.

La germinación de ambas especies es elevada aplicando el protocolo de germinación que estableció González, A. (González, A. 2016) con un 90% de éxito. Además, queda demostrado que el estratificado en frío no causa ningún efecto en la viabilidad germinativa de los achenios. Los achenios no presentan dormancia, ni necesidades de horas frío.



7. Referencias Bibliográficas.

- Castro, S.; Loureiro, J.** (2014). El papel de la reproducción en el origen y la evolución de las plantas poliploides. *Revista Ecosistemas*, 23(3), 67–77. <https://doi.org/10.7818/re.2014.23-3.00>
- Dittrich, M.** (1977). *Cynareae-systematic review*. In: Heywood, V.H., Harborne J.B. & Turner B.L. (eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae*: 999-1016. Academic Press.London& New York.
- Font, M.** (2007). *Poliploidia, filogènia i biogeografiaen Centaurea L. seccióAcrocentron*(Cass.) DC. Tesis doctoral. Sección Botánica, Departamento de Productos Naturales, Biología vegetal y edafología. Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona
- Ferriol, M.; Garmendia, A.; González, A; Merle, HB.** (2015). Alloamy-Autogamy Switch Enhance Assortative Mating in the Allotetraploid *Centaurea seridis* L. Coexisting with the Diploid *Centaurea aspera* L. and Triggers the Asymmetrical Formation of Triploid Hybrids. *PLoS ONE*. 10(10):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0140465
- Ferriol, M.; Merle, HB.; Garmendia, A.** (2014). Microsatellite evidence for low genetic diversity and reproductive isolation in tetraploid *Centaurea seridis* (Asteraceae) coexisting with diploid *Centaurea aspera* and triploid hybrids in contact zones. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 176(1):82-98. doi:10.1111/boj.12194
- Ferriol, M.; Garmendia, A.; Ruiz, J.; Merle, HB.; 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(1):86-100. doi:10.1080/11263504.2012.727878
- Fraga, P.; Garcia, O.** (2004). Notes i contribucions al coneixement de la flora de Menorca (VI). *Boll. Soco Hist. Nat. Balears*, 47: 143-152. ISSN 0212-260X. Palma de Mallorca.
- Fraga, P.; Mascaró, C.; Carreras, D.; Garcia, Ò.; Pallicer, X.; Truyol, M**(2004). *Catàleg de la flora vascular de Menorca*; InstitutMenorquí d'Estudis 368 p.: 118
- García, E. C.** (2013). Mecanismos de especiación ecológica en plantas y animales. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 14(2), 7–13.
- Garcia-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. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(2), 377-394. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.03.010>
- Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Mozaffarian, V. & Ilarslan, R.** (2000). The natural delimitation of *Centaurea* (Asteraceae-Cardueae): ITS sequence analysis of the *Centaurea jaceae* group. *Pl. Syst. Evol.* 223: 185-199.



- Garmendia, A.; Ferriol, M.; Juarez, J.; Zajac, A.; Kaluzny, K.; MerleFarinós, HB.** (2015). A rare case of a natural contact zone in Morocco between an autopolyploid and an allopolyploid of *Centaurea aspera* with sterile tetraploid hybrids. *Plant Biology*. 17(3):746-757. doi:10.1111/plb.12284
- González Delgado, A.** (2016). Estudio del nivel de ploidía de *Centaurea aspera* subsp. *gentilii* (Braun-Blanq. & Maire) Dobignard a lo largo de su área de distribución marroquí. Correlación con la localización geográfica y las características del hábitat. <http://hdl.handle.net/10251/69221>.
- Gomez, M.; Garmendia, A.; Ferriol, M.** (2016). Análisis de la distribución espacial en el complejo poliploide de *Centaurea aspera* (2n) - *C. subdecurrens* (3n) - *C. seridis* (4n) en sus zonas de contacto. Universitat Politècnica de València.
- Hellwig, F. H.** 2004. Centaureinae (Asteraceae) in the Mediterranean-History of ecogeographical radiation. *Plant Systematics and Evolution* 246: 137-162.
- Invernon, V.; Devesa, J. A.; López, E.** (2013). Contribución al conocimiento cariológico del género *Centaurea* L. (Asteraceae) en la Península Ibérica. Sect. *Seridia* (Juss.) DC. *Acta Botánica Malacitana* 38: 41-47.
- Invernon, V.; Devesa, J. A.** (2013). Revisión taxonómica de *Centaurea* Sect. *Seridia* (Juss.) DC. (Asteraceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Acta Botánica Malacitana* 38: 49-102.
- López, E. & Devesa, J. A.** (2011). Revisión taxonómica del complejo *Centaurea alba* L. (Asteraceae) en la Península Ibérica. *Collectanea Botanica*, 30(0), 37-52. <https://doi.org/10.3989/collectbot.2011.004>
- Merle, HB.; Garmendia, A.; Ferriol, M.** (2010). Nuevo híbrido del género *Centaurea* L. (Compositae) sect. *Seridia* (Juss.) Czerep. *Flora Montibérica*. 44:66-71. <http://hdl.handle.net/10251/89689>
- Mateo, G., & Crespo, M. B.** (2008). Novedades y consideraciones sobre el género *Centaurea* L. en la flora valenciana. Mateo Sanz, Gonzalo; Crespo Villalba, Manuel Benito. Novedades Y Consideraciones Sobre El Género *Centaurea* L. En La Flora Valenciana. En: *Flora Montiberica*, 2008, No. 40: 50-59. Retrieved from <http://roderic.uv.es/handle/10550/45393>
- Okie, W.R. and Weinberger, J.H.** (1996). Plums. p. 559-607. En: Janick, J. y Moore, J. N (eds). *Fruit Breeding*. Vol. I. Tree and tropical fruits. John Wiley & Sons. New York.
- Panero J.L.; Funk V.A.** (2008). The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 757-782.
- Sitte, P.; Weiler E.W.; Kadereit J.W.; Bresinsky, A.; Körner, C.** (2008). *Strasburger*. Tratado de botánica. 35a ed. Omega. Barcelona.
- Susanna, A. & Garcia-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.



Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Soltis, D.E. & Soltis, P.S.(1995). Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) base on ITS sequences. American Journal of Botany. Official Publication of the Botanical Society of America 82: 1056-1068.

Páginas web.

Anthos. Sistema de información sobre las plantas de España. (s. f.). Recuperado 19 de abril de 2017, a partir de <http://www.anthos.es/>

Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. (s. f.). Recuperado 19 de abril de 2017, a partir de <http://www.floraiberica.es/PHP/cientificos2.php?gen=Centaurea&espe= &infrank= &infra= &autabre=L.&familia=Compositae>

Mejora de plantas autógamias. Universidad de Navarra. (s. f.) Recuperado 30 de abril de 2017, http://www.unavarra.es/genmic/genetica%20y%20mejora/mej_autogamas/mej_autogamas.pdf

Worldwide Bioclimatic Classification System, 1996-2017, S.Rivas-Martinez & S.Rivas-Saenz, Phytosociological Research Center, Spain. Recuperado 19 abril de 2017 a partir de <http://www.globalbioclimatics.org>

8. Anexos.