

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural



TRABAJO FINAL DE MÁSTER  
CURSO 2015/2016

**ESTUDIO DEL NIVEL DE PLOIDÍA DE *Centaurea aspera* subsp. *gentilii*  
(Braun-Blanquet & Maire) Dobignard A LO LARGO DE SU ÁREA DE  
DISTRIBUCIÓN MARROQUÍ. CORRELACIÓN CON LA LOCALIZACIÓN  
GEOGRÁFICA Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL HÁBITAT.**

**Autora:**

**ANA GONZÁLEZ DELGADO**

**Titulación:**

**MÁSTER EN INGENIERÍA DE MONTES**

**Tutor:**

**HUGO BASILIO MERLE FARINÓS**

**Cotutor:**

**ALFONSO GARMENDIA SALVADOR**

**Valencia, Julio de 2016**

## Datos del trabajo final de máster

Título del TFG:	Estudio del nivel de ploidía de <i>Centaurea aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> (Braun-Blanq. & Maire) Dobignard a lo largo de su área de distribución marroquí. Correlación con la localización geográfica y las características del hábitat.
Autora:	Ana González Delgado
Tutor académico:	Hugo Basilio Merle Farinós
Cotutor:	Alfonso Garmendia Salvador
Localidad y fecha:	Valencia, Julio de 2016

## Resumen

El presente trabajo se centra en el estudio del nivel de ploidía del taxón *Centaurea aspera* subsp. *gentilii* en la costa atlántica marroquí. Este taxón se considera a priori un autoetraploide (AAAA) del diploide *C. aspera sensu lato* (AA) ya que expresa exactamente el mismo fenotipo, cambiando solo su dotación cromosómica y área fitogeográfica. En un estudio previo en el que se muestrearon 81 individuos en poblaciones marroquíes: ZA (*Zaouiat el Kourati*), CG (*Cape Ghir*), TM (*Tamri*), TK (*Takat*), WM (*Oued Massa*) y SM (*Sous Massa*) aparecieron pequeños porcentajes de 2x y 3x entre los tetraploides (4x). Tras estos resultados se planificó un estudio exclusivamente citométrico de las poblaciones marroquíes y su posible correlación del nivel de ploidía con las características de los hábitats. Así pues, en el presente trabajo se analiza por citometría de flujo 375 muestras tomadas y georreferenciadas al suroeste de la costa atlántica marroquí en las poblaciones de ZA, TM, TK, SM y una nueva población prospectada al norte de ZA, CB (*Cap Beddouza*). Además, se comprueba la posible correlación de los distintos citotipos con el gradiente latitudinal Norte-Sur y con la caracterización ecológica de sus hábitats. Las características de los hábitats de las poblaciones muestreadas se evaluaron mediante la identificación de especies acompañantes, evaluación de distintos parámetros poblacionales (índice de abundancia de Braun-Blanquet y tipo de distribución geográfica), descripción de la parcela y el paisaje, orografía, grado de antropización (turismo, presión ganadera y actividad agrícola).

Los análisis de las 375 muestras se realizaron consecutivamente en el tiempo y durante un periodo corto, lo que permitió una puesta a punto metodológica común, pudiéndose comparar los resultados entre individuos. Se realizaron repeticiones de aquellos análisis dudosos, llegándose a realizar en algunos casos hasta 3 análisis por muestra para confirmar los resultados. Tras los análisis de citometría todos los individuos muestrados resultaron tetraploides (4x). Estos resultados rechazan la hipótesis inicial sobre la existencia de citotipos 2x, híbridos 3x u otros niveles de ploidía (5x, 6x). Todo indica la existencia de una posible distribución alopatrica de la especie *C. aspera* entre los citotipos diploide (2x) de la Península Ibérica y tetraploide (4x) de la costa oeste de África con una discontinuidad en el Estrecho de Gibraltar. Los resultados de caracterización ecológica dejaron ver que no existe correlación de los distintos citotipos con el gradiente latitudinal Norte-Sur, ni con características determinadas de los hábitats.

## Palabras clave:

*Centaurea aspera* subsp. *gentilii*, poliploidía, autotetraploide, hibridación, zonas de contacto.

## Resum

El present treball se centra en l'estudi del nivell de ploidia del tàxon *Centàurea aspera* subsp. *gentilii* en la costa atlàntica marroquina. Este tàxon es considera a priori un autoetraploide (AAAA) del diploide *C. aspera sensu lato* (AA) ja que expressa exactament el mateix fenotip, canviant només la seua dotació cromosòmica i àrea fitogeogràfica. En un estudi previ en què es mostrejaren 81 individus en poblacions marroquines: ZA (*Zaouiat el Kourati*), CG (*Cape Ghir*), TM (*Tamri*), TK (*Takat*), WM (*Oued Massa*) i SM (*Sous Massa*) van aparèixer xicotets percentatges de 2x i 3x entre els tetraploides (4x). Després d'estos resultats es va planificar un estudi exclusivament citomètric de les poblacions marroquines i la seua possible correlació del nivell de ploidia amb les característiques dels hàbitats. Així doncs, en el present treball s'analitzen per citometria de flux 375 mostres preses i georreferenciades al sud-oest de la costa atlàntica marroquina en les poblacions de ZA, TM, TK, SM i una nova població prospectada al nord de ZA, CB (*Cap Beddouza*). A més, comprovar la possible correlació dels distints citotips amb el gradient longitudinal Nord-Sud i amb la caracterització ecològica dels seus hàbitats. Les característiques dels hàbitats de les poblacions mostrejades es van avaluar per mitjà de la identificació d'espècies acompanyants, avaluació de distints paràmetres poblacionals (índex d'abundància de Braun-Blanquet i tipus de distribució geogràfica), descripció de la parcel·la i el paisatge, orografia, grau d'antropització (turisme, pressió ramadera i activitat agrícola).

Les anàlisis de les 375 mostres es van realitzar consecutivament en el temps i durant un període curt, la qual cosa va permetre una posada al punt metodològica comú, podent-se comparar els resultats entre individus. Es van realitzar repeticions d'aquelles anàlisis dubtoses, arribant-se a realitzar en alguns casos fins a 3 anàlisis per mostra per a confirmar els resultats. Després de les anàlisis de citometria tots els individus mostrejats han resultat tetraploides (4x), per tant, aquests resultats rebutgen la hipòtesi inicial sobre l'existència de citotips 2x, híbrids 3x o altres nivells de ploidia (5x, 6x). Tot indica l'existència d'una possible distribució al·lopàtrica de l'espècie *C. aspera* entre els citotips diploide (2x) de la Península Ibèrica i tetraploide (4x) de la costa oest d'Àfrica amb una discontinuïtat en l'Estret de Gibraltar. Els resultats de caracterització ecològica van deixar veure que no hi ha correlació dels distints citotips amb el gradient longitudinal Nord-Sud, ni amb característiques determinades dels hàbitats.

## Paraules clau

*Centaurea aspera* subsp. *gentilii*, poliploidia, autotetraploide, hibridació, zones de contacte.

## Abstract

This paper focuses on the study of ploidy level of the taxon *Centaurea aspera* subsp. *gentilii* in the Moroccan Atlantic coast. This taxon is considered a priori an autotetraploid (AAAA) of the diploid *C. aspera sensu lato* (AA) because it expresses exactly the same phenotype, changing only its chromosomes and phytogeography area. In a previous study in which 81 individuals were sampled in Moroccan populations: ZA (*Zaouiat el Kourati*), CG (*Cape Ghir*), TM (*Tamri*), TK (*Takat*), WM (*Oued Massa*) and SM (*Sous Massa*), small percentages of 2x and 3x appeared amongst (4x) tetraploids. After these results we planned an exclusively cytometric study of the Moroccan populations and the possible correlation of ploidy level with the characteristics of habitats. Thus, in the present study we analysed 375 samples by flow cytometry. The samples were taken and georeferenced in the southwest of the Moroccan Atlantic coast in populations of ZA, TM, TK, SM and a new prospected to the north of ZA, CB (*Cap Beddouza*) population. Furthermore, we checked the possible correlation of cytotypes with the different latitudinal North-South gradient and ecological characterization of their habitats. The habitats' characteristics of the sampled populations were evaluated by identifying accompanying species, evaluation of various population parameters (abundance index of Braun-Blanquet and type of geographical distribution), plot and landscape description, orography, rates of anthropization (tourism, livestock and agricultural activity pressure).

The analyses of 375 samples were carried out consecutively and for a short period, which allowed making a methodological common fine tuning. The doubtful analyses were repeated and in some cases they were repeated up to 3 times to confirm the results. After cytometric analyses all individuals sampled have resulted tetraploid (4x). Therefore, these results reject the initial hypothesis of the existence of 2x cytotypes, 3x hybrids and other ploidy levels (5x, 6x). Everything indicates the existence of a possible allopatric distribution of *C. aspera* specie between cytotypes, the diploid (2x) of the Iberian Peninsula and tetraploid (4x) on the West coast of Africa with a discontinuity in the Strait of Gibraltar. Ecological characterization results suggest that there is no correlation between different cytotypes and the North-South latitudinal gradient or certain characteristics of the habitat.

## Key words

*Centaurea aspera* subsp. *gentilii*, polyploidy, autotetraploid, hybridization, contact zones.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo y ayuda de varias personas a las que me gustaría dar mi agradecimiento.

En primer lugar, a mis tutores Hugo Merle y Alfonso Garmendia, con quienes he empezado este camino fascinante y me gustaría que continuase hacia adelante. Por compartir su sabiduría y haberme ayudado siempre que lo he necesitado. A la profesora María Ferriol, integrante de este equipo, por prestar su apoyo y disposición en este tiempo.

También agradezco su ayuda, así como sabios consejos a mis compañeros Andrés y María del Departamento de Cultivo de Tejidos del IVIA, que me permitieron trabajar en su laboratorio. Y en especial a Pepe Juárez quien desde fuera continúa aportando conocimiento sobre la materia.

A mi familia, en especial a mi hermana Eva, mi madre Gracia, mis dos pilares fundamentales y a mi novia Julia por estar siempre conmigo y porque todos los días aprendo algo nuevo gracias a ti.

*“Las especies que sobreviven no son las más fuertes, ni las más rápidas, ni las más inteligentes; sino aquellas que se adaptan mejor al cambio.”*

*Charles Darwin.*

## ÍNDICE

## MEMORIA

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
2.	ANTECEDENTES.....	2
2.1	Taxonomía del género <i>Centaurea</i> .....	2
2.1.1	Secciones del género <i>Centaurea</i> .....	3
2.1.2	Taxonomía de la sección <i>Seridia</i> .....	4
2.1.3	Taxonomía de <i>C. aspera</i> y <i>C. seridis</i> en la Península Ibérica y Marruecos.....	5
2.2	Diversidad y evolución en el género <i>Centaurea</i> .....	7
2.3	Zonas de contacto e hibridación entre citotipos del género <i>Centaurea</i> .....	8
2.3.1	Complejos poliploides de <i>Centaurea aspera</i> .....	9
2.4	Estudios preliminares sobre <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> en la costa atlántica marroquí.....	13
3.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	16
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
4.1	Cronología .....	18
4.2	Búsqueda de profesores colaboradores en Marruecos. ....	18
4.3	Ensayos previos para conservación de las muestras .....	18
4.4	Estimación del tamaño muestral .....	19
4.5	Trabajo de campo. ....	20
4.5.1	Muestreo, geolocalización, codificación y etiquetado. ....	20
4.5.2	Toma de datos de caracterización ecológica de los hábitats .....	22
4.6	Trabajo de laboratorio. ....	24
4.6.1	Citometría de flujo para análisis del nivel de ploidía .....	24
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
5.1	Niveles de ploidía de las poblaciones de <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> de la costa atlántica suroeste de Marruecos. ....	26
5.2	Correlación entre citotipos con las condiciones de los hábitats o el gradiente latitudinal. ....	27
5.3	Caracterización de los hábitats en los que se localizan las poblaciones ...	28
5.4	Próximos trabajos .....	30
6.	CONCLUSIONES .....	31
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	32
	ANEXOS.....	39
	PLANOS.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de clasificación taxonómica del género <i>Centaurea</i> . Elaboración propia a partir de Susanna y García-Jacas, 2007. ....	3
<b>Figura 2.</b> Distribución geográfica de los taxones estudiados. Los puntos representan los individuos observados y los daos de la bibliografía de las citas. Las áreas de color blanco representan su distribución aproximada. S/E Fuente: (Garmendia <i>et al.</i> , 2015).....	6
<b>Figura 3.</b> Esquema de complejos poliploides estudiados recientemente y relacionados con <i>C. aspera</i> (Garmendia <i>et al.</i> , 2015; Ferriol <i>et al.</i> , 2015; Ferriol <i>et al.</i> , 2014; Ferriol <i>et al.</i> , 2012; Merle <i>et al.</i> , 2010) relación entre sus taxones e híbridos formados a partir de sus parentales. En gris taxones de la Península Ibérica, en naranja de Marruecos. Fuente: elaboración propia. ....	10
<b>Figura 4.</b> Esquema representativo del continuo de variabilidad morfológica en el tamaño del capítulo de los taxones del complejo poliploide estudiado en la costa atlántica marroquí Elaboración propia a partir de Garmendia <i>et al.</i> , 2015. ....	12
<b>Figura 5.</b> Localización de las 8 poblaciones de <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> muestreadas en el estudio previo de la costa oeste de Marruecos en el año 2013. S/E.....	14
<b>Figura 6.</b> Representación de las proporciones en porcentaje de los distintos citotipos dentro de cada población muestreada en el estudio preliminar de la especie Marroquí <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> .....	14
<b>Figura 7.</b> Ensayo de humedades para conservación de las muestras en bolsas; de izquierda a derecha: sin agua, con agua, con un papel húmedo de 3 cm <sup>2</sup> y con un papel húmedo de 6 cm <sup>2</sup> . ....	19
<b>Figura 8.</b> Nombre y localización de las poblaciones seleccionadas para el muestreo. S/E.....	21
<b>Figura 9.</b> Bolsas de plástico con cierre hermético, nevera portable y placas refrigerantes. ....	21
<b>Figura 10.</b> <i>C. gentilii</i> etiquetada con su correspondiente código y georreferenciada con GPS de precisión. ....	22
<b>Figura 11.</b> Ejemplo de codificación específica de cada individuo muestreado de la especie <i>C. gentilii</i> en Marruecos y significado de los diferentes dígitos que componen el código.....	22
<b>Figura 12.</b> Histograma del preparado nuclear para control de 2x y 4x.....	24
<b>Figura 13.</b> Esquema representativo de los niveles de ploidía de <i>C. aspera sensu lato</i> , centrado en la posiblemente distribución alopátrica entre España y Marruecos y en la zona que falta por prospectar. ....	27
<b>Figura 14.</b> Agrupación de las poblaciones muestreadas de <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> en función de sus diferencias más notables. S/E. ....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación en secciones de la subtribu <i>Centaureineae</i> , en función del tipo polínico y la biogeografía. Donde x: número básico de cromosomas. Elaboración propia a partir de Garcia-Jacas <i>et al.</i> , 2009.....	4
<b>Tabla 2.</b> Comparación de taxones por niveles de ploidía. El color naranja corresponde a los taxones marroquíes, el color blanco a los peninsulares. ....	12
<b>Tabla 3.</b> Número de individuos muestreados y de cada ploidía (2x, 3x, 4x y Pd: ploidía desconocida).....	14
<b>Tabla 4.</b> Ejemplo de cálculos con diferentes tamaños de una muestra (n), la probabilidad resultante de no muestrear ningún 2x (Nn) y de muestrear al menos un 2x (Sn). El color naranja corresponde al tamaño mínimo muestral a partir del cual la probabilidad de no encontrar ninguno es menor a 0,05 .....	20
<b>Tabla 5.</b> Datos en cada población de <i>C.aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> muestreada: nombre de la localidad, código asignado a la población y número de individuos muestreados. ....	21
<b>Tabla 6.</b> Resumen de las variables utilizadas y sus abreviaturas para la caracterización ecológica de las poblaciones muestreadas de <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> en Marruecos.....	23
<b>Tabla 7.</b> Escala de abundancia-dominancia de Braun Blanquet. (Westhoff & van der Maarel, 1978).....	23
<b>Tabla 8.</b> Resumen de las variables más significativas observadas en los hábitats de las poblaciones muestreadas de <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> en Marruecos. Dónde Pcob%: porcentaje de cobertura; Plñ: presencia de leñosas; lab: índice de abundancia; Dgeo: distribución geográfica; Ppl: presencia de plántulas; SuAr: suelo arenoso; RSua: reslieves suaves; Or: orientación; Pte%: porcentaje de pendiente; Mov: movimientos o deposiciones de arena; Vcom: presencia de vías de comunicación; Obr: presencia de obras o infraestructuras; Pers: presencia de personas; Gan: presión ganadera. En el cuerpo de la tabla: - significa presencia afirmativa; * presencia con mayor intensidad; A: distribución agregada; U: distribución uniforme; E: este, O: oeste y NO: noroeste.....	30



## 1. INTRODUCCIÓN

La poliploidía, es decir, la adquisición de más de dos juegos de cromosomas, es una importante fuerza impulsora de la evolución de las plantas (Otto 2007; Soltis & Soltis, 2009). La proporción de plantas angiospermas poliploides varía del 30% al 70% (Bennet, 2004; Pellicer *et al.*, 2010), pero los últimos estudios filogenéticos indican ubicuidad en angiospermas (Jiao *et al.*, 2011).

No está claro si la poliploidía es una ventaja o una desventaja evolutiva, esto depende del momento evolutivo (Parisod *et al.*, 2010) y de los taxones (Madlung, 2013). La importancia ecológica y evolutiva de la multiplicación del genoma, puede analizarse mejor en zonas donde los taxones relacionados por procesos de poliploidización coexisten e interactúan (Lumaret, 1988a; Bretagnolle & Thompson, 1995; Gao *et al.*, 2014).

El género *Centaurea* presenta una amplia diversificación y especiación debido a la frecuencia de fenómenos de disploidía, hibridación y poliploidización (Hellwig, 2004; Romaschenko *et al.*, 2004). A menudo, los taxones diploides y poliploides coexisten en zonas de contacto, dando lugar a la producción de descendencia híbrida. Estos híbridos pueden tener una importante influencia en la dinámica y evolución de complejos poliploides (Petit *et al.*, 1999).

Conocer la diversidad vegetal y toda su variabilidad permite establecer estrategias de gestión, conservación y ordenación de espacios que salvaguarden esta diversidad. En especial *Centaurea aspera* L. presenta un gran número de especies relacionadas, subespecies, citotipos variedades y formas, entre los cuales está presente el alotetraploide *Centaurea seridis* L. y el presumible autotetraploide natural *Centaurea aspera* subsp. *gentilii* (Braun-Blanq. & Maire) Dobignard, en este interesante taxón se centra el contenido el presente trabajo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Taxonomía del género *Centaurea*.

La taxonomía biológica tiene como objetivo la clasificación de los seres vivos. Esta clasificación se intenta hacer siempre que se puede teniendo en cuenta la filogenia, es decir, la reconstrucción de su historia evolutiva. La filogenética es la parte de la biología evolutiva que se ocupa de estudiar las relaciones entre diferentes grupos de organismos a partir de la distribución de los caracteres primitivos y derivados en cada taxón (Martínez y Truyols, 1994).

*Centaurea aspera* subsp. *gentilii*, objeto del presente estudio es la subespecie marroquí de la especie *Centaurea aspera*, incluida dentro del género *Centaurea*, que pertenece a la familia *Asteraceae* (*Compositae*), que a su vez se incluye en el orden *Asterales*, subclase *Asteridae*, clase *Magnoliopsida* (eucotiledóneas), división *Magnoliophyta* (angiospermas o plantas con flores) y reino *Plantae* (reino vegetal) (Sitte *et al.*, 2008) (Figura 1).

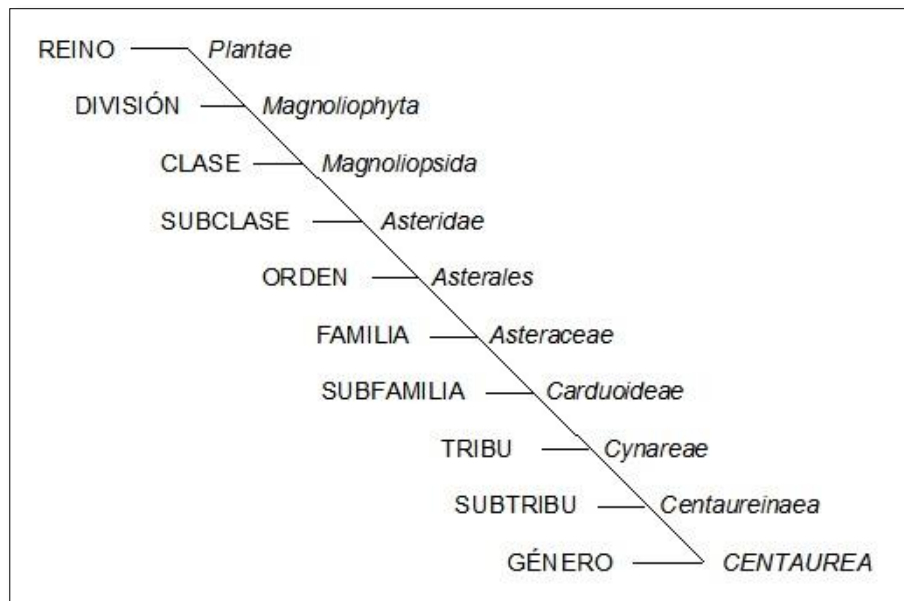
La familia *Asteraceae* es de las más diversas y complejas. La más reciente reorganización y reclasificación de los taxones fue realizada por Panero & Funk (2008), identificando 12 subfamilias y 38 tribus. En esta clasificación, el género *Centaurea* pertenece a la subfamilia *Carduoideae* Sweet, y dentro de esta, a la tribu *Cynareae* Lam. & DC. (sinónimo de *Cardueae* Cass.), subtribu *Centaureineae* Dumort. (Bremer, 1996; Panero y Funk, 2008) (Figura 1).

El género *Centaurea* comprende en su concepción actual unas 250 especies (Susanna y García-Jacas, 2007) distribuidas principalmente por Europa, la Región Mediterránea y el Suroeste de Asia. Incluye hierbas anuales o perennes, a menudo espinosas, conocidas comúnmente como cardos, a veces, de porte arbustivo con hojas enteras o más comúnmente lobuladas. Los capítulos pueden aparecer solitarios o en inflorescencias corimbiformes, generalmente de apariencia radiada y heterógamos<sup>1</sup>. Las brácteas involucrales tienen normalmente un apéndice fimbriado<sup>2</sup>, lacerado o espinoso. Las flores pueden ser rosadas, rojas, purpúreas, lilas, azules, amarillas o blancas. Los aquenios son oblongo-ovoides, un poco comprimidos, glabros o escasamente pelosos con vilano ligeramente doble, aunque a veces el interno falta (Font, 2007).

---

<sup>1</sup> Heterógamo: capítulo en el que no todas las flores son hermafroditas, sino que van acompañadas de otras que son unisexuales.

<sup>2</sup> Fimbriado: dicho de un órgano laminar, que está dividido en lacinias muy finas.



**Figura 1.** Esquema de clasificación taxonómica del género *Centaurea*. Elaboración propia a partir de Susanna y García-Jacas, 2007.

### 2.1.1 Secciones del género *Centaurea*

Estudios filogenéticos demuestran el carácter monofilético de la tribu *Cynareae* (Bremer, 1996; Panero & Funk, 2008). Todos los organismos incluidos dentro de esta tribu (*Cynareae*) son descendientes de un solo ancestro y, por tanto, han evolucionado a partir de una única población ancestral de plantas, es por ello que a este grupo se le denomina monofilético o clado.

Todas las plantas que pertenecen a una misma población ancestral monofilética comparten un mismo origen y por tanto tienen caracteres homólogos, pero tras varias generaciones las evidentes mutaciones al azar, selección natural y/o deriva genética generan diferentes genotipos con cambios de los caracteres por radiación adaptativa que acaban formando taxones diferentes de forma gradual. Pero, además, en este género están muy presentes otros mecanismos evolutivos de disiploidía, hibridación y poliploidización que, en numerosas ocasiones, han generado un aislamiento reproductivo y la ausencia de flujo genético (Ferriol *et al.*, 2014).

El resultado son poblaciones genéticamente muy similares entre sí y al ancestro común, pero con algún carácter exclusivo que las distingue y las diferencia. De este modo, la monofilética tribu *Cynareae* se divide en subtribus y estas a su vez en géneros. La sucesión de eventos de especiación se hace todavía más patente al observar la compleja división en secciones del género *Centaurea*.

Las especies del género *Centaurea* se clasifican por secciones en función del tipo polínico, la biogeografía, los caracteres morfológicos y números cromosómicos fundamentales (Wagenitz, 1955; García-Jacas *et al.*, 2000; García-Jacas *et al.*, 2006).

En esta clasificación, el taxon objeto del presente estudio *Centaurea aspera* subsp. *gentilii* tiene un número cromosómico básico de  $x=11$ , pertenece al clado (tipo polínico) *Jacea*, uno de los 3 grandes linajes que se reconocen en *Centaurea* (García-Jacas *et al.*, 2001) y dentro de este al subclado (región biogeográfica) Mediterráneo occidental y la sección *Seridia* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación en **secciones** de la subtribu *Centaureineae*, en función del tipo polínico y la biogeografía. Donde x: número básico de cromosomas. Elaboración propia a partir de Garcia-Jacas *et al.*, 2009.

TIPO POLÍNICO	SECCIONES
<i>Serratula</i> (x = 16, 15, 14, 13)	<i>Plectocephalus</i> y <i>Centaurea</i>
<i>Centaurea centaurium</i> (x = 15)	<i>Plectocephalus</i> y <i>Centaurea</i>
<i>Cyanus</i> (x = 12, 9, 8)	<i>Plectocephalus</i>
<i>Montana</i> (x = 11, 10)	<i>Plectocephalus</i>
<i>Scabiosa</i> (x = 11, 10)	<i>Acrocentron</i>
<i>Dealbata</i> (x = 15)	<i>Psephellus</i>
<b>Jacea*</b> (x = 15, 14, 12, 11, 10, 9, 8, 7)	
Circunmediterránea y eurosiberiana	<i>Acrolophus</i>
	<i>Ammocyanus</i>
	<i>Phalolepis</i>
	<i>Calcitrapa</i>
	<i>Willkoma</i>
	<i>Jacea-Leptanthus</i>
	<i>Ptosimopappus</i>
	<i>Phaeoppapus</i>
Mediterránea oriental	<i>Cynaroides</i>
	<i>Microlophus</i>
	<i>Chartolepis</i>
	<i>Rhizocalathium</i>
	<i>Grossheimia</i>
	<i>Cheirolepis</i>
<b>Mediterránea occidental</b>	<i>Pseudophaeopappoides</i>
	<b>Seridia</b>
	<i>Hymenocentron</i>
	<i>Mesocentron</i>
	<i>Melanoloma</i>

\*Regiones biogeográficas del tipo polínico *Jacea* y sus secciones asociadas.

### 2.1.2 **Taxonomía de la sección *Seridia***

Se conoce que la sección *Seridia* (Juss.) Czerep contiene 22 especies a nivel mundial, 8 de ellas presentes en la Península Ibérica y Baleares cuyo conocimiento es bastante amplio. Según Flora Ibérica, estas especies son: *C. seridis* L., *C. sphaerocephala* L., *C. lusitánica* Boiss. & Reut., *C. polyacanta* Willd., *C. susannae* Invernón & Devesa, *C. malacitana* Boiss., *C. barrasi* Pau y *C. aspera* L.

Hasta la fecha el conocimiento de este grupo taxonómico en las costas de la Península Ibérica ha generado fructuosos estudios basados en los tratamientos genéricos de Willkomm (1865) y Tutin *et al.* (1976), como continuación a los mismos se suman las distintas floras regionales y numerosas publicaciones en las que intervienen *C. aspera* y *C. seridis* L. (Pau, 1898; Costa y Mansanet, 1981; Susanna, 1988; Crespo y Mateo, 1990; Mateo y Crespo, 2009; Merle *et al.*, 2010; Garmendia *et al.*, 2010; Ferriol *et al.*, 2012; Ferriol *et al.*, 2014; etc.).

Son especies polimórficas con un gran número de subespecies y variedades (Ball, 1878; Jahandiez y Maire, 1934; Tutin *et al.*, 1976; Bolòs y Vigo, 1995; Mateo y Crespo, 2009). Se encuentran distribuidas por el Mediterráneo Occidental (Tutin *et al.*, 1976) incluyendo la subregión biogeográfica Mediterránea (Médail & Quézel, 1999), aunque llegan a alcanzar las costas atlánticas de Marruecos y Portugal, como es el caso de *Centaurea aspera* y *Centaurea seridis* que en estos territorios se encuentran instaladas principalmente en hábitats costeros, principalmente en dunas (Hellwig, 2004).

### **2.1.3 Taxonomía de *C. aspera* y *C. seridis* en la Península Ibérica y Marruecos.**

En la costa levantina de la Península Ibérica *C. seridis* y *C. aspera*, están representadas por dos subespecies diferenciadas por sus características morfológicas y de hábitat:

*C. seridis* L. (= *C. jacobi* Duf.) está representada por dos subespecies: la subsp. *maritima*, (Duf.) Dostál de carácter sabulícola ocupa arenales marítimos algo ruderalizados, esta se encuentra distribuida desde el norte de Castellón hasta la costa almeriense y la subsp. *cruenta* (Willd.) Dóstal. (Tutin *et al.*, 1976; Rigual, 1984; Sagredo, 1987; Bolòs y Vigo, 1995; Laguna *et al.*, 1998; Maestre, 1999) está más distribuida hacia el interior sobre el valle del río Vinalopó (Alicante) (Bolòs y Vigo, 1995; Maestre, 1999) (Figura 2).

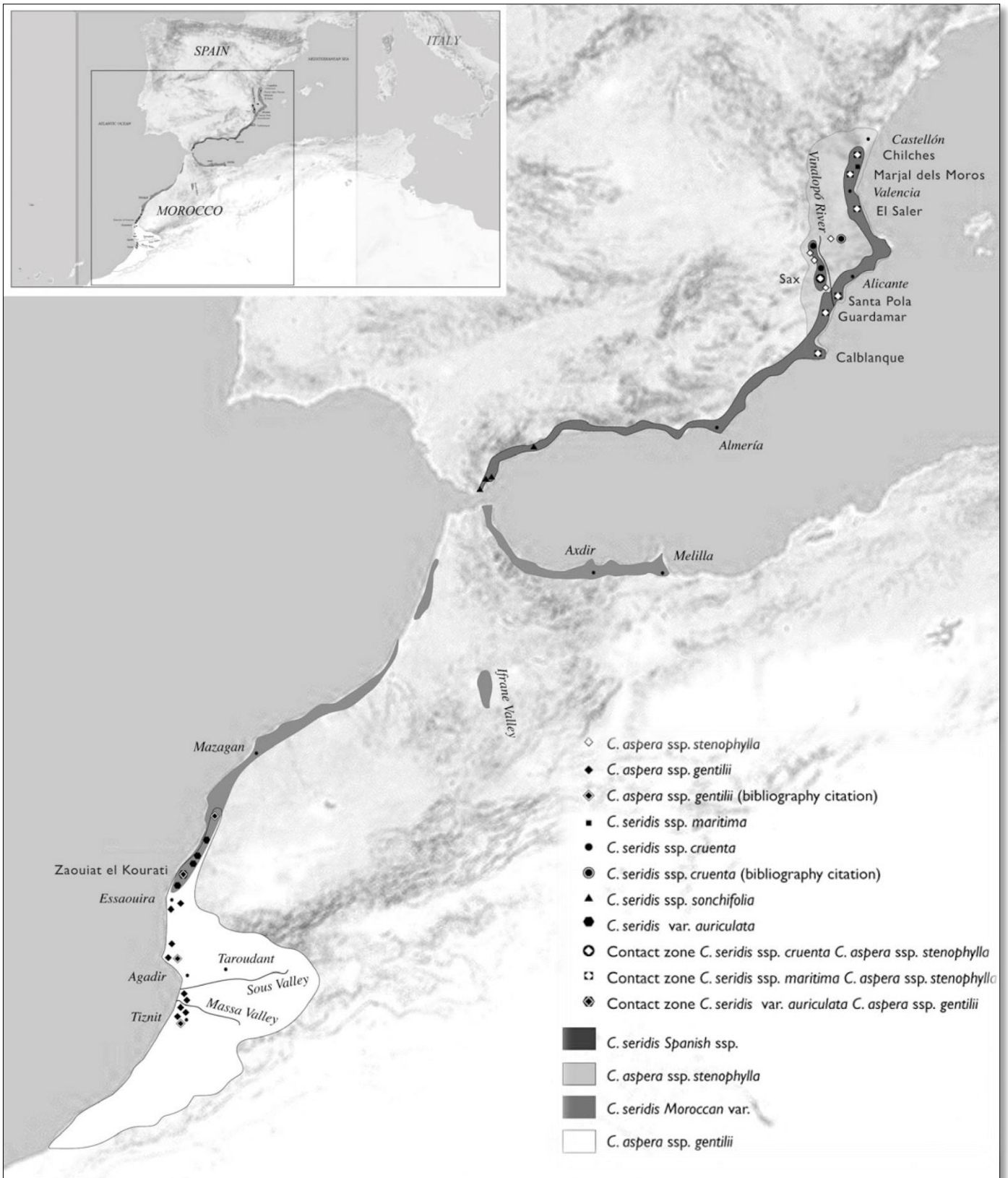
*C. aspera* L. está representada por la subsp. *aspera* y la subsp. *stenophylla* (Dufour) Nyman (Tutin *et al.*, 1976; Bolos y Vigo, 1995; Mateo y Crespo, 2009) estas crecen a lo largo del litoral desde Castellón hasta Murcia extendiéndose hacia el interior (Rigual, 1984; Alcaraz *et al.*, 1985; Bolòs y Vigo, 1995; Mateo y Crespo, 2009) (Figura 2).

En Marruecos, *C. seridis* está representada por 6 variedades: var. *auriculata* (Bald.) Ball, var. *epapposa* Caballero, var. *calva* Maire & Sauvage, var. *subferox* Pau & Font Quer., var. *pterochaetos* (Pomel) Maire, and var. *oligocentra* Maire (Ball, 1878; Caballero, 1917; Jahandiez, y Maire, 1934; Emberger y Maire, 1941; González-Bueno, 1988), y *C. aspera* está representada por una única subespecie, por la subespecie *C. aspera* subsp. *gentilii* (Garmendia *et al.*, 2015).

*C. seridis* var. *auriculata* la única variedad estudiada en la costa marroquí cerca de Mazagan, se encuentra en las dunas de arena semifijas y aparece más abundantemente en zona con cierto grado de antropización (Garmendia *et al.*, 2015) (Figura 2).

*C. aspera* subsp. *gentilii* es un taxon endémico del suroeste de Marruecos y la isla de Gran Canaria (Greuter y Raab-Straube, 2007). Es común en suelos costeros arenosos desde *Zaouiat el Kourati* hasta *Tiznit* y se extiende hacia el interior siguiendo el valle *Sous* hasta los alrededores de *Taroudant* (Braun-Blanquet & Maire, 1922; observaciones personales, Merle & Garmendia) (Figura 2). Pertenece a la asociación de dunas fijas *Bubonio imbricati-Centaureetum gentilii* Peltir (Médail y Quézel, 1999), y crece acompañada de la *Argania spinosa* Sleels y *Retama raetam* Webb & Berthel. También se encuentra en tenues acantilados de arena asociándose con *Argania spinosa* y *Euphorbia beaumierana* Hook.f. & Coss. (Garmendia *et al.* 2015).

Las diferencias entre las variedades marroquíes y las subespecies de la Península son muy sutiles o casi ausentes. Se observa que forman un continuo de variabilidad morfológica, debido a su origen ancestral común, lo que dificulta el establecimiento de límites que nos permita diferenciar los taxones (Garmendia *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Distribución geográfica de los taxones estudiados. Los puntos representan los individuos observados y los daos de la bibliografía de las citas. Las áreas de color blanco representan su distribución aproximada. S/E Fuente: (Garmendia *et al.*,2015)

## 2.2 Diversidad y evolución en el género *Centaurea*

Cuando los recursos están restringidos, la competencia conduce a la selección del fenotipo mejor adaptado, que será el que tenga más probabilidades de sobrevivir y reproducirse. La evolución de las especies permite una mayor adaptación al medio en el que viven. Entre los periodos largos de equilibrio con pocos cambios evolutivos, puede haber periodos cortos con cambios rápidos, sobre todo en zonas con alteraciones frecuentes, en las que la evolución puede producirse de forma especialmente rápida (Murray *et al.*, 2006).

La enorme diversidad del género *Centaurea* se debe básicamente a tres causas de tipo genético: disploidía, hibridación y poliploidización.

La disploidía sucede cuando dentro de un mismo género se da una disminución del número cromosómico básico. *Centaurea* muestra una compleja disploidía, desde  $x=16$  a  $x=7$  (Susanna *et al.*, 1995; García-Jacas *et al.*, 1996) y un incremento en la asimetría del cariotipo (Fernández Casas y Fernández Morales, 1979; Siljak-Yakovlev, 1986), debido a translocaciones y pérdidas de porciones de cromosomas (López y Devesa, 2008). En general, números cromosómicos altos (superiores a 12), corresponden a secciones con tipos de polen primitivos, como *Serratula*, *Dealbata* y *Centaurea centaurium* (Tabla 1); mientras que los tipos de polen más evolucionados tienen números cromosómicos más bajos, del tipo *Cyanus*, *Montana*, *Scabiosa* y *Jacea* (García-Jacas y Susanna, 1992; Susanna *et al.*, 1995; García-Jacas *et al.*, 2001) (Tabla 1). Existe además una correlación entre el número cromosómico y la morfología de la planta. Los taxones más primitivos tienen capítulos más grandes, brácteas involucrales más o menos enteras y simples, hojas enteras y anchas (López y Devesa, 2008).

La hibridación es la producción natural o artificial de un organismo vivo, procedente del cruce de dos especies o subespecies distintas. La capacidad de hibridación en el género *Centaurea*, es una de las más altas conocidas, afectando sobre todo a especies cercanas o de la misma sección (Mateo & Crespo, 2009). En las secciones *Jacea* y *Seridia*, este proceso es y continuará siendo uno de los principales factores de evolución, produciendo híbridos a menudo viables entre especies que pueden incluso presentar dotaciones cromosómicas de diferente número básico (García-Jacas *et al.*, 2006; Ferriol *et al.*, 2012). El grupo *Jacea* se difundió por la cuenca Mediterránea entre el Plioceno y el Pleistoceno. Dentro de este, existen tres grupos con distinta corología: un grupo de amplia distribución circummediterránea y eurosiberiana, otro grupo del Mediterráneo oriental y otro del Mediterráneo occidental, el cual incluye la sección *Seridia* y *Melanoloma* (Tabla 1). En estas secciones predominan los procesos de hibridación y poliploidía generalmente en las especies perennes, mientras que las especies anuales son las que muestran mayor disploidía y menor poliploidía e hibridación (Hellwig, 2004).

La poliploidía, hace referencia a las células que contienen más de dos juegos de cromosomas completos. La mayoría de organismos son diploides (AA) con un par de cromosomas homólogos. Un organismo es autopoliploide cuando contiene más de dos grupos de cromosomas completos, por ejemplo, un auto-tetraploide (AAAA) o un auto-hexaploide (AAAAAA), en este caso los dos grupos de cromosomas son completamente homólogos y por lo tanto provienen de la misma especie ancestral, mientras que un organismo se considera alo-poliploide cuando los grupos de cromosomas no son completamente homólogos, por ejemplo, un alo-tetraploide (AABB), en este caso la procedencia de los grupos de cromosomas podría deberse a la hibridación de dos o más especies o subespecies, incluso en ocasiones, se desconoce el origen de alguno de los genomas de una especie

alopoliploide, porque puede pertenecer a una especie parental extinta o no descubierta (Jackson, 1982; Ramsey y Schemske, 2002; Parisod *et al.*, 2010).

Esta clasificación entre auto o alo-poliploide muestra una división muy simplificada de un continuo proceso de grados de divergencia entre los parentales involucrados en cruces y la formación de poliploides (Stebbins, 1971; Abbott *et al.*, 2013). Se han realizado diversos estudios con el objeto de evidenciar metodologías que permitan deducir el origen auto o alo-poliploide de un taxón y se ha demostrado que el modo de herencia de los alelos (Hardy *et al.*, 2001a), la divergencia de ribotipos (Mráz *et al.*, 2012) y el fenotipo del tetraploide (García-Jacas *et al.*, 2009) son indicadores útiles para deducir este origen. Generalmente si el diploide y el tetraploide tienen fenotipos indistinguibles en campo, entonces se considera que el tetraploide es un verdadero autopoliploide (García-Jacas *et al.*, 2009); pero si por el contrario los fenotipos diploide y tetraploide están bien diferenciados entonces se necesitan más evidencias para saber si son auto o ali-plopoloides. Por ejemplo, los organismos poliploides tienen comúnmente el núcleo, y por lo tanto sus células, mayores que los diploides, al igual que ocurre con la disploidía, el nivel de ploidía se encuentra relacionado con la morfología, siendo en algunas ocasiones los organismos poliploides, sobre todo los aloplopoloides, de mayores dimensiones que los diploides (Petit *et al.*, 1999).

La poliploidía puede suponer la adquisición de ventajas evolutivas derivadas del aumento de la heterocigosidad<sup>3</sup>, de la diversidad genética, y de la tolerancia de consanguinidad o adaptabilidad, sobre la que puede actuar la selección (Soltis *et al.*, 2004a). Además, la poliploidía también es una forma común de especiación simpátrica en angiospermas, ya que puede provocar un aislamiento reproductivo inmediato (Coyne y Orr, 2004).

### 2.3 Zonas de contacto e hibridación entre citotipos del género *Centaurea*

En el género *Centaurea* podemos encontrar zonas de solape donde coexisten taxones pertenecientes a la misma especie, o a especies muy estrechamente relacionadas, con distintos niveles de ploidía. En estas zonas habitualmente denominadas complejos poliploides, es común que predominen citotipos diploides (2x) y tetraploides (4x). En menor medida y con frecuencias muy bajas se han observado triploides (3x), pentaploides (5x) y hexaploides (6x) (Hardy *et al.*, 2000; Koutecký *et al.*, 2012; Mráz *et al.*, 2012).

Frecuentemente, de la coexistencia entre citotipos puede resultar la producción de descendencia híbrida. En ocasiones, esta descendencia está formada por individuos triploides. Los triploides suelen tener un alto grado de esterilidad, por la gran dificultad que presentan para formar gametos viables debido a una distribución asimétrica de los alelos durante la meiosis (Darlington, 1937; Ramsey & Schemske, 1998). En otras ocasiones, la descendencia híbrida puede resultar tetraploide, en este caso aparentemente los híbridos deberían resultar fértiles, pero también pueden ser estériles debido a la posibilidad de estar formados por un número impar de cromosomas homólogos, lo que provocaría irregularidades durante la meiosis mediante la formación de gametos aneuploides inviables (Garmencia *et al.*, 2015).

La hibridación afecta en la dinámica y la evolución de las especies en función de si el híbrido es estéril o fértil. En el género *Centaurea* se ha estudiado la estructura poblacional, las barreras reproductivas y la distribución espacial de varios complejos

---

<sup>3</sup> Heterocigosidad: medida de la variación genética de una población respecto a un locus particular.



poliploides. En especial, recientemente se han estudiado los complejos poliploides de los cuales *Centaurea aspera* es el epicentro. Este interés es debido a su incesante evolución en diversas zonas de contacto en las que se pueden encontrar de manera natural alotetraploides, autotetraploides, híbridos con diferentes niveles de ploidía, citotipos, y el parental diploide que los relaciona (Figura 3).

En concreto para el presente trabajo, de acuerdo a los datos publicados (Vogt & Oberprieler, 2008), *C. aspera* subsp. *stenophylla* es diploide ( $2x = 22$ ) y *C. aspera* subsp. *gentilii* es tetraploide ( $4x = 44$ ). Los fenotipos de *C. aspera* subsp. *stenophylla* y *C. aspera* subsp. *gentilii* son indistinguibles en campo a pesar de pequeñas diferencias mostradas en análisis morfométricos (Garmendia *et al.* 2015). De cualquier forma, ambos táxones, subsp. *gentilii* y subsp. *stenophylla*, a priori no coexisten, ya que sus áreas fitogeográficas son alopátricas en Marruecos y España respectivamente (según la bibliografía publicada hasta la fecha). Así pues, *C. aspera* subsp. *gentilii* se considera, a priori, un verdadero autotetrapoliploide (AAAA) del diploide *C. aspera sensu lato* (AA), ya que tienen exactamente el mismo fenotipo y solo cambia su ploidía y área fitogeográfica. Es frecuente que cuando los fenotipos de dos citotipos diploide y tetraploide son indistinguibles, el tetraploide sea considerado un autotetraploide del diploide (García-Jacas *et al.*, 2009).

Otro taxon fuertemente emparentado con *C. aspera* y que juega un papel importante en los complejos poliploides es *Centaurea seridis*. Los estudios de diversidad genética realizados con micro-satélites sugieren que *C. seridis* subsp. *maritima* (4x) y subsp. *cruenta* (4x) son alopoliploides (AABB), considerando a *C. aspera* (2x) (AA) como uno de sus parentales (Ferriol *et al.*, 2014). En Marruecos encontramos ligeras variaciones de *C. seridis* clasificadas como *C. seridis* var. *auriculata*. Este taxon es tetraploide (4x) y su fenotipo coincide con *C. seridis sensu lato*, por lo tanto, se considera también un alopoliploide (AABB) que comparte con *C. aspera* subsp. *gentilii* (AAAA) al parental común *C. aspera* (AA).

En los sucesivos apartados se resumen algunos de los estudios realizados sobre complejos poliploides en los que están involucrados *C. aspera* y *C. seridis* (Figura 3) y, posteriormente, se concreta sobre el complejo poliploide marroquí *C. aspera* subsp. *gentilii* objeto del presente trabajo.

### **2.3.1 Complejos poliploides de *Centaurea aspera***

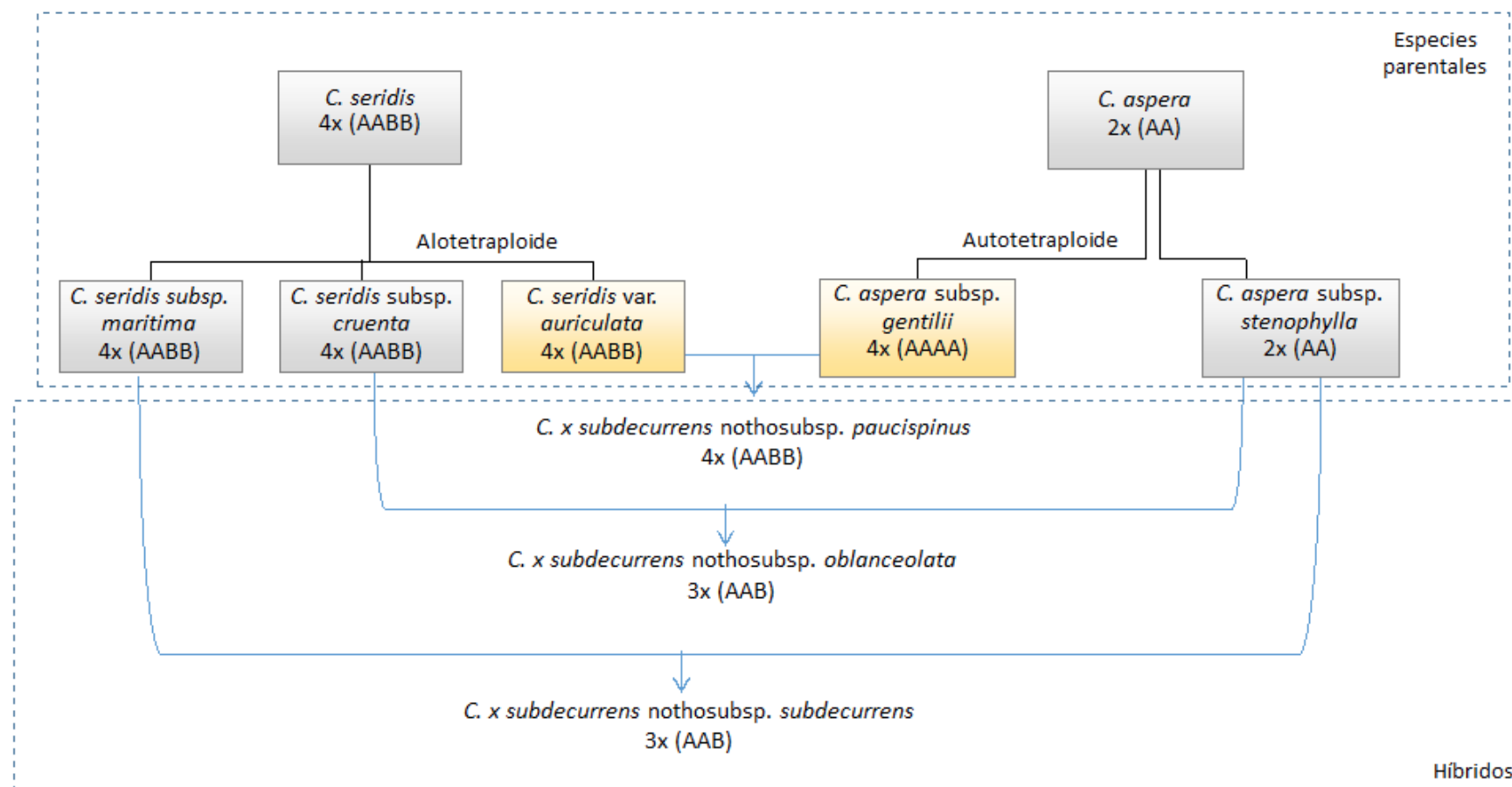
En el Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la UPV se han estudiado distintas zonas de contacto e hibridación de varios complejos poliploides:

Complejo poliploide 1 formado por distintas subespecies de *C. aspera* (AA) y *C. seridis* (AABB) en distintas zonas de la Península Ibérica (Figura 3):

- *C. seridis* subsp. *maritima*, *C. aspera* subsp. *stenophylla* y su híbrido *C. x subdecurrens* nothosubsp. *Subdecurrens*.

- *C. seridis* subsp. *cruenta*, *C. aspera* subsp. *stenophylla* y su híbrido *C. x subdecurrens* nothosubsp. *Oblanceolata*.

Complejo poliplide 2 en la costa de Marruecos (Figura 3): *C. seridis* var. *auriculata* (AABB), *C. aspera* subsp. *gentilii* (AAAA) y su híbrido *C. x subdecurrens* nothosubsp. *paucispinus* (AAAB).



**Figura 3.** Esquema de complejos poliploides estudiados recientemente y relacionados con *C. aspera* (Garmendia *et al.*, 2015; Ferriol *et al.*, 2015; Ferriol *et al.*, 2014; Ferriol *et al.*, 2012; Merle *et al.*, 2010) relación entre sus taxones e híbridos formados a partir de sus parentales. En gris taxones de la Península Ibérica, en naranja de Marruecos. Fuente: elaboración propia.

### 2.3.1.1 *C. aspera* (AA) y *C. seridis* (AABB) en la Península Ibérica.

Este complejo poliploide se encuentra en la costa levantina de la Península Ibérica, en la que convive el diploide *C. aspera* subsp. *stenophylla* (AA), un alotetraploide *C. seridis* subsp. *maritima* (AABB), y el híbrido triploide que se produce entre los dos *C. x subdecurrens*. Estos taxones se diferencian adecuadamente en campo por el tamaño de sus órganos y otros caracteres relacionados al tamaño (número de espinas de las brácteas del involucre, longitud de las espinas, tamaño del capítulo, etc.) siendo esencialmente los tetraploides más grandes y los diploides más pequeños (Ferriol *et al.*, 2012).

Inicialmente se confirmó mediante RAPDs que el triploide *C. x subdecurrens* (AAB) es la verdadera descendencia F1 entre *C. aspera* (2x) y *C. seridis* (4x) (Ferriol *et al.*, 2012), a través de la fusión de gametos reducidos A (de *C. aspera* subsp. *stenophylla*) y AB (de *C. seridis* subsp. *maritima*). En este caso, y a diferencia de otros complejos poliploides de *Centaurea* en los que los híbridos triploides son raros o inexistentes (Hardy *et al.*, 2001a), ambos taxones forman el híbrido triploide estéril *C. x subdecurrens* (Ferriol *et al.*, 2015) muy frecuentemente (Garmendia *et al.*, 2010).

Del complejo localizado en El Saler (Valencia) se estudió la genética a través de marcadores microsatélites, los cuales constataron la fuerte diferenciación genética entre los dos citotipos. La diversidad genética resultó mayor en los diploides (*C. aspera*) que en los tetraploides (*C. seridis*), también se observó que no existe flujo génico entre ambos. *C. seridis* resultó ser un aloploiploide con muy baja diversidad genética y una consistente estructura genética en dos poblaciones muy diferenciadas, al contrario que *C. aspera*, su único progenitor diploide conocido, constituido por una única población genética (Ferriol *et al.*, 2014).

El estudio de cruces forzados en *C. aspera* (2x), *C. x subdecurrens* (3x) y *C. seridis* (4x) dentro de cada taxon y entre ellos, mediante polinizaciones controladas en el complejo poliploide de El Saler (Valencia), confirmó que el híbrido *C. x subdecurrens* proviene de *C. aspera* polinizada con polen de *C. seridis* y que esto no ocurre al revés. *C. seridis* (4x) resultó ser altamente autógena mientras que *C. aspera* (2x) resultó ser estrictamente alógama. Además, se confirmó que el polen y los óvulos de *C. x subdecurrens* (3x) son estériles, actuando como una barrera de bloqueo triploide que corroboró la ausencia de flujo génico entre los dos citotipos parentales (Ferriol *et al.*, 2015).

### 2.3.1.2 *C. aspera* (AAAA) y *C. seridis* (AABB) en Marruecos.

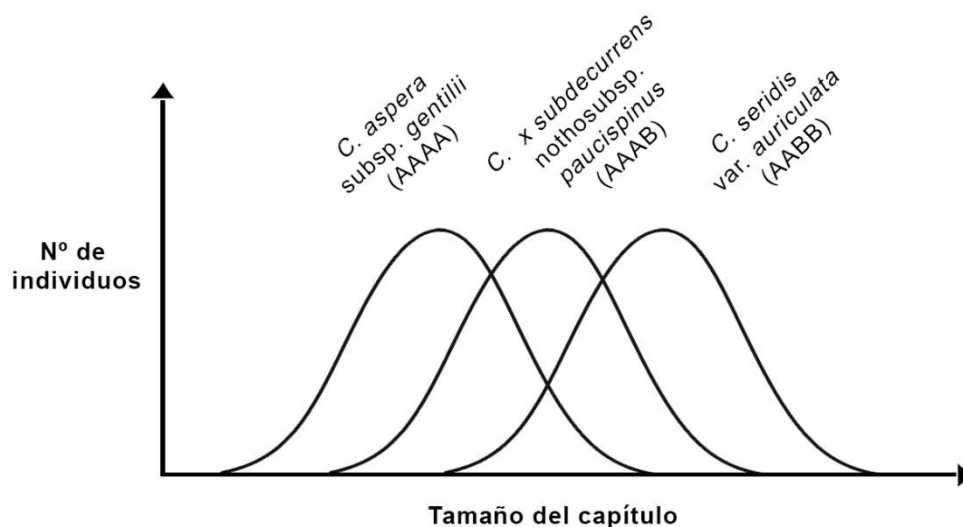
La revisión bibliográfica y un estudio morfométrico en este complejo poliploide mostró que *C. aspera* subsp. *gentilii* es posiblemente un autopoliploide y que *C. seridis* var. *auriculata* es un aloploiploide. Además, en la zona donde ambos taxones coexisten se describe el híbrido estéril *C. x subdecurrens* nothosubsp. *paucispinus* (Garmendia *et al.* 2015).

Este complejo poliploide marroquí se comparó con la zona de contacto homóloga en España. Principalmente difieren en la distribución geográfica (Marruecos y España) y en los niveles de ploidía: los taxones marroquíes son todos tetraploide (4x =44): *C. aspera* subsp. *gentilii* (AAAA), *C. seridis* var. *auriculata* (AABB) y *C. x subdecurrens* nothosubsp. *paucispinus* (AAAB), a diferencia de de *C. aspera* subsp. *stenophylla* de España que es diploide (AA), y el híbrido *C. x subdecurrens* nothosubsp. *subdecurrens* que es triploide (AAB); *C. seridis* subsp. *maritima* comparte la misma ploidía que la variedad marroquí (ambas AABB) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Comparación de taxones por niveles de ploidía. El color naranja corresponde a los taxones marroquí, el color blanco a los peninsulares.

Taxon		Nivel ploidía
<b>C. aspera</b>	subsp. <i>stenophylla</i>	2x
	subsp. <i>gentilii</i>	4x
<b>C. seridis</b>	subsp. <i>maritima</i>	4x
	var. <i>auriculata</i>	4x
<b>C. x subdecurrens</b>	nothosubsp. <i>subdecurrens</i>	3x
	nothosubsp. <i>paucispinus</i>	4x

El análisis morfométrico mostró que existe una fuerte proximidad fenotípica dentro de las áreas de contacto. Los tres taxones del complejo de la Península poseen unas características más diferenciadas que los de Marruecos, tan próximos entre sí que resulta difícil diferenciarlos en campo. Las diferencias entre taxones marroquíes son pequeñas ya que *C. seridis* var. *auriculata* es el taxón de *C. seridis* más próximo a *C. aspera*: *C. seridis* var. *auriculata* tiene sólo 5 espinas en cada bráctea del involucreo al igual que *C. aspera*.



**Figura 4.** Esquema representativo del continuo de variabilidad morfológica en el tamaño del capítulo de los taxones del complejo poliploide estudiado en la costa atlántica marroquí. Elaboración propia a partir de Garmendia *et al.*, 2015.

Esta proximidad entre caracteres se expresa como un continuo de variabilidad morfológica (Figura 4) que dificulta el establecimiento de límites claros en la distinción a simple vista de los diferentes taxones que forman el complejo poliploide marroquí. Como consecuencia en estas zonas existe una competencia más directa entre los taxones ya que no muestran adaptaciones específicas (Garmendia *et al.*, 2015).

Los híbridos *C. x subdecurrens* nothosubsp. *subdecurrens* (español) y nothosubsp. *paucispinus* (marroquí) están fenotípicamente en un punto intermedio equidistante entre sus parentales y, por tanto, la variabilidad morfológica de los híbridos es similar a la variabilidad morfológica de sus parentales. El único rasgo

realmente diferenciador es la completa esterilidad de sus capítulos. Posiblemente la esterilidad del híbrido tetraploide marroquí *C. x subdecurrens* nothosubsp. *paucispinus* tiene una explicación similar a la del híbrido triploide español, es decir, que el genoma tetraploide resultante (AAAB) del híbrido marroquí, a través de la fusión de gametos AA (de *C. aspera* subsp. *gentilii*) y AB (de *C. seridis* var. *auriculata*) genera irregularidades durante la meiosis con formación de gametos aneuploides<sup>4</sup> al igual que *C. x subdecurrens* nothosubsp. *subdecurrens* (AAB) (Garmendia *et al.*, 2015; Ferriol *et al.*, 2015; Ferriol *et al.*, 2014; Ferriol *et al.*, 2012).

### **2.3.1.3 El complejo poliploide formado por *C. aspera* subsp *gentilii* en la costa atlántica marroquí.**

Es probable que *C. aspera* subsp. *gentilii* presente diferentes citotipos en algunas zonas de Marruecos. En tal caso el complejo estaría formado por los citotipos (2x, 3x y 4x) de *C. aspera* subsp. *gentilii* (AA, AAA y AAAA respectivamente). Estos citotipos no serían diferenciables en campo y a su vez, idénticos a *C. aspera* diploide de la Península Ibérica, ya que se suponen todos autopoliploides.

Los datos preliminares del equipo de investigación muestran que pequeños porcentajes de diferentes niveles de ploidia podrían estar presentes en algunas poblaciones marroquíes.

## **2.4 Estudios preliminares sobre *C. aspera* subsp. *gentilii* en la costa atlántica marroquí.**

En el año 2013 el equipo de investigación realizó un estudio en el que se muestrearon poblaciones *C. aspera* subsp. *gentilii* en la costa oeste de Marruecos. El objetivo del muestreo fue la recogida de material vegetal para el estudio de su diversidad genética, y un análisis preliminar de los niveles de ploidía de las poblaciones a lo largo del gradiente latitudinal Norte/Sur.

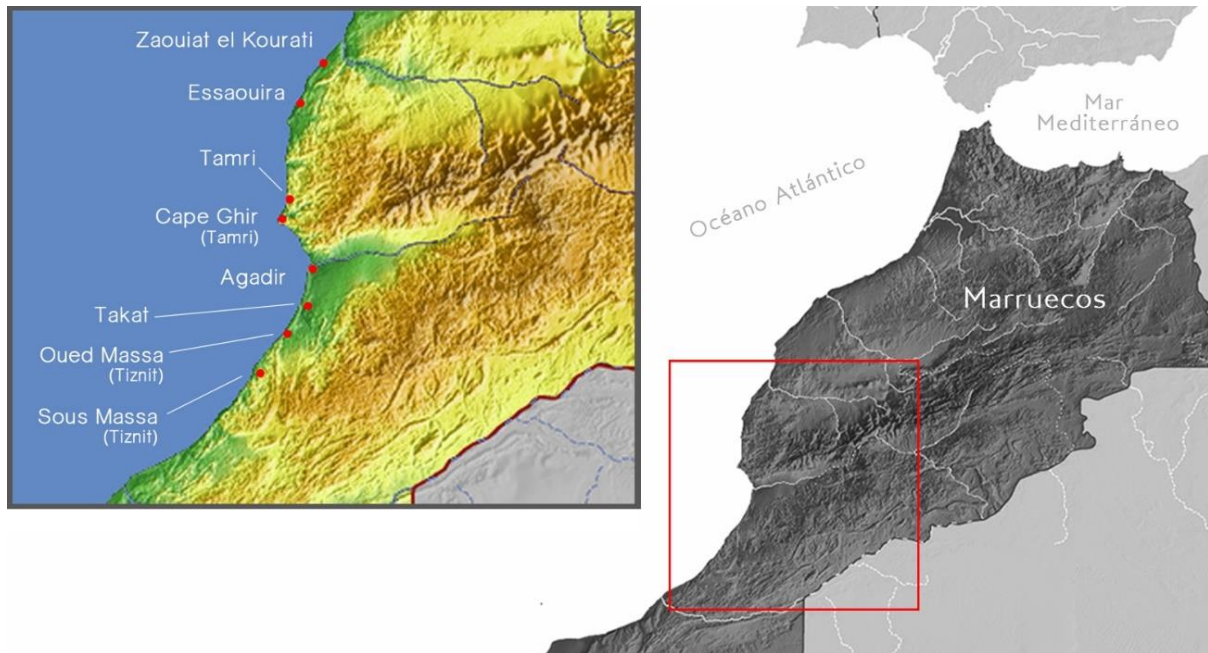
Se muestrearon 10 individuos en las localidades de *Zaouiat el Kourati* (ZA), *Essaouira* (ES), *Tamri* (TM), *Cape Ghir* (CG), *Agadir* (AG), *Oued Massa* (WM) y *Sous Massa* (SM) y 11 individuos en *Takat* (TK) (Figura 5, Tabla 3), lo que resultó un muestreo total de 81 individuos de *C. aspera* subsp *gentilii*. Debido al escaso número de individuos muestreados por población, el estudio de los niveles de ploidía se consideró preliminar.

Los resultados de dicho estudio y sus conclusiones se exponen a continuación ya que han servido de base del presente estudio en cuanto al diseño del trabajo de campo en el nuevo muestreo, de la nueva prospección en la búsqueda de nuevas poblaciones y el análisis de las muestras por citometría de flujo.

La citometría de flujo mostró variedad de citotipos en las poblaciones: 2x, 3x y 4x (Figura 6, Tabla 3).

---

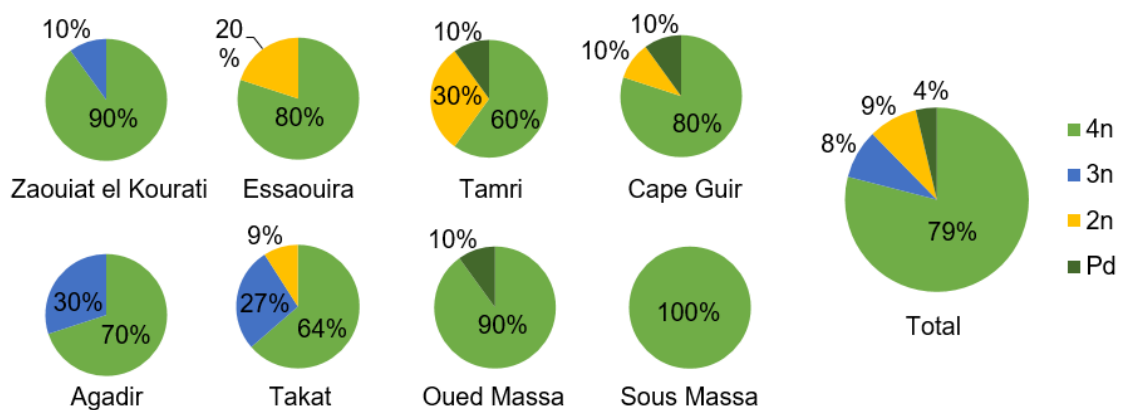
<sup>4</sup> Aneuploide: condición por la que una célula posee muchas o pocas copias de cromosomas concretos por fallos en la separación de cromosomas homólogos durante la mitosis o la meiosis.



**Figura 5.** Localización de las 8 poblaciones de *C. aspera* subsp. *gentilii* muestreadas en el estudio previo de la costa oeste de Marruecos en el año 2013. S/E.

**Tabla 3.** Número de individuos muestreados y de cada ploidía (2x, 3x, 4x y Pd: ploidía desconocida).

Población	Nº individuos	Nº 2x	Nº 3x	Nº 4x	Nº Pd
<i>Zaouiat el Kourati</i>	10	-	1	9	-
Essaouira	10	2	-	8	-
<i>Tamri</i>	10	3	-	6	1
Cape Guir	10	1	-	8	1
Agadir	10	-	3	7	-
<i>Takat</i>	11	1	3	7	-
Oued Massa	10	-	-	9	1
<i>Sous Massa</i>	10	-	-	10	-
Total	81	7	7	64	3



**Figura 6.** Representación de las proporciones en porcentaje de los distintos citotipos dentro de cada población muestreada en el estudio preliminar de la especie Marroquí *C. aspera* subsp. *gentilii*.

Tal y como se observa en la Tabla 3 y la Figura 6, las poblaciones de *Centaurea aspera* subsp. *gentilii* resultaron principalmente compuestas por tetraploides (4x) con un porcentaje total del 79% (64 individuos). Aparecieron 7 individuos diploides (2x) formando el 9% total del muestreo; y casi el mismo número de triploides (3x) formando el 8%. Hubo 3 individuos de los que no se puede conocer el nivel de ploidía (4%). Las observaciones de campo no mostraron diferencias fenotípicas entre los citotipos.

Sólo en una población, *Sous Massa* aparecen todos los individuos como 4x, mientras que en cuatro poblaciones aparecieron además individuos 2x: uno en *Takat*, uno en Cape Guir, tres en *Tamri*, y dos en Essaouira. Y en tres poblaciones aparecieron individuos 3x: tres en *Takat*, tres en Agadir y uno en *Zaouiat el Kourati*.

Algunos de los picos de la citometría de flujo realizada sobre estos individuos resultaron dudosos. Este hecho, junto a los pequeños porcentajes de citotipos distintos a 4x y a los pocos individuos analizados por población, evidenciaron la necesidad de realizar un muestreo más robusto para conocer los niveles de ploidia de *C. aspera* subsp. *gentilii* en su área de distribución marroquí, así como incorporar el estudio de otros factores que pudiesen influir sobre esos niveles de ploidía como podría ser las características del hábitat en el que se distribuyen los distintos citotipos y si existen una correlación por adaptaciones a hábitats específicos.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Existen numerosas evidencias que muestran que se está produciendo un cambio climático global con un aumento marcado de las temperaturas. La disminución de hielo marino del Ártico, el retroceso de los glaciares, o el aumento global de la temperatura son solo algunos de ejemplos que marcan la tendencia actual. En ecosistemas actualmente áridos, este aumento de la temperatura puede suponer una agudización de las condiciones limitantes. A través del estudio de las especies que viven en climas extremadamente áridos, como *Centaurea aspera* L. en Marruecos, se puede conocer los mecanismos que éstas utilizan para conseguir adaptarse a los factores limitantes. El estudio de estos mecanismos de adaptación puede servir de referencia en el diseño de medidas ante la desertificación provocada por el cambio climático que afecta a las especies. Medidas tanto de planificación, gestión y conservación en los espacios, como de mejora genética de los taxones.

*C. aspera* es una especie ampliamente distribuida por el mediterráneo occidental (Hellwig, 2004). Los estudios realizados sobre la misma muestran que las poblaciones Peninsulares son diploides (Ferriol *et al.*, 2012), sin embargo, las poblaciones marroquíes corresponden a la subespecie *C. aspera* ssp. *gentilii* (Garmendia *et al.*, 2015). Los estudios preliminares realizados por el equipo de investigación muestran que las poblaciones marroquíes son fundamentalmente tetraploides, pero presentan un pequeño porcentaje de individuos diploides e incluso triploides.

Conocer los niveles de ploidía (2x, 3x, 4x) de los individuos de las poblaciones marroquíes de *C. aspera* subsp. *gentilii* resulta primordial para entender los procesos de competencia y otras interacciones que se establecen entre ellos. Si el tetraploide *C. gentilii* es dominante en el norte de África, mientras que las poblaciones de la Península Ibérica son diploides, ¿cuáles han sido los factores que han determinado esta distribución alopatrica? ¿Porque resulta más competitivo el tetraploide en Marruecos y/o el diploide en la península? ¿Tiene la poliploidía alguna ventaja o desventaja *per se*? Antes de poder responder a todas estas preguntas debemos conocer en detalle cuál es la distribución de los citotipos en Marruecos, si son poblaciones puras de tetraploides, si contienen pequeños porcentajes de diploides o si encontramos poblaciones mixtas de diploides, triploides, y tetraploides, y si esa distribución de citotipos está correlacionada con alguna característica de hábitat o ubicación geográfica.

Es por ello, que el objetivo principal del presente trabajo es:

- Conocer los porcentajes de 2x, 3x y 4x de las poblaciones de *C. aspera* subsp. *gentilii* del suroeste de Marruecos.
- Relacionar la distribución de los citotipos de *C. aspera* subsp. *gentilii*, con la latitud o con otras características del hábitat.
- Confirmar si existen híbridos 3x u otros niveles de ploidía (5x, 6x)

Para conseguir el objetivo principal, se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:

- Tomar muestras, etiquetar y georeferenciar un mínimo de 65 muestras de cada una de las poblaciones con mayor resultado de diploides en el muestreo preliminar del complejo poliploide formado por *Centaurea aspera* subsp. *gentilii* y localizado en la costa del oeste de Marruecos.



- Tomar datos en campo sobre las características de los hábitats en los que se localizan las poblaciones identificando el tipo de vegetación, parámetros poblacionales, orografía, altitud, distancia a la costa, ganadería y otros factores antrópicos.

- Analizar la ploidía de los individuos en los laboratorios del IVIA-Moncada a partir de las hojas frescas de todas las plantas muestreadas, mediante la técnica de citometría de flujo que contabiliza el contenido de ADN de los núcleos en interfase.

- Analizar los porcentajes de aparición de las distintas ploidías en cada una de las poblaciones muestreadas.

- Correlacionar la aparición de individuos con distintas ploidías con su georeferencia, las características del hábitat y la ubicación geográfica.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Cronología

Las tareas realizadas durante el trabajo se encuentran agrupadas en 8 puntos. Se ha utilizado el diagrama de Gantt (Anexo 1) para la esquematización de su duración y orden cronológico.

- Búsqueda de profesorado colaborador en Marruecos.
- Diseño y planificación del trabajo de campo.
- Diseño de la caracterización ecológica.
- Ensayo para conservación de las muestras.
- Toma de contacto con el responsable del Departamento de Cultivo de Tejidos del IVIA.
- Planificación del trabajo de laboratorio.
- Trabajo de campo en Marruecos (muestreo, toma de datos, geolocalización y etiquetado).
- Trabajo de laboratorio en el IVIA (Citometrías y análisis de resultados).

### 4.2 Búsqueda de profesores colaboradores en Marruecos.

La búsqueda de colaboradores en Marruecos se realizó contactando con los responsables de varios departamentos relacionados con la temática del proyecto, en diferentes universidades de Marrakech y Rabat. A su vez, se consultaron conocidos que nos sugiriesen profesionales botánicos expertos en el territorio que se iba a muestrear. El objetivo buscado era establecer una relación de colaboración y compromiso participativo. Los profesionales que se ofrecieron fueron:

- Profesor Ahmed Ouhammou, perteneciente al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de Semlalia de la Universidad Cadi Ayyad (Marruecos).
- Profesor Abdelkader Taleb, perteneciente al Departamento de Recursos Naturales y del Medio Ambiente del Instituto de Agronomía y Veterinaria Hassan II (Rabat).
- Homrani Bakali Abdelmonaim, investigador ecólogo en el Centro Regional de Investigación Agrícola de Errachidia

Inicialmente, la función principal del colaborador en el presente trabajo era la de prestar soporte general en la logística del muestreo de *C. aspera* subsp. *gentilii* en Marruecos. A su vez, se buscaba el intercambio de conocimientos sobre la materia, hipótesis y cooperación en los próximos estudios.

### 4.3 Ensayos previos para conservación de las muestras

En el presente trabajo, debido al elevado número de muestras previstas para la recolección en una única prospección, los análisis del nivel de ploidía de las muestras por citometría de flujo pueden suponer varios días de trabajo. Durante este tiempo de espera se puede producir procesos de deterioro que pueden dificultar el conteo celular mediante el citómetro. Por este motivo, se realizó una estimación del número de análisis de citometría que se debían realizar al día y un ensayo de conservación de hojas que nos garantizara las mejores condiciones posibles hasta el momento de su procesado.

Este ensayo consistió en introducir varias hojas de *C. aspera* cortadas, limpias y escurridas en cuatro bolsas con distintas humedades en su interior (Figura 7): sin agua, con agua salpicada, con un papel húmedo de diferentes tamaños y cerradas herméticamente.



**Figura 7.** Ensayo de humedades para conservación de las muestras en bolsas; de izquierda a derecha: sin agua, con agua, con un papel húmedo de 3 cm<sup>2</sup> y con un papel húmedo de 6 cm<sup>2</sup>.

Las bolsas cerradas herméticamente se conservaron en una nevera a una temperatura de 8°C y se observaron diariamente. Las hojas de bolsa sin agua permanecieron en condiciones favorables hasta el catorceavo día. La bolsa con agua salpicada provocó un aumento de la humedad en las hojas observándose maceraciones a partir del tercer día. Para este tipo de embolsamiento al cabo de cinco días no se observó ningún trozo de hoja que se encuentra limpio y turgente; las bolsas con papel húmedo de ambos tamaños (3 x 3 cm y 6 x 6 cm) generaron hongos que provocaron la contaminación de las muestras.

Finalmente, se concluye que la forma óptima de conservación de las muestras es en una bolsa cerrada herméticamente con su humedad natural, limpia y escurrida, sin añadir agua y guardada en un lugar fresco y seco. De esta forma se pueden conservar durante aproximadamente dos semanas.

#### 4.4 Estimación del tamaño muestral

El número de individuos a muestrear en cada población debe ser el suficiente para que los resultados obtenidos sean representativos de cada población completa, a su vez, el tamaño de la muestra no debe exceder demasiado el valor mínimo establecido ya que con un mínimo de garantía detectará igualmente las posibles hipótesis si realmente se dan entre los individuos de estudio, esto nos permite ahorrar costes y aumentar la rapidez del estudio.

Para calcular el tamaño de la muestra se utiliza la función de probabilidad (función que asocia a cada punto de su espacio muestral X la probabilidad de que ésta lo asuma) y teniendo en cuenta la valoración de los resultados del muestreo previo en el que resultó una presencia de individuos 2x y 3x del 9% y 8% respectivamente (Figura 6). Cabe considerar que en realidad no se conoce la proporción real ya que estos porcentajes son una estimación a partir de un muestreo reducido realizado en 2013. A pesar de obtener una proporción resultante de 2x ( $P_0$ ) del 9% se realiza el cálculo considerando un 5% para ser precavidos y realizar un muestreo del lado de la seguridad.

Para calcular el tamaño muestral necesario para obtener al menos un 2x en cada muestreo se ha calculado la probabilidad para los diferentes tamaños de

muestreo utilizando una hoja de cálculo y se ha seleccionado un tamaño muestral en el que la probabilidad de no encontrar ninguno fuese menor a 0,05, ( $N_n < 0,05$ ).

Para el cálculo de las probabilidades se han realizado los siguientes pasos:

Considerando  $S_n$  la probabilidad de que salga al menos un 2x en una muestra de  $n$  individuos y considerando a su inverso  $N_n$  la probabilidad de que no caiga ningún 2x en una muestra  $n$ , tenemos:

$$S_n = 1 - N_n \quad , \quad y \quad N_n = A_n^n \quad , \quad \text{donde} \quad A_n' = 1 - A_n$$

En la siguiente tabla se encuentra el cálculo de las probabilidades para distintos tamaños de una muestra (Tabla 4).

**Tabla 4.** Ejemplo de cálculos con diferentes tamaños de una muestra ( $n$ ), la probabilidad resultante de no muestrear ningún 2x ( $N_n$ ) y de muestrear al menos un 2x ( $S_n$ ). El color naranja corresponde al tamaño mínimo muestral a partir del cual la probabilidad de no encontrar ninguno es menor a 0,05

n	Nn	Sn
1	0,95	0,05
10	0,60	0,40
20	0,36	0,64
30	0,21	0,79
40	0,13	0,87
50	0,08	0,92
<b>60</b>	<b>0,05</b>	<b>0,95</b>
70	0,03	0,97

## 4.5 Trabajo de campo.

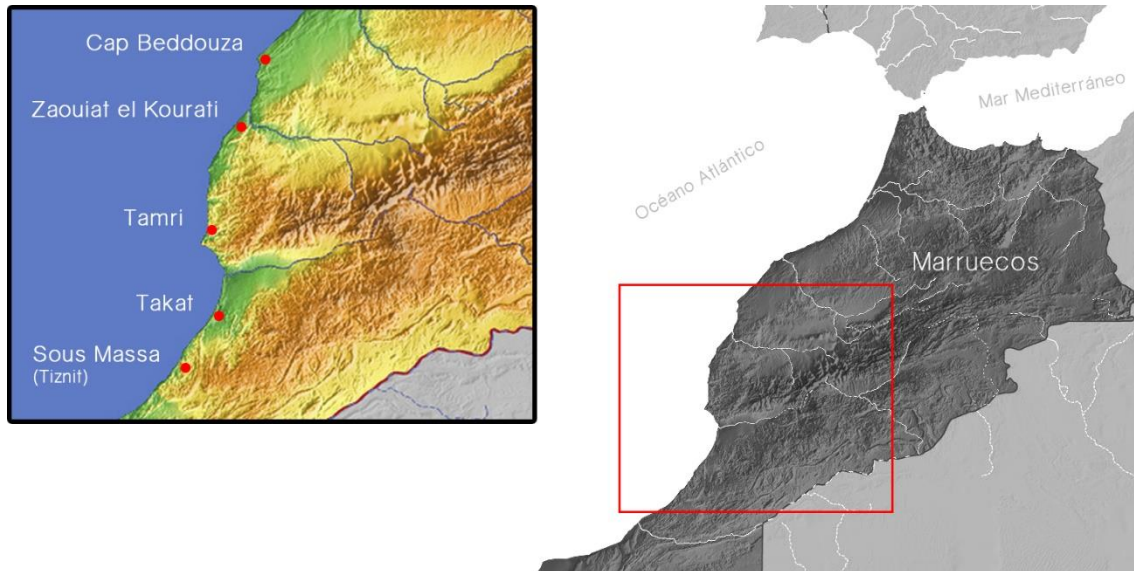
### 4.5.1 Muestreo, geolocalización, codificación y etiquetado.

El 27 de abril de 2016 se inició la prospección en Marruecos. Durante esta prospección se muestrearon 4 poblaciones elegidas de las 8 conocidas. Para la selección de las poblaciones a muestrear nos basamos en los resultados del estudio preliminar realizado por el equipo de investigación en el año 2013 (Tabla 3, Figura 6).

La selección de las poblaciones se basó fundamentalmente en tres criterios: (i) la abundancia de individuos de las poblaciones; (ii) la ubicación latitudinal, con el fin de obtener una amplia representación de la distribución norte-sur, por ello se seleccionó la población ubicada más al sur (*Sous Massa*) y más al norte (*Zaouiat el Kourati*); y (iii) la presencia de niveles de ploidia 2x y 3x según los resultados preliminares (*Takat* y *Tamri*) (Tabla 3, Figura 5 y Figura 6). La ubicación de estas poblaciones era conocida y estaban georeferenciadas con GPS desde el muestreo del 2013. Además de estas 4 poblaciones conocidas, se prospectó nuevo territorio a unos 100 km de distancia de *Zaouiat el Kourati* hacia el norte, en busca de la especie y se muestreó una nueva población en *Cap Beddouza* (Figura 8).

Por orden cronológico las poblaciones y el número de individuos muestreados en cada población fue: 65 individuos en *Zaouiat el Kourati* (ZA), 114 *Tamri* (TM) que se dividió en dos sub-poblaciones (71 en ladera y 43 en duna), 66

en *Takat* (TK), 64 *Sous Massa* (SM), y por último 66 en *Cap Beddouza* (CB). Un total de 375 individuos en 5 poblaciones. El detalle del número total de individuos por población se encuentra en la Tabla 5 y la ubicación de las poblaciones a lo largo de la costa atlántica en la Figura 8.



**Figura 8.** Nombre y localización de las poblaciones seleccionadas para el muestreo. S/E.

**Tabla 5.** Datos en cada población de *C.aspera* subsp. *gentilii* muestreada: nombre de la localidad, código asignado a la población y número de individuos muestreados.

Localidad	Código población	Nº individuos muestreados
<i>Cap Beddouza</i>	CB	66
<i>Zaouiat el Kourati</i>	ZA	65
<i>Tamri</i>	TM	114
<i>Takat</i>	TK	66
<i>Sous Massa</i>	SM	64
	Total	375

El material utilizado para guardar las muestras consta de unas bolsas de plástico con cierre hermético tamaño 8 x 6 cm y nevera portable con placas refrigerantes (Figura 9).

Se utilizó un *GPS Garmin Oregon 300* de precisión para memorizar los datos de fecha y hora de recolección, coordenadas UTM y cota altimétrica sobre el nivel del mar de los 375 puntos de muestreo. Los *waypoints* del *GPS*, van desde el 49 hasta el 423, estos datos están correlacionados en la tabla de datos del Anexo 2 del presente documento con una codificación específica de cada individuo muestreado. Las poblaciones se pueden observar en fotos en el documento planos del presente trabajo.



**Figura 9.** Bolsas de plástico con cierre hermético, nevera portable y placas refrigerantes.

En el mismo momento en que se recolectó cada individuo, se georeferenció a través del *waypoint*, se rotuló la bolsa con el código de la población y la numeración del individuo, y se colocó a etiqueta con el mismo código en cada planta (Figura 10).

En ocasiones, el etiquetado resultó dificultoso debido al estado de las plantas. En estos casos, el etiquetado se realizó en alguna planta cercana. Cabe recordar que se trata de una especie perenne pero que se agosta y puede perder todo el aparato vegetativo aéreo durante los meses de invierno dependiendo de las condiciones del hábitat, por lo que la pérdida del etiquetado puede complicar los próximos estudios si se demoran en el tiempo.

El código específico para cada muestra se compuso de siete dígitos. El primer y segundo dígito (AG) corresponden a la especie *C. aspera* subsp. *gentilii*; el tercer y cuarto dígito corresponde al nombre de la población de muestreo (ZA, TM, TK, SM o CB) (Tabla 5); el quinto y sexto dígito corresponde al número correlativo de planta muestreada de una población (desde 01 hasta la última planta muestreada de la misma población), y el séptimo dígito corresponde a la inicial (A) que diferencia este muestreo de otros realizados por el equipo de investigación anteriormente (Figura 11).



Figura 10. *C. gentilii* etiquetada con su correspondiente código y georeferenciada con GPS de precisión.



AG TM 107 A

- AG especie *C. aspera* subsp. *gentilii*
- TM población Tamri
- 107 número de muestra de esa población
- A trabajo de Ana González

Figura 11. Ejemplo de codificación específica de cada individuo muestreado de la especie *C. gentilii* en Marruecos y significado de los diferentes dígitos que componen el código.

Es importante que las plantas queden bien etiquetadas y georeferenciadas ya que se pretende continuar hacia el norte prospectando la costa atlántica hacia *Rabat* y *Tánger* hasta llegar al estrecho e incluso continuar por la costa mediterránea en busca de una buena representación de todo el litoral marroquí. Además, una vez conocido el nivel de ploidía de las plantas georeferenciadas, sería muy interesante recolectar sus aquenios, estudiar su descendencia y conocer cómo se cruzan la/s especie/s entre ellas y entre los distintos citotipos.

#### 4.5.2 Toma de datos de caracterización ecológica de los hábitats

En las poblaciones de *C. aspera* subsp. *gentilii* que se muestrearon, se observaron y anotaron las características de los hábitats. Los datos que se tomaron en campo se detallan en el siguiente apartado, los datos obtenidos se recogen en el Anexo 3.

- Datos generales: el nombre de la localidad, fecha de muestreo, cantidad y tipo de material recolectado (hojas, flores, aquenios), *waypoints* GPS.
- Vegetación: tipo de vegetación, especie dominante, porcentaje de cobertura, presencia de leñosas (Tabla 6).
- Parámetros poblacionales: índice de abundancia- dominancia de Braun Blanquet (Tabla 7), distribución geográfica, presencia de plántulas, descripción de la parcela y descripción del paisaje.
- Orografía: tipo de suelo, relieve, orientación, pendiente, marcas de erosión y movimientos o deposición de arena (Tabla 6).
- Antropización: presencia de peatones o afluencia turística, presencia y proximidad de vías de comunicación (carretera, pista, senda), basuras y urbanización o infraestructuras (Tabla 6).
- Ganadería: presencia de ganado y tipo, y de plantas mordidas (Tabla 6).

**Tabla 6.** Resumen de las variables utilizadas y sus abreviaturas para la caracterización ecológica de las poblaciones muestreadas de *C. aspera* subsp. *gentilii* en Marruecos.

Abreviatura	Variable observada	Abreviatura	Variable observada
Pcob%	Porcentaje de cobertura	Or	Orientación
Plñ	Presencia de leñosas	Pte%	Porcentaje de pendiente
lab	Índice de abundancia	Mov	Movimientos o deposiciones de arena
Dgeo	Distribución geográfica	Vcom	Presencia de vías de comunicación
Ppl	Presencia de plántulas	Obr	Presencia de Obras o infraestructuras
SuAr	Suelo tipo arenoso	Pers	Presencia de personas
RSua	Relieve suave del terreno	Gan	Presión ganadera

**Tabla 7.** Escala de abundancia-dominancia de Braun Blanquet. (Westhoff & van der Maarel, 1978).

Índice	Significado
r	Un solo individuo, cobertura despreciable
+	Más individuos, cobertura muy baja
1	Cobertura menor del 5%
2	Cobertura del 5 al 25%
3	Cobertura del 25 al 50%
4	Cobertura el 50 al 75%
5	Cobertura igual o superior al 75%

## 4.6 Trabajo de laboratorio.

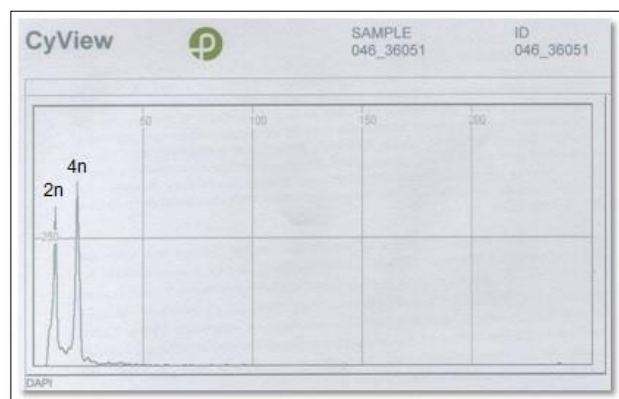
### 4.6.1 Citometría de flujo para análisis del nivel de ploidía

El número de citometrías realizables al día según los expertos del laboratorio de cultivos de tejido del IVIA es de 50 muestras diarias como máximo debido a su tedioso y meticuloso proceso, el cual se detalla a continuación.

La determinación del nivel de ploidía se realiza mediante citometría de flujo. Esta técnica de análisis celular, mide las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células a medida que se les hace fluir por el interior de un fino tubo donde se cruzan con un láser. En este punto se realiza la medición del contenido de ADN de los núcleos en interfase, esto permite realizar un posterior análisis estadístico de los datos mucho más exhaustivo y preciso, además, el gran número de células que se analizan de forma simultánea confieren a esta técnica una gran solidez (Dolezel *et al.*, 2007). Se trata de la técnica más competitiva en términos de simplicidad, precisión y costos, ya que desde que se han introducido los métodos de fluorescencia para la medición automática de ploidía, se ha encontrado un proceso sencillo que puede llevarse a cabo sin necesidad de una previa formación especialmente difícil (De Laat *et al.*, 1987).

Cada muestra a analizar, está formada por un fragmento de hoja de una superficie aproximada de 2 mm<sup>2</sup>. Este fragmento se trocea finamente junto con un fragmento de hoja control de ploidía conocida del mismo tamaño, con la ayuda de una cuchilla y unas gotas de tampón de extracción de núcleos (High resolution DNA kit type P, solution A; Partec®). A continuación, se le añade 1 ml del tampón de extracción de núcleos, se filtra a través de una malla (tipo 30 m nylon) y se añade aproximadamente 5 veces el volumen que contiene la solución de extracción de núcleos con 4-6-diamidino-2-fenil indol (DAPI) (High Resolution DNA kit type P, solution B; Partec®). Después de 5 minutos de incubación se toman 2 ml aproximadamente de la solución con los núcleos teñidos y se procede al análisis en el citómetro de flujo CyFlow® Ploidy Analyzer (Partec®). El citómetro está equipado con parámetros ópticos de detección de la fluorescencia DAPI excitados con una emisión ultravioleta UV-LED a 365 nm provisto de una lámpara de mercurio HBO 100W (Osram®).

El histograma de intensidad de fluorescencia obtenido se evalúa mediante el uso del programa informático CyView software (Partec®), incorporado en el propio citómetro, que determina la posición de los picos. Para cada análisis este programa determina el número de núcleos analizados (particles), la posición relativa de los picos (Figura 12), el coeficiente de variación del análisis (CV %) y el índice de ploidía relativo (index) de las muestras analizadas.



**Figura 12.** Histograma del preparado nuclear para control de 2x y 4x.

Durante las más de 375 citometrías de flujo hubo histogramas con dificultades de interpretación. En ocasiones, cada muestra tenía como resultado una posición diferente del pico respecto al pico de otra muestra, a su vez, los picos mostraron variabilidad en la posición respecto a su testigo o control. Los individuos



mostraron variabilidad y algunos histogramas resultaron dudosos, en tales casos se procedió a las siguientes técnicas para aclarar su nivel de ploidía:

- Repetición de citometrías con diferentes controles con distintos niveles de ploidía, llegándose a realizar en algunos casos hasta 3 análisis con distintos controles por muestra para confirmar los resultados.

- Agrupación de las muestras sin testigo para comprobación de la homogeneidad de citotipos entre sí.

Los análisis se han realizado consecutivamente en el tiempo y durante un periodo corto, lo que ha permitido una puesta a punto metodológica común, pudiéndose comparar los resultados entre individuos. Las comprobaciones reiteradas nos aseguran una total fiabilidad del nivel de ploidía de las muestras analizadas.

Una vez finalizadas todas las citometrías y obtenidos los resultados de niveles de ploidía que se especifican en el siguiente apartado, el material vegetal se congeló a  $-40^{\circ}\text{C}$  para futuros análisis genéticos.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Niveles de ploidía de las poblaciones de *C. aspera* subsp. *gentilii* de la costa atlántica suroeste de Marruecos.

La mayoría de los individuos muestreados de *C. aspera* subsp. *gentilii* (367) resultaron ser tetraploides (4x), mientras que en los restantes (8) no se obtuvo ningún resultado por encontrarse en mal estado. Todos los resultados obtenidos se encuentran recogidos en el Anexo 2.

Este resultado contrasta directamente con los resultados preliminares obtenidos en el muestreo de 2013. En el muestreo de 2013 únicamente se recogieron 10 individuos por población y el objetivo fue la localización y toma de contacto con las poblaciones, la caracterización morfométrica de los individuos, y la recogida de material para el análisis de diversidad genética. Además, se realizó la citometría de las muestras en cuyo resultado se encontraron algunos individuos diploides y triploides en muy baja proporción. Sobre dichos resultados se mencionó que algunos picos del histograma obtenidos entonces fueron dudosos, y el número de individuos por población claramente insuficiente para poder concluir sobre el nivel de ploidía de las poblaciones.

Es por ello que uno de los objetivos del presente trabajo era confirmar o desmentir estos resultados preliminares a través de un muestreo específico para citometría con un elevado número de individuos (375 individuos) y un elevado número de análisis de citometría. Los presentes resultados rechazan claramente la hipótesis de la existencia de variabilidad de citotipos intermedios que formarían un complejo híbrido dentro de *C. gentilii* y, por tanto, apoyan la hipótesis de que las poblaciones de la costa atlántica oeste de Marruecos son exclusivamente tetraploides.

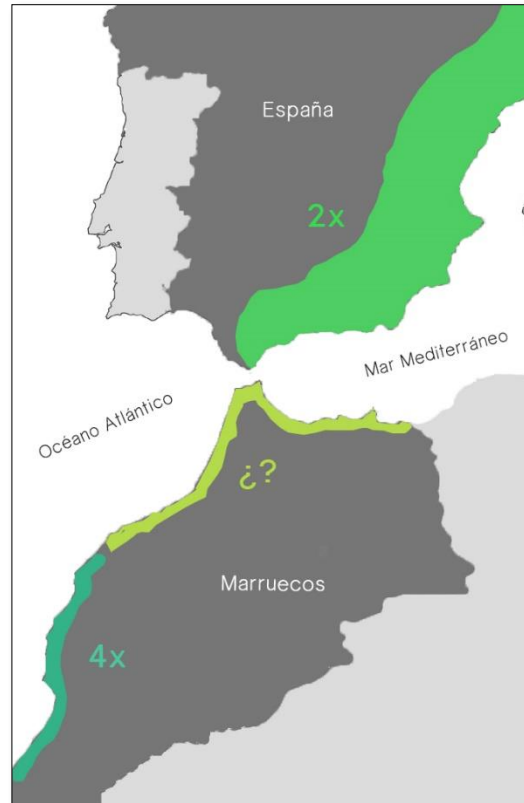
Según los resultados obtenidos todo indica la existencia de una distribución alopatrica de la especie 2x en la Península Ibérica (*C. aspera sensu lato*) y el 4x en Marruecos (*C. aspera* subsp. *gentilii*) con una discontinuidad por el Estrecho de Gibraltar, lo cual podría estar mostrando que el citotipo tetraploide es el que mejor se adapta a climas extremos y dinámicos donde la aridez resultaría limitante. Se trataría de una evidencia más que apoyaría la hipótesis de que el carácter poliploide puede suponer una serie de ventajas evolutivas en determinados momentos. Así, poblaciones con altas tasas de diversificación pero que se encuentran amenazadas por el aumento de la temperatura, cada vez más acusado en el planeta debido al cambio climático, se hallarían inmersas en procesos de poliploidización que les permitiría adaptarse mejor a los cambios.

Resultaría muy interesante estudiar la zona intermedia del Estrecho de Gibraltar donde convergen la costa Mediterránea con la costa Atlántica como modelo de zona de discontinuidad en la distribución alopatrica o transitoria entre citotipos. Estos datos confirmarían si se trata de una distribución completamente alopatrica o si por el contrario existen poblaciones mixtas (2x, 4x) en el norte de Marruecos debido al paso del citotipo diploide desde la Península a través del Estrecho (Figura 13).

Por otra parte, según los análisis morfométricos realizados con anterioridad los citotipos diploide y tetraploide son prácticamente idénticos. Esto sería consecuencia de su presumible origen autotetraploide, por lo que el segundo par de

cromosomas homólogos no se expresaría (Garmendia *et al.*, 2015). Si no hay diferencias fenotípicas (por lo menos a nivel macroscópico) que permitan actuar a la selección natural, tal vez las ventajas adquiridas tienen más que ver con: (i) la posible mayor diversidad genética y heterocigosidad de los tetraploides (Soltis *et al.*, 2004a), lo que les conferiría mayor adaptabilidad a condiciones ambientales cambiantes y mejor capacidad para regenerar poblaciones a partir de pocos individuos con menores problemas de deriva génica; y (ii) con las posibles relaciones asimétricas de cruzabilidad entre citotipos, que podrían favorecer a uno u otro en poblaciones mixtas en función de la compatibilidad polínica.

La realización de un análisis de diversidad genética, de pruebas de cruzabilidad entre citotipos, así como la comprobación de semejanza de los fenotipos a nivel microscópico como: el tamaño del polen, la densidad y tamaño de estomas en el envés, estigmas, estambres, etc. aportaría luz a la identificación de las ventajas evolutivas adquiridas en los procesos de auto-poliploidización.



**Figura 13.** Esquema representativo de los niveles de ploidía de *C. aspera sensu lato*, centrado en la posible distribución alopatrica entre España y Marruecos y en la zona que falta por prospectar.

## 5.2 Correlación entre citotipos con las condiciones de los hábitats o el gradiente latitudinal.

Las variables observadas en los hábitats de las poblaciones muestreadas tienen aptitudes muy diversas (Anexo 3). Se han muestreado poblaciones en distintos hábitats cuyas características:

- Presentaban distintos grados de presencia de especies leñosas con porcentajes de cobertura variables.
- Variaban en las características orográficas por su orientación, pendientes y llanos, presencia y ausencia de erosión y movimientos de arena.
- Tenían niveles distintos de antropización altos (con fuerte presión ganadera y actividad agrícola) y bajos (con ausencia de presiones antrópicas).
- Tenían distintos parámetros poblaciones (índice de abundancia, distribución geográfica de los individuos, presencia de plántulas, estado de la parcela y el paisaje).

A pesar de la heterogeneidad en las características de los hábitats del muestreo en las distintas poblaciones muestreadas, el resultado del nivel de ploidía ha sido totalmente homogéneo, por todo esto, podemos decir que en el territorio prospectado no existen correlaciones entre las condiciones del hábitat y la presencia o ausencia de citotipos distintos a los tetraploides.

Inicialmente también se pensó que podría existir una gradación latitudinal de citotipos: mayor presencia de citotipos diploides (2x) en el norte por proximidad con la Península Ibérica, y poblaciones puras de tetraploides (4x) en el sur de Marruecos donde además las condiciones de aridez son más acentuadas. Los presentes resultados rechazan claramente la hipótesis de la existencia de gradación de citotipos. Sin embargo, en el siguiente apartado se explica que sí se observaron interesantes diferencias, en función del gradiente latitudinal, en el estado fisiológico general de las plantas entre poblaciones.

### 5.3 Caracterización de los hábitats en los que se localizan las poblaciones

La caracterización ecológica de los hábitats de las poblaciones de *C. aspera* subsp. *gentilii* se encuentra recogida en el Anexo 3, este incluye todos los datos tomados *in situ*. Al final de este apartado, en la tabla 8 se resumen los parámetros más destacados en este aspecto. Además, en los planos como documento fotográfico se obtiene un enfoque más realista de la descripción de las poblaciones.

En ocasiones, en el espacio ocupado por las poblaciones encontramos variabilidad de las características del hábitat debido a factores naturales y/o antrópicos. El factor natural más condicionante en estas poblaciones era la aridez. La aridez variaba de norte a sur (de menos a más) siendo el factor más limitante al sur en la supervivencia de las poblaciones. A esto se suman los factores antrópicos (necesidades o costumbres agrícolas y ganaderas de la zona) que a su vez agudizan sus efectos en la vegetación con la aridez.

Las poblaciones que se desarrollaban bajo condiciones ambientales favorables (sin factores limitantes de aridez o temperatura) se encontraban con más recursos y la presión ganadera era más tenue. Se componían de plantas muy grandes y vigorosas acompañadas de plántulas. También convivían con otras especies leñosas. Los porcentajes de cobertura vegetal eran altos, además, estas poblaciones presentaban índices de abundancia medio altos y la distribución de sus individuos tendía a ser más más agregada. En cambio, en las poblaciones muestreadas que se desarrollaban bajo condiciones extremas de aridez, la presión ganadera las hacía todavía más vulnerables. Estas poblaciones poseían plantas prácticamente sin aparato vegetativo con una cobertura vegetal inferior a lo habitual, el índice de abundancia era muy bajo y los individuos de estas poblaciones se distribuían uniformemente (Tabla 8). Esta distribución uniforme muestra la aguda competencia por los recursos entre individuos. También lo más habitual fue encontrar densidades medias y bajas en las zonas naturales, mientras que en las zonas con alteraciones de tipo antrópico (borde de carreteras, obras, vallas, movimientos de tierra, bordes de cultivos, etc.) la densidad pasaba a ser muy alta.

A continuación, se resumen las características generales observadas de las cinco poblaciones muestreadas, divididas en tres grupos (Figura 14): grupo norte (*Cap Beddouza* y *Zaouiat el Kourati*), grupo centro (ambas subpoblaciones muestreadas en *Tamri*, ladera rocosa y duna) y grupo sur (*Takat* y *Sous Massa*). Esta división se ha basado en observaciones de campo sobre el estado general de la vegetación afectado por los factores naturales y antrópicos. Además, se detallan las características más notables y fácilmente comparables que se visualizaron (Tabla 8).

El grupo norte está formado por las dos poblaciones ubicadas más al norte (*Cap Beddouza* y *Zaouiat el Kourati*) (Figura 14) con unas condiciones muy favorables. Se distinguían del resto de poblaciones por ser hábitats un poco más húmedos. Esta característica queda patente por la presencia de vegetación de porte arbóreo (bosques abiertos de *Juniperus phoenicea* L. y *Tetraclinis articulata* (Vhal) en las inmediaciones), 70% de cobertura, presencia de leñosas, índices de abundancia de Braun Blanchet entre 3 y 4, distribución geográfica agregada en los márgenes de cultivos y caminos con presencia de plántulas (Tabla 8). Las poblaciones presentaban individuos muy grandes y en buen estado, con toda la vegetación circundante en flor. En concreto, en la población de *Cap Beddouza* predominaba el uso de suelo agrícola, que formaba un mosaico de cultivos que bajaba desde la colina hacia el mar llegando hasta la duna litoral, por lo que las poblaciones de *C. aspera* subsp. *gentilii* aparecían en los fértiles e irrigados taludes entre cultivos. También *Zaouiat el Kourati* estaba diferenciada del resto por la presencia de ganado vacuno, el cual es más exigente, requiriendo especies palatables de mayor porte.



Figura 14. Agrupación de las poblaciones muestreadas de *C. aspera* subsp. *gentilii* en función de sus diferencias más notables. S/E.

El grupo central o grupo centro está formado por las dos subpoblaciones de *Tamri* (TM) (Figura 14). *Tamri* es la población central (N-S) y también se encontraba en buen estado. Las dos subpoblaciones tienen una distribución de tipo uniforme (Tabla 8), se observa que están optimizando los recursos hídricos y de nutrientes, los cuales que empiezan a escasear. En concreto la sub-población de la ladera tenía un suelo más rocoso, un relieve abrupto y accidentado con un mayor porcentaje de cobertura y un índice de abundancia más positivo que la subpoblación de dunas (cobertura del 70% frente a 40% y 2 en ladera frente a + en dunas según Braun Blanchet). También presentaba una vegetación leñosa de tipo arbóreo alto. En esta sub-población de ladera la especie *C. aspera* subsp. *gentilii* tenía mayor y mejor presencia que en la sub-población de duna con suelo arenoso de relieves suaves donde la vegetación empezaba a escasear y estaba compuesta por arbustos. En la sub-población de duna *C. gentilii* se encontraba sin flor y en una calidad de estado vegetativo intermedio con las del tercer grupo, las poblaciones más resistentes ubicadas al sur.

El grupo sur está formado por las dos poblaciones ubicadas más al sur *Takat* y *Sous Massa* (Figura 14). A medida que se avanzaba hacia el sur se observaba que las condiciones de aridez eran más extremas. Se puede decir que, en concreto, la población en *Takat* se encontró al borde de la desaparición. La situación resultó similar en la siguiente población más al sur, *Sous Massa*. En ambas el aspecto de la vegetación era totalmente desértico, con una abundancia de plantas muy baja y de crecimiento nulo.

Las escasas plantas se encontraban distribuidas en grupos dispersos a lo largo de las dunas, con escasa biomasa aérea en un constante intento de rebrote. En las zonas donde el hábitat era más extremo las plantas tenían los tallos engrosados enterrados en la arena, la parte aérea estaba ausente y había rebrotes a partir de los tallos enterrados. Este comportamiento otorga a las plantas una mayor posibilidad de supervivencia y adaptación a hábitats, pero el hecho de que esto ocurra tanto en diploides (por ejemplo, en Santa Pola en la Península Ibérica) (Ferriol

et al., 2014, Alcaraz et al., 1985), como en tetraploides demuestra que no es una adaptación estricta de los tetraploides.

Además, en estas poblaciones del sur la presión ganadera era bastante más fuerte que en las demás (Tabla 8), lo que provoca una mayor escasez de plantas. La diferencia fundamental en las plantas del sur frente a las del norte es la ausencia de parte aérea. Las plantas de las poblaciones del grupo norte, se encontraban crecidas y con buena biomasa aérea gracias a la humedad y la presencia de otras plantas más palatables para el aprovechamiento ganadero. Dentro de la población de *Sous Massa* se encontró un grupo de plantas en una pequeña parcela de antiguo uso agrícola ubicada en la periferia de un poblado llamado *Timzilt*. Este grupo de plantas se caracterizaba por la presencia de plántulas a la sombra de vegetación circundante del margen de la parcela y por sus hojas hiperlobuladas.

**Tabla 8.** Resumen de las variables más significativas observadas en los hábitats de las poblaciones muestreadas de *C. aspera* subsp. *gentilii* en Marruecos. Dónde Pcob%: porcentaje de cobertura; Plñ: presencia de leñosas; lab: índice de abundancia; Dgeo: distribución geográfica; Ppl: presencia de plántulas; SuAr: suelo arenoso; RSua: reslieves suaves; Or: orientación; Pte%: porcentaje de pendiente; Mov: movimientos o deposiciones de arena; Vcom: presencia de vías de comunicación; Obr: presencia de obras o infraestructuras; Pers: presencia de personas; Gan: presión ganadera. En el cuerpo de la tabla: - significa presencia afirmativa; \* presencia con mayor intensidad; A: distribución agregada; U: distribución uniforme; E: este, O: oeste y NO: noroeste.

Grupo	Población	Pcob%	Plñ	lab	Dgeo	Ppl	SuAr	RSua	Or	Pte%	Mov	Vcom	Obr	Pers	Gan
Norte	CB	70	*	4	A	-	-	-	E	30	-	-	-	-	-
	ZA	70	*	3	A	-	-	-	O	15	-	-	-	-	-
Centro	TM (ladera)	70	*	2	U	-	-	-	NO	40	-	-	-	-	-
	TM (duna)	40	-	+	U	-	-	-	NO	10	-	-	-	-	-
Sur	TK	10	-	+	A	-	-	-		5	-	-	-	-	*
	SM	30	-	+	U	-	-	-	NO	15	-	-	-	-	*

#### 5.4 Próximos trabajos

Para próximos trabajos sería muy interesante estudiar la costa del norte de Marruecos. La zona intermedia entre ambos citotipos desvelaría si se trata de una distribución completamente alopátrica o si el paso del citotipo diploide a través del Estrecho ha generado poblaciones mixtas (2x, 4x) (Figura 13). Por otra parte, sería interesante investigar sobre las ventajas evolutivas adquiridas en los procesos de auto-poliploidización. ¿Porque el citotipo tetraploide es más competitivo en Marruecos? Para ello, sería necesario realizar estudios de diversidad genética de las poblaciones, pruebas de cruzabilidad entre citotipos, comparación de fenotipos a nivel microscópico: tamaño del polen, densidad y tamaño de estomas en el envés, estigmas, estambres, etc.

## 6. CONCLUSIONES

Los individuos que forman las poblaciones de *C. aspera* subsp. *gentilii* de la costa atlántica oeste de Marruecos son exclusivamente tetraploides (4x).

La heterogeneidad de hábitats en las poblaciones muestreadas no condiciona la presencia de otros niveles de ploidía.

No existe correlación de distintos citotipos con la localización geográfica ni con las características de los hábitats.

Es necesario estudiar la costa del norte de Marruecos como zona intermedia para desvelar si se trata de una distribución completamente alopátrica o si el paso del citotipo diploide (2x) de la Península Ibérica a través del Estrecho ha generado poblaciones mixtas (2x, 4x).

Sería interesante estudiar los mecanismos por los que el tetraploide (4x) está mejor adaptado que el diploide (2x) a situaciones de aridez acentuadas como las que se dan en Marruecos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, R.; Albach, D.; Ansell, S.; Arntzen, J.W.; Baird, S.J.E.; Bierne, N.; Boughman, J.W.; Brelsford, A.; Buerkle, C.A.; Buggs, R.; Butlin, R.K.; Dieckmann, U.; Eroukhmanoff, F.; Grill, A.; Cahan, S.H.; Hermansen, J.S.; Hewitt, G.; Hudson, A.G.; Jiggins, C.; Jones, J.; Keller, B.; Marczewski, T.; Mallet, J.; Martinez-Rodriguez, P.; Moest, M.; Mullen, S.; Nichols, R.; Nolte, A.W.; Parisod, C.; Pfennig, K.; Rice, A.M.; Ritchie, M.G.; Seifert, B.; Smadja, C.M.; Stelkens, R.; Szymura, J.M.; Vainola, R.; Wolf, J.B.W.; Zinner, D. 2013. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 229–246.
- Alcaraz, F.; Garre, N.; Sánchez, P. 1985. Catálogo de la flora cormofítica de los sistemas de dunas litorales comprendidos entre Santa Pola y Calblanque (SE de España). *Anales Biol. Universidad de Murcia* 6: 79-87.
- Ball, J. 1878. *Spicilegium Flora Marocana*. Botanical Journal of the Linnean Society, 16, 473–568.
- Bolos, O.; Vigo, J. 1995. *Flora dels Països Catalans*. Vol. III. Editorial Barcino. Barcelona.
- Bennet, M.D. 2004. Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo. *Biol J. Linn Soc.* 82: 411-423.
- Bremer K. 1996. Major clades and grades of the Asteraceae. In: Hind D.J.N., Beentje H.J. (eds.). *Compositae: Systematics: 1-7*. Proc. Int. Compositae Conf., Kew, 1994. *Royal Botanical Gardens*. Kew.
- Bretagnolle, F; Thompson, J.D. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*. 129: 1-22.
- Caballero, A. 1917. Excursión botánica a Melilla en 1915. *Trabajos del Museo Nacional de Ciencias Naturales. Serie Botánica*, 11, pp 34.
- 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*.
- Crespo, M. B.; Mateo, G. 1990. Novelty on taxonomy and nomenclature of Spanish vascular hybrids. *Collectanea Botanica* 18: 93-98.
- Darlington, C.D. 1937. *Recent Advances in Cytology*. 2nd edition. J. & A. Churchill Ltd., London. 672 pp.
- De Laat A.M.M.; Gohde, W.; Vogelzang, M.J.D.C. 1987. Determination of Ploidy of Single Plant Populations by Flow Cytometry. *Plant Breeding* 99: 303-307.
- Dolezel, J.; Greilhuber, J.; Suda, J. 2007. *Flow Cytometry with Plant Cells*. Institute of Botany Academy of Sciences.
- Emberger, L.; Maire, R. 1941. Catalogue des plantes du Maroc (Spermatophytes et Pteridophytes) Vol IV. Supplement aux volumes I, II et III. Algiers, Morocco, pp 1160.
- 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.
- Ferriol, M.; Merle H.; Garmendia, A. 2014. Microsatellite evidence for low genetic diversity and reproductive isolation in tetraploid *Centaurea seridis* (Asteraceae)



coexisting with diploid *C. aspera* and triploid hybrids in contact zones. *Botanical Journal of the Linnean Society*, in press.

**Ferriol, M.; Garmendia, A.; González, A.; Merle, H.** 2015. Allogamy-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): e0140465.

**Font, M.** 2007. *Poliploidia, filogènia i biogeografia en Centaurea L. secció Acrocentron* (Cass.) DC. Tesis doctoral. Sección Botánica, Departamento de Productos Naturales, Biología vegetal y edafología. Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

**García-Jacas, N.; Susanna, A.** 1992. Karyological notes on *Centaurea* sect. *Acrocentron*. *Plant Systematics and Evolution* 179: 1-18.

**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.; Susanna, A.; Mozaffarian, V. & Ilarsan, R.** 2000. The natural delimitation of *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae): ITS sequence analysis of the *Centaurea jacea* group. *Plant Systematics and evolution* 223: 185-199.

**García-Jacas, N.; Susanna, A.; Garnatje, T.; Vilatersana, R.** 2001. Generic delimitation and phylogeny of the subtribe Centaureinae (Asteraceae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Annals of Botany* (London) 87: 503-515.

**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.; Vilatersana, R.; Soltis, D.; 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.

**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.

**Garmendia, A.; Merle, H.; Segura, I.; Ferriol M.** 2010. Biogeografía de *Centaurea x subdecurrens* Pau nothosubsp. *subdecurrens* como indicador del estado de degradación de las dunas litorales del levante español. In: Giménez P., Marco J.A., Matarredona E., Padilla A., Sánchez A. (Eds), Biogeografía: una ciencia para la conservación del medio. Universitat d'Alacant, Alicante, Spain, pp 463-469.

**Garmendia, A.; Ferriol, M.; Juarez, J.; Zając, A.; Kałużny, K.; Merle, H.** 2015. A Rare Case of a Natural Contact Zone in Morocco between an Autopolyploid and an Allopolyploid of *Centaurea aspera* with Sterile Tetraploid Hybrids. *Plant Biology* 17 (3): 746-57.

**Gao, J.Y.; Liu, Q.; Li, Q.J.** 2014. The comparative reproductive biology of a tetraploid species, *Hedychium villosum*, and its polyploid progenitor *H. tenuiflorum* Zingiberaceae). *Plant Biology* 16:3, 683-689

**González-Bueno, A.** 1988. Les campanyes botàniques de Pius Font i Quer al Nord d'Àfrica. *Treballs de l'Institut Botànic de Barcelona*, 12, 89.

**Greuter, W.; Raab-Straube, E.** 2007. Euro+Med Notulae, 3. *Willdenowia*, 37, 139-189.

**Hardy, O.J.; De Loose, M.; Vekemans, X.; Meerts, P.** 2001a. Allozyme segregation and inter-cytotype reproductive barriers in the polyploidy complex *Centaurea jacea*. *Heredity* 87: 136-145.

- Hardy, O.J.; Vanderhoeven, S.; De Loose, M.; Meerts, P.** 2000a. Ecological, morphological and allozymic differentiation between diploid and tetraploide knapweeds (*Centaurea jacea*) from a contact zone in the Belgian Ardennes. *New Phytologist* 146: 281-290.
- Hardy, O.J.; Vanderhoeven, S.; Meerts, P.; De Loose, M.** 2000b. Spatial autocorrelation of allozyme and quantitative markers within a natural population of *Centaurea jacea* (Asteraceae). *Journal of Evolutionary Biology* 13 (4): 656-667.
- Hardy, O.J.; Vekemans, X.** 2001b. Patterns of allozyme variation in diploid and tetraploide *Centaurea jacea* at different spatial scales. *Evolution* 55(5): 943-954.
- Hellwig, F. H.** 2004. Centaureinae (Asteraceae) in the Mediterranean-History of ecogeographical radiation. *Plant Systematics and Evolution* 246: 137-162.
- Jackson, R.C.** 1982. Polyploidy and diploidy: new perspectives on chromosome-pairing and its evolutionary implications. *American Journal of Botany*, 69, 1512–1523.
- Jahandiez, E.; Maire, R.** 1934. *Catalogue des plantes du Maroc* (Spermatophytes et Pteridophytes) Vol III. Supplement aux volumes I et II. Algiers, Morocco, pp 816.
- Jiao, Y.; Wickett, N.J.; Ayyampalayam, S.; Chanderbali, A.S.; Landherr, L.; Ralph, P.E.; Tomsho, L.P.; Hu, Y.; Liang, H.; Soltis, P.S.; Soltis, D.E.; Clifton, S.W.; Schlarbaum, S.E.; Schuster, S.C.; Ma, H.; Leebens-Mack, J.; dePamphilis, C.W.** (2011) Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*, 473, 97–100.
- Koutecký, P.; Štěpánek, J.; Badurová, T.** 2012. Differentiation between diploid and tetraploid *Centaurea phrygia*: Mating barriers, morphology and geographic distribution. *Preslia* 84: 1–32.
- Laguna, E.; Crespo, M. B.; Mateo, G.; López, S.; Fabregar, C; Serra, L.; Herreo-Borgoñón, J. J.; Carretero, J. L.; Aguilera, A.; Figuerola, R.** 1998. *Flora endémica, rara o amenazada de la Comunidad Valenciana*. Colección Biodiversidad. Generalitat Valenciana. Conselleria de Medio Ambiente. Valencia.
- López, E.; Devesa, J. A.** 2008. *Contribución al conocimiento cariológico del género Centaurea L. (Asteraceae) en la Península Ibérica*. *Acta Botánica Malacitana* ISSN 0210-9506 33: 57-68.
- Lumaret, R.** 1988a. Adaptative strategies and poidy levels. *Oecol. Plant.*, 9 (1): 83-93.
- Madlung A.** 2013. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity* (Edinb).110(2):99-104.
- Maestre, F.T.** 1999. Notas sobre la flora vascular endémica de Sax (Alicante). *Blancoana* 16: 3-21.
- Martínez, N; Truyols, J.** 1994. Paleontología. Conceptos y métodos. *Ciencias de la vida* 19: 125 y 195.
- Mateo, G.; Crespo, M.** 2009. Sobre algunos híbridos ibéricos del género *Centaurea* L. (Compositae). *Flora Montiberica* 41: 28-34.
- Médail, F.; Quézel, P.** 1999. The phytogeographical significance of SW Morocco compared to the Canary Islands. *Plant Ecology*, 140, 221–244.
- Merle, H.; Garmendia, A.; Ferriol, M.** 2010. Nuevo híbrido del género *Centaurea* L. (Compositae) sección Seridia (Juss.) Czerep. *Flora Montibérica* 44: 66-71.
- Mráz P.; Španiel, S.; Keller, A.; Bowmann, G.; Farkas, A.; Šingliarová, B.; Rohr, R.P.; Broennimann, O.; Müller-Schärer, H.** 2012. Anthropogenic disturbance as a driver of microspatial and microhabitat segregation of cytotypes of *Centaurea stoebe* and cytotype interactions in secondary contact zones. *Annals of Botany* 110: 615-627.

- 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.
- 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
- Parisod, C., Holderegger, R.; Brochmann, C.** 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*, 186: 5–17.
- Pau, C.** 1898. Noticia de algunas plantas curiosas o nuevas. *Actas Sociedad Española de Historia Natural* 27: 196-200.
- Pellicer, J.; Garnatje, T.; Hidalgo, O.; Tagashira, N.; Vallès, J.; Kondo, K.** 2010. Do polyploids require proportionally less rDNA loci than their corresponding diploids? Examples from *Artemisia* subgenera *absinthium* and *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae). *Plant Biosyst.* 144: 841-848.
- Petit, C.; Bretagnolle, F.; Felber, F.** 1999. Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species. *TREE*. Vol. 14: 306-311.
- Ramsey J.; Schemske D. W.** 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Ann Rev Ecol Syst.* 29: 467-501.
- Ramsey, J.; Schemske, D.W.** 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 589–639.
- Rigual, A.** 1984. Flora y vegetación de la provincia de Alicante (*el paisaje vegetal alicantino*). Instituto de estudios Juan Gil-Albert. Alicante.
- Romaschenko, K.; Ertugrul, K.; Susanna, A.; García-Jacas, N.; Uysal, T.; Arslan, E.** (2004) New chromosome counts in the *Centaurea Jacea* group (Asteraceae, Cardueae) and some related taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 145, 345–352.
- Sagredo, R.** 1987. Flora de Almería: *plantas vasculares de la provincia*. Instituto de Estudios Almerienses. Almería.
- Siljak-Yakovlev, S.** 1986. *Étude cytogenétique et palynologique de Compositae endémiques ou reliques de la flore Yougoslave*. Thèse Doctorale, Université de Paris-Sud (Centre d'Orsay), Paris.
- Stebbins, G.L.** 1971. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Edward Arnold, London, UK.
- Sitte, P.; Weiler E.W.; Kadereit J.W.; Bresinsky, A.; Körner, C.** 2008. *Strasburger*. Tratado de botánica. 35a ed. Omega. Barcelona.
- Soltis, D.E.; Soltis, P.S.** 2009. The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology*. 60: 561-588.
- 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.
- Susanna, A.** 1988. Asientos para una flora occidental, 9. *Fontqueria* 18: 51-52.
- 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.; Garcia-Jacas, N.** 2007. Tribe Cardueae. In: J.W. Kadereit & C. Jeffrey eds. *The families and genera of vascular plants* 8: 123-147. Springer-Verlag, Berlin.

**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: 254-301. Cambridge University Press.

**Vogt, R.; Oberprieler, Ch.** 2008. *Chromosome numbers of North African phanerogams VIII*. More counts in **Compositae** – *Willdenowia* 38: 497-519.

**Wagenitz, G.** 1955. Pollenmorphologie und Systematik in der Gattung *Centaurea* L. *S.L. Flora* 142: 213-279.

**Westhoff, V. & Van Der Maarel, E.** 1978. The Braun-Blanquet approach. In Whittaker, R.H. (ed.), *Classification of plant communities*:287-399. Dr W. Junk Publishers, The Hague.

**Willkomm, H. M.** 1865. *Centaurea* L. In: H.M. Willkomm & J.M. CH. Lange eds. *Prodromus florum hispanicae...* 2: 138-169. Stuttgart.

## **ANEXOS**

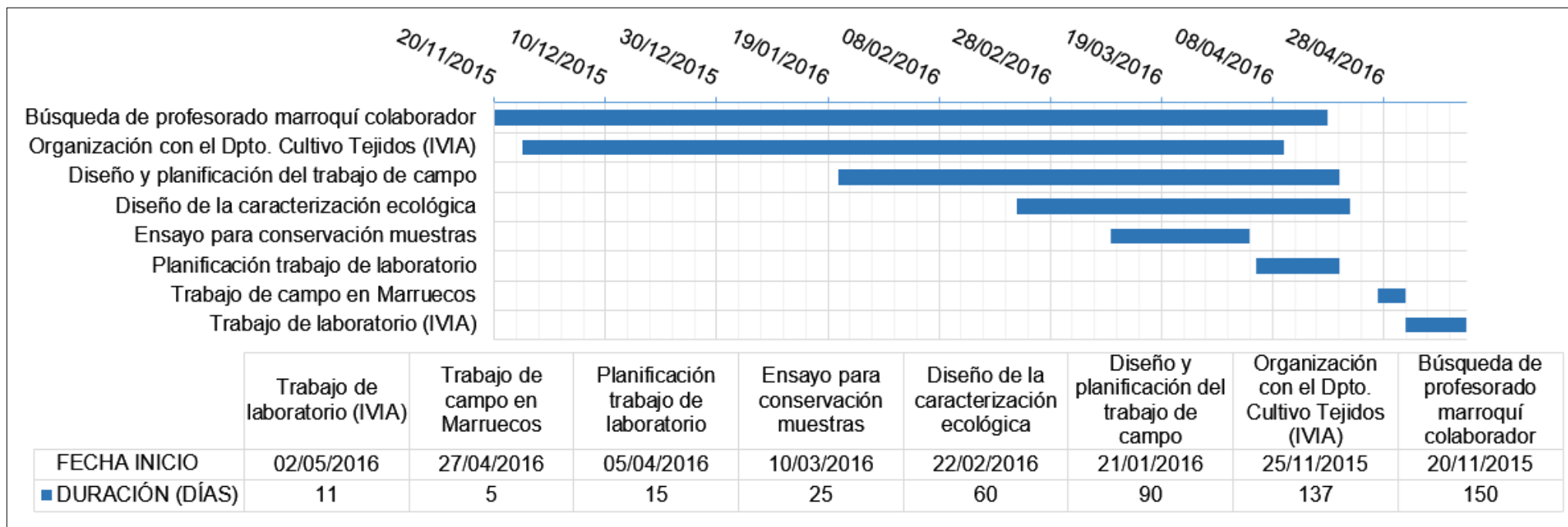
## ÍNDICE DE ANEXOS.

**ANEXO 1.** Diagrama de Gantt. Tiempo de dedicación en orden cronológico de las diferentes tareas realizadas, fecha de inicio y duración en días.

**ANEXO 2.** Georreferenciación y resultados del nivel de ploidía de 375 individuos de *C. aspera* subsp. *gentilii* muestreados en la costa atlántica marroquí. Nombre de la población, *Waypoint*, fecha y hora de la recolección, coordenadas UTM, altitud y nivel de ploidía.

**ANEXO 3.** Datos de campo. Fichas de caracterización ecológica de los hábitats en las poblaciones de *C.aspera* subsp. *gentilii* muestreadas en la costa atlántica marroquí.

**ANEXO 1.** Diagrama de Gantt. Tiempo de dedicación en orden cronológico de las diferentes tareas realizadas, fecha de inicio y duración en días.



**ANEXO 2.** Georreferenciación y resultados del nivel de ploidía de 375 individuos de *C. aspera* subsp. *gentilii* muestreados en la costa atlántica marroquí. Nombre de la población, *Waypoint*, fecha y hora de la recolección, coordenadas UTM, altitud y nivel de ploidía.

Waypoints	Código muestra	Fecha y hora	Coordenadas UTM	Altitud	Nivel ploidía
49	AGZA1 A	28-APR-16 1:36:22PM	29 R 439411 3508979	48 m	Sin lectura
50	AGZA2 A	28-APR-16 1:44:31PM	29 R 439399 3508959	55 m	4x
51	AGZA3 A	28-APR-16 1:45:33PM	29 R 439393 3508951	54 m	4x
52	AGZA4 A	28-APR-16 1:46:09PM	29 R 439393 3508951	52 m	4x
53	AGZA5 A	28-APR-16 1:46:55PM	29 R 439392 3508951	53 m	4x
54	AGZA6 A	28-APR-16 1:47:55PM	29 R 439392 3508950	53 m	4x
55	AGZA7 A	28-APR-16 1:48:48PM	29 R 439388 3508947	52 m	Sin lectura
56	AGZA8 A	28-APR-16 1:49:30PM	29 R 439389 3508947	54 m	4x
57	AGZA9 A	28-APR-16 1:52:15PM	29 R 439361 3508905	55 m	4x
58	AGZA10 A	28-APR-16 1:53:12PM	29 R 439361 3508905	55 m	4x
59	AGZA11 A	28-APR-16 1:56:15PM	29 R 439351 3508911	55 m	4x
60	AGZA12 A	28-APR-16 1:57:04PM	29 R 439351 3508912	56 m	Sin lectura
61	AGZA13 A	28-APR-16 1:58:10PM	29 R 439350 3508914	56 m	4x
62	AGZA14 A	28-APR-16 1:59:23PM	29 R 439349 3508915	58 m	4x
63	AGZA15 A	28-APR-16 2:00:17PM	29 R 439349 3508916	55 m	4x
64	AGZA16 A	28-APR-16 2:01:05PM	29 R 439347 3508916	54 m	4x
65	AGZA17 A	28-APR-16 2:02:20PM	29 R 439347 3508918	53 m	4x
66	AGZA18 A	28-APR-16 2:03:03PM	29 R 439346 3508917	52 m	4x
67	AGZA19 A	28-APR-16 2:03:49PM	29 R 439346 3508918	55 m	4x
68	AGZA20 A	28-APR-16 2:04:50PM	29 R 439342 3508918	55 m	Sin lectura
69	AGZA21 A	28-APR-16 2:05:37PM	29 R 439340 3508921	54 m	4x
70	AGZA22 A	28-APR-16 2:05:42PM	29 R 439340 3508921	54 m	4x
71	AGZA23 A	28-APR-16 2:06:44PM	29 R 439338 3508921	53 m	4x
72	AGZA24 A	28-APR-16 2:07:41PM	29 R 439327 3508928	56 m	4x
73	AGZA25 A	28-APR-16 2:09:13PM	29 R 439326 3508927	52 m	4x
74	AGZA26 A	28-APR-16 2:09:16PM	29 R 439325 3508928	53 m	4x
75	AGZA27 A	28-APR-16 2:09:56PM	29 R 439311 3508938	50 m	4x
76	AGZA28 A	28-APR-16 2:11:20PM	29 R 439311 3508937	52 m	4x
77	AGZA29 A	28-APR-16 2:13:27PM	29 R 439305 3508928	53 m	4x
78	AGZA30 A	28-APR-16 2:14:14PM	29 R 439303 3508924	51 m	4x
79	AGZA31 A	28-APR-16 2:15:46PM	29 R 439291 3508922	50 m	4x
80	AGZA32 A	28-APR-16 2:16:15PM	29 R 439290 3508922	50 m	4x
81	AGZA33 A	28-APR-16 2:16:45PM	29 R 439291 3508922	49 m	4x
82	AGZA34 A	28-APR-16 2:18:54PM	29 R 439288 3508922	51 m	4x
83	AGZA35 A	28-APR-16 2:19:36PM	29 R 439284 3508925	51 m	4x
84	AGZA36 A	28-APR-16 2:22:10PM	29 R 439272 3508931	52 m	4x
85	AGZA37 A	28-APR-16 2:23:15PM	29 R 439259 3508937	48 m	4x
86	AGZA38 A	28-APR-16 2:24:08PM	29 R 439253 3508939	49 m	4x
87	AGZA39 A	28-APR-16 2:35:09PM	29 R 439331 3508897	60 m	4x
88	AGZA40 A	28-APR-16 2:35:40PM	29 R 439329 3508896	62 m	4x
89	AGZA41 A	28-APR-16 2:36:47PM	29 R 439328 3508898	59 m	4x



Waypoints	Código muestra	Fecha y hora	Coordenadas UTM	Altitud	Nivel ploidía
90	AGZA42 A	28-APR-16 2:37:31PM	29 R 439316 3508909	58 m	4x
91	AGZA43 A	28-APR-16 2:39:11PM	29 R 439307 3508904	59 m	4x
92	AGZA44 A	28-APR-16 2:40:00PM	29 R 439309 3508903	60 m	4x
93	AGZA45 A	28-APR-16 2:40:31PM	29 R 439310 3508903	59 m	Sin lectura
94	AGZA46 A	28-APR-16 2:41:40PM	29 R 439305 3508906	62 m	4x
95	AGZA47 A	28-APR-16 2:42:26PM	29 R 439302 3508906	61 m	4x
96	AGZA48 A	28-APR-16 2:43:25PM	29 R 439301 3508898	60 m	4x
97	AGZA49 A	28-APR-16 2:45:05PM	29 R 439301 3508895	64 m	4x
98	AGZA50 A	28-APR-16 2:45:09PM	29 R 439301 3508895	64 m	4x
99	AGZA51 A	28-APR-16 2:47:56PM	29 R 439298 3508891	64 m	4x
100	AGZA52 A	28-APR-16 2:48:01PM	29 R 439299 3508891	63 m	4x
101	AGZA53 A	28-APR-16 2:48:49PM	29 R 439299 3508884	66 m	4x
102	AGZA54 A	28-APR-16 2:49:21PM	29 R 439298 3508883	71 m	4x
103	AGZA55 A	28-APR-16 2:53:38PM	29 R 439321 3508954	65 m	4x
104	AGZA56 A	28-APR-16 2:55:29PM	29 R 439323 3508946	63 m	4x
105	AGZA57 A	28-APR-16 2:56:09PM	29 R 439328 3508941	66 m	4x
106	AGZA58 A	28-APR-16 2:57:39PM	29 R 439329 3508940	65 m	4x
107	AGZA59 A	28-APR-16 2:57:58PM	29 R 439331 3508939	65 m	4x
108	AGZA60 A	28-APR-16 3:03:53PM	29 R 439374 3509013	63 m	4x
109	AGZA61 A	28-APR-16 3:06:11PM	29 R 439372 3508958	61 m	4x
110	AGZA62 A	28-APR-16 3:07:34PM	29 R 439370 3508955	64 m	4x
111	AGZA63 A	28-APR-16 3:08:22PM	29 R 439370 3508955	63 m	4x
112	AGZA64 A	28-APR-16 3:13:23PM	29 R 439362 3508925	66 m	4x
113	AGZA65 A	28-APR-16 3:13:50PM	29 R 439359 3508924	65 m	4x
114	AGTM1 A	28-APR-16 6:28:55PM	29 R 422654 3403969	242 m	4x
115	AGTM2 A	28-APR-16 6:29:23PM	29 R 422655 3403969	241 m	4x
116	AGTM3 A	28-APR-16 6:30:01PM	29 R 422655 3403969	240 m	4x
117	AGTM4 A	28-APR-16 6:30:42PM	29 R 422655 3403967	241 m	4x
118	AGTM5 A	28-APR-16 6:32:18PM	29 R 422652 3403964	242 m	4x
119	AGTM6 A	28-APR-16 6:32:27PM	29 R 422652 3403965	241 m	4x
120	AGTM7 A	28-APR-16 6:32:54PM	29 R 422652 3403965	241 m	4x
121	AGTM8 A	28-APR-16 6:33:36PM	29 R 422650 3403965	240 m	4x
122	AGTM9 A	28-APR-16 6:33:40PM	29 R 422651 3403965	241 m	4x
123	AGTM10 A	28-APR-16 6:35:13PM	29 R 422642 3403962	243 m	4x
124	AGTM11 A	28-APR-16 6:36:11PM	29 R 422639 3403960	241 m	4x
125	AGTM12 A	28-APR-16 6:37:35PM	29 R 422638 3403959	243 m	4x
126	AGTM13 A	28-APR-16 6:38:55PM	29 R 422636 3403958	242 m	4x
127	AGTM14 A	28-APR-16 6:41:27PM	29 R 422638 3403956	244 m	4x
128	AGTM15 A	28-APR-16 6:41:32PM	29 R 422638 3403956	243 m	4x
129	AGTM16 A	28-APR-16 6:43:41PM	29 R 422646 3403957	244 m	4x
130	AGTM17 A	28-APR-16 6:43:45PM	29 R 422646 3403957	245 m	4x
131	AGTM18 A	28-APR-16 6:44:49PM	29 R 422642 3403953	245 m	4x
132	AGTM19 A	28-APR-16 6:45:33PM	29 R 422647 3403956	246 m	4x
133	AGTM20 A	28-APR-16 6:46:19PM	29 R 422649 3403957	243 m	4x
134	AGTM21 A	28-APR-16 6:46:57PM	29 R 422649 3403957	244 m	4x

Waypoints	Código muestra	Fecha y hora	Coordenadas UTM	Altitud	Nivel ploidía
135	AGTM22 A	28-APR-16 6:47:45PM	29 R 422649 3403958	244 m	4x
136	AGTM23 A	28-APR-16 6:48:18PM	29 R 422650 3403958	243 m	4x
137	AGTM24 A	28-APR-16 6:48:49PM	29 R 422651 3403958	243 m	4x
138	AGTM25 A	28-APR-16 6:50:12PM	29 R 422656 3403958	245 m	4x
139	AGTM26 A	28-APR-16 6:50:15PM	29 R 422656 3403958	243 m	4x
140	AGTM27 A	28-APR-16 6:51:28PM	29 R 422657 3403959	243 m	4x
141	AGTM28 A	28-APR-16 6:52:09PM	29 R 422656 3403955	243 m	4x
142	AGTM29 A	28-APR-16 6:53:03PM	29 R 422653 3403952	243 m	4x
143	AGTM30 A	28-APR-16 6:53:43PM	29 R 422649 3403949	244 m	4x
144	AGTM31 A	28-APR-16 6:54:39PM	29 R 422648 3403947	244 m	4x
145	AGTM32 A	28-APR-16 6:55:19PM	29 R 422645 3403946	243 m	4x
146	AGTM33 A	28-APR-16 6:56:02PM	29 R 422643 3403945	244 m	4x
147	AGTM34 A	28-APR-16 6:56:47PM	29 R 422643 3403945	244 m	4x
148	AGTM35 A	28-APR-16 6:56:53PM	29 R 422643 3403945	244 m	4x
149	AGTM36 A	28-APR-16 6:58:09PM	29 R 422645 3403945	243 m	4x
150	AGTM37 A	28-APR-16 6:59:04PM	29 R 422646 3403944	244 m	4x
151	AGTM38 A	28-APR-16 6:59:44PM	29 R 422646 3403943	244 m	4x
152	AGTM39 A	28-APR-16 6:59:54PM	29 R 422647 3403941	244 m	4x
153	AGTM40 A	28-APR-16 7:00:28PM	29 R 422645 3403939	243 m	4x
154	AGTM41 A	28-APR-16 7:01:12PM	29 R 422645 3403939	244 m	4x
155	AGTM42 A	28-APR-16 7:01:41PM	29 R 422646 3403936	246 m	4x
156	AGTM43 A	28-APR-16 7:02:17PM	29 R 422640 3403933	246 m	4x
157	AGTM44 A	28-APR-16 7:02:49PM	29 R 422638 3403935	245 m	4x
158	AGTM45 A	28-APR-16 7:03:21PM	29 R 422637 3403935	246 m	4x
159	AGTM46 A	28-APR-16 7:04:10PM	29 R 422634 3403933	245 m	4x
160	AGTM47 A	28-APR-16 7:05:00PM	29 R 422633 3403932	247 m	4x
161	AGTM48 A	28-APR-16 7:05:44PM	29 R 422636 3403931	247 m	4x
162	AGTM49 A	28-APR-16 7:06:21PM	29 R 422636 3403929	247 m	4x
163	AGTM50 A	28-APR-16 7:06:47PM	29 R 422635 3403927	248 m	4x
164	AGTM51 A	28-APR-16 7:07:29PM	29 R 422637 3403927	247 m	4x
165	AGTM52 A	28-APR-16 7:08:05PM	29 R 422638 3403928	250 m	4x
166	AGTM53 A	28-APR-16 7:08:43PM	29 R 422639 3403925	253 m	4x
167	AGTM54 A	28-APR-16 7:09:44PM	29 R 422645 3403924	253 m	4x
168	AGTM55 A	28-APR-16 7:10:34PM	29 R 422652 3403922	258 m	4x
169	AGTM56 A	28-APR-16 7:11:33PM	29 R 422659 3403925	258 m	4x
170	AGTM57 A	28-APR-16 7:12:18PM	29 R 422660 3403924	257 m	4x
171	AGTM58 A	28-APR-16 7:12:37PM	29 R 422660 3403924	257 m	4x
172	AGTM59 A	28-APR-16 7:13:27PM	29 R 422662 3403926	258 m	4x
173	AGTM60 A	28-APR-16 7:14:07PM	29 R 422664 3403927	259 m	4x
174	AGTM61 A	28-APR-16 7:14:54PM	29 R 422667 3403933	258 m	4x
175	AGTM62 A	28-APR-16 7:15:26PM	29 R 422668 3403934	257 m	4x
176	AGTM63 A	28-APR-16 7:15:59PM	29 R 422673 3403936	256 m	4x
177	AGTM64 A	28-APR-16 7:16:24PM	29 R 422674 3403936	256 m	4x
178	AGTM65 A	28-APR-16 7:16:58PM	29 R 422672 3403938	253 m	4x
179	AGTM66 A	28-APR-16 7:18:39PM	29 R 422667 3403943	252 m	4x

Waypoints	Código muestra	Fecha y hora	Coordenadas UTM	Altitud	Nivel ploidía
180	AGTM67 A	28-APR-16 7:19:37PM	29 R 422658 3403947	248 m	4x
181	AGTM68 A	28-APR-16 7:19:53PM	29 R 422658 3403949	247 m	4x
182	AGTM69 A	28-APR-16 7:20:04PM	29 R 422655 3403946	246 m	4x
183	AGTM70 A	28-APR-16 7:20:58PM	29 R 422642 3403945	240 m	4x
184	AGTM71 A	28-APR-16 7:21:58PM	29 R 422646 3403962	236 m	4x
185	AGTM72 A	29-APR-16 7:53:40AM	29 R 421322 3403737	78 m	4x
186	AGTM73 A	29-APR-16 7:54:24AM	29 R 421321 3403733	79 m	4x
187	AGTM74 A	29-APR-16 7:55:00AM	29 R 421318 3403728	79 m	4x
188	AGTM75 A	29-APR-16 7:55:37AM	29 R 421317 3403727	79 m	4x
189	AGTM76 A	29-APR-16 7:56:20AM	29 R 421310 3403726	79 m	4x
190	AGTM77 A	29-APR-16 7:57:08AM	29 R 421308 3403724	78 m	4x
191	AGTM78 A	29-APR-16 7:58:54AM	29 R 421308 3403715	80 m	4x
192	AGTM79 A	29-APR-16 7:59:53AM	29 R 421301 3403711	79 m	4x
193	AGTM80 A	29-APR-16 8:01:01AM	29 R 421294 3403716	79 m	4x
194	AGTM81 A	29-APR-16 8:02:03AM	29 R 421289 3403714	79 m	Sin lectura
195	AGTM82 A	29-APR-16 8:02:42AM	29 R 421283 3403716	78 m	4x
196	AGTM83 A	29-APR-16 8:04:30AM	29 R 421273 3403702	80 m	4x
197	AGTM84 A	29-APR-16 8:06:36AM	29 R 421283 3403676	81 m	4x
198	AGTM85 A	29-APR-16 8:07:28AM	29 R 421282 3403674	82 m	Sin lectura
199	AGTM86 A	29-APR-16 8:09:03AM	29 R 421276 3403655	78 m	4x
200	AGTM87 A	29-APR-16 8:09:47AM	29 R 421274 3403657	83 m	4x
201	AGTM88 A	29-APR-16 8:10:10AM	29 R 421273 3403655	83 m	4x
202	AGTM89 A	29-APR-16 8:10:39AM	29 R 421272 3403655	84 m	4x
203	AGTM90 A	29-APR-16 8:12:03AM	29 R 421271 3403652	84 m	4x
204	AGTM91 A	29-APR-16 8:12:36AM	29 R 421270 3403651	84 m	4x
205	AGTM92 A	29-APR-16 8:13:09AM	29 R 421271 3403648	84 m	4x
206	AGTM93 A	29-APR-16 8:13:54AM	29 R 421270 3403646	83 m	4x
207	AGTM94 A	29-APR-16 8:14:08AM	29 R 421269 3403646	82 m	4x
208	AGTM95 A	29-APR-16 8:15:29AM	29 R 421267 3403641	82 m	4x
209	AGTM96 A	29-APR-16 8:16:20AM	29 R 421262 3403640	82 m	4x
210	AGTM97 A	29-APR-16 8:16:51AM	29 R 421258 3403640	81 m	4x
211	AGTM98 A	29-APR-16 8:17:41AM	29 R 421256 3403638	80 m	4x
212	AGTM99 A	29-APR-16 8:18:38AM	29 R 421249 3403634	81 m	4x
213	AGTM100 A	29-APR-16 8:19:15AM	29 R 421248 3403633	82 m	4x
214	AGTM101 A	29-APR-16 8:19:57AM	29 R 421243 3403631	82 m	4x
215	AGTM102 A	29-APR-16 8:20:29AM	29 R 421237 3403630	81 m	4x
216	AGTM103 A	29-APR-16 8:21:45AM	29 R 421237 3403631	81 m	4x
217	AGTM104 A	29-APR-16 8:22:46AM	29 R 421235 3403630	85 m	4x
218	AGTM105 A	29-APR-16 8:23:36AM	29 R 421233 3403629	80 m	4x
219	AGTM106 A	29-APR-16 8:24:20AM	29 R 421231 3403627	83 m	4x
220	AGTM107 A	29-APR-16 8:25:31AM	29 R 421221 3403627	83 m	4x
221	AGTM108 A	29-APR-16 8:26:09AM	29 R 421220 3403627	81 m	5x
222	AGTM109 A	29-APR-16 8:27:10AM	29 R 421218 3403627	81 m	4x
223	AGTM110 A	29-APR-16 8:28:28AM	29 R 421214 3403625	85 m	4x
224	AGTM111 A	29-APR-16 8:29:10AM	29 R 421207 3403629	83 m	4x

Waypoints	Código muestra	Fecha y hora	Coordenadas UTM	Altitud	Nivel ploidía
225	AGTM112 A	29-APR-16 8:36:50AM	29 R 421046 3403822	61 m	4x
226	AGTM113 A	29-APR-16 8:38:28AM	29 R 421045 3403822	60 m	4x
227	AGTM114 A	29-APR-16 8:39:23AM	29 R 421042 3403821	63 m	4x
228	AGTK1 A	29-APR-16 11:59:34AM	29 R 441615 3347395	69 m	4x
229	AGTK2 A	29-APR-16 12:06:01PM	29 R 440947 3347422	60 m	4x
230	AGTK3 A	29-APR-16 12:06:39PM	29 R 440943 3347421	58 m	4x
231	AGTK4 A	29-APR-16 12:07:49PM	29 R 440938 3347424	63 m	4x
232	AGTK5 A	29-APR-16 12:09:19PM	29 R 440938 3347421	60 m	4x
233	AGTK6 A	29-APR-16 12:10:11PM	29 R 440937 3347420	61 m	4x
234	AGTK7 A	29-APR-16 12:11:28PM	29 R 440929 3347424	57 m	4x
235	AGTK8 A	29-APR-16 12:12:36PM	29 R 440932 3347425	61 m	4x
236	AGTK9 A	29-APR-16 12:39:42PM	29 R 440951 3347402	59 m	4x
237	AGTK10 A	29-APR-16 12:39:48PM	29 R 440948 3347402	60 m	4x
238	AGTK11 A	29-APR-16 12:41:00PM	29 R 440940 3347399	59 m	4x
239	AGTK12 A	29-APR-16 12:41:43PM	29 R 440943 3347401	65 m	4x
240	AGTK13 A	29-APR-16 12:42:20PM	29 R 440935 3347399	64 m	4x
241	AGTK14 A	29-APR-16 12:42:51PM	29 R 440935 3347399	62 m	4x
242	AGTK15 A	29-APR-16 12:44:38PM	29 R 440900 3347409	60 m	4x
243	AGTK16 A	29-APR-16 12:45:44PM	29 R 440903 3347407	65 m	4x
244	AGTK17 A	29-APR-16 12:46:40PM	29 R 440909 3347408	62 m	4x
245	AGTK18 A	29-APR-16 12:48:54PM	29 R 440884 3347405	63 m	4x
246	AGTK19 A	29-APR-16 12:51:34PM	29 R 440861 3347409	66 m	4x
247	AGTK20 A	29-APR-16 12:52:51PM	29 R 440851 3347411	68 m	4x
248	AGTK21 A	29-APR-16 12:53:47PM	29 R 440846 3347409	66 m	4x
249	AGTK22 A	29-APR-16 12:59:12PM	29 R 440868 3347420	70 m	4x
250	AGTK23 A	29-APR-16 1:00:23PM	29 R 440869 3347417	69 m	4x
251	AGTK24 A	29-APR-16 1:01:09PM	29 R 440876 3347421	70 m	4x
252	AGTK25 A	29-APR-16 1:04:20PM	29 R 440922 3347436	70 m	4x
253	AGTK26 A	29-APR-16 1:05:54PM	29 R 440941 3347429	72 m	4x
254	AGTK27 A	29-APR-16 1:06:35PM	29 R 440946 3347425	71 m	4x
255	AGTK28 A	29-APR-16 1:07:28PM	29 R 440949 3347428	72 m	4x
256	AGTK29 A	29-APR-16 1:08:37PM	29 R 440958 3347434	71 m	4x
257	AGTK30 A	29-APR-16 1:09:26PM	29 R 440959 3347432	72 m	4x
258	AGTK31 A	29-APR-16 1:10:19PM	29 R 440963 3347431	71 m	4x
259	AGTK32 A	29-APR-16 1:11:29PM	29 R 440960 3347421	72 m	4x
260	AGTK33 A	29-APR-16 1:12:05PM	29 R 440961 3347416	70 m	4x
261	AGTK34 A	29-APR-16 1:12:57PM	29 R 440966 3347417	70 m	4x
262	AGTK35 A	29-APR-16 1:14:53PM	29 R 440999 3347414	73 m	4x
263	AGTK36 A	29-APR-16 1:16:00PM	29 R 440998 3347415	72 m	4x
264	AGTK37 A	29-APR-16 1:16:39PM	29 R 441000 3347413	73 m	4x
265	AGTK38 A	29-APR-16 1:17:42PM	29 R 441002 3347415	70 m	4x
266	AGTK39 A	29-APR-16 1:18:12PM	29 R 441004 3347415	72 m	4x
267	AGTK40 A	29-APR-16 1:18:41PM	29 R 441004 3347415	69 m	4x
268	AGTK41 A	29-APR-16 1:19:19PM	29 R 441006 3347414	74 m	4x
269	AGTK42 A	29-APR-16 1:20:17PM	29 R 441009 3347413	69 m	4x

Waypoints	Código muestra	Fecha y hora	Coordenadas UTM	Altitud	Nivel ploidía
270	AGTK43 A	29-APR-16 1:20:54PM	29 R 441012 3347414	70 m	4x
271	AGTK44 A	29-APR-16 1:21:23PM	29 R 441013 3347413	70 m	4x
272	AGTK45 A	29-APR-16 1:22:12PM	29 R 441017 3347414	72 m	4x
273	AGTK46 A	29-APR-16 1:23:05PM	29 R 441021 3347412	69 m	4x
274	AGTK47 A	29-APR-16 1:23:53PM	29 R 441026 3347417	71 m	4x
275	AGTK48 A	29-APR-16 1:24:59PM	29 R 441031 3347416	71 m	4x
276	AGTK49 A	29-APR-16 1:26:33PM	29 R 441051 3347420	72 m	4x
277	AGTK50 A	29-APR-16 1:26:56PM	29 R 441051 3347420	71 m	4x
278	AGTK51 A	29-APR-16 1:29:19PM	29 R 441068 3347416	72 m	4x
279	AGTK52 A	29-APR-16 1:32:18PM	29 R 441086 3347427	68 m	4x
280	AGTK53 A	29-APR-16 1:32:57PM	29 R 441086 3347428	72 m	4x
281	AGTK54 A	29-APR-16 1:35:17PM	29 R 441081 3347443	67 m	4x
282	AGTK55 A	29-APR-16 1:36:28PM	29 R 441077 3347438	72 m	4x
283	AGTK56 A	29-APR-16 1:36:31PM	29 R 441077 3347438	71 m	4x
284	AGTK57 A	29-APR-16 1:36:34PM	29 R 441077 3347438	70 m	4x
285	AGTK58 A	29-APR-16 1:37:10PM	29 R 441083 3347444	69 m	4x
286	AGTK59 A	29-APR-16 1:38:26PM	29 R 441076 3347442	68 m	4x
287	AGTK60 A	29-APR-16 1:39:01PM	29 R 441077 3347441	67 m	4x
288	AGTK61 A	29-APR-16 1:39:09PM	29 R 441077 3347441	67 m	4x
289	AGTK62 A	29-APR-16 1:40:16PM	29 R 441071 3347439	71 m	4x
290	AGTK63 A	29-APR-16 1:40:48PM	29 R 441070 3347441	68 m	4x
291	AGTK64 A	29-APR-16 1:41:43PM	29 R 441063 3347441	69 m	4x
292	AGTK65 A	29-APR-16 1:42:26PM	29 R 441064 3347439	69 m	4x
293	AGTK66 A	29-APR-16 1:43:24PM	29 R 441061 3347439	63 m	4x
294	AGSM1 A	29-APR-16 5:38:27PM	29 R 422352 3300016	128 m	4x
295	AGSM2 A	29-APR-16 5:39:08PM	29 R 422351 3300016	129 m	4x
296	AGSM3 A	29-APR-16 5:39:16PM	29 R 422351 3300016	129 m	4x
297	AGSM4 A	29-APR-16 5:39:19PM	29 R 422351 3300016	128 m	4x
298	AGSM5 A	29-APR-16 5:42:51PM	29 R 422359 3300019	131 m	4x
299	AGSM6 A	29-APR-16 5:43:26PM	29 R 422360 3300018	134 m	4x
300	AGSM7 A	29-APR-16 5:44:35PM	29 R 422360 3300019	132 m	4x
301	AGSM8 A	29-APR-16 5:46:13PM	29 R 422359 3300021	136 m	4x
302	AGSM9 A	29-APR-16 5:46:17PM	29 R 422359 3300021	135 m	4x
303	AGSM10 A	29-APR-16 5:46:49PM	29 R 422363 3300019	134 m	4x
304	AGSM11 A	29-APR-16 5:47:26PM	29 R 422362 3300019	132 m	4x
305	AGSM12 A	29-APR-16 5:47:53PM	29 R 422362 3300019	136 m	4x
306	AGSM13 A	29-APR-16 5:48:27PM	29 R 422364 3300023	135 m	4x
307	AGSM14 A	29-APR-16 5:49:00PM	29 R 422368 3300023	135 m	4x
308	AGSM15 A	29-APR-16 5:49:50PM	29 R 422369 3300030	136 m	4x
309	AGSM16 A	29-APR-16 5:50:29PM	29 R 422365 3300033	133 m	4x
310	AGSM17 A	29-APR-16 5:51:09PM	29 R 422364 3300033	134 m	4x
311	AGSM18 A	29-APR-16 5:51:45PM	29 R 422368 3300034	136 m	4x
312	AGSM19 A	29-APR-16 5:52:40PM	29 R 422369 3300036	136 m	4x
313	AGSM20 A	29-APR-16 5:53:52PM	29 R 422374 3300034	139 m	4x
314	AGSM21 A	29-APR-16 5:59:06PM	29 R 422488 3300077	147 m	4x

Waypoints	Código muestra	Fecha y hora	Coordenadas UTM	Altitud	Nivel ploidía
315	AGSM22 A	29-APR-16 6:08:04PM	29 R 422815 3300182	111 m	4x
316	AGSM23 A	29-APR-16 6:08:42PM	29 R 422815 3300182	108 m	4x
317	AGSM24 A	29-APR-16 6:17:26PM	29 R 423164 3300313	93 m	4x
318	AGSM25 A	29-APR-16 6:17:51PM	29 R 423166 3300313	92 m	4x
319	AGSM26 A	29-APR-16 6:18:30PM	29 R 423166 3300314	90 m	4x
320	AGSM27 A	29-APR-16 6:19:03PM	29 R 423167 3300314	93 m	4x
321	AGSM28 A	29-APR-16 6:26:11PM	29 R 423495 3300480	86 m	4x
322	AGSM29 A	29-APR-16 6:27:21PM	29 R 423493 3300480	87 m	4x
323	AGSM30 A	29-APR-16 6:27:41PM	29 R 423493 3300480	86 m	4x
324	AGSM31 A	29-APR-16 6:28:16PM	29 R 423492 3300479	80 m	4x
325	AGSM32 A	29-APR-16 6:28:40PM	29 R 423492 3300479	85 m	4x
326	AGSM33 A	29-APR-16 6:29:24PM	29 R 423494 3300478	82 m	4x
327	AGSM34 A	29-APR-16 6:30:36PM	29 R 423495 3300477	84 m	4x
328	AGSM35 A	29-APR-16 6:30:42PM	29 R 423495 3300477	84 m	4x
329	AGSM36 A	29-APR-16 6:31:00PM	29 R 423496 3300477	84 m	4x
330	AGSM37 A	29-APR-16 6:31:31PM	29 R 423497 3300478	84 m	4x
331	AGSM38 A	29-APR-16 6:32:04PM	29 R 423499 3300478	86 m	4x
332	AGSM39 A	29-APR-16 6:32:49PM	29 R 423500 3300479	83 m	4x
333	AGSM40 A	29-APR-16 6:33:16PM	29 R 423498 3300479	82 m	4x
334	AGSM41 A	29-APR-16 6:33:54PM	29 R 423499 3300480	83 m	4x
335	AGSM42 A	29-APR-16 6:34:36PM	29 R 423501 3300481	81 m	4x
336	AGSM43 A	29-APR-16 6:35:11PM	29 R 423501 3300483	81 m	4x
337	AGSM44 A	29-APR-16 6:35:40PM	29 R 423500 3300484	83 m	4x
338	AGSM45 A	29-APR-16 6:36:10PM	29 R 423500 3300485	83 m	4x
339	AGSM46 A	29-APR-16 6:36:47PM	29 R 423504 3300484	84 m	4x
340	AGSM47 A	29-APR-16 6:37:16PM	29 R 423505 3300483	83 m	4x
341	AGSM48 A	29-APR-16 6:37:42PM	29 R 423506 3300482	83 m	4x
342	AGSM49 A	29-APR-16 6:38:13PM	29 R 423506 3300480	83 m	4x
343	AGSM50 A	29-APR-16 6:38:34PM	29 R 423505 3300480	83 m	4x
344	AGSM51 A	29-APR-16 6:38:58PM	29 R 423504 3300479	83 m	4x
345	AGSM52 A	29-APR-16 6:39:26PM	29 R 423504 3300474	83 m	4x
346	AGSM53 A	29-APR-16 6:40:00PM	29 R 423504 3300473	83 m	4x
347	AGSM54 A	29-APR-16 6:40:28PM	29 R 423506 3300475	81 m	4x
348	AGSM55 A	29-APR-16 6:41:03PM	29 R 423509 3300473	81 m	4x
349	AGSM56 A	29-APR-16 6:41:36PM	29 R 423511 3300473	82 m	4x
350	AGSM57 A	29-APR-16 6:41:54PM	29 R 423514 3300474	80 m	4x
351	AGSM58 A	29-APR-16 6:42:38PM	29 R 423515 3300474	81 m	4x
352	AGSM59 A	29-APR-16 6:43:27PM	29 R 423519 3300474	80 m	4x
353	AGSM60 A	29-APR-16 6:43:30PM	29 R 423519 3300474	81 m	4x
354	AGSM61 A	29-APR-16 6:44:15PM	29 R 423520 3300475	81 m	4x
355	AGSM62 A	29-APR-16 6:44:17PM	29 R 423520 3300475	81 m	4x
356	AGSM63 A	29-APR-16 6:44:45PM	29 R 423520 3300474	81 m	4x
357	AGSM64 A	29-APR-16 6:45:00PM	29 R 423522 3300475	80 m	4x
358	AGCB1 A	30-APR-16 5:13:42PM	29 S 491860 3616181	94 m	4x
359	AGCB2 A	30-APR-16 5:49:36PM	29 S 492176 3617370	40 m	4x

Waypoints	Código muestra	Fecha y hora	Coordenadas UTM	Altitud	Nivel ploidía
360	AGCB3 A	30-APR-16 5:49:55PM	29 S 492178 3617371	39 m	4x
361	AGCB4 A	30-APR-16 5:50:18PM	29 S 492181 3617374	37 m	4x
362	AGCB5 A	30-APR-16 5:50:47PM	29 S 492183 3617376	35 m	4x
363	AGCB6 A	30-APR-16 5:51:14PM	29 S 492183 3617376	36 m	4x
364	AGCB7 A	30-APR-16 5:51:35PM	29 S 492183 3617376	44 m	4x
365	AGCB8 A	30-APR-16 5:52:01PM	29 S 492183 3617377	40 m	4x
366	AGCB9 A	30-APR-16 5:52:10PM	29 S 492183 3617378	41 m	4x
367	AGCB10 A	30-APR-16 5:52:50PM	29 S 492188 3617383	41 m	4x
368	AGCB11 A	30-APR-16 5:53:12PM	29 S 492189 3617383	39 m	4x
369	AGCB12 A	30-APR-16 5:53:29PM	29 S 492190 3617384	37 m	4x
370	AGCB13 A	30-APR-16 5:54:14PM	29 S 492191 3617384	37 m	4x
371	AGCB14 A	30-APR-16 5:54:57PM	29 S 492194 3617389	41 m	4x
372	AGCB15 A	30-APR-16 5:55:39PM	29 S 492206 3617401	42 m	4x
373	AGCB16 A	30-APR-16 5:56:24PM	29 S 492208 3617404	38 m	4x
374	AGCB17 A	30-APR-16 5:58:08PM	29 S 492209 3617421	41 m	4x
375	AGCB18 A	30-APR-16 5:58:46PM	29 S 492208 3617419	39 m	4x
376	AGCB19 A	30-APR-16 5:59:17PM	29 S 492205 3617413	42 m	4x
377	AGCB20 A	30-APR-16 5:59:49PM	29 S 492202 3617407	29 m	4x
378	AGCB21 A	30-APR-16 6:00:16PM	29 S 492202 3617406	41 m	4x
379	AGCB22 A	30-APR-16 6:00:37PM	29 S 492201 3617405	44 m	4x
380	AGCB23 A	30-APR-16 6:01:02PM	29 S 492201 3617404	36 m	4x
381	AGCB24 A	30-APR-16 6:01:04PM	29 S 492201 3617404	41 m	4x
382	AGCB25 A	30-APR-16 6:02:15PM	29 S 492190 3617394	38 m	4x
383	AGCB26 A	30-APR-16 6:02:37PM	29 S 492189 3617394	41 m	4x
384	AGCB27 A	30-APR-16 6:03:09PM	29 S 492188 3617392	41 m	4x
385	AGCB28 A	30-APR-16 6:03:48PM	29 S 492187 3617391	40 m	4x
386	AGCB29 A	30-APR-16 6:04:19PM	29 S 492187 3617392	38 m	4x
387	AGCB30 A	30-APR-16 6:05:22PM	29 S 492177 3617382	40 m	4x
388	AGCB31 A	30-APR-16 6:05:48PM	29 S 492176 3617382	42 m	Sin lectura
389	AGCB32 A	30-APR-16 6:06:20PM	29 S 492174 3617380	42 m	4x
390	AGCB33 A	30-APR-16 6:07:17PM	29 S 492164 3617362	40 m	4x
391	AGCB34 A	30-APR-16 6:07:49PM	29 S 492164 3617359	41 m	4x
392	AGCB35 A	30-APR-16 6:08:23PM	29 S 492163 3617358	38 m	4x
393	AGCB36 A	30-APR-16 6:09:01PM	29 S 492163 3617356	40 m	4x
394	AGCB37 A	30-APR-16 6:10:15PM	29 S 492160 3617354	41 m	4x
395	AGCB38 A	30-APR-16 6:10:38PM	29 S 492157 3617351	37 m	4x
396	AGCB39 A	30-APR-16 6:11:54PM	29 S 492156 3617350	41 m	4x
397	AGCB40 A	30-APR-16 6:12:25PM	29 S 492153 3617346	41 m	4x
398	AGCB41 A	30-APR-16 6:12:51PM	29 S 492150 3617339	44 m	4x
399	AGCB42 A	30-APR-16 6:13:22PM	29 S 492148 3617338	43 m	4x
400	AGCB43 A	30-APR-16 6:13:50PM	29 S 492149 3617337	42 m	4x
401	AGCB44 A	30-APR-16 6:14:24PM	29 S 492148 3617336	39 m	4x
402	AGCB45 A	30-APR-16 6:14:33PM	29 S 492148 3617336	41 m	4x
403	AGCB46 A	30-APR-16 6:14:56PM	29 S 492148 3617336	44 m	4x
404	AGCB47 A	30-APR-16 6:15:28PM	29 S 492146 3617334	41 m	4x

Waypoints	Código muestra	Fecha y hora	Coordenadas UTM	Altitud	Nivel ploidía
405	AGCB48 A	30-APR-16 6:16:24PM	29 S 492144 3617332	40 m	4x
406	AGCB49 A	30-APR-16 6:17:00PM	29 S 492144 3617332	40 m	4x
407	AGCB50 A	30-APR-16 6:17:32PM	29 S 492143 3617330	42 m	4x
408	AGCB51 A	30-APR-16 6:18:16PM	29 S 492142 3617328	42 m	4x
409	AGCB52 A	30-APR-16 6:18:53PM	29 S 492140 3617326	41 m	4x
410	AGCB53 A	30-APR-16 6:19:19PM	29 S 492139 3617326	42 m	4x
411	AGCB54 A	30-APR-16 6:19:41PM	29 S 492138 3617327	43 m	4x
412	AGCB55 A	30-APR-16 6:20:03PM	29 S 492136 3617327	41 m	4x
413	AGCB56 A	30-APR-16 6:20:10PM	29 S 492135 3617325	42 m	4x
414	AGCB57 A	30-APR-16 6:21:41PM	29 S 492128 3617311	42 m	4x
415	AGCB58 A	30-APR-16 6:22:11PM	29 S 492126 3617311	41 m	4x
416	AGCB59 A	30-APR-16 6:22:50PM	29 S 492118 3617303	41 m	4x
417	AGCB60 A	30-APR-16 6:23:22PM	29 S 492119 3617302	42 m	4x
418	AGCB61 A	30-APR-16 6:23:55PM	29 S 492116 3617299	42 m	4x
419	AGCB62 A	30-APR-16 6:24:19PM	29 S 492115 3617296	39 m	4x
420	AGCB63 A	30-APR-16 6:24:43PM	29 S 492115 3617296	41 m	4x
421	AGCB64 A	30-APR-16 6:25:44PM	29 S 492102 3617283	40 m	4x
422	AGCB65 A	30-APR-16 6:26:21PM	29 S 492102 3617281	40 m	4x
423	AGCB66 A	30-APR-16 6:27:02PM	29 S 492097 3617274	40 m	4x



**ANEXO 3.** Datos de campo. Fichas de caracterización ecológica de los hábitats en las poblaciones de *C. aspera* subsp. *gentilii* muestreadas en la costa atlántica marroquí.

**Fecha del muestreo:** 30 de abril de 2016

**Población:** *Cap Beddouza* (CB).

**Material recolectado:** 66 hojas y 50 capítulos.

**Waypoints GPS:** desde 358 hasta 423.

## VEGETACIÓN

**Tipo de vegetación:** cultivos de hortícolas (*Zea mays*, *Solanum lycopersicum*, etc.) junto a vegetación dunar con *Halimium halimifolium* y vegetación arvense de borde de camino.

**Especie/s dominante/s:** plantas matorrales de borde de camino, *Paronychia capitata*, *Echium sabulicola*, *Alyssum linifolium*, *Arundo donax*, *Cardus sp.*, etc.

**Porcentaje de cobertura:** entre 40 y 70% distribuido según el esquema de la figura adjunta.



Esquema de distribución de porcentajes de cobertura de *C. aspera* subsp. *gentilii* en Cap Beddouza (Marruecos). Fuente: elaboración propia.

**Presencia de leñosas:** sí, arbustos altos.

## PARÁMETROS POBLACIONALES

**Índice de abundancia (Braun-Blanquet):** 2 y en algunos tramos 3.

**Distribución geográfica:** agregada.

**Presencia de plántulas:** sí.

**Descripción de la parcela:** espacios intensamente humanizados. *C. gentilii* se encuentra en parcelas lineales, bordes de caminos, bordes de cultivos y taludes.

**Descripción del paisaje:** mosaico postdunar de cultivos hortícolas con riego por acequia, taludes y duna semifija en primera línea de costa.

## OROGRAFÍA

**Tipo de suelo:** dunar arenoso.

**Relieve:** suaves.

**Orientación:** Este postdunar.

**Pendiente:** entre 20 y 30% en taludes y 0 y 5% en mosaico de cultivos.

**Marcas de erosión:** no.

**Movimientos o deposiciones de arena:** sí, escasos movimientos eólicos y antrópicos por los cultivos.

### ANTROPIZACIÓN

**Carreteras y proximidad (<500m):** sí a 500 m.

**Pistas y proximidad (<500m):** sí, contigua a la población que se encuentra agregada en el borde de la pista.

**Sendas y proximidad (<500m):** sí, contiguas.

**Basuras:** no.

**Presencia personas/ turismo:** sí, agricultores locales.

**Urbanización/ infraestructuras:** no.

### GANADERÍA

**Presencia y tipo:** sí, asnal.

**Centaurea mordida:** no.

**Fecha del muestreo:** 28 de abril de 2016

**Población:** *Zaouiat el Kourati* (ZA).

**Material recolectado:** 65 hojas

**Waypoints GPS:** desde 49 hasta 113

### VEGETACIÓN

**Tipo de vegetación:** vegetación dunar formada por especies muy típicas de las costas del suroeste ibérico y noroeste marroquí con *Retama monosperma* y *Rhus albida*. En la vegetación climas estaría presente el *Juniperus phoenicea* y *Tetraclinis auriculata*.

**Especie/s dominante/s:** *Avena sterilis*, *Malva parviflora*, *Ononix natrix*, *Retama monosperma*, *Volutaria lipii*, *Echium vulgare*, *Paronychia argentea*, *Emex spinosa*, *Anagallis monelli*, *Chrysanthemum sp.*, *Anacyclus sp.*, *Diploaxis sp.*, *Herodium sp.*, *Cardus sp.*, *Nicotiana glauca*, *Hordeum vulgare*, *Hordeum murinum*.

**Porcentaje de cobertura:** > 70%

**Presencia de leñosas:** *Nicotiana glauca*, *Retama monosperma* y *Rhus albida*.

### PARÁMETROS POBLACIONALES

**Índice de abundancia (Braun-Blanquet):** 3

**Distribución geográfica:** agregada.

**Presencia de plántulas:** sí

**Descripción de la parcela:** *C. gentilii* tiene una distribución agregada en bordes de caminos, bordes de construcción y en ribazos de cultivos de *Zea Mays*, *Triticum vulgare* y *Hordeum vulgare*.

**Descripción del paisaje:** típico de duna fija natural con matorral litoral próximo a la costa de la playa de arena ligeramente antropizada.

## OROGRAFÍA

**Tipo de suelo:** dunar arenoso con rocas calcáreas.

**Relieve:** suave que forma colina seguida de una ladera hacia el mar.

**Orientación:** Oeste.

**Pendiente:** ≈15%

**Marcas de erosión:** no, se trata de una duna fija.

**Movimientos o deposiciones de arena:** sí, movimientos de arena de tipo antrópico, acopios para construcción de casas y accesos.

## ANTROPIZACIÓN

**Carreteras y proximidad (<500m):** sí, junto a la población muestreada.

**Pistas y proximidad (<500m):** sí, junto a la población muestreada.

**Sendas y proximidad (<500m):** sí, recorren la población muestreada.

**Basuras:** sí.

**Presencia personas/ turismo:** sí, turismo local.

**Urbanización/ infraestructuras:** sí, casas individuales.

## GANADERÍA

**Presencia y tipo:** bovino, ovino y asnos.

**Centaurea mordida:** sí.

**Fecha del muestreo:** 28 de abril de 2016

**Población:** *Tamri* (ladera) (TM).

**Material recolectado:** 71 hojas

**Waypoints GPS:** Desde 114 hasta 184

## VEGETACIÓN

**Tipo de vegetación:** matorral bajo con árboles dispersos.

**Especie/s dominante/s:** *Euphorbia arbustiva*, *Scabiosa atropurpurea*, *Ononix natrix*, *Phagnalon rupestre*, *Rhamnus sp.*, *Ulex sp.*, *Suaeda sp.*

**Porcentaje de cobertura:** ≈ 70%

**Presencia de leñosas:** sí, dispersas y poco abundantes con forma aparasolada por la influencia marina.

### PARÁMETROS POBLACIONALES

**Índice de abundancia (Braun Blanquet):** 2

**Distribución geográfica:** uniforme.

**Presencia de plántulas:** sí.

**Descripción de la parcela:** ladera rocosa con orientación al mar, poblado de matorral espinoso típico de litoral, especies tipo *Rhamnus sp.*, *Ulex sp.* y *Euphorbia sp.*

**Descripción del paisaje:** Colinas litorales que vierten al atlántico. Sucesión desde vegetación de primera línea de dunas. Matorrales litorales espinosos y bosques abiertos de *Juniperus* y *Argania*.

### OROGRAFÍA

**Tipo de suelo:** duna fija con arena y material duro rocoso de tipo calcáreo.

**Relieve:** colina.

**Orientación:** Noroeste.

**Pendiente:** entre el 30 y 40%

**Marcas de erosión:** sí, pérdida de suelo por escorrentía.

**Movimientos o deposiciones de arena:** no.

### ANTROPIZACIÓN

**Carreteras y proximidad (<500m):** sí, a 100 m.

**Pistas y proximidad (<500m):** no.

**Sendas y proximidad (<500m):** no.

**Basuras:** no.

**Presencia personas/ turismo:** no.

**Urbanización/ infraestructuras:** no.

### GANADERÍA

**Presencia y tipo:** ovino y caprino.

**Centaurea mordida:** no.

---

**Fecha del muestreo:** 29 de abril de 2016

**Población:** *Tamri* (dunas) (TM).

**Material recolectado:** 44 hojas

**Waypoints GPS:** desde 185 hasta 227

## VEGETACIÓN

**Tipo de vegetación:** matorral cerrado de duna litoral.

**Especie/s dominante/s:** flora de dunas con *Retama monosperma*, *Arthrocnemum macrostachyum*, *Ononix natrix*, *Aster maritimus*, *Euphorbia sp.*, *Linaria sp.*, etc.

**Porcentaje de cobertura:** ≈ 40%

**Presencia de leñosas:** sí, dispersas y poco abundantes.

## PARÁMETROS POBLACIONALES

**Índice de abundancia (Braun Blanquet):** +

**Distribución geográfica:** uniforme.

**Presencia de plántulas:** sí, pero muy pocas.

**Descripción de la parcela:** dunas pobladas de *Centaureas* rebrotando de forma muy dispersa y uniforme

**Descripción del paisaje:** duna semifija en primera línea de costa.

## OROGRAFÍA

**Tipo de suelo:** duna semifija de suelo arenoso.

**Relieve:** suave.

**Orientación:** Noroeste.

**Pendiente:** entre el 5 y 10%

**Marcas de erosión:** no.

**Movimientos o deposiciones de arena:** sí, junto a la carretera de tipo antrópico y entre las dunas de tipo natural eólico.

## ANTROPIZACIÓN

**Carreteras y proximidad (<500m):** sí, adyacente a la población.

**Pistas y proximidad (<500m):** sí.

**Sendas y proximidad (<500m):** sí.

**Basuras:** sí.

**Presencia personas/ turismo:** sí, locales.

**Urbanización/ infraestructuras:** no.

## GANADERÍA

**Presencia y tipo:** ovino y caprino.

**Centaurea mordida:** sí.

**Fecha del muestreo:** 29 de abril de 2016

**Población:** *Takat* (TK)

**Material recolectado:** 66 hojas.

**Waypoints GPS:** desde 228 hasta 293

## VEGETACIÓN

**Tipo de vegetación:** matorral bajo.

**Especie/s dominante/s:** *Ononix natrix*, *Cardus sp.*, (amarilla), *Eucaliptus globulus* plantados.

**Porcentaje de cobertura:** ≈ 10%

**Presencia de leñosas:** *Ononix natrix* y *Eucaliptus globulus* plantados.

## PARÁMETROS POBLACIONALES

**Índice de abundancia (Braun-Blanchet):** +

**Distribución geográfica:** agregada.

**Presencia de plántulas:** no.

**Descripción de la parcela:** duna sobrepastoreada, con vegetación de tipo desértico, aspecto muy esquilmado.

**Descripción del paisaje:** costa árida, con alto aprovechamiento ganadera, sobrepastoreo de la vegetación desértica.

## OROGRAFÍA

**Tipo de suelo:** arenoso, horizonte único de tipo dunar.

**Relieve:** muy suave.

**Orientación:** -----

**Pendiente:** entre 2 y 5%

**Marcas de erosión:** no.

**Movimientos o deposiciones de arena:** sí, movimientos eólicos y suaves de arena.

## ANTROPIZACIÓN

**Carreteras y proximidad (<500m):** sí, carretera contigua a la población.

**Pistas y proximidad (<500m):** sí, entre la población.

**Sendas y proximidad (<500m):** sí sobre la población.

**Basuras:** sí.

**Presencia personas/ turismo:** sí, pastor.

**Urbanización/ infraestructuras:** sí, pequeñas construcciones locales en la costa.

## GANADERÍA

**Presencia y tipo:** ovino y caprino.

**Centaurea mordida:** sí, muy intensamente.

**Fecha del muestreo:** 29 de abril de 2016

**Población:** *Sous Massa (Tiznit)* (SM).

**Material recolectado:** 64 hojas.

**Waypoints GPS:** desde 294 hasta 357

## VEGETACIÓN

**Tipo de vegetación:** vegetación dunar con arbustos equidistantes.

**Especie/s dominante/s:** flora dunar, *Ononix natrix*, *Teucrium dunense*, *Limonium sp.*, *Suaeda sp.*, *Euphorbia sp.*, *Acacia dealbata*.

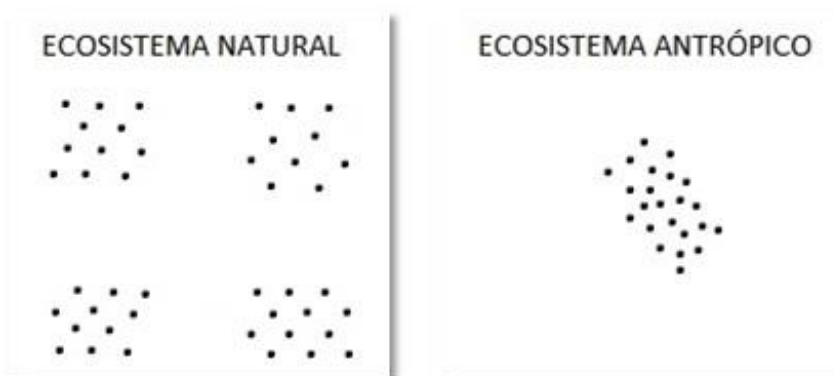
**Porcentaje de cobertura:** entre 25 y 30%

**Presencia de leñosas:** sí, caméfitos y fanerófitos.

## PARÁMETROS POBLACIONALES

**Índice de abundancia (Braun-Blanquet):** + en colina y 1 en parcela antrópica.

**Distribución geográfica:** el comportamiento de distribución geográfica era distinto en la colina donde el ecosistema era natural con una distribución agregada pero más extensa y uniforme, mientras que en zonas antrópicas estaba muy agregada.



Esquema de distribución geográfica de *C. aspera* subsp. *gentilii* en ecosistemas naturales y antrópicos.

**Presencia de plántulas:** sí, abundantes en una parcela antigua de cultivo en desuso limitada por *Acacia dealbata*. Ausencia de plántulas en la colina, únicamente presencia de rebrotes tras ramoneo.

**Descripción de la parcela:** se diferencian dos tipos de parcelas, colinas costeras formadas por dunas semifijas con matorral ralo bajo equidistante muy ramoneado y por otro lado una parcela de cultivo antigua limitada por acacias en desuso en las afueras de *Timzilt*.

**Descripción del paisaje:** en la colina se observa paisaje dunar litoral árido con uniformidad. Ausencia de formaciones boscosas cercanas y toda la vegetación circundante es muy árida. Paisaje distinto en la zona perimetral de *Timzilt* con algún aprovechamiento agrícola.

## **OROGRAFÍA**

**Tipo de suelo:** dunar arenoso.

**Relieve:** colina suave y llano de cultivo

**Orientación:** Noroeste y Oeste.

**Pendiente:** entre 10 y 15% en la colina y llano en la parcela antrópica.

**Marcas de erosión:** no.

**Movimientos o deposiciones de arena:** sí, movimientos eólicos y suaves de arena.

## **ANTROPIZACIÓN**

**Carreteras y proximidad (<500m):** no.

**Pistas y proximidad (<500m):** sí, pero en la colina a una distancia aproximada de 1000 m y en la parcela llana presencia de una pista contigua.

**Sendas y proximidad (<500m):** sí.

**Basuras:** no.

**Presencia personas/ turismo:** sí, en la colina presencia de pescadores y locales, en la parcela antrópica un pastor y locales.

**Urbanización/ infraestructuras:** no recientes. Construcciones muy antiguas aparentemente en abandono.

## **GANADERÍA**

**Presencia y tipo:** ovino y caprino.

**Centaurea mordida:** en la colina muy ramoneada en la parcela antrópica no.



**PLANOS**

## INDICE DE PLANOS.

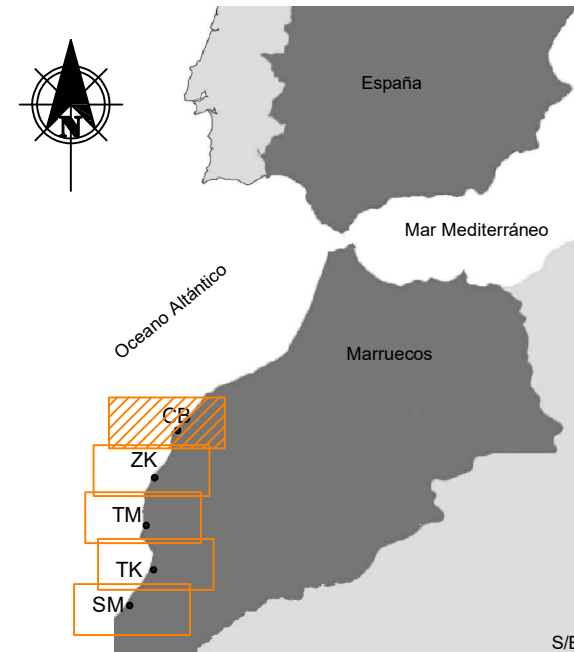
**Nº 1.** Muestreo de *C. aspera* subsp. *gentilii* en la población de *Cap Beddouza*.  
Escala 1/5.000

**Nº 2.** Muestreo de *C. aspera* subsp. *gentilii* en la población de *Zaouiat el Kourati*. Escala 1/5.000

**Nº 3.** Muestreo de *C. aspera* subsp. *gentilii* en la población de *Tamri*. Varias escalas

**Nº 4.** Muestreo de *C. aspera* subsp. *gentilii* en la población de *Takat*. Varias escalas

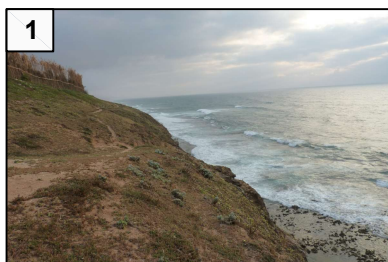
**Nº 5.** Muestreo de *C. aspera* subsp. *gentilii* en la población de *Sous Massa*.  
Escala 1/20.000



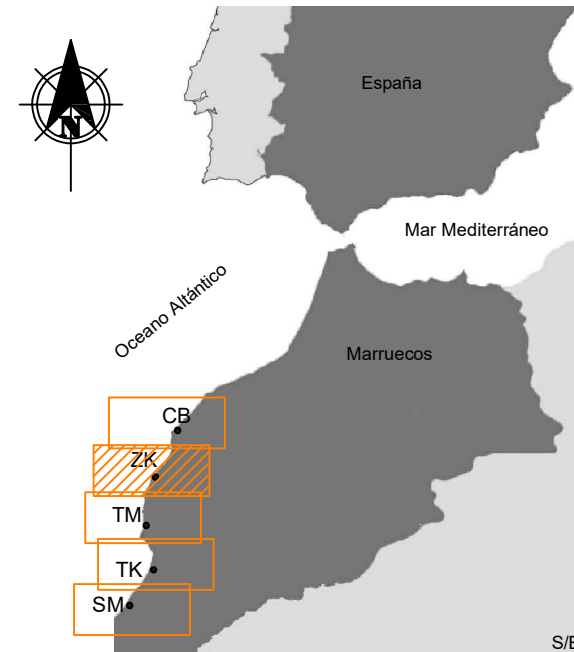
LEYENDA

● *C. aspera* subsp. *gentilii* muestreada

- CB *Cap Beddouza*
- ZA *Zaouiat el Kourati*
- TM *Tamri*
- TK *Takat*
- SM *Sous Massa*



ESTUDIO DEL NIVEL DE PLOIDIA DE <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> A LO LARGO DE SU ÁREA DE DISTRIBUCIÓN MARROQUÍ. CORRELACIÓN CON LA LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL HÁBITAT.		
PLANO N°: 1	DESIGNACIÓN: Muestreo de <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> en la población de <i>Cap Beddouza</i>	ESCALA: 1/5.000 50 0 50m 
AUTORA: ANA GONZÁLEZ DELGADO		FECHA: JULIO 2016



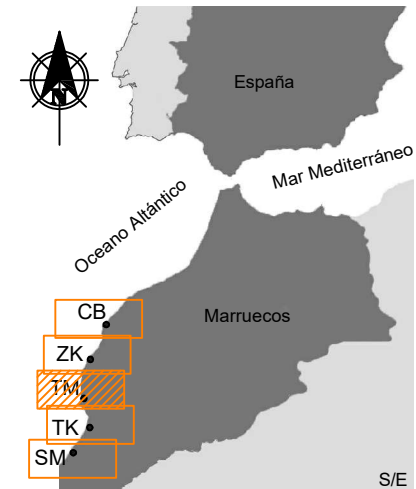
LEYENDA

● *C. aspera* subsp. *gentilii* muestreada

- CB *Cap Beddouza*
- ZA *Zaouiat el Kourati*
- TM *Tamri*
- TK *Takat*
- SM *Sous Massa*



ESTUDIO DEL NIVEL DE PLOIDIA DE <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> A LO LARGO DE SU ÁREA DE DISTRIBUCIÓN MARROQUÍ. CORRELACIÓN CON LA LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL HÁBITAT.		
PLANO N°: 2	DESIGNACIÓN: Muestreo de <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> en la población de <i>Zaouiat el Kourati</i>	ESCALA: 1/5.000 50 0 50m
AUTORA: ANA GONZÁLEZ DELGADO		FECHA: JULIO 2016



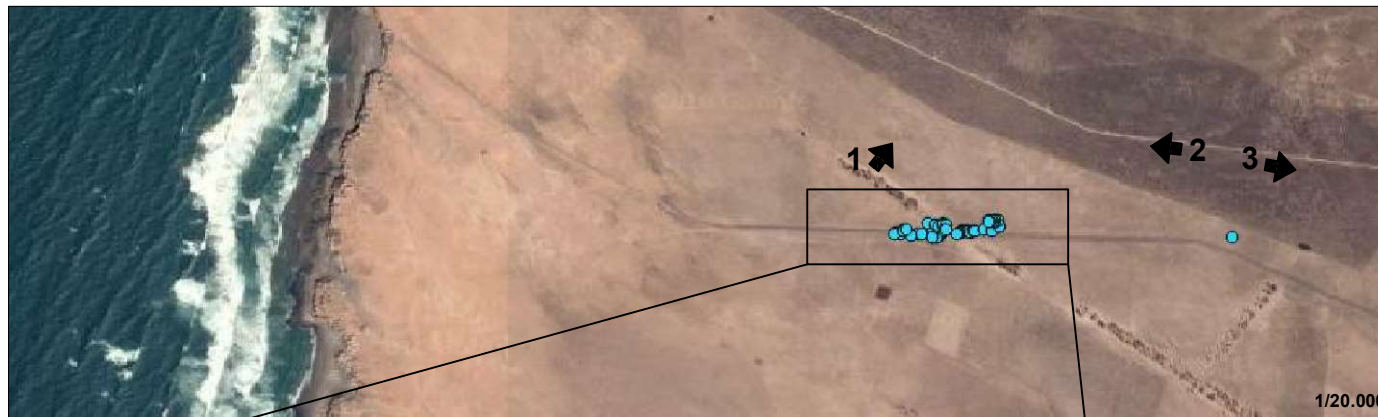
LEYENDA

● *C. aspera* subsp. *gentilii* muestreada

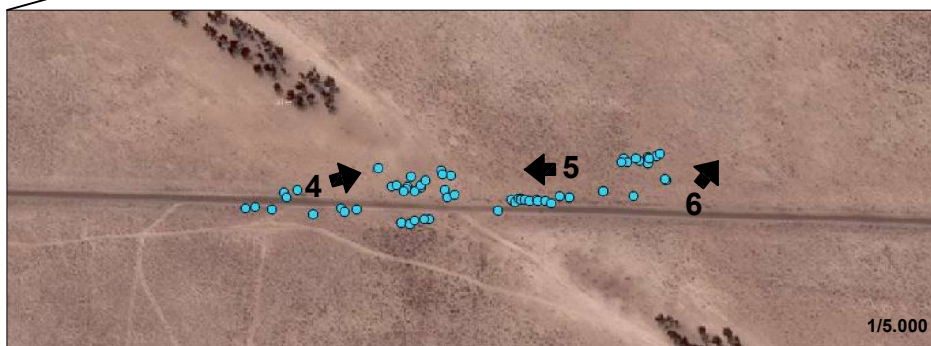
- CB *Cap Beddouza*
- ZA *Zaouiat el Kourati*
- TM *Tamri*
- TK *Takat*
- SM *Sous Massa*

ESTUDIO DEL NIVEL DE PLOIDÍA DE *C. aspera* subsp. *gentilii* A LO LARGO DE SU ÁREA DE DISTRIBUCIÓN MARROQUÍ. CORRELACIÓN CON LA LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL HÁBITAT.

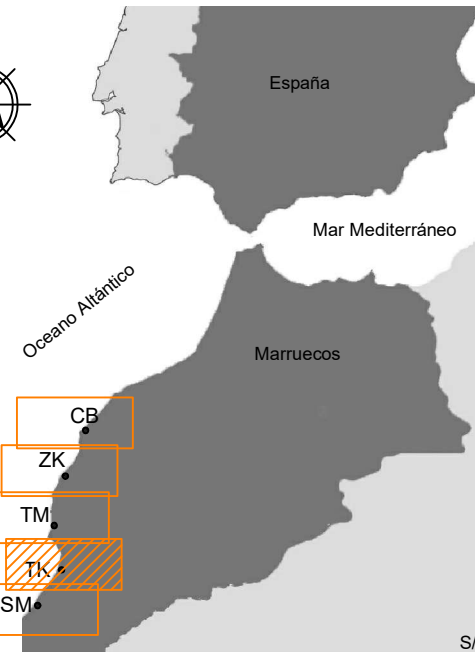
PLANO N°: 3	DESIGNACIÓN: Muestreo de <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> en las dos subpoblaciones de <i>Tamri</i>	ESCALA: VARIAS
AUTORA: ANA GONZÁLEZ DELGADO		FECHA: JULIO 2016



1/20.000



1/5.000



S/E

LEYENDA

● *C. aspera* subsp. *gentilii* muestreada

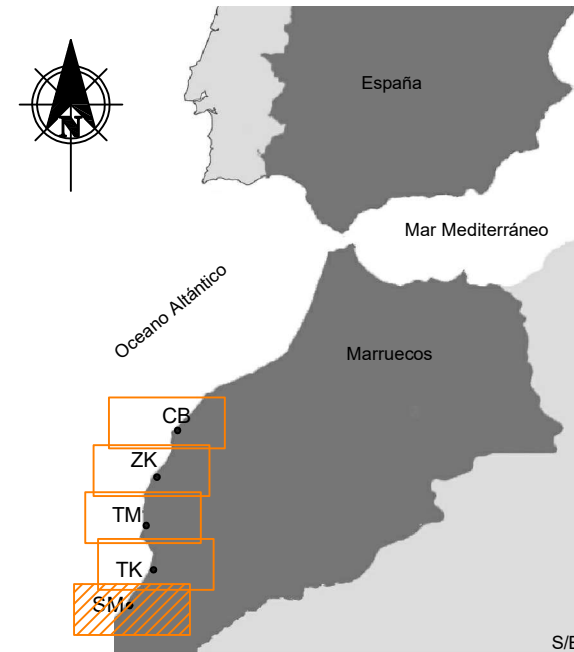
- CB *Cap Beddouza*
- ZA *Zaouiat el Kourati*
- TM *Tamri*
- TK *Takat*
- SM *Sous Massa*



ESTUDIO DEL NIVEL DE PLOIDÍA DE *C. aspera* subsp. *gentilii* A LO LARGO DE SU ÁREA DE DISTRIBUCIÓN MARROQUÍ. CORRELACIÓN CON LA LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL HÁBITAT.

PLANO N°: 4	DESIGNACIÓN: Muestreo de <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> en la población de <i>Takat</i>	ESCALA: VARIAS
----------------	---	-------------------

AUTORA: ANA GONZÁLEZ DELGADO	FECHA: JULIO 2016
---------------------------------	----------------------



LEYENDA

● *C. aspera* subsp. *gentilii* muestreada

- CB *Cap Beddouza*
- ZA *Zaouiat el Kourati*
- TM *Tamri*
- TK *Takat*
- SM *Sous Massa*



ESTUDIO DEL NIVEL DE PLOIDÍA DE *C. aspera* subsp. *gentilii* A LO LARGO DE SU ÁREA DE DISTRIBUCIÓN MARROQUÍ. CORRELACIÓN CON LA LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL HÁBITAT.

PLANO N°: 5	DESIGNACIÓN: Muestreo de <i>C. aspera</i> subsp. <i>gentilii</i> en la población de <i>Sous Massa</i>	ESCALA: 1/20.000 200 0 200m 
----------------	--	------------------------------------

AUTORA: ANA GONZÁLEZ DELGADO	FECHA: JULIO 2016
---------------------------------	----------------------