



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía

Área de Botánica

**Estudios de Biología Reproductiva en el género *Anthoxanthum*  
L. (Poaceae)**

**Estudos de Bioloxía Reprodutiva no xénero *Anthoxanthum* L.  
(Poaceae)**

**Reproductive Biology studies in genus *Anthoxanthum* L.  
(Poaceae)**

Sofía Salutregui Darriba

Trabajo de Fin de Grado

29/07/2015

Tutores: Dr Manuel Pimentel Pereira y Elvira Sahuquillo Balbuena.

## TRABALLO DE FIN DE GRAO

Manuel Pimentel Pereira E Elvira Sahuquillo Balbuena autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao “Estudios de Biología Reproductiva en el género *Anthoxanthum* L. (Poaceae)” presentado por Sofía Salutregui Darriba para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña, a 22 de xullo de 2015

Asdo.: Dr. Manuel Pimentel

Asdo.: Dra. Elvira Sahuquillo

## RESUMEN

En este estudio se ha llevado a cabo el análisis micro-morfológico de la anatomía foliar de *Anthoxanthum aristatum* (2x) y *A. odoratum* (4x). Asimismo, se ha analizado un parámetro esencial de la biología reproductiva, la viabilidad polínica. El objetivo general del trabajo fue conocer cómo afecta el nivel de ploidía a los parámetros analizados. En total, seis poblaciones del NW de la Península Ibérica fueron estudiadas. Se tomaron medidas anatómicas de la superficie abaxial de la epidermis en 15 individuos por población. Asimismo, se hizo un examen de la viabilidad del polen mediante el empleo de Diacetato de Fluoresceína (FDA), técnica cuya utilidad está condicionada a que las anteras se encuentren en el estadio de maduración adecuado.

Los resultados micro-morfológicos obtenidos permiten diferenciar los niveles de ploidía en base a los caracteres estudiados, presentando el tetraploide valores más altos. Los resultados del test de viabilidad polínica muestran un aumento de la misma en la especie diploide con respecto a su pariente tetraploide. Este resultado obtenido para *Anthoxanthum* L. es coherente con lo observado en la literatura.

## ABSTRACT

Both the micro-morphology and the pollen viability (essential in a plant reproductive biology) of two species in the *Anthoxanthum* polyploid complex have been assessed in this study. More particularly, the taxa *A. aristatum* (2x) and *A. odoratum* (4x) have been chosen for this research project. Our main aim was to understand they way in which ploidy level affects the analysed parameters. Overall, six populations from NW Iberian Peninsula were considered. Micro-morphological traits from the abaxial epidermal surface were measured in 15 specimens per population. Moreover, pollen viability was assessed through the use of FDA staining; a method suitable for *Anthoxanthum* provided that the anthers are at the right developmental stage. The obtained data were analysed through descriptive statistics and different tests of data variation and dispersal.

Our micro-morphological results allowed us to differentiate between the different species (and ploidy levels), with the tetraploid taxon showing higher values. The results of the pollen viability analysis showed an increase in the diploid species with respect to the tetraploid taxon. This result is consistent with what has been found in the literature.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Características del género y de las especies analizadas .....	2
1.2. Anatomía foliar del género <i>Anthoxanthum</i> .....	4
1.3. Importancia de la poliploidía en evolución vegetal .....	5
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	7
3.1. Recogida y análisis de muestras campo y laboratorio .....	7
3.2. Estudio anatómico.....	8
3.3. Estudio de la viabilidad polínica.....	8
3.4. Tratamiento de datos.....	10
4. RESULTADOS .....	11
4.1. Estudio anatómico.....	11
4.2. Viabilidad polínica.....	17
5. DISCUSIÓN.....	20
6. CONCLUSIONES.....	23
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24

## 1. INTRODUCCIÓN

*Anthoxanthum* L. s. str. (Poaceae; Pooideae) es un género de plantas vasculares que incluye aproximadamente 22 especies (Watson & Dallwitz, 1992; Soreng & Davis, 2000) anuales y perennes de morfología muy similar. Las especies que conforman el género crecen en zonas templadas y ártico-alpinas de Europa, Asia y África (Clayton & Renvoize, 1986; Watson & Dallwitz, 1992; Drapikowska *et al.*, 2013), aunque *Anthoxanthum odoratum* ha sido introducida tanto en América como en Australia (Mack, 2000).

Junto con los géneros *Hierochloë* R.Br. y *Phalaris* L., las especies del género *Anthoxanthum* han sido tradicionalmente incluidas dentro de la tribu Phalarideae (Soreng & Davis, 2000). Los miembros de la tribu presentan en común que sus espiguillas están formadas por tres flores, y éstas están además lateralmente comprimidas (Soreng *et al.*, 2009). De estas tres flores, la superior es hermafrodita, mientras que las dos inferiores presentan sus piezas florales reducidas a diferentes niveles (Schouten & Veldkamp, 1985). En *Anthoxanthum*, las flores inferiores son estériles, pudiendo estar reducidas a lemas.

### 1.1. Características del género y de las especies analizadas

Las especies que se van a tratar en el presente trabajo pertenecen a *Anthoxanthum* sección *Anthoxanthum*, que comprende de nueve a diez especies anuales y perennes, las cuales muestran una gran variabilidad, tanto en niveles de ploidía como en morfología (Pimentel *et al.*, 2007). Esta sección está distribuida mayoritariamente en regiones templadas y ártico-alpinas del norte de Eurasia, el Mediterráneo, Macaronesia y este de África. Se trata de plantas herbáceas caracterizadas por tener las hojas envainantes y planas, con lígulas membranosas, truncadas o en punta, pero nunca reducidas a una línea de pelos (Tutin, 1980). Plantas glabras o pilosas, con inflorescencias en forma de panícula condensada. La inflorescencia porta numerosas espiguillas (**Figura 1**) lateralmente comprimidas, con una sola flor fértil y dos flores estériles inferiores reducidas a los lemas, de mayor tamaño que la flor fértil y pubescentes con el dorso aristado. Las glumas son desiguales: la inferior es más corta y uninervia, y la superior es más larga que las flores y trinervada. Los lemas y páleas presentan diferencias entre las flores fértiles y las dos estériles: en las fértiles son pequeñas, membranosas y glabras,

mientras que en las estériles son pilosas y aristadas. En ambos casos, el lema superior tiene una gran arista. La flor fértil no tiene lodículas. La cariósida es glabra, brillante y oval.

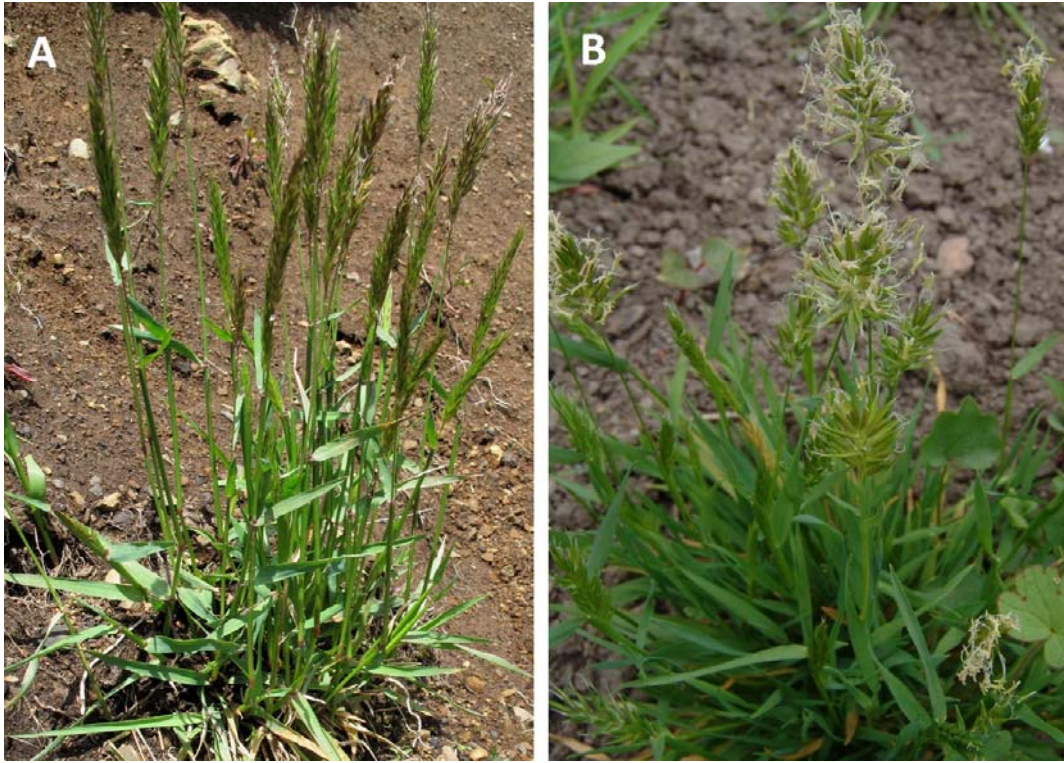


**Figura 1.** Inflorescencia y espiguilla de *Anthoxanthum*. Autor: David Romero.

En el presente estudio trabajaremos sobre dos taxa, diferentes según su nivel de ploidía. El tetraploide *Anthoxanthum odoratum* L. ( $2n=20$ ), también conocido como “grama de olor”, es una hierba tremendamente variable que aparece como perenne en pastos, aunque en algunas localidades se ha visto en zonas húmedas o bosques. La especie muestra una gran adaptabilidad, pudiendo llegar a colonizar una gran cantidad de hábitats. *Anthoxanthum aristatum* Boiss. se trata de una especie anual y diploide ( $2n = 10$ ), propia de zonas costeras y a menudo rocosas (también presente en zonas de poco suelo en el interior), distribuyéndose a lo largo de la Cuenca Mediterránea, áreas Atlánticas del Sur de Europa y Norte de África (Pimentel *et al.*, 2007).

Los estudios morfológicos entre *Anthoxanthum aristatum* y *Anthoxanthum odoratum* revelaron que existen diferencias significativas entre las dos especies (e.g. Drapikowska *et al.*, 2008), pero ocasionalmente los rasgos de ambas especies pueden solaparse, dificultando así su identificación. *Anthoxanthum odoratum* (**Figura 2.A.**) se diferencia por ser una planta cespitosa perenne que no presenta raíces tuberosas en la base, por poseer una anchura de las hojas de entre 2 y 8 mm, por el tamaño de sus espiguillas (7 – 9 mm) y por el grado de pubescencia en las lemas de las flores estériles que tienen,

además, una arista geniculada. *A. aristatum* (**Figura 2.B.**) puede ser glabra o poco pilosa, con hojas de hasta 5 mm de anchura y con espiguillas de hasta 5 mm de longitud. En general, su porte es inferior al de *A. odoratum*. La lema superior estéril presenta una arista que supera con creces la espiguilla, y siendo la flor fértil de un tamaño más reducido que las estériles (Paunero, 1953).



**Figura 2.** A. *Anthoxanthum odoratum* L., tomado de science.halleyhosting.com; B. *Anthoxanthum aristatum* Boiss., tomado de blumeninschwaben.de.

### 1.2. Anatomía foliar del género *Anthoxanthum*

En general, la estructura de las hojas en las gramíneas tiene escasa importancia taxonómica (salvo por características relacionadas con la vaina y la lígula), sin embargo, se ha puesto de manifiesto el valor de ciertos caracteres anatómicos (Brown, 1958) relativos a la epidermis tanto adaxial como abaxial, siendo esta última la más empleada por su facilidad de extracción (Devesa, 1992). Los caracteres de uso más habitual serán la longitud y tipología de las células largas y cortas y las dimensiones de los estomas (Devesa, 1992; Drapikowska *et al.* 2013). En el género *Anthoxanthum* se han observado correlaciones entre estos caracteres y el nivel de ploidía (Pimentel & Sahuquillo, 2003; Drapikowska *et al.* 2013).

### **1.3. Importancia de la poliploidía en evolución vegetal.**

La poliploidía consiste en la posesión de más de dos juegos de cromosomas por cada núcleo (Soltis & Soltis, 1999), y está considerada como una de las mayores fuerzas que operan en la evolución de las plantas, afectando tanto a la diversificación como a la especiación (Otto & Whitton, 2000; Adams & Wendel, 2005; Soltis *et al.*, 2009). Las duplicaciones completas del genoma causan en las plantas cambios genéticos que conducen a la diferenciación genética, fisiológica y morfológica, dando como resultado nuevos fenotipos (Adams & Wendel, 2005).

En términos de especiación y diversificación, el rol de la poliploidía en angiospermas es todavía controvertido (Stebbins, 1950). Estudios recientes destacan el potencial de los poliploides en la evolución, pues el elevado número de alelos aporta: (i) enmascaramiento de mutaciones deletéreas recesivas, (ii) heterosis estable y (iii) el potencial de los genes duplicados de adquirir nuevas y variadas funciones (Wendel, 2000; Adams & Wendel, 2005). Por otra parte, también es considerado como un factor importante en la distribución y ecología de las especies (Soltis & Soltis, 2012). Mantener la reproducción sexual en estos nuevos genotipos podría ser arriesgado, pues podrían entrecruzarse con sus progenitores. Además, se podrían formar frecuentemente irregularidades cromosómicas, llevando a la producción de gametos no viables (Hardion *et al.*, 2015).

Aunque la poliploidía está muy extendida en el reino vegetal, su frecuencia y nivel varían dependiendo del grupo taxonómico (Husband *et al.*, 2013). Dentro de las angiospermas, se da más frecuentemente en monocotiledóneas que en dicotiledóneas (Otto & Whitton, 2000). Es especialmente abundante entre las gramíneas, siendo por ejemplo el género *Anthoxanthum* un interesante representante de complejo poliploide (Hedberg, 1986).



## 2. OBJETIVOS

En el presente estudio se explora la relación entre distintos caracteres anatómicos y biológicos y el nivel de ploidía (i.e. la taxonomía) en poblaciones del NW ibérico del complejo poliploide *A. odoratum*/*A. aristatum*. Objetivos específicos de este trabajo serán:

1. Correlacionar la variabilidad de tres caracteres anatómico-foliare de uso habitual en la taxonomía de las gramíneas con el nivel de ploidía en especies del complejo poliploide de *Anthoxanthum*.
2. Correlacionar la viabilidad polínica en dos especies del género *Anthoxanthum* que presentan diferentes niveles de ploidía.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Recogida y análisis de muestras: campo y laboratorio

Para la realización de los objetivos expuestos anteriormente, se seleccionaron 6 poblaciones (**Tabla 1**) en el-NW de la Península Ibérica: tres de *Anthoxanthum aristatum*, y tres de *A. odoratum*. La unidad de estudio fue la población porque, según Tyteca & Gathoye (1988), la información que se obtiene mediante ejemplares recogidos individualmente es poco significativa. Dada la capacidad para la reproducción asexual de *A. odoratum*, las muestras se recogieron separadas 1 m. Para su transporte, se almacenaron en bolsas individuales, manteniendo las raíces húmedas envolviéndolas con papel mojado. Ya en el laboratorio las plantas se identificaron según los trabajos de Paunero (1953) y Valdés (1973).

En un primer momento, las plantas colectadas se mantuvieron en bandejas con perlita regadas con agua y abono general al 0,05%, lo que permitió la puesta a punto de los métodos. Posteriormente, las plantas recolectadas eran procesadas directamente.

**Tabla 1.** Poblaciones estudiadas. La fecha indicada hace referencia al día en que el material fue recogido del campo. NA: número de ejemplares utilizados para evaluar los caracteres anatómicos. NP: número de ejemplares utilizados para evaluar la viabilidad del polen.

Especie	Ploidía	Localidad	Provincia	Fecha	NA	NP
<i>A. aristatum</i>	2x	Dexo, Oleiros	A Coruña	23/03/2015	15	5
<i>A. aristatum</i>	2x	Sequeiros, Quiroga	Lugo	15/04/2015	15	5
<i>A. aristatum</i>	2x	Cabo Silleiro, Sta María de Oia	Pontevedra	15/04/2015	0	5
<i>A. odoratum</i>	4x	Arillo, Oleiros	A Coruña	23/03/2015	15	5
<i>A. odoratum</i>	4x	Sarria	Lugo	02/05/2015	15	5
<i>A. odoratum</i>	4x	A Zapateira	A Coruña	22/07/2015	15	5

### 3.2. Estudio anatómico

Para cada población fueron seleccionados 15 individuos (excepto para la de Dexo, sin datos anatómicos, y para la población de Arillo, en la que se midieron 10 individuos), seleccionados en base al estado de las hojas. En total, se tomaron medidas de 75 plantas.

A cada uno de estos individuos le fue retirada la segunda hoja (tercio inferior) empezando por la base de la planta. Se aplicó siempre este mismo criterio, basado en un trabajo de Devesa (1992), con el fin de estandarizar la toma de las medidas y poder compararlas entre sí. Los caracteres analizados se tomaron siempre en la parte abaxial de la hoja. Las muestras fueron preparadas mediante el procedimiento de Devesa (1992). Este método consiste en realizar una inmersión del tejido vegetal en agua destilada hirviendo. Para *A. odoratum*, el tiempo de inmersión fue de 20 segundos. Dada la fragilidad de las hojas de *A. aristatum*, el reblandecimiento de los tejidos se consiguió mediante la inmersión en ácido láctico al 50% ligeramente calentado durante 10 segundos. Una vez reblandecidas las hojas, se eliminaron los tejidos no epidérmicos con una cuchilla o lanceta.

La medida de los caracteres fue posible mediante el empleo del microscopio óptico (Olympus) a 400x. Se midieron tres caracteres cuantitativos: longitud de las células largas y la longitud y anchura de los estomas. La medida final de cada individuo para cada carácter resultó de la media de 10 medidas independientes.

### 3.3. Estudio de la viabilidad polínica

Se seleccionaron cinco individuos de cada una de las seis poblaciones. El criterio para su selección se basó en el estado fenológico de la inflorescencia, seleccionándose aquellas plantas que presentaban anteras dehiscentes en las espiguillas más apicales. Las espiguillas que se recogieron para el estudio fueron las de la zona basal, con las anteras todavía sin abrir. También fueron descartadas aquellas que presentaban síntomas de sequedad. Estas características pueden ser observadas en la **Figura 3**.

Para la puesta a punto de esta técnica se realizaron pruebas con las especies: *A. aristatum*, *A. odoratum*, *A. amarum* Brot. y una especie perteneciente al género *Briza* L. Se probaron anteras en distinto estado fenológico. Se determinó que el estado ideal para

la comprobación de viabilidad es el de las anteras todavía no abiertas y antes de su salida de la espiguilla.

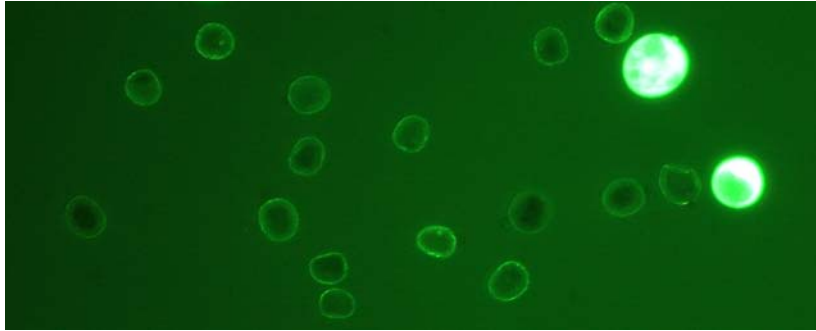


**Figura 3.** Inflorescencias en diferentes estados fenológicos de *Anthoxanthum aristatum* (Población de Cabo Silleiro).

Una vez separadas las anteras, se sometían a inmersión en agua sobre un portaobjetos, donde se forzaba la liberación del polen con una lanceta. Después, con una micropipeta se recogía la mezcla de agua y polen y se depositaba en un eppendorf con una solución con diacetato de fluoresceína (FDA) a temperatura ambiente durante una hora según Yarnes (2011) y en oscuridad. Si el polen es viable, se activarán las enzimas esterases y el FDA será hidrolizado a fluoresceína, que emitirá fluorescencia (Li, 2011).

El eppendorf fue llevado a la centrífuga durante 10 minutos, a 1200 rpm. Se retiró la mayor parte del sobrenadante, dejando una cantidad de aproximadamente 50  $\mu$ l, los cuales se resuspendieron con el polen depositado en el fondo. De estos 50  $\mu$ l se tomaron 20  $\mu$ l y se montaron en un portaobjetos con un cubreobjetos para su observación bajo el microscopio de fluorescencia.

El microscopio de fluorescencia utilizado fue Nikon Y-FL, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la UDC. El recuento se realizó a 10x utilizando la cuadrícula del propio microscopio como límite de superficie de recuento. Para cada muestra se realizaron 5 recuentos (uno en el centro de la cuadrícula y cuatro en cada una de las esquinas). Se anotó el número total de granos de polen contenidos en cada una de estas zonas, y se ficharon como viables aquellos que emitían una fuerte fluorescencia de color verde (siendo además de elevado tamaño) y como inviables aquellos de color negro o verde apagado (de menor tamaño que los anteriores y, en ocasiones, amorfos). Estos criterios pueden observarse en la **Figura 4.**



**Figura 4.** Granos de polen de *Anthoxanthum odoratum* (Sarria) vistos con el microscopio de fluorescencia a 100 aumentos. En la imagen se diferencian aquellos granos de polen viables (con fluorescencia verde y grandes de la esquina superior derecha, únicamente dos en la imagen) de aquellos inviables.

### 3.4. Tratamiento de datos

El análisis de los datos obtenidos se basó en los siguientes métodos: (i) análisis descriptivos de los datos por nivel de ploidía (especie) y población y (ii) análisis de la variación y dispersión de los datos en los distintos grupos analizados. Los análisis descriptivos consistieron en el cálculo de la media, la desviación típica, los máximos y mínimos y los coeficientes de variación (Pimentel *et al.*, 2007). Asimismo, se construyeron los diagramas de cajas para observar gráficamente la posible existencia de *outliers*. La variación de los datos entre los distintos grupos (y su dispersión) se observó mediante: (i) Análisis de la varianza (ANOVA), empleando como variable de selección el nivel de ploidía. (ii) El análisis cluster jerárquico; en este test la similaridad entre los individuos se estimó mediante la distancia de Manhattan (Legendre & Legendre, 1998) y el dendrograma se construyó mediante el algoritmo UPGMA (Legendre & Legendre, 1998). (iii) El análisis de Componentes Principales (ACP) se empleó para resumir la variabilidad de los datos en función de unas nuevas componentes, combinación de las variables microanatómicas analizadas. Para el ACP se empleó también la rotación Varimax, que maximiza la variación entre los grupos (Legendre & Legendre, 1998). Finalmente, la existencia de diferencias en la viabilidad polínica entre las especies se realizó mediante el test t-Student. El programa utilizado para todos los análisis fue SPSS Statistics 17.0. (IBM SPSS, Armonk, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudio anatómico

En este estudio se tomaron datos en un total de 75 individuos, 30 de la especie *Anthoxanthum aristatum* y 45 de *A. odoratum*. Para cada una de estas especies se midieron la longitud y anchura de los estomas y de las células largas en 300 estomas y en 300 células largas en *A. aristatum* y 400 estomas y células largas en *A. odoratum*. El resumen del número de medidas realizado en cada población aparece reflejado en la **Tabla 2**. La población de Dexo perteneciente a la especie *A. aristatum* no pudo ser medida ya que se trata de plantas anuales de pequeño tamaño y las hojas basales enseguida se decoloran en cuanto alcanzan plena floración.

**Tabla 2.** Cantidad total de caracteres medidos por población y por especie. PM: plantas medidas. NCL: número de células largas. NE: número de estomas.

Especie	Población	PM	NCL	NE
<i>Anthoxanthum aristatum</i>	Cabo Silleiro	15	150	150
	Sequeiros	15	150	150
		30	300	300
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	A Zapateira	15	150	150
	Arillo	10	100	100
	Sarria	15	150	150
		45	400	400

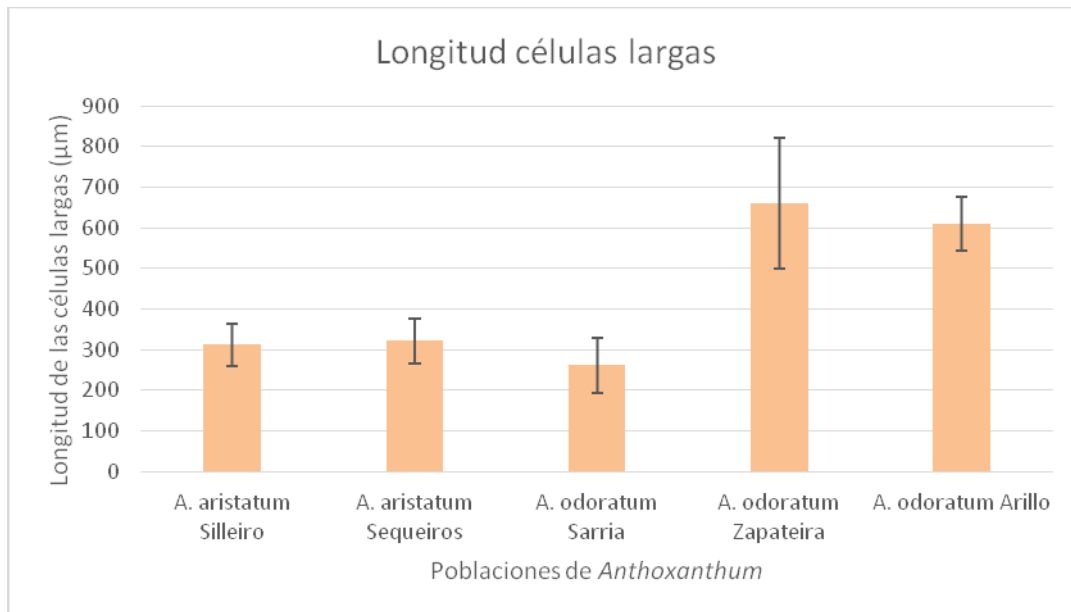
Los datos obtenidos muestran valores más altos en todos los caracteres medidos en las poblaciones de *A. odoratum* que en las de *A. aristatum* (**Tabla 3**). Todas las poblaciones de *A.odoratum* mostraron este mayor tamaño, con excepción de la población de Sarria, cuyos resultados son inferiores a cualquiera de las poblaciones de *A. aristatum*. Los análisis descriptivos de las poblaciones y de las especies se recogen también en la tabla 3.

**Tabla 3.** Media de los resultados obtenidos por población y por especie. LE: longitud estomática. AE: anchura estomática. LCL: longitud de las células largas. Lmax E: longitud máxima estomática en la especie. Lmin E: longitud mínima estomática en la especie. Amax E: anchura máxima estomática en la especie. Amin E: anchura mínima estomática en la especie. Lmax CL: longitud máxima de células largas en la especie. Lmin CL: longitud mínima de células largas en la especie.  $\sigma_{LE}$ : desviación típica de

longitud estomática.  $\sigma_{AE}$ : desviación típica de anchura estomática.  $\sigma_{LCL}$ : desviación típica de células largas.  $C_V$  LE: coeficiente de variación de longitud estomática.  $C_V$  AE: coeficiente de varianza de anchura estomática.  $C_V$  LCL: coeficiente de varianza de células largas.

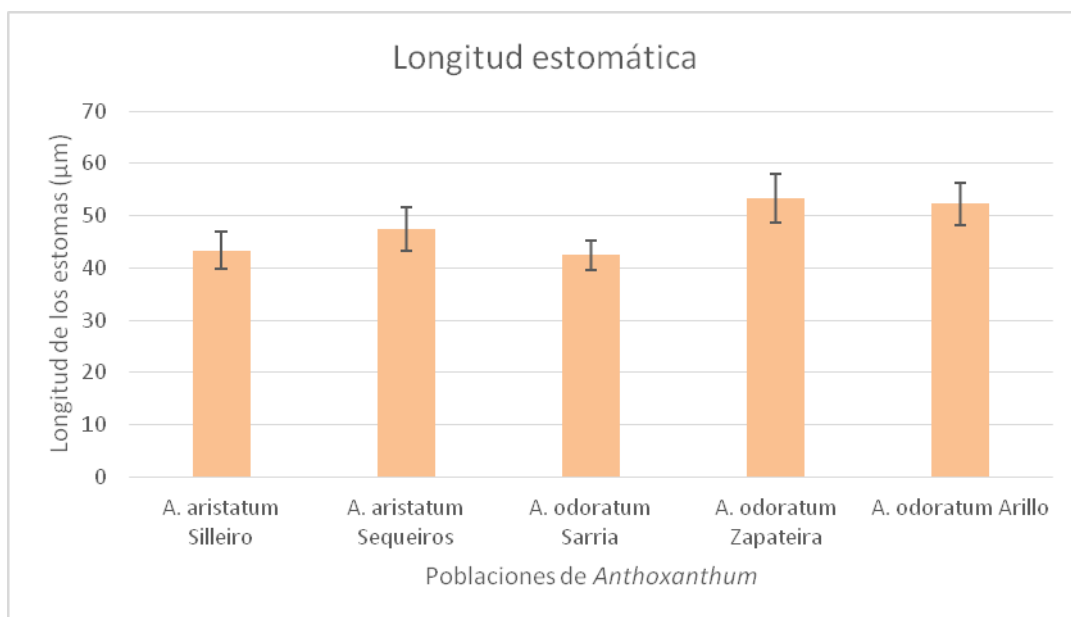
Carácter	<i>A. aristatum</i>			<i>A. odoratum</i>			
	Silleiro	Sequeiros	Total sp	Sarria	A Zapateira	Arillo	Total sp
LE ( $\mu\text{m}$ )	43,28	42,42	42,85	47,53	53,37	52,25	50,9
AE ( $\mu\text{m}$ )	21,6	21,88	21,74	28,28	25,07	22,75	26,26
LCL ( $\mu\text{m}$ )	311,75	321,2	316,475	261,4	661,1	610,1	474
Lmax E ( $\mu\text{m}$ )	49	49,75	49,75	52,5	62	60,75	62
Lmin E ( $\mu\text{m}$ )	39,5	35	35	41,25	48	45,25	41,25
Amax E ( $\mu\text{m}$ )	23,25	24,25	23,25	32,75	27,25	28,75	32,75
Amin E ( $\mu\text{m}$ )	19,5	19,75	19,5	25,5	21,75	22,25	21,75
Lmax CL ( $\mu\text{m}$ )	400	413	400	364,9	769	714	769
Lmin CL ( $\mu\text{m}$ )	199,5	202	199,5	134,5	258,5	508	134,5
$\sigma_{LE}$	3,56	4,15	3,64	2,91	4,66	4,05	4,67
$\sigma_{AE}$	1,3	1,48	1,4	2,11	2,05	2,08	2,52
$\sigma_{LCL}$	53,25	53,91	53,29	67,7	161,08	66,13	188,3
$C_V$ LE	0,08	0,1	0,08	0,06	0,09	0,08	0,092
$C_V$ AE	0,06	0,07	0,06	0,07	0,08	0,09	0,096
$C_V$ LCL	0,17	0,17	0,17	0,26	0,24	0,11	0,397

Para una visualización más gráfica que facilitase la posterior discusión de los resultados, se representaron las medidas de los caracteres por población (**Figuras 5, 6 y 7**). Se muestra una clara diferenciación en la longitud de las células largas en las poblaciones de A Zapateira y Arillo, pertenecientes a *A. odoratum* (tetraploide), pero no en la población de Sarria, también de *A.odoratum*, con respecto a las dos poblaciones de *A. aristatum* analizadas (**Figuras 5**).



**Figura 5.** Representación gráfica de la longitud de las células largas para cada población.

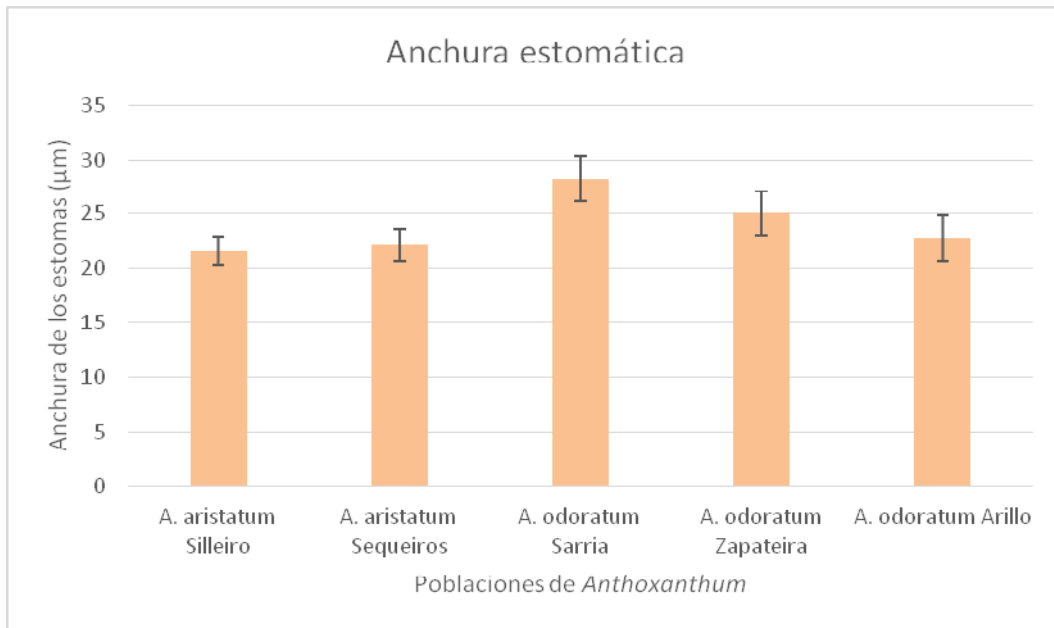
La diferenciación de las especies por las medidas estomáticas no resulta tan evidente, aunque de nuevo las poblaciones de Zapateira y Arillo resultaron claramente más grandes en cuanto a su longitud estomática (**Figuras 6**), a pesar de la existencia de un cierto solapamiento con el resto.



**Figura 6.** Representación gráfica de la longitud de los estomas para cada población.

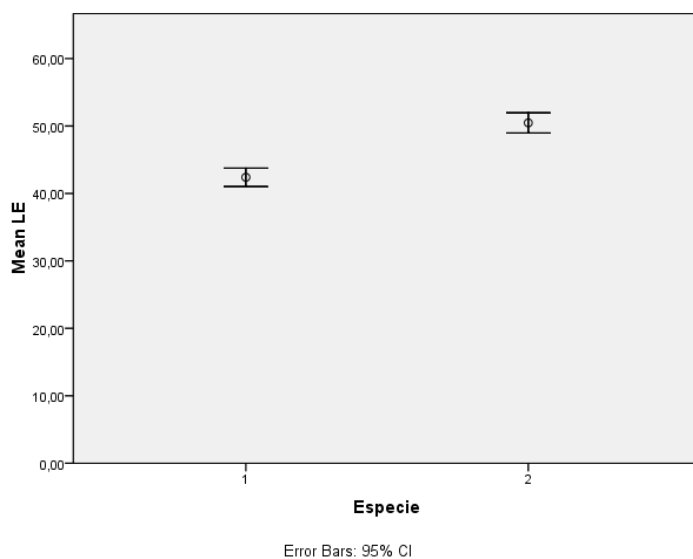


El resultado observado en la anchura de los estomas (**Figura 7**) resultó además sorprendente ya que la población de Sarria presenta los valores más altos, siendo éste el único carácter en el que supera a todas las poblaciones, incluidas Zapateira y Arillo, que también pertenecen a *A. odoratum*.



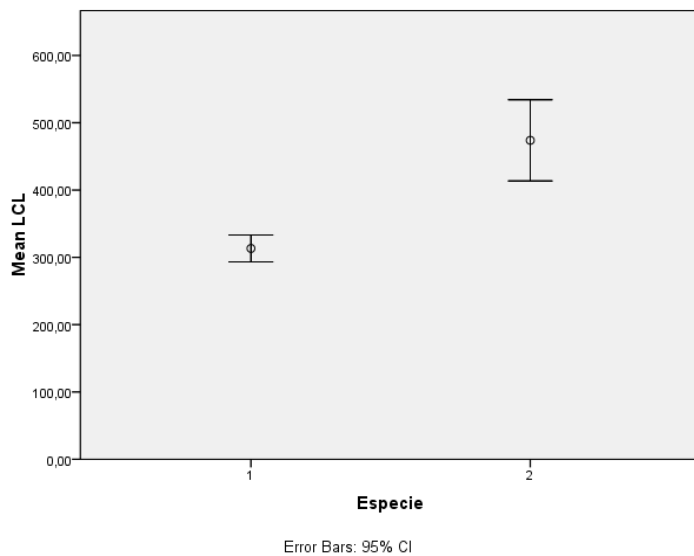
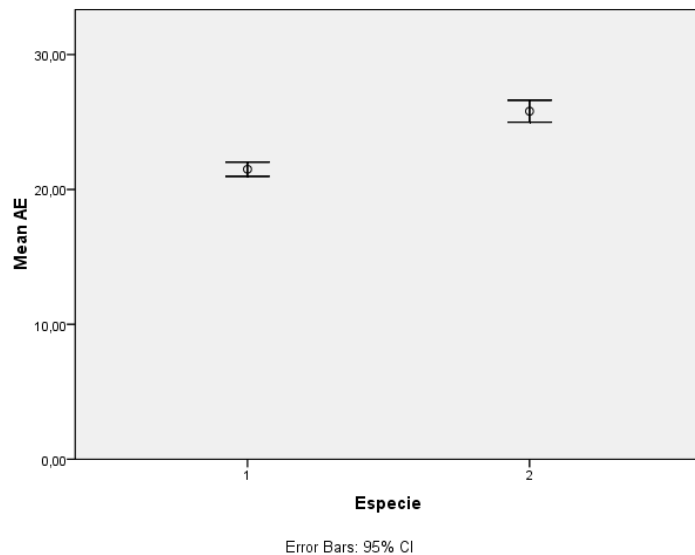
**Figura 7.** Representación gráfica de la longitud de anchura de los estomas para cada población.

El conjunto de datos puede visualizarse en los diagramas de caja de las **Figuras 8, 9 y 10**. En ninguno de los casos se observan valores atípicos.



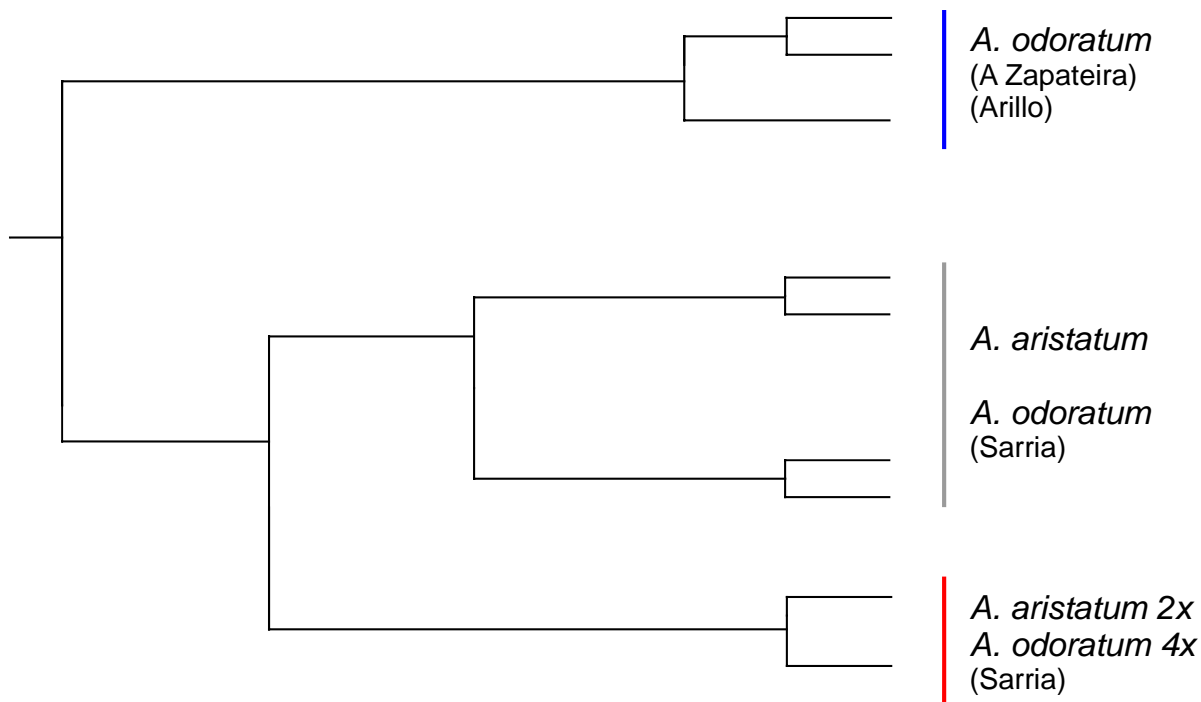
**Figura 8.** Diagrama de cajas donde la variable de estudio para las especies es la media de la longitud de los estomas. 1: *Anthoxanthum aristatum*. 2: *Anthoxanthum odoratum*. Las distribuciones no se solapan, no son similares, aunque sí lo es la dispersión que presentan.

**Figura 9.** Diagrama de cajas donde la variable de estudio para las especies es la media de la anchura de los estomas. 1: *Anthoxanthum aristatum*. 2: *Anthoxanthum odoratum*. La distribución de los datos no es similar, no existe solapamiento. La dispersión es mayor en *A. odoratum* que en *A. aristatum*.



**Figura 10.** Diagrama de cajas donde la variable de estudio para las especies es la media de la longitud de las células largas. 1: *Anthoxanthum aristatum*. 2: *Anthoxanthum odoratum*. Los datos no son similares, mostrando todavía una mayor diferencia de los valores que en la Figura 8 y Figura 9, no hay solapamiento. De nuevo, vemos que *A. odoratum* presenta una mayor dispersión de los datos.

El resultado del Análisis Cluster por el método UPGMA proporcionó un dendrograma (**Figura 11**) en el que se pueden apreciar dos grandes grupos de datos. Uno corresponde a la especie *A. odoratum*, pero sin incluir los representantes de Sarria, únicamente los ejemplares de las poblaciones de A Zapateira y Arillo. En el otro cluster aparecen las muestras de las poblaciones de Silleiro y Sequeiros pertenecientes a *A. aristatum* entremezcladas con los individuos de la población de Sarria (*A.odoratum*)



**Figura 11.** Dendrograma construido a partir del análisis de cluster jerárquico usando la distancia de Manhattan y el algoritmo UPGMA (linkage between groups). Los nombres de las poblaciones solo se indican en *A. odoratum*, ya que en *A. aristatum* no se aprecia ordenación en las muestras.

El ACP trata de crear nuevas variables –las componentes-, resultado de la combinación de las estudiadas, que expliquen la mayor proporción de la varianza observada en la muestra estudiada. En la **Tabla 4** se recogen los autovalores como indicadores de la proporción de la varianza explicada. En el análisis se obtienen tres componente pero solo la primera tiene un valor  $>1$  y explica el 60.70% de la varianza observada.

**Tabla 4.** Resultado del ACP: autovalores y varianza total explicada por las componentes.

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	1,823	60,770	60,770	1,823	60,770	60,770
2	0,917	30,571	91,341			
3	0,260	8,659	100,000			

Los pesos de cada variable en cada componente aparecen recogidos en la **Tabla 5** y en ella se observa que la longitud de estomas y células largas son los que tienen mayor peso.

**Tabla 5.** Valores de las variables analizadas en la primera componente.

Variable	Component
	1
LE	0,928
AE	0,550
LCL	0,812

Por último, para detectar si hay diferencias significativas entre las dos especies para los tres caracteres anatómicos analizados se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), si bien previamente se testó la normalidad mediante un test de Kolmogorov-Smirnov. En todos los casos se obtuvo un  $p\text{-valor} < 0,05$  (**Tabla 6**), lo que indica que existen diferencias significativas entre las especies para cada variable morfológica. Estos valores apoyan los resultados obtenidos en los diagramas de cajas (**Figura 8, 9 y 10**).

**Tabla 6.** Resumen de los valores obtenidos en la ANOVA. LE: longitud de los estomas. AE: anchura de los estomas. LCL: longitud de las células largas.

	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	p-valor
LE entre grupos	1117,81	1	1117,81	61,44	0,00
AE entre grupos	316,971	1	316,971	69,55	0,00
LCL entre grupos	442338,31	1	442338,31	20,51	0,00

## 4.2. Viabilidad polínica

En el estudio de la viabilidad del polen cuantificaron 4042 granos, de los que 1724 granos de polen pertenecen a *A. odoratum* y 2318 a *A. aristatum*. Los datos por población aparecen desglosados en la **Tabla 7**. Los granos de polen fueron separados en dos grupos, viables y no viables, dependiendo del nivel de fluorescencia. En este

apartado no se tuvo en cuenta la población de Arillo perteneciente a la especie *A. odoratum*, porque no se encontraron anteras en estado adecuado para la observación.

**Tabla 7.** Recuento de viables y no viables por población y por especie.

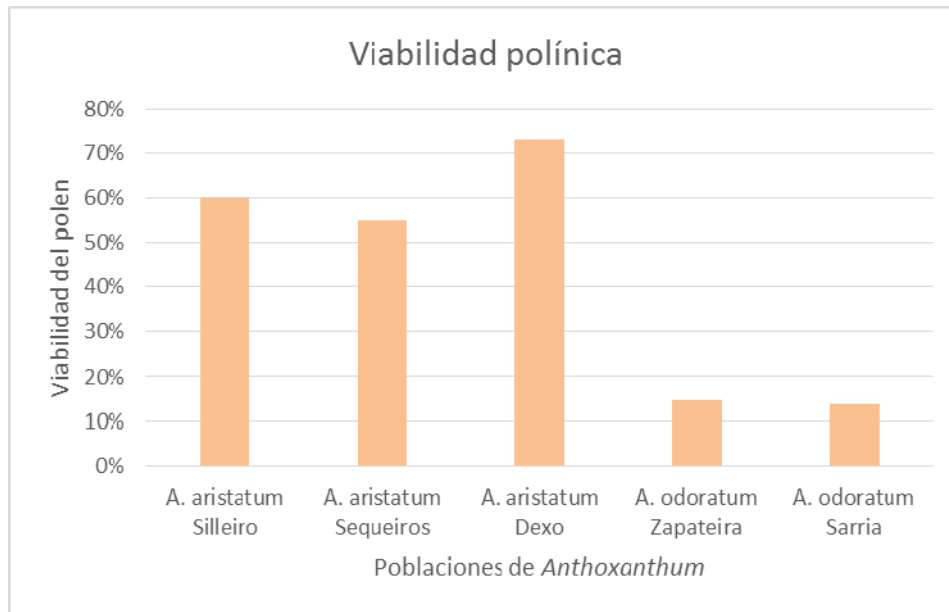
Especie	Población	Viables	No viables
<i>Anthoxanthum aristatum</i>	Dexo	552	253
	Cabo Silleiro	361	240
	Sequeiros	499	413
		1412	906
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	A Zapateira	92	516
	Sarria	143	973
		235	1489

En la **Tabla 8** se muestran los porcentajes de viabilidad encontrados en cada población. Todas las poblaciones de *A. aristatum* presentaron valores de viabilidad superiores a los de las poblaciones de *A. odoratum*. Con respecto a la viabilidad se observó que el 62,69% de los granos de polen presentaban fuerte fluorescencia en *A. aristatum*, por lo tanto eran viables, mientras que en *A. odoratum* solo alcanzaban el 14,31%.

**Tabla 8.** Recuento de granos de polen para cada población y para cada especie.

Carácter	<i>A. aristatum</i>				<i>A. odoratum</i>		
	Dexo	Silleiro	Sequeiros	Media total	A Zapateira	Sarria	Media total
Viabilidad %	72,98	60,28	54,82	62,69	14,72	13,89	14,31

La representación gráfica de los valores de viabilidad en cada población pone de manifiesto de forma intuitiva la existencia de diferencias significativas entre las dos especies (**Figura 12**).



**Figura 12.** Representación gráfica de la viabilidad polínica para cada población.

A fin de comparar los valores de viabilidad del polen de las especies, se llevó a cabo un test t-Student para muestras independientes (**Tabla 9**). Los resultados revelan que existen diferencias significativas entre las dos especies ( $p\text{-valor} < 0.05$ ), lo que coincide con lo observado en la **Figura 12**.

**Tabla 9.** Prueba t-Student para comparar los datos de viabilidad del polen de las dos especies de *Anthoxanthum*.

Viabilidad	Test de Levene para igualdad de las varianzas		t-test para la igualdad de las medias				
	F	p-valor	t	df	p-valor	Dif.sig.	Dif.est
Varianzas similares asumidas	10,493	0,004	8,498	23	0,000	46,96	5,53

## 5. DISCUSIÓN

El análisis de tres caracteres morfológico-anatómicos estudiados en dos especies del género *Anthoxanthum* pone de manifiesto la relación existente entre estos caracteres y las condiciones ambientales en las que se desarrollan las poblaciones. Ambas especies resultaron bien caracterizadas por los tres caracteres analizados, aunque es importante destacar que el número de poblaciones e individuos analizados por especie es bajo.

En general, *A. odoratum* presenta un tamaño medio mayor que *A. aristatum* para las tres variables medidas (**Tabla 3**) y el análisis estadístico realizado indica la existencia de diferencias significativas para las tres variables entre las dos especies (**Tabla 6**). Si se analizan las poblaciones independientemente, esta premisa se cumple para dos de las localidades, A Zapateira y Arillo, pero no para Sarria y la longitud de las células largas. Esta población presenta un valor incluso inferior al de cualquiera de las poblaciones de *A. aristatum* (**Figura 5**). Este dato y las relaciones de agrupación mostradas en el dendrograma de la **Figura 11** nos llevan a pensar que puede existir una diferenciación significativa de la población de Sarria dentro de la especie, pues los individuos de esa población aparecen intercalados con los miembros de *A. aristatum*, separándose del grupo formado por las poblaciones de A Zapateira y Arillo.

La población de Sarria se encuentra en el interior de Galicia, desarrollándose bajo un bosque de carballos (*Quercus robur* L.) ligeramente aclarado pero donde las plantas crecen en sombra buena parte de su ciclo vital, mientras que las de A Zapateira y Arillo están más próximas a la costa, en zonas más abiertas. Hay que tener en cuenta que el grado de insolación es uno de los factores que más influyen en los caracteres anatómicos de la epidermis foliar (Aiken *et al.*, 1984; Pimentel & Sahuquillo, 2003). La identificación morfológica indica que los ejemplares de esta población se encuadran dentro de las características propias de *A. odoratum*. En estos ejemplares se observa que el lema y palea de las flores estériles cubren claramente la flor fértil y no presentan anchos márgenes papiráceos (Valdés 1973, Paunero 1953). Por ello, aunque no se han realizado recuentos cromosómicos, el tamaño de los estomas y su morfología liga a estos ejemplares con el citotipo tetraploide.

Los datos obtenidos no discrepan demasiado con los publicados hasta el momento para *A. odoratum*. En este taxón se observa una cierta diferencia con respecto al tamaño de las células largas, que es inferior a las descripciones que existen de la especie en sus

valores máximos, pero no para sus mínimos (Devesa, 1992). El menor valor observado en la obra antes citada puede deberse a la diferencia climática existente entre las localidades de Galicia y las de Extremadura, que es donde Devesa (1992) obtuvo sus muestras. Numerosos estudios han mostrado la dependencia de los caracteres anatómicos y el medio ambiente (e.g. Aiken *et al.*, 1984; Hedberg, 1990). Las medidas encontradas concuerdan con lo observado por Pimentel & Sahuquillo (2003) en poblaciones recolectadas en el conjunto de la Península Ibérica. Estos mismos autores señalan la diversidad genética existente dentro del linaje anual diploide de *Anthoxanthum*, diversidad no bien traducida taxonómicamente (López-González, 1994; Pimentel *et al.*, 2010) y que probablemente se traduzca en diversidad morfológica y anatómica.

En *Anthoxanthum aristatum* los valores obtenidos son discrepantes con respecto a lo publicado para el resto de la Península Ibérica con respecto a una de las variables analizadas. Así, según Devesa (1992), las células largas pueden alcanzar los 1250  $\mu\text{m}$ , pero en las poblaciones analizadas los valores no superan los 370  $\mu\text{m}$ . De nuevo, los datos obtenidos por Pimentel (2001) concuerdan con los obtenidos aquí y consideramos, al igual que en el caso anterior, que esta discrepancia puede deberse al origen de las poblaciones y las condiciones ambientales en las que estas se desarrollan.

El análisis de componentes principales obtuvo una única componente significativa, lo que puede anunciar una alta correlación entre los datos (Legendre & Legendre, 1998). Asimismo, el resultado del PCA mostró que los caracteres estomáticos tienen un gran peso en la variabilidad de las especies, lo que ha sido corroborado en otras ocasiones (Devesa, 1992; Humbert-Droz & Felber, 1992). En nuestro caso será la longitud de los estomas el carácter que muestre más peso.

Para todos los caracteres se observó una diferencia significativa entre los niveles de ploidía, lo que coincidiría con lo observado en la literatura (Humbert-Droz & Felber, 1992). Sin embargo, esta tendencia no es completa, tal y como se puede deducir de la posición de los individuos de Sarria. Es necesario señalar que *A. odoratum* se trata de una especie morfológica (no monofilética), originada mediante eventos independientes de poliploidización (Pimentel *et al.*, 2013). No podemos descartar que la población de Sarria, si bien su genoma nuclear es claramente tetraploide, sea fruto de un evento de poliploidización independiente con respecto a las poblaciones de Arillo y A Zapateira.



En cuanto a los estudios de la viabilidad polínica, se obtuvieron valores más elevados en las poblaciones de *A. aristatum* que en las de *A. odoratum*, si bien los valores observados en su conjunto son bajos comparados con los datos de la literatura (Wang et al., 2004). Se encontraron diferencias significativas ( $p\text{-valor}<0.05$ ) entre las distintas especies. Basándonos en un trabajo reciente de Husband *et. al* (2013), estos resultados se ajustan a lo esperado para los complejos poliploides. Las especies poliploides son más frecuentemente perennes que anuales y suelen presentar frecuencias más altas de reproducción asexual y más bajas de reproducción sexual. Si bien en este trabajo no se ha estudiado la prevalencia de la reproducción asexual, se observa que en *Anthoxanthum* se cumplen algunos de los caracteres citados anteriormente (*A. odoratum*, tetraploide, especie perenne y de viabilidad polínica baja; *A. aristatum*, diploide anual y de viabilidad polínica alta).

Para continuar con esta línea de investigación será necesario hacer observaciones directas de la existencia de reproducción asexual en los grupos-niveles de ploidía, además de analizar nuevos caracteres de la fitness reproductiva como la viabilidad de las semillas y la tasa de germinación (Castro *et al.*, 2007).

## 6. CONCLUSIONES

El estudio de la relación existente entre caracteres anatómico-biológicos y el nivel de ploidía en poblaciones de las especies *Anthoxanthum odoratum* y *A. aristatum* procedentes del NW de la Península Ibérica, permiten plantear las siguientes conclusiones:

1- Los análisis llevados a cabo en la epidermis foliar muestran una diferencia entre algunos caracteres (longitud y anchura de los estomas y longitud de las células largas) entre las dos especies estudiadas (y por lo tanto sus niveles de ploidía). Los caracteres estomáticos pueden tener un gran peso en la diferenciación taxonómica, si bien nuestros resultados apuntan también a la variación ambiental.

2- Los resultados del test de viabilidad polínica correlacionan la viabilidad del polen con el nivel de ploidía de las especies objeto de estudio, corroborando un descenso de la viabilidad cuando se aumenta el nivel de ploidía que podría estar asociado a su vez con la mayor reproducción vegetativa que presentan.

3- La tinción con FDA permitió la diferenciación entre granos de polen viable y no viable, por lo que se considera un método adecuado para el análisis polínico del género *Anthoxanthum*. A la hora de tomar los datos es importante tener en cuenta el estado de madurez de las anteras y la rápida pérdida de emisión de fluorescencia.

## CONCLUSIONS

The conclusions of our study are:

1.- The analyses conducted highlight a differentiation in several anatomical characters (stomata length and width and long cells length) between the two species analysed (and, therefore, their ploidy levels). Stomata traits are useful for taxonomical differentiation, although our results also indicate a likely influence of the environment.

2.- Pollen viability tests indicate a correlation between pollen viability and ploidy level in the studied species, detecting a decrease in viability when ploidy level increases. There may be a connection between pollen viability and clonal spread prevalence.

3.- The FDA staining allowed the differentiation between viable and not viable pollen grains in *Anthoxanthum* provided that the anthers are in the right maturation stage.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

**Adams KL, Wendel JF. 2005.** Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**:135–141.

**Aiken SG, Darbyshire SJ, Lefkovitch LP. 1984.** The taxonomic value of using epidermal characteristics in the Canadian rough fescue complex (*Festuca altaica*, *F. campestris*, *F. halii*, *F. scabrella*). *Canadian Journal of Botany* **62**: 1864–1870.

**Brown WV. 1958.** Leaf anatomy in grass systematics. *Botanical Gazette* **119**(3): 170–178.

**Castro S, Loureiro J, Santos C, Ater M, Ayensa G, Navarro L. 2007.** Distribution of flower morphs, ploidy level and sexual reproduction of invasive weed *Oxalis pes-caprae* in the western area of the Mediterranean Region. *Annals of Botany* **99**: 507–517.

**Clayton WD, Renvoize SA. 1986.** Genera Graminum: Grasses of the world. Kew Bulletin, Additional series **13**: 1–389.

**Devesa JA. 1992.** Anatomía foliar. En: Devesa JA. Eds. *Anatomía foliar y palinología de las gramíneas extremeñas*. Badajoz: Universidad de Extremadura, 9–47.

**Drapikoska M, Szkudlarz P, Celka Z, Pierscinska J, Jackowiak B. 2008.** Preliminary results of the studies on morphological diversity of the lowland populations of species from the genus *Anthoxanthum* L. En: Kocarek P, Plasek V, Malachova K, Cimalova S. eds. *Environmental Changes and Biological Assessment*. Scripta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Ostraviensis, 236–242.

**Drapikowska M, Susek K, Hasterok R, Szkudlarz P, Celka Z, Jackowiak B. 2013.** Variability of stomata and 45S and 5S rDNAs loci characteristics in two species of *Anthoxanthum* genus: *A. aristatum* and *A. odoratum* (Poaceae). *Acta Biologica Hungarica* **64**(3): 352–363.

**Hardion L, Verlaque R, Rosato M, Rosselló JA, Vila B. 2015.** Impact of polyploidy on fertility variation of Mediterranean *Arundo* L. (Poaceae). *Comptes Rendus Biologies* **338**: 298–206.

**Hedberg I. 1986.** The genesis of tetraploid *Anthoxanthum odoratum* L. *Symbolae Botanicae Upsaliensis* **27**: 147–154.

**Hedberg I. 1990.** Morphological, cytotaxonomic and evolutionary studies in *Anthoxanthum odoratum* L. s.l.-a critical review. *Sommerfeltia* **11**: 97–107.

**Humbert-Droz C, Felber F. 1992.** Etude biométrique des stomates et des grains de pollen comme indicateurs du degré de polyploidie chez *Anthoxanthum alpinum* Löve et Löve. Institut de Botanique, Université de Neuchâtel, Neuchâtel.

**Husband BC, Baldwin SJ, Suda J. 2013.** The incidence of polyploidy in plants: major patterns and evolutionary processes. En: Greilhuber J, Wendel JF. eds. *Plant Genomic Diversity Vol II*. Springer, Vienna, Alemania, 255–276.

- Legendre P, Legendre L. 1998.** Numerical Ecology 2nd edition. Elsevier, Amsterdam.
- Li X. 2011.** Pollen Fertility/viability Assay Using FDA Staining. *Bio-protocol* Bio101: e75. <http://www.bio-protocol.org/e75>
- López-González G. 1994.** Notas sobre el género *Anthoxanthum* L. (Gramineae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. **51**(2): 309–312.
- Mack RN. 2000.** Assessing the extent, status, and dynamism of plant invasions: Current and emerging approaches. In: Mooney, H. A., Hobbs, R. J. (eds.) *Invasive Species in a Changing World*. Island. Press, Washington, DC, 141–168.
- Otto SP, Whitton J. 2000.** Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* **34**: 401–437.
- Paunero E. 1953.** Las especies españolas del género *Anthoxanthum* L. *Anales del Instituto Botánico AJ Cavanilles* **12**: 401–442.
- Pimentel Pereira, Manuel. 2001.** *Estudio taxonómico do xénero Anthoxanthum L. (Poaceae, Pooideae) en Galicia (NW Península ibérica)*. Directora: Elvira Sahuquillo Balbuena. Tesis de licenciatura. Universidade da Coruña; Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía vexetal e Ecoloxía.
- Pimentel M, Sahuquillo E. 2003.** Study of the leaf anatomy of the Iberian species of genus *Anthoxanthum* (Poaceae). *Bocconea* **16**(2): 683–689.
- Pimentel M, Estévez G, Sahuquillo E. 2007.** European sweet vernal grasses (*Anthoxanthum*, Poaceae, Pooideae, Aveneae): a morphometric taxonomical approach. *Systematic Botany* **32**: 43–59.
- Pimentel M, Catalán P, Sahuquillo E. 2010.** Morphological and molecular taxonomy of the annual diploids *Anthoxanthum aristatum* and *A. ovatum* (Poaceae) in the Iberian Peninsula. Evidence of introgression in natural populations. *Botanical Journal of the Linnean Society* **164**: 53–71.
- Pimentel M, Sahuquillo E, Torrecilla Z, Popp M, Catalán P, Brochmann C. 2013.** Hybridization and long-distance colonization at different time scales: towards resolution of long-term controversies in the sweet vernal grasses (*Anthoxanthum*). *Annals of botany* **112**(6): 1015–30.
- Schouten Y, Vedkamp JF. 1985.** A revision of *Anthoxanthum* including *Hierochloë* (Gramineae) in Malesia and Thailand. *Blumea* **30**: 319–351.
- Soltis DE, Soltis PS. 1999.** Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in ecology and evolution* **14**: 34–352.
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, Depamphilis CW, Wall PK, Soltis PS. 2009.** Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* **96**: 336–348.

**Soreng RJ, Davis JI. 2000.** Phylogenetic structure in Poaceae subfamily Pooideae as inferred from molecular and morphological characters: misclassification versus reticulation. En: Jacobs W, Everett J. eds. *Grasses. Systematics and evolution*. Collingwood: CSIRO.

**Soreng RJ, Davidse G, Peterson PM, Zuloaga FO, Judziewicz EJ, Filgueiras TS, Morrone O. 2009.** Catalogue of New World grasses. [www.tropicos.org/Project/CNWG](http://www.tropicos.org/Project/CNWG) (accedido 24 Mayo 2015).

**Stebbins, GL. 1950.** Variation and evolution in plants. Columbia Univ Press, New York.

**Tutin TG. 1980.** *Anthoxanthum* L. En: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. eds. *Flora Europaea*, Vol. 5. Cambridge: Cambridge University Press, 229–230.

**Tyteca D, Gathoye JL. 1988.** Les Dactylorhiza d'Europe occidentale: approche biostatistique. *Les Naturalistes belgues*, **69**(2): 65–97.

**Valdés B. 1973.** Revisión de las especies anuales del género *Anthoxanthum* (Gramineae). *Lagascalia* **3**: 99–141.

**Wang Z, Ge Y, Scott M, Spangenberg G. 2004.** Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) plants. *American Journal of Botany* **91**(4): 523–530.

**Watson L, Dallwitz M. 1992.** The grass genera of the world. Wallingford, UK: CAB.

**Wendel JF. 2000.** Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* **42**: 225–249.

**Yarnes S. 2011.** Pollen Conservation and FDA Protocol. Available at: <http://www.acffarms.org/papers/>