



TRABAJO FIN DE GRADO

**¿Provoca el cruce entre razas cromosómicas
disfunción híbrida en la germinación de *Carex
helodes* y *Carex laevigata* (Cyperaceae)?**

Diego Herrero Doblado

Junio 2022

Área de Botánica

Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

Tutores: José Ignacio Márquez Corro & Santiago Martín Bravo

Con la colaboración de Antonio Marcial Escudero Lirio

RESUMEN

Carex es el tercer género de angiospermas con mayor número de especies del mundo. Una de sus peculiaridades evolutivas consiste en la presencia de cromosomas holocéntricos, lo que posibilita la viabilidad de los fragmentos de cromosomas generados por procesos de fusión y fisión de los mismos, al contrario de lo que ocurre en la mayoría de organismos con cromosomas monocéntricos. Esto se refleja en una enorme variabilidad citogenética en el género *Carex*, con números de cromosomas que oscilan desde $2n=10$ hasta $2n=132$, y que varían no sólo entre distintas especies sino incluso entre distintas poblaciones de una misma especie. En este proyecto se investiga el efecto sobre el éxito reproductivo (fitness), medido en términos de germinación, del cruzamiento entre individuos conoespecíficos de *Carex* pertenecientes a poblaciones con distinto número de cromosomas. De esta manera, se pretende evaluar el papel de la especiación cromosómica en la diferenciación genética a nivel poblacional de organismos con cromosomas holocéntricos. Para ello, se recolectaron individuos de dos especies distintas (*Carex helodes* y *C. laevigata*) de varias poblaciones del sur de Portugal y el sur-oeste de Andalucía con distinto número de cromosomas. Estos individuos parentales se cultivaron en el invernadero y se realizaron distintos tipos de cruces entre las poblaciones muestreadas, para luego germinar los utrículos resultantes en cámaras de incubación y así estimar sus tasas de germinación. Se germinaron utrículos procedentes de cruces híbridos para dos generaciones (F1 y F2), así como para autocruzamientos de los individuos parentales. Teóricamente, las reorganizaciones cromosómicas deberían disminuir el fitness (tasa de germinación) de los descendientes F1 y F2 obtenidos entre cruces de poblaciones diferenciadas cromosómicamente con respecto al autocruzamiento de los parentales. Los resultados obtenidos en *C. laevigata* parecen ser compatibles con la hipótesis de la disfunción híbrida con unas tasas de germinación progresivamente más bajas en F1 y F2 con respecto a los autocruces de los parentales (cerca del 50%). Por el contrario, los resultados para *C. helodes* no parecen apoyar directamente esta hipótesis, dando a entender que puede haber consanguineidad en, al menos, una de las poblaciones del sur de España ya que el fitness para los autocruces de los parentales es muy bajo (menos del 20%) comparado con los distintos cruces de F1 y F2.

Palabras clave: citogenética, consanguineidad, cromosomas holocéntricos, disfunción híbrida, evolución cromosómica, germinación, vigor híbrido.

ABSTRACT

Carex is the third most biodiverse genus of angiosperms in the world. One of its evolutionary peculiarities is the presence of holocentric chromosomes, which allows the inheriting of chromosome fragments generated by chromosome fusion and fission processes, contrary to what occurs in organisms with monocentric chromosomes. This is reflected in the wide cytogenetic variability in the genus *Carex*, with chromosome numbers ranging from $2n=10$ to $2n=132$, which vary not only between species but even between populations of the same species. This project investigates the effect on reproductive success (fitness), measured in terms of germination rates, of crosses between conspecific *Carex* individuals belonging to populations with different chromosome numbers. In this way, we aim to assess the role of chromosomal speciation in genetic differentiation at the population level of organisms with holocentric chromosomes. For this purpose, individuals of two different species (*Carex helodes* and *C. laevigata*) were collected from several populations in southern Portugal and south-western Andalusia with different chromosome numbers. These parental individuals were grown in a greenhouse and different types of crosses were made between the sampled populations. The resulting utricles were germinated in incubator chambers to estimate their germination rates. Utricles from hybrid crosses were germinated for two generations (F1 and F2), as well as for self-crosses of the parental individuals. Theoretically, chromosomal rearrangements should decrease the fitness (germination rate) of F1 and F2 offspring obtained between crosses of chromosomally differentiated populations with respect to the self-crossing of the parents. The results obtained for *C. laevigata* seem to be compatible with the hypothesis of hybrid dysfunction with progressively lower germination rates in F1 and F2 with respect to the parental self-crosses (about 50%). In contrast, the results for *C. helodes* do not seem to directly support this hypothesis, suggesting that there may be inbreeding depression in at least one of the southern Spanish populations as the fitness for parental outcrosses is very low (less than 20%) compared to the different F1 and F2 crosses.

Key words: cytogenetics, inbreeding depression, holocentric chromosomes, hybrid dysfunction, chromosome evolution, germination, hybrid vigor.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
2.1 Especies de estudio.....	3
2.2 Parentales.....	4
2.3 Cruces.....	5
2.4 Germinación.....	7
2.5 Invernadero.....	10
2.6 Cálculos de las tasas de germinación.....	13
3. RESULTADOS.....	14
3.1 <i>Carex helodes</i>.....	14
3.2 <i>Carex laevigata</i>.....	19
4. DISCUSIÓN.....	24
5. CONCLUSIONES.....	28
6. AGRADECIMIENTOS.....	29
7. BIBLIOGRAFÍA.....	30

1. INTRODUCCIÓN

Las ciperáceas (Cyperaceae, orden Poales) componen una de las familias más grandes de las angiospermas, conteniendo aproximadamente 5000 especies y unos 70–115 géneros (Voss & Reznicek, 2013) que se distribuyen por todo el mundo a excepción de la Antártida, habitando principalmente zonas húmedas. En este estudio se trata con el género *Carex*, que, con diferencia, es el grupo más diverso dentro de esta familia, siendo el tercer género de angiospermas con más especies del mundo, con alrededor de 2000 aceptadas en la actualidad. Además, constituye el género más rico en especies en las zonas templadas de ambos hemisferios, muchas de las cuales poseen gran importancia ecológica, dominando mayoritariamente zonas de humedales. También es uno de los géneros de angiospermas más ricos en la Unión Europea con cerca de 250 especies (Jiménez-Mejías & Luceño, 2011) y el segundo más rico en la Península Ibérica con 95 especies (Luceño, 2008). El género *Carex* presenta cromosomas holocéntricos, con múltiples centrómeros distribuidos por todo el cromosoma, a diferencia de los monocéntricos que solo tienen uno (Bell, 1992; Luceño & Castroviejo, 1991; Hipp, 2007; Hipp et al., 2009, 2010; Chung et al., 2011; Escudero et al., 2012, 2013a, 2013b; 2016; 2018; Márquez-Corro et al. 2019a). Esta característica tan sólo se ha descrito en tres de los seis reinos del dominio Eucariota (Archaeplastida, Opisthokonta y Rhizaria; Márquez-Corro et al., 2018). En el género *Carex*, el número cromosómico oscila entre $2n=10$ y $2n=132$ (Roalson, 2008), mientras que en ciperáceas es $2n=4-226$ (Roalson, 2008). En *Carex*, esta variabilidad de cromosomas se produce, no sólo entre especies, sino que también varía entre poblaciones de la misma especie, una peculiaridad que sugiere que los cromosomas holocéntricos podrían suponer un factor importante para la determinación de los patrones de la biodiversidad, demostrándose que tienen una influencia mucho más importante en la diversificación de plantas frente a animales (Rieseberg, 2001).

La presencia de este tipo de cromosomas, permite que los fragmentos derivados de procesos de unión y ruptura de cromosomas (fusión y fisión, respectivamente), puedan segregarse correctamente durante la meiosis, puesto que el huso acromático se adhiere a esos fragmentos debido a su actividad cinetocórica, lo que permite su migración a los polos de la célula (Escudero et al., 2016; Márquez-Corro et al., 2019a). Se ha demostrado que la variación en el número de cromosomas de *Carex* no se debe a la poliploidía sino a las fusiones y fisiones de cromosomas (Hipp et al., 2009,

Márquez-Corro et al., 2019b). Como resultado, pueden observarse cariotipos con cromosomas trivalentes y tetravalentes en meiosis (por ejemplo *Carex siderosticta*, con cromosomas tetravalentes durante la meiosis; Tanaka 1940, 1949 o sin ir más lejos, algunas de las poblaciones de *Carex helodes* procedentes de Portugal (Escudero et al., 2008)), haciendo que el número de cromosomas de *Carex* sea muy variable. Los reordenamientos cromosómicos pueden impulsar la especiación ya que reducen el flujo genético entre los individuos que se encuentran en divergencia (Grant, 1950). Hay un modelo de especiación cromosomática basado en la “disfunción híbrida”, que propone la reducción del éxito reproductivo (“fitness”) de los híbridos resultantes de los cruces entre individuos pertenecientes a razas cromosomáticas distintas (Ayala & Coluzzi, 2005; Lai et al., 2005). Esto, provoca que la selección en contra de los individuos de la F1 (heterocigotos) dificulte en gran medida que se fijen las mutaciones subdominantes (selecciones que afectan negativamente al heterocigoto, pudiendo provocar una selección divergente en los parentales) que puedan llegar a ocurrir (Coyne & Orr, 2004). Así, al reducirse el fitness de la F1, no se fijarán estas mutaciones y por tanto, no se transmitirán a generaciones futuras (F2). El papel de los cromosomas holocéntricos en la diferenciación genética poblacional (y eventual especiación) ha sido estudiado para poblaciones que se encuentran geográficamente muy alejadas entre sí (Whitkus, 1988; Hipp et al., 2009; Escudero et al., 2016), pero no han sido evaluados adecuadamente, entre poblaciones más próximas a priori con mayor grado de parentesco. Las dos especies que se trabajan en este estudio, *Carex helodes* Link y *C. laevigata* Sm, presentan diferencias en el número de cromosomas, es decir, que tanto las poblaciones más cercanas entre ellas, como las más lejanas, pueden diferir en su número de cromosomas, teniendo una variación elevada en el número de cromosomas a nivel intraespecífico ($2n=68-75$ y $2n=69-84$, respectivamente; Luceño & Castroviejo, 1991). Siendo un ejemplo entre las poblaciones de *C. helodes* de La Rocina (sureste de Huelva) que muestran $2n=76$ y $2n=78$ y las poblaciones de Los Barrios – Facinas (sur de Cádiz) que muestra tanto $2n=78$ como $2n=80$ (con un cromosoma trivalente) (Luceño & Castroviejo, 1991). Por último, destacar que se realizó un experimento similar con *Carex scoparia* (Escudero et al., 2016; 2018) donde se detectó de manera exitosa efecto de disfunción híbrida (inviabilidad de los utrículos F2). Esto es debido a que se producen más de dos reordenamientos cromosómicos entre los parentales (fase de la meiosis donde se separan los cromosomas y migran a los polos de la célula) impulsando la aparición de

mutaciones, fisiones y fusiones de los cromosomas (Escudero et al., 2016). Además, hay un importante efecto de distorsión (desviación de los genotipos esperados resultantes de estos cruces con respecto a los parentales) sobre los cruces de F2, motivado por la carga genética. El impulso meiótico o holocinético es el mayor culpable de este proceso, haciendo que aquellos cromosomas más grandes (y por tanto con los centrómeros más grandes y a su vez, con placas cinetocóricas más grandes) migren preferencialmente a los polos (ventaja evolutiva), garantizando su herencia (Bureš & Zedek, 2014; Márquez-Corro et al., 2019a). Esto provoca en parte, la segregación de las regiones del genoma de la especie, impulsando la diversificación a través de fisiones y fusiones (Bureš & Zedek, 2014). Se pretende evaluar el papel que desempeña la disfunción híbrida en la diferenciación genética de las poblaciones, teniendo como principal motivo la gran diversidad citogenética que tienen estas poblaciones, debido a la existencia de los cromosomas holocéntricos, que permiten que las distintas poblaciones se diferencien mediante el aislamiento postcigótico (Escudero et al., 2016). Este estudio pretende complementar los estudios que evidencian el efecto de la disfunción híbrida motivada por la presencia de cromosomas holocéntricos en el género *Carex*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Especies de estudio

El género que se estudia es *Carex* Lin (Cyperaceae), perteneciente al orden Poales. Se distribuyen principalmente por el hemisferio norte, dominando generalmente en zonas húmedas. Las especies de estudio son *Carex helodes*, distribuida sólo en el suroeste de la península ibérica y en el norte de África (Marruecos) (Escudero et al., 2008) y *C. laevigata*, distribuida por el norte, oeste y suroeste de la península ibérica (Luceño & Castroviejo, 1991). Ambas especies presentan una gran variación en su número de cromosomas, distinguiendo grandes diferencias entre diferentes poblaciones de las mismas especies (Tabla 1). En *C. helodes* nos encontramos con una variación de cromosomas de $2n=68$ hasta $2n=74$ (Escudero et al., 2008). Y en *C. laevigata*, tenemos una variación de $2n=69$ hasta $2n=80$ (Luceño & Castroviejo, 1991). Ambas especies aumentan su número de cromosomas conforme se desciende hacia el sur de la península ibérica.

<i>Carex helodes</i>	Aznalcóllar ♂ 2n=68	Río Tinto ♂ 2n=70	Barranco do Velho (Portugal) ♂ 2n=72
Aznalcóllar ♀		X	X
Río Tinto ♀		X	X
Barranco do Velho (Portugal) ♀			X

<i>Carex laevigata</i>	Facinas-Los Barrios ♂ 2n=78	La Rocina ♂ 2n=76	Alferce (Portugal) ♂ 2n=74
Facinas-Los Barrios ♀	X	X	X
La Rocina ♀		X	
Alferce (Portugal) ♀			X

Tabla 1: Los distintos cruces efectuados y del número de cromosomas que corresponde a cada población para *C. helodes* y *C. laevigata*. La “X” marca los cruces realizados, incluidos los autocruces de los parentales. La celda con color indica que se ha realizado la F2 de ese cruce. Las filas indican la madre en el cruce (el primero en ser mencionado en el cruce) y las columnas el padre (el segundo en ser mencionado en el cruce). Ej.: Aznalcóllar x Río Tinto es la X marcada en *Carex helodes* debajo de la columna de “Río Tinto 2n=72” cruce y selfing de F1 (F2). Números de cromosomas obtenidos de Escudero, et al., (2008) para *C. helodes* y Castroviejo & Luceño, (1991) para *C. laevigata*.

2.2. Parentales

Los parentales se recolectaron en marzo de 2019 en distintos puntos del sur y suroeste de la península ibérica (Tabla 2). Los individuos de *Carex helodes* se recolectaron en la zona de: Aznalcóllar (Sevilla): 9 individuos, 4 de ellos recolectados en 2018 y 5 de ellos en 2019), Río Tinto (Huelva): 5 individuos y Barranco do Velho (Portugal): 5 individuos. Los individuos de *Carex laevigata* fueron recolectados de: Facinas-Los Barrios (Cádiz): 5 individuos, Alferce en Faro (Portugal): 5 individuos y La Rocina (Huelva): 5 individuos (Fig. 1a y 1b). Los parentales se trasplantaron al invernadero del área de Botánica de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla) y se metieron en macetas con nuevo sustrato y se colocaron sobre mesas de cultivo (bandejas) inundadas y con un sistema de riego que regaba por aspersion cada 6 horas durante 5 minutos.

Código colector	Nº Cromosomas	A	Género	Especie	Autor Especie	Estado	Provincia	Localidad	Localidad datos	Ubicación	Altura (m)	Coordenadas	Hábitat	Fecha recolección	Colector principal	Colectores secundarios
1JMC19 // H1 (1-4)	2n= 68	PLANTA VIVA del 1-4 (4 indivs)	Carex	helodes	Link	España	Sevilla	Aznalcóllar	Aznalcóllar	Madroñalejo	73	37.591342, -6.355398	praderas temporalmente inundadas	18/VI/2018	LEG.: J.I. Márquez-Corro	M. Escudero
1JMC19 // H1 (A-E)	2n= 68	PLANTA VIVA de la A-E (5 indivs)	Carex	helodes	Link	España	Sevilla	Aznalcóllar	Aznalcóllar	Madroñalejo	73	37.591342, -6.355398	praderas temporalmente inundadas	07/III/2019	LEG.: J.I. Márquez-Corro	M. Escudero
2JMC19 // H2 (A-E)	2n= 70	PLANTA VIVA de la A-E (5 indivs)	Carex	helodes	Link	España	Huelva	Niebla	Río Tinto	cuneta de camino forestal pascando la aldea de El Guijo	127	37.496670, -6.588608	suelos húmedos y umbrosos en la cara norte del Pie del Carricejo	09/III/2019	LEG.: J.I. Márquez-Corro	M.J. García-Pérez & I. Miñón-Villa
4JMC19 // H4 (A-E)	2n= 72	PLANTA VIVA de la A-E (5 indivs)	Carex	helodes	Link	Portugal	Faro	São Brás de Alportel	Barranco do Velho	carretera N2 antes de llegar a Barranco do Velho	469	37.229531, -7.934769	praderas temporalmente inundadas	22/III/2019	LEG.: J.I. Márquez-Corro	M. Escudero
3JMC19 // L3 (A-F)	2n= 78	PLANTA VIVA de la A-F (5 indivs)	Carex	laevigata	Sm.	España	Cádiz	Los Barrios	Facinas-Los Barrios	carril cicloturista Valle de Ojén, de Los Barrios a Facinas, antes de llegar al arroyo del Caballo	208	36.171467, -5.580351	suelos húmedos y umbrosos bajo Quercus suber	14/III/2019	LEG.: J.I. Márquez-Corro	S. Martín-Bravo
5JMC19 // 5 (A-E)	2n= 74	PLANTA VIVA de la A-E (5 indivs)	Carex	laevigata	Sm.	Portugal	Faro	Silves	Alferce	pequeña rambla junto a la carretera N267	263	37.339645, -8.461991	suelos umbrosos e inundados en el remanso de una rambla	22/III/2019	LEG.: J.I. Márquez-Corro	M. Escudero
6JMC19 // 6 (A-E)	2n= 76	PLANTA VIVA de la A-E (5 indivs)	Carex	laevigata	Sm.	España	Huelva	El Rocío	La Rocina	sendero peatonal "Charco del Acebrón", arroyo de la Casa de la Cabrera	11	37.142454, -6.543431	suelos umbrosos y saturados de agua	24/III/2019	LEG.: J.I. Márquez-Corro	J. Márquez & R. Corro

Tabla 2: Tabla con la información de recolección de los parentales.



Figura 1: Mapa de las poblaciones de los parentales de *Carex helodes* y *laevigata* recolectados en el suroeste de la península ibérica. a) En azul Barranco do Velho (Portugal), en naranja Río Tinto (Huelva) y en amarillo Aznalcóllar (Sevilla). b) En azul Alferce (Portugal), en amarillo La Rocina (Huelva) y en rojo Facinas-Los Barrios (Cádiz).

2.3. Cruces

Una vez establecidos los parentales, se esperó a que empezara su floración. En 2018 se aislaron las espigas masculinas y femeninas con sobres de papel etiquetados para recoger el polen y poderlo utilizar para realizar cruces controlados. Una vez terminó la generación de polen se procedió a la polinización manual de las espigas femeninas, metiendo las espigas femeninas antes de su maduración en los sobres con el polen recogido y cerrándolos para evitar

polinizaciones no controladas. Se realizaron dos tipos de cruce: autocruzamiento (selfing) de los parentales (P) y cruzamiento entre los parentales (F1), indicando siempre la madre al principio del código de cruce con el que se etiquetaba el sobre. Los cruces se diseñaron para implicar a individuos de poblaciones diferenciadas cromosómicamente (Fig. 2). Así en *C. helodes* las poblaciones implicadas en los cruces fueron: Aznalcóllar x Río Tinto, Aznalcóllar x Barranco do Velho (Portugal) y Río Tinto x Barranco do Velho (Tabla 1). Y en *C. laevigata* fueron: La Rocina x Facinas-Los Barrios, Los Barrios x Facinas-Los Barrios, Facinas-Los Barrios x Alferce (Portugal), Alferce (Portugal) x La Rocina (Tabla 1), las cuales presentan cromosomas desde $2n=68$ hasta $2n=72$ en *C. helodes* y desde $2n=72$ hasta $2n=78$ en *C. laevigata* (Tabla 1 y Tabla 2).

*Ejemplo del cruce 1JMC18A 2 x 2JMC18C (H12x2C) (*C. helodes*); donde se estaría cruzando la madre procedente de Aznalcóllar con el padre procedente de Río Tinto*

En 2021 se prosiguió con el experimento, donde, a parte de volver a generar Selfing de los parentales y F1, se realizaron selfing de los individuos F1 germinados en 2018 para obtener la F2, siguiendo el mismo método inicial; etiquetar y encapsular las espigas masculinas para tener cruces controlados para posteriormente usar ese polen para polinizar las espigas femeninas deseadas.

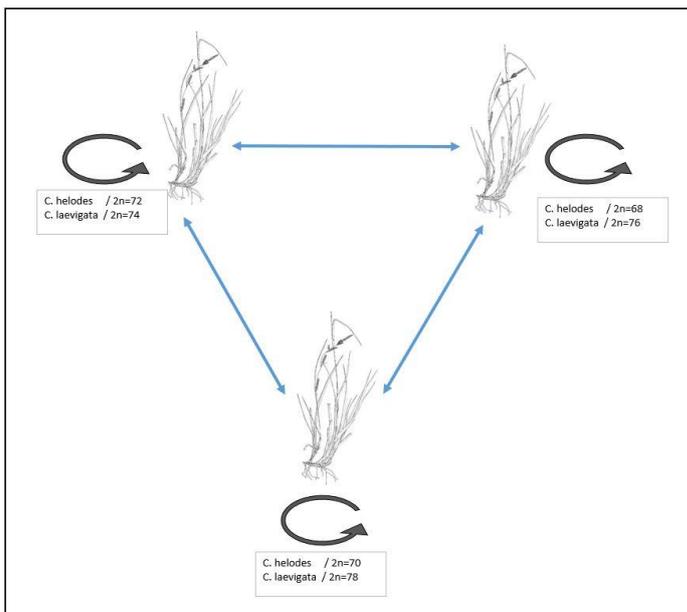


Figura 2: Esquematización de los cruces entre poblaciones y su número de cromosomas para *C. helodes* y *C. laevigata*. Indicado con una flecha circular, los autocruces de los parentales (selfing P) y con flechas simples los cruces tipo F1. No están representados los cruces tipo F2 ya que son autocruces de los mismos cruces F1.

2.4. Germinación

Viabilidad de los utrículos: Una vez maduras las espigas femeninas utilizadas en los cruces, se retiraron los sobres de las plantas y se hizo una clasificación de los utrículos en: aparentemente viables (con embrión) y aparentemente no viables (sin embrión) para obtener una estimación de utrículos a plantar y organizar los espacios dentro del invernadero. Para evitar sesgos o fallos en este método de clasificación, se intentaron germinar todas las semillas incluyendo las que aparentemente no tenían embrión, pero a la hora de adjudicarles un sitio en el invernadero, se partía de las que sí tenían embrión. En 2019 se utilizó un solo incubador refrigerador de laboratorio FRIOCELL FC 55 para la germinación de los utrículos, pero en 2021 se tuvo que usar también otro incubador, modelo POL-EKO ST 2 SMART, por la gran cantidad de placas que había para realizar el experimento. Los incubadores se programaron con un fotoperiodo de día a 24°C durante 11 horas y noche a 14°C durante 13 horas, siguiendo las indicaciones de un trabajo previo de germinación en *C. helodes* (Narbona et al., 2013) para las dos especies de *Carex*, ya que ambas están estrechamente emparentadas (subgen. *Carex*, sect. *Spirostachyae*) (Drejer) L.H.Bailey).

Placas: Se prepararon las placas de Petri con un papel de filtro autoclavado para eliminar las posibles bacterias y hongos que pudiera haber en este y se recortó para que cupiese en la base de la placa. Se colocaron dos de estos papeles con el fin de aumentar la retención de agua y así favorecer la humedad sobre el sustrato en el que se colocaban los utrículos.

Etiquetado: Se estableció un etiquetado exclusivo para cada placa, donde se rotulaba el código del cruce, que indica las poblaciones o población implicada; el número identificativo de cada placa/cruce, que es único y por último, el número de utrículos que aparentemente serían viables y no viables (Fig. 3), con el fin de identificar inequívocamente el cruce del que provenían los utrículos. Dentro de cada placa, se ponían (a ser posible) todos los utrículos extraídos de una espiga, quedando las semillas de una espiga en una sola placa. La cantidad de utrículos que se colocaban en cada placa dependía de la cantidad que hubiese en la espiga. En los cruces realizados en 2018, los utrículos por placa no superaron los más de 100, de forma similar a *C. helodes* para el año 2021. Sin embargo, para *C.*

laevigata en ese mismo año, el número de utrículos alcanzaba en algunos casos más de 200, siendo la mayoría semillas inviables. Además, se separó dentro de la placa los grupos de utrículos (embrión y sin embrión) para tener más controlada la germinación de estos y favoreciendo una disposición (dando cierto espacio entre cada semilla) donde se evitaba la interferencia entre ellos en la medida de lo posible. Así, se numeraron según se iban colocando los utrículos. En 2019, la numeración incluía del 1 al 56 ya que había 56 placas en total y se iban numerando progresivamente por lo que el valor numérico de cada placa era único. Para 2021 se siguió la misma metodología para la numeración, pero la de placas aumentó a 166.



Figura 3: Foto de una de las bandejas del incubador durante el riego de utrículos. Semillas de *C. helodes* (año de germinación: 2019) colocadas en su placa rotulada correspondiente y sobre la doble capa de papel de filtro. El rotulado de las placas contiene la información del tipo cruce (ej. helodes 3 x 4JMC19C); el número específico de cruce/placa (ej. 54) y el número de utrículos que parecerían ser viables y los que no (ej. 0+ 8-).

Riego: Se humidificaron las placas cada 2–3 días con una pipeta de Pasteur. Se utilizaba agua destilada con una gota de lejía comercial por cada 100mL para el riego (Buide, com. pers.) aunque en el año 2021 se incrementó esta cantidad ya que proliferaron muchos más hongos que atacaban a los utrículos. En primera instancia, se fue aumentando la dosis paulatinamente y a lo largo de unas semanas para comprobar que no existía daño a corto plazo en la testa de las semillas. Se alcanzó una dosis de 2 gotas de lejía por cada 100mL con el fin de intentar destruir el hongo invasor en su mayoría, luego se bajó la dosis a 1,5 gotas de lejía por cada 100mL y se mantuvo durante los últimos 30 días de lo que duraba la

fase de germinación (90 días). Para evitar realizar una humidificación excesiva, se procuraba dejar húmedo el papel, pero sin llegar a inundarlo, para ello se miraba el color del papel, cuanto más blanco menos agua contenía y las gotas acumuladas en la tapa de la placa indicaban una alta humedad. Estrictamente había que humedecer los papeles de filtro que necesitaran agua, por lo tanto, era común encontrarse también con placas lo suficientemente húmedas, por lo que se evitaba humedecer estas.

Lavado de semillas: Debido a la asidua aparición de hongos no deseados, se realizó un lavado de las semillas posterior a su colocación en las placas. Para ello se prepararon en tres vasos de precipitados, uno de ellos con lejía comercial y los otros dos con agua destilada para aclarar los utrículos. El lavado se efectuó en placas de Petri, donde se colocaban las semillas, y se iban lavando, primero con lejía y luego se aclaraba dos veces para finalmente colocar estas semillas lavadas en una nueva placa y filtro. La técnica de lavado consistía en sumergir los utrículos en la lejía durante 3 minutos y luego, enjuagar bien las semillas para retirar toda la lejía que pudiera quedar (Míguez com. pers.).

Inicio de germinación: las primeras semillas en germinar lo hacían aproximadamente tras un mes. Se anotaban los utrículos que iban germinando y se preparaban para pasarlas al invernadero, donde se plantaban en alveolos (añadiendo sustrato) sobre una mesa de cultivo (bandeja) inundada y se regaban con un sistema automático de aspersión cada 6 horas durante 5 minutos. Luego se le insertaba una etiqueta en la tierra, que permitiera su posterior identificación. Los criterios para determinar el momento en que las semillas germinadas se trasplantaban al invernadero, se medían por la presencia de radícula y yema del cotiledón, así como por la longitud de la yema. Se contaba como APTO (APTO: el utrículo reunía las condiciones como para contar el utrículo como germinado y en tal caso, apto también para pasar al invernadero siempre y cuando hubiese hueco) si la longitud de la yema era $\geq 5\text{mm}$ y presentaba radícula (Fig. 4a y 4b). También se buscaba predecir una futura germinación en el caso de no poder revisar las placas en un intervalo de días corto. Se marcaba el utrículo germinado con un punto en la placa y se separaba del resto dentro de la misma placa, para así evitar confusión para trasplantarlas en el invernadero. Una vez se conseguía un número máximo de germinadas para trasplantar al invernadero, se continuaba reservando estas plantas por si surgía algún problema en el invernadero, tener

repuestos para plantar allí. Una vez concluido el trasplante de utrículos germinados, las semillas de repuesto (todas las placas de los incubadores) se desechaban al no ser de utilidad para el experimento.

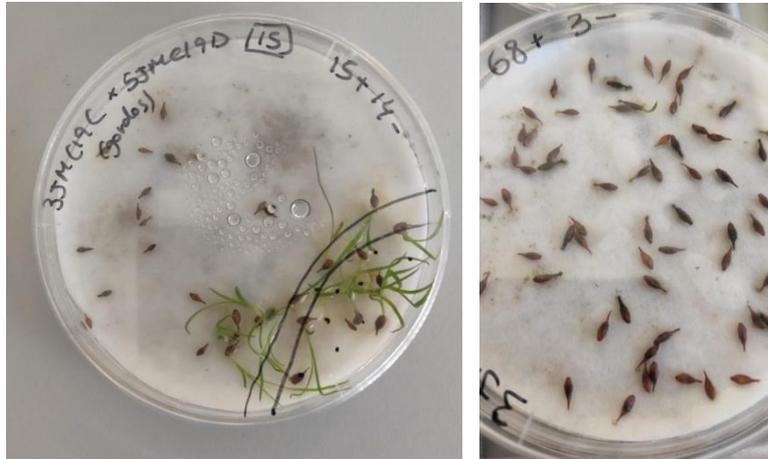


Figura 4: Fotos de las placas de Petri que contienen *Carex laevigata* y *helodes* (2019). a) Placa de *C. laevigata* con utrículos germinados. Se puede ver como el tamaño del cotiledón supera los 5cm y hay presencia de radícula (apreciable como un hilo amarillo). b) Placa de *C. helodes* donde se aprecia claramente que apenas hay semillas germinadas y las que aparentemente podrían serlo, tienen la yema de un tamaño insuficiente y no presentan radícula.

2.5. Invernadero

Metodología: En primer lugar, se hacía una estima de los utrículos que iban a resultar viables y se le adjuntaba un sitio en un hueco de alveolo (utilizando una hoja de cálculo) (Fig. 5a y 5b); donde se elegía virtualmente el lugar que ocuparía la semilla, por lo que una vez germinaba una, se sabía con certeza qué lugar le correspondía dentro del invernadero.

BANDEJA 1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
A1	66	53	84	62	42	57	49	86	53	1	60	65	53	42	71	61	46	66	84	55	1	54	49	53	82	55	71	1	66	78	49	53	67	
B1	88	46	68	60	65	45	67	54	66	88	48	78	49	66	54	71	89	57	53	71	61	79	66	73	62	71	90	61	85	42	53	71	1	
C1	60	71	1	53	57	89	88	53	45	54	53	1	54	88	53	62	1	54	82	60	88	57	64	53	85	73	53	60	78	67	68	82	62	
D1	83	54	66	73	82	71	60	82	64	88	82	60	68	53	88	86	64	49	53	53	84	88	60	78	54	85	71	73	57	82	45	59	66	
E1	66	49	85	71	53	1	45	83	89	53	71	78	55	1	64	49	54	85	88	86	57	64	49	53	82	88	54	60	54	71	88	67	61	
F1	55	72	43	62	82	54	60	49	62	73	86	60	88	54	85	78	53	57	60	90	53	60	46	57	55	54	62	84	49	79	64	55	42	
G1	85	66	54	73	53	1	88	57	78	88	53	49	71	82	60	89	60	82	53	84	1	68	83	82	71	86	45	88	71	46	53	84	66	
H1	42	53	1	49	88	68	45	54	71	53	88	82	64	62	84	54	90	71	78	42	62	54	1	60	53	78	60	64	54	86	67	60	45	
I1	57	65	86	53	61	55	66	85	61	88	71	84	53	66	59	53	42	54	61	82	65	88	42	53	90	71	54	49	1	66	82	46	88	
J1	1	54	46	72	73	89	57	45	71	55	42	59	67	85	78	71	66	79	66	53	1	54	66	82	59	1	46	88	55	71	73	53	57	

BANDEJA 1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
A1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
B1	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	
C1	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	
D1	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	
E1	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	
F1	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	
G1	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	
H1	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	
I1	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	
J1	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	

Figura 5: Matrices representando la disposición de las semillas germinadas trasplantadas a las bandejas de cultivo del invernadero, indicando la numeración en cuadrículas y numérica. a) Matriz de Excel para la bandeja 1 del invernadero donde se muestra la colocación de los individuos germinados, siendo el número que contiene cada celda, el número de cruce/placa único de cada una de ellas y la numeración del 1 al 33 y de la A a la J. b) Misma matriz de Excel pero para la numeración del 1 al 330 en esta bandeja, por lo que el número que contiene cada celda es su numeración para identificarlos, no el número de la placa como en la Fig. 5a.

La localización elegida fue parcialmente aleatoria, ya que se pretendía minimizar de forma equitativa el posible efecto borde en las bandejas. Una vez se llegaba al día 90, que es el día elegido para la finalización de la etapa de germinación, pues se considera tiempo suficiente como para que germinen todas las semillas viables (Narbona et al., 2013). Se dejaban de pasar las germinadas al invernadero. Los días de riego se aprovechaba y se pasaban las semillas al invernadero, para ello se separaban de las placas del germinador. Para ello, los utrículos se colocaron en otras placas nuevas y se marcaban bien a qué número pertenecían para evitar confusión sobre la procedencia de los utrículos. Una vez en el invernadero, se siguió el código según la ubicación, mediante una cuadrícula y numeración de

las bandejas. Se establecieron filas de la letra A a la J y columnas con los números 1 al 33 (Fig. 5a).

Etiquetado: cada utrículo plantado debía tener su propia etiqueta para poder identificar la planta correctamente. Esta etiqueta tenía la ubicación en la cuadrícula y su código de cruce (Fig. 6). Estos datos eran suficientes como para saber todo lo relacionado con dicho individuo, ya que toda la información se encuentra perfectamente ordenada en las hojas de cálculo del experimento. Además, tener el código en la misma planta ayuda a etiquetar posteriormente los sobres con el polen para hacer los cruces.

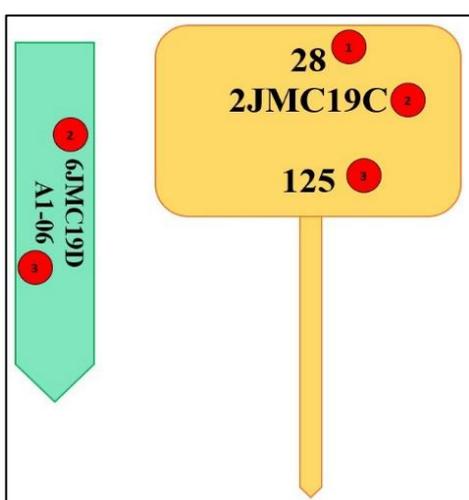


Figura 6: Información escrita en las etiquetas para cada individuo germinado en el invernadero. Información de las etiquetas que se colocaron tras plantar los individuos en el invernadero. La de color verde (2019) que contenía información de; 1-posición en la bandeja según la numeración de la Fig. 5a y 2-código de la planta. La de color amarillo (2021) que contiene; 1-número de la placa de Petri, 2-código de la planta y 3-la posición en la bandeja de la numeración de la Fig. 5b.

Durante 2019 se utilizaron etiquetas pequeñas, pero no resultaron ser las mejores por su baja visibilidad al crecer la planta y a la facilidad de pérdida, por ello, en 2021 se optó por utilizar etiquetas más grandes, además se completó con más datos, añadiendo el código del cruce.

Se optó por añadir una numeración entera del 1 al 1208 para evitar confusiones de lectura con respecto a la cuadrícula y así facilitar la labor de los encargados de etiquetar los sobres con el polen (Fig. 5b).

Plantado: En el mismo momento, cuando se sacaban los utrículos de las placas y se bajaban al invernadero, se ponía la tierra en los alveolos donde ese mismo día se iban a plantar, ya que el relleno previo con tierra permite la proliferación de otras plantas y hongos que pueden interferir en el crecimiento de las plantas de estudio. Se utilizaba sustrato normal y se rellenaba hasta el límite superior y se compactaba muy levemente. Posteriormente se humedecía la tierra con la

manguera procurando no crear un hueco con el agua. Por último, se plantaba el utrículo germinado (Fig. 7), siempre, enterrando la radícula y dejando fuera el resto. Aquí era importante el tamaño de la hoja ya que plántulas con la yema demasiado pequeña eran propensas a no sobrevivir a este cambio de ambiente.



Figura 7: Imagen del proceso de plantación en el invernadero. Las primeras que se pasaron ya iban creciendo. Se puede ver el alveolo de 2x3 huecos con individuos. De los 6 huecos, solo 4 están ocupados por plantas vivas, debido a la muerte de las otras 2 que había plantadas y que aparecen sin etiquetar.

Mantenimiento: Tras plantar las semillas, había que retirar todo aquello que resultaba no deseado, como especies que invadían los alveolos (saltamontes, malas hierbas, caracoles, algas en el agua...). Fue importante realizar esta labor de mantenimiento durante los primeros meses posteriores a los 90 días de la fase de germinación.

Retirada: Para abrir paso a las futuras germinaciones, que iban a comenzar en diciembre de 2021, se limpió todo el invernadero de las *Carex* en la segunda quincena de junio de ese mismo año y se prensaron todos los individuos que crecieron exitosamente durante los dos últimos años (2018–2021), para su futura medición e investigación con estudios morfológicos, genéticos, etc.

2.6. Cálculos de las tasas de germinación

Se han obtenido tres tipos de resultados de tasas de germinación para cada especie: **1)** tasas de germinación para cada réplica de cruce realizado (que a veces suponía más de una placa de germinación) implicando al mismo o a los mismos individuo/s (ej. H12x2A; cruce en *C. helodes*) (Fig. 8 para *C. helodes* y Fig. 12 para *C. laevigata*); **2)** tasas de germinación de cada uno de los tres tipos de cruce

(Selfing P, F1 y F2) (Fig. 9 para *C. helodes* y Fig. 13 para *C. laevigata*); **3**) las tasas de germinación de cada uno de los tres tipos de cruce (Selfing P, F1 y F2) según la población de origen del individuo o individuos implicados en los cruces (Fig. 10 para *C. helodes* y Fig. 14 para *C. laevigata*). Los datos utilizados para calcular las tasas de germinación por réplica de cruce (1) y por tipo de cruce (2), están en la Tabla 3 y Tabla 4 para *C. helodes* y *laevigata* respectivamente. Para obtener la tasa de germinación de cada réplica de cruce (1), se calculó la media de las tasas de germinación de las distintas réplicas (“n” de la tasa de germinación 1) para obtener una media “ \bar{X} ”. Además, para aquellos cruces realizados con una “n” mayor que 1, se pudo calcular la desviación estándar “ σ ”. Finalmente, se realizó un boxplot que mostrase toda esta información. Se hizo un cálculo parecido para las tasas de germinación (2) para cada tipo de cruce (Selfing P, F1 y F2), agrupando los valores según su tipo de cruce y no por réplica de cruce, obteniendo un boxplot con una media (\bar{X}), una “n”, que muestra la cantidad de cruces de un tipo de los que se ha sacado la media y una desviación estándar (σ) si fuera posible calcularla. Por último, se obtuvieron las tasas de germinación (3), agrupando los datos según el origen de las poblaciones y los cruces realizados, obteniendo la media de las tasas de germinación según la población o poblaciones implicadas en los cruces (ej. Aznalcóllar x Río Tinto F1 = 64% para *C. helodes*), el número de cruces implicando a la misma o las mismas poblaciones (n) y la desviación estándar (σ).

3. RESULTADOS

3.1. *Carex helodes*

Centrándonos en la tasa de germinación para las réplicas (1) obtenidas, separando cada gráfica por cada tipo de cruce (Selfing P, F1 y F2). Para los selfing en *C. helodes*, las tasas de germinación obtenidas para cada cruce, fueron (Tabla 3): **H4B** con un **69%**; **H2E** con un **27%**; **H2A** con un **23%**; **H2D** y **H4E** con un **6%** (Fig. 8a).

En cuanto a las tasas de germinación para los cruces entre los parentales (F1) (Fig. 8b) nos encontramos: **H12x4B** con un **96%**; **H12x2E** con un **87%**; **H12x4C** y **H2x4C** ambos con un **86%**. Mientras que **H12x2A** tuvo un **40%**.

Y terminando el análisis del desglose de cada cruce, tenemos para F2 (Fig. 8c), unos valores más organizados en unas tasas de germinación cercanas entre los 4 cruces de F2; **H12x4C** con un **60%**; **H12x2A** con un **44%**; **H12x4B** con un **43%** y **H12x2E** con un **30%**.

Parentesco	Tipos	Nº de cruces	Desv σ	T. Germinación	%
Selfing P	H2A	3	0,128	0,228	23
Selfing P	H2E	8	0,163	0,265	27
Selfing P	H2D	1	x	0,056	6
Selfing P	H4E	2	0,042	0,055	6
Selfing P	H4B	5	0,246	0,686	69
F1 (cruce P)	H12x2A	2	0,136	0,404	40
F1 (cruce P)	H12x2E	1	x	0,870	87
F1 (cruce P)	H12x4B	1	x	0,957	96
F1 (cruce P)	H12x4C	1	x	0,860	86
F1 (cruce P)	H2x4C	1	x	0,862	86
F2 (selfing F1)	H12x4B	6	0,259	0,427	43
F2 (selfing F1)	H12x2A	14	0,269	0,435	44
F2 (selfing F1)	H12x4C	9	0,289	0,605	60
F2 (selfing F1)	H12x2E	7	0,171	0,302	30

	Media	%	Desv σ	n
Selfing P	0,258	26	0,258	n= 5
F1 (cruce P)	0,791	79	0,220	n= 4
F2 (selfing F1)	0,442	44	0,124	n= 4
Media total	0,501	50	x	n cruces totales= 13

Tabla 3: Tabla de resultados de las tasas de germinación de *Carex helodes*. Se muestran los datos utilizados para obtener los resultados correspondientes en la Fig. 8 y Fig. 9.

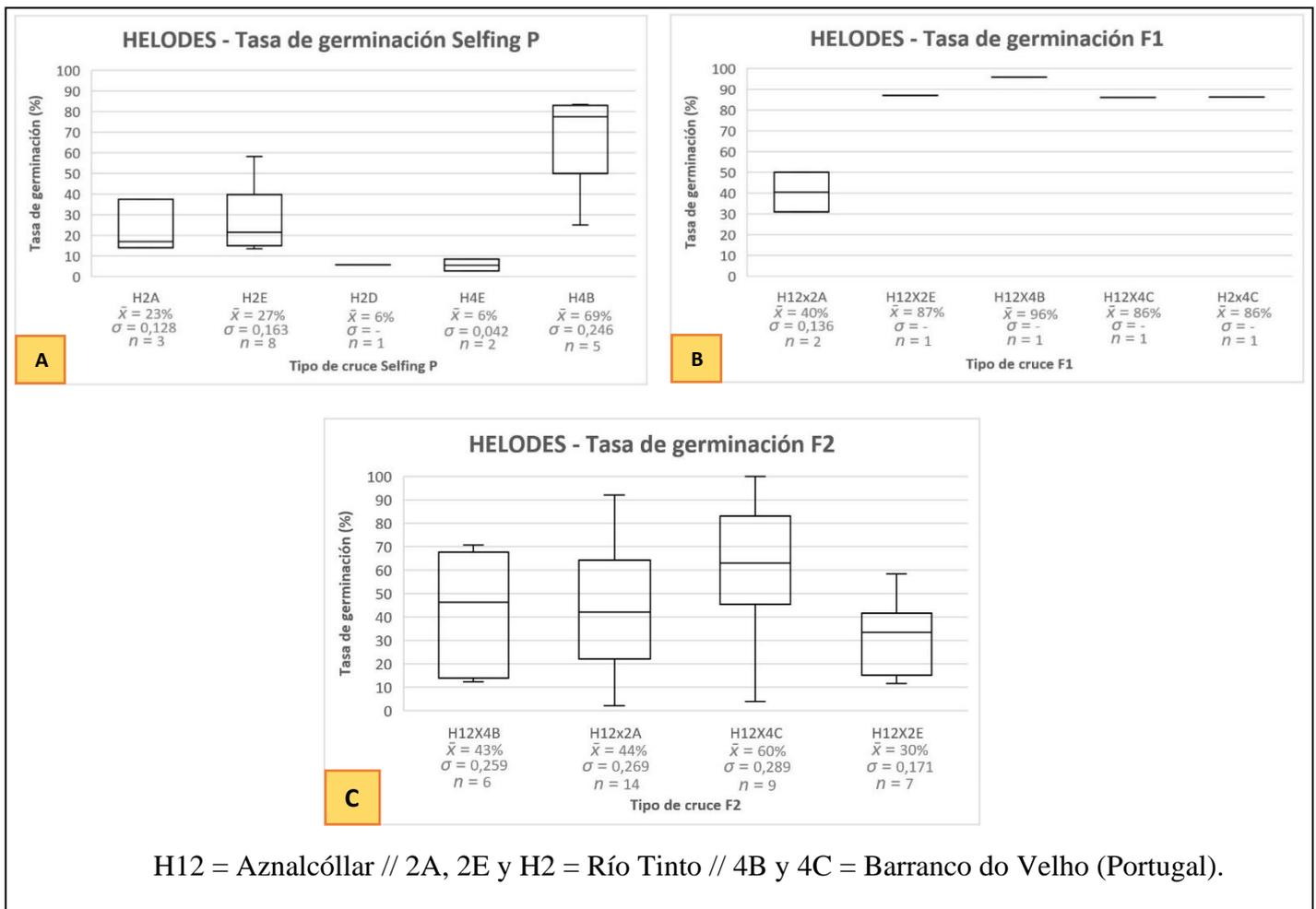


Figura 8: Boxplot de las tasas de germinación por tipo de cruce para los autocruces parentales (Selfing P), cruces de los parentales (F1) y selfing de F1 (F2) de *Carex helodes*. Se muestra la media (\bar{X}), la desviación estándar (σ) y el número de placas que contenían este mismo tipo de cruce (n). La línea que aparece en la mitad de la caja es la mediana o cuartil dos, indicando dónde queda el valor central de los valores (el 50%). Los bigotes de la caja representan el valor máximo y mínimo si lo hubiese. El código de los utrículos germinados se define en la Tabla 2 y en la base de esta figura. **a)** H2A, H2E, H2D: Selfing P de individuos de la población de Río Tinto; H4E y H4B; Selfing P de individuos de la población de Barranco do Velho (Portugal). **b)** H12x2A: cruce de un individuo de Aznalcóllar con uno de Río Tinto... **c)** H12x4B es el Selfing del cruce de un individuo de la población de Aznalcóllar con uno de la población de Barranco do Velho (Portugal).

Obtuvimos para la tasa de germinación (2) de los tres tipos de cruces: Selfing P, F1 y F2 (Fig. 9), de **26%**, **79%** y **44%** respectivamente.

Por último, según la tasa de germinación por población/es (3), (Fig. 10) que, los selfing P de **H2**, una tasa de germinación del **18%** y para **H4** un **37%**. Para F1 obtuvimos para el cruce de **H12x2** un **64%**, para **H12x4** un **96%** y para **H2x4** un

86%. Y por último para F2 obtuvimos para el selfing del cruce **H12x2** un 38%, para el selfing del cruce de **H12x4** un 43% y para **H2x4** un 60%.

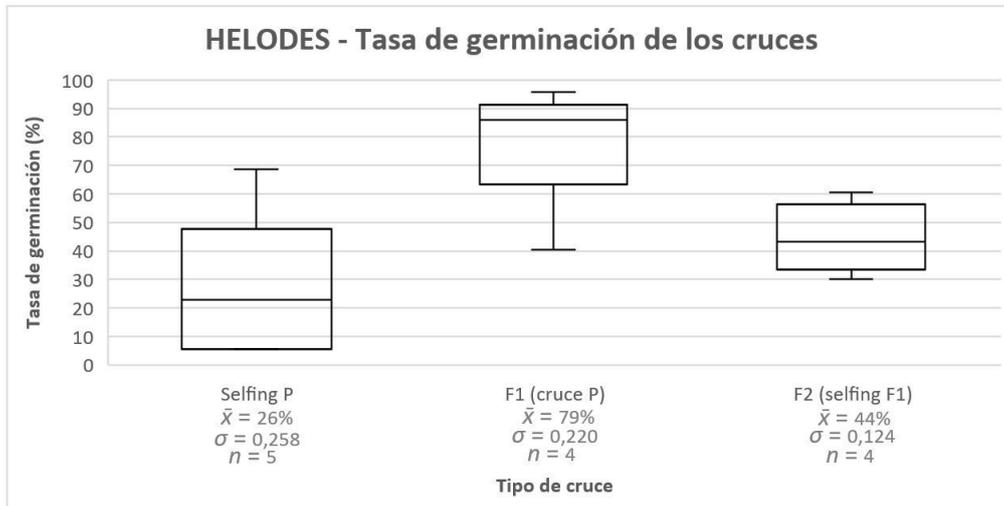


Figura 9: Diagrama de cajas (bloxplot) mostrando la tasa de germinación de los tres tipos de cruces distintos (Selfing P, F1 y F2) realizados para *Carex helodes*. Se incluyen todos los cruces realizados en 2019 y 2021. \bar{X} es la media y n el número de cruces realizados para cada tipo con el que se ha calculado (Tabla 3). La línea que aparece en la mitad de la caja es la mediana o cuartil dos, indicando dónde queda el valor central de los valores (el 50%). Los bigotes de la caja representan el valor máximo y mínimo si lo hubiese.

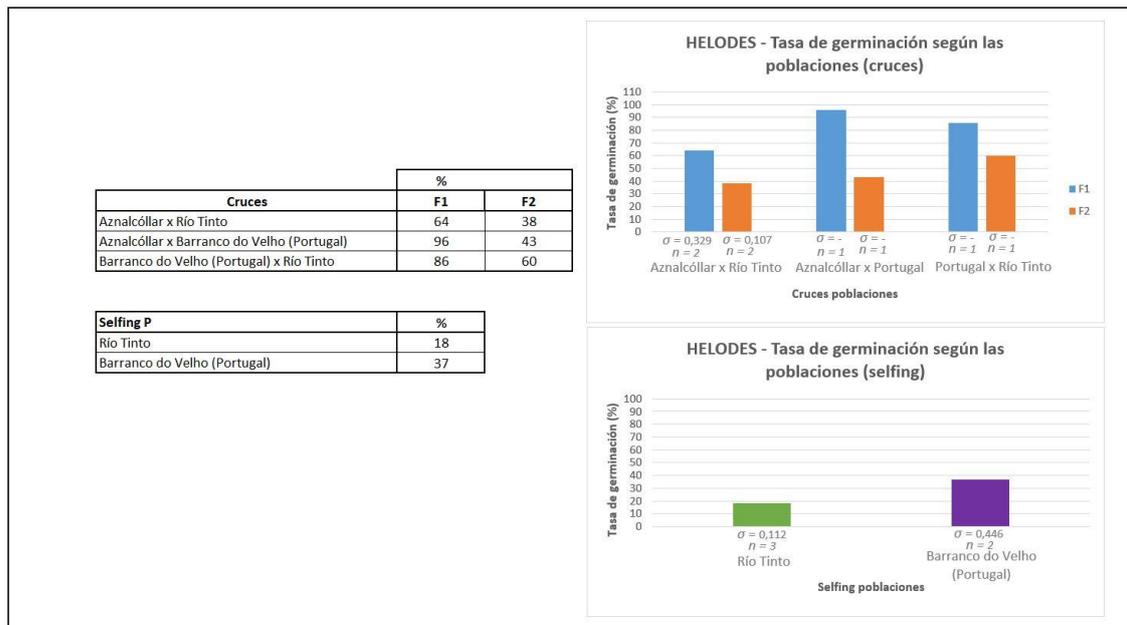


Figura 10: Tablas y gráficas de las tasas de germinación agrupadas según el origen de los individuos de *Carex helodes*. En las tablas separadas por Selfing P por un lado y F1 y F2, donde se muestran las tasas de germinación calculadas a través de la media de las tasas de germinación del mismo tipo de cruce y de código. En las gráficas, se muestra el valor de las tablas de forma gráfica de barras.

Queda a la vista que los porcentajes más altos se dieron en F1, luego en F2 y por último en Selfing P, de igual manera, esto también se puede apreciar en las gráficas de germinación (Fig. 11a, 11b y 11c), donde la germinación es mayor en F1, luego en F2 y por último en Selfing P.

para los selfing P (Fig. 11a), se obtuvo para los utrículos germinados procedentes de la población de Río Tinto, un muy bajo porcentaje, al igual que uno de los individuos de la población de Barranco do Velho (H4E). Sin embargo, el porcentaje de germinadas para H4B (Barranco do Velho), es mucho mayor, llegando al 80%. El porcentaje de utrículos germinados para el cruce F1 (Fig. 11b) es contrario a los resultados de selfing P, mostrando unos porcentajes para todos los cruces realizados de Aznalcóllar x Barranco do Velho, cerca del 90%. Lo mismo para uno de los cruces de Aznalcóllar x Río Tinto, que se acerca a este 90%, sin embargo uno de los cruces realizados entre estas poblaciones, ha resultado ser bajo, superando por poco el 30%. Por último, para los utrículos germinados en la F2 (Fig. 11c), los resultados son más estables, mostrando todos los resultados entre el 50% y el 20%, siendo el porcentaje más alto el autocruce del cruce de Aznalcóllar x Barranco do Velho (43%).



Figura 11: Porcentaje de utrículos germinados en el cruce tipo Selfing P, F1 y F2 en *Carex helodes*. Son los resultados de dividir el número de utrículos germinados entre el total. **a)** Selfing P: En las tablas se puede apreciar este porcentaje acumulado según pasan los días tras haber iniciado el experimento (del 0 al 90). En la gráfica se observa el porcentaje de utrículos germinados durante el transcurso del experimento. **b)** F1. **c)** F2.

3.2. *Carex laevigata*

Los resultados (Tabla 4) obtenidos para la tasa de germinación de cada réplica **(1)** son, para selfing P (Fig. 12a) de: **L3Eself** con un **88%**; **L5C** con un **56%**, **L3Cself** con un **49%** y **L6D** con un **31%**.

Para los cruces resultantes de los parentales (F1) (Fig. 12b) tenemos; **L3Ex6D** con un **79%**; **L3Ex5D** con un **45%**; **L3Bx5C** con un **30%** y con un **2%**.

Por último, para el selfing de la F1 (F2) (Fig. 12c) tenemos solo dos valores; **L3Ex6D** con un **24%** y **L3Ex5D** con un **18%**.

Parentesco	Tipos	Nº de cruces	Desv σ	T. Germinación	%
Selfing P	L3Cself	3	0,262	0,493	49
Selfing P	L3Eself	4	0,050	0,883	88
Selfing P	L5C	6	0,330	0,556	56
Selfing P	L6D	4	0,318	0,310	31
F1 (cruce P)	L3Ex5C	1	x	0,019	2
F1 (cruce P)	L3Ex5D	2	0,050	0,448	45
F1 (cruce P)	L3Ex6D	3	0,154	0,790	79
F1 (cruce P)	L3Bx5C	1	x	0,300	30
F2 (selfing F1)	L3Ex6D	34	0,215	0,243	24
F2 (selfing F1)	L3Ex5D	9	0,208	0,180	18

	Media	%	Desv σ	n
Selfing P	0,560	56	0,239	n= 4
F1 (cruce P)	0,389	39	0,321	n= 4
F2 (selfing F1)	0,211	21	0,045	n= 2
Media total	0,422	42		n cruces totales= 10

Tabla 4: Tabla de resultados de las tasas de germinación de *Carex laevigata*.
En esta tabla se muestran todos los datos utilizados para obtener todos los resultados correspondientes a la Fig. 12 y Fig. 13.

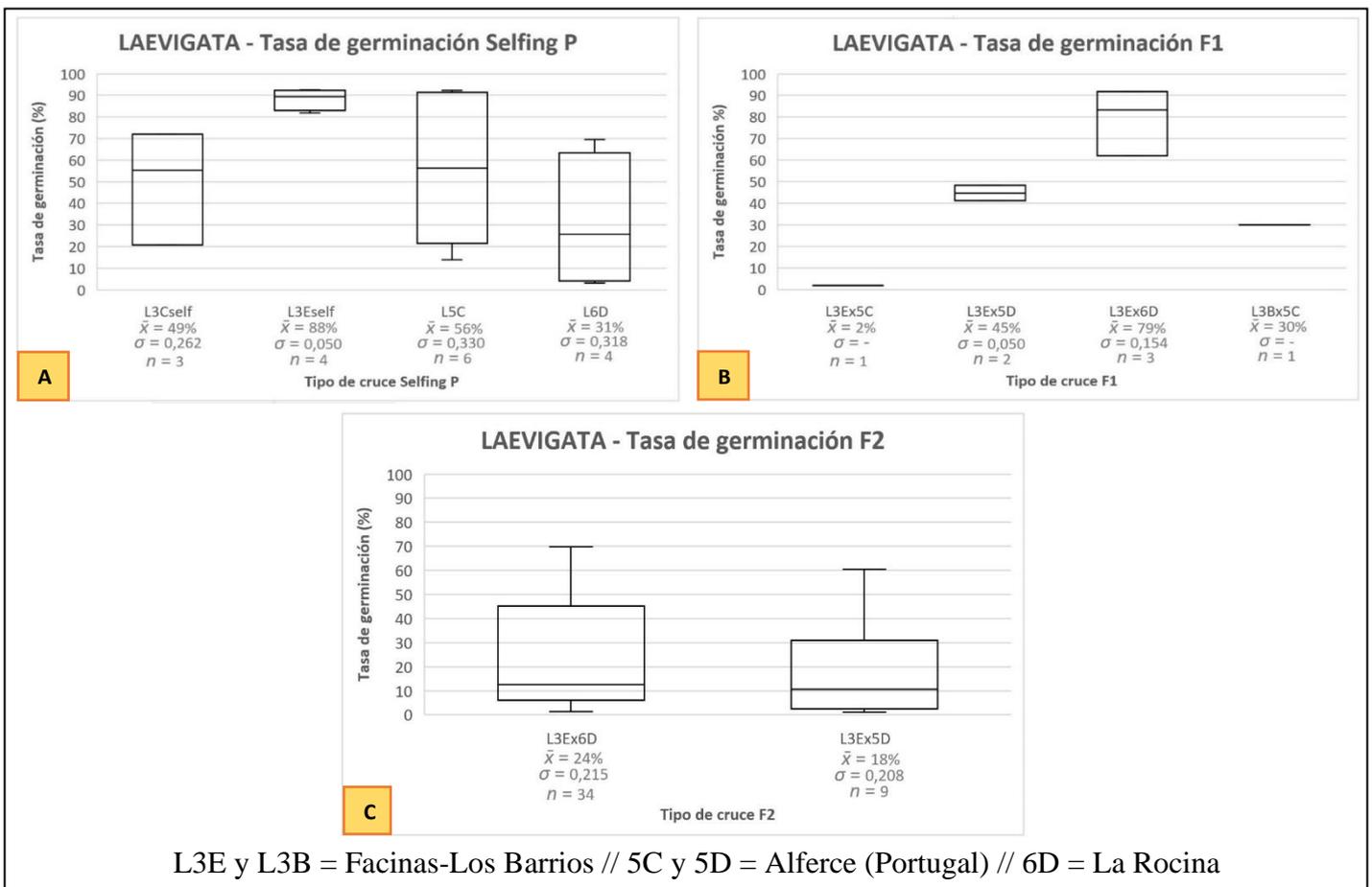


Figura 12: Boxplot de las tasas de germinación por tipo de cruce para los autocruces parentales (Selfing P), cruces de los parentales (F1) y selfing de F1 (F2) de *Carex laevigata*. Se muestra la media (\bar{X}), la desviación estándar (σ) y el número de placas que contenían este mismo tipo de cruce (n). La línea que aparece en la mitad de la caja es la mediana o cuartil dos, indicando dónde queda el valor central de los valores (el 50%). Los bigotes de la caja representan el valor máximo y mínimo si lo hubiese. El código de los utrículos germinados se define en la Tabla 2 y en la base de esta figura. **a)** L3Cself y L3Eself: Selfing P de individuos de la población de Facinas-Los Barrios. L5C; Selfing P de individuos de la población de Alferce (Portugal); L6D; Selfing P de individuos de la población de La Rocina. **b)** L3Ex5C: cruce de un individuo de Facinas-Los Barrios con uno de Alferce (Portugal)... **c)** L3Ex6D es el Selfing del cruce de un individuo de la población de Facinas-Los Barrios con uno de la población de La Rocina.

La tasa de germinación (2) calculada para los tipos de cruces selfing P, F1 y F2 (Fig. 13), tenemos unos valores de **56%**, **39%** y **21%** respectivamente.

Terminando con las tasas de germinación de los cruces por tipos de cruce según la población (3) (Fig. 14), tenemos que los selfing P de **L3**, **L6** y **L5**, unas tasas de germinación de **69%**, **31%** y **56%** respectivamente. En los cruces de los parentales obtenemos en **L3x6** y **L3x5** un **79%** y **26%**. Y para los selfing de los cruces de F1 obtenemos los valores de **L3x6** con un **24%** y **L3x5** con un **18%**. A diferencia de *C. helodes* aquí obtenemos que, de mayor a menor tasa de germinación, tenemos; selfing P, F1 y por último F2.

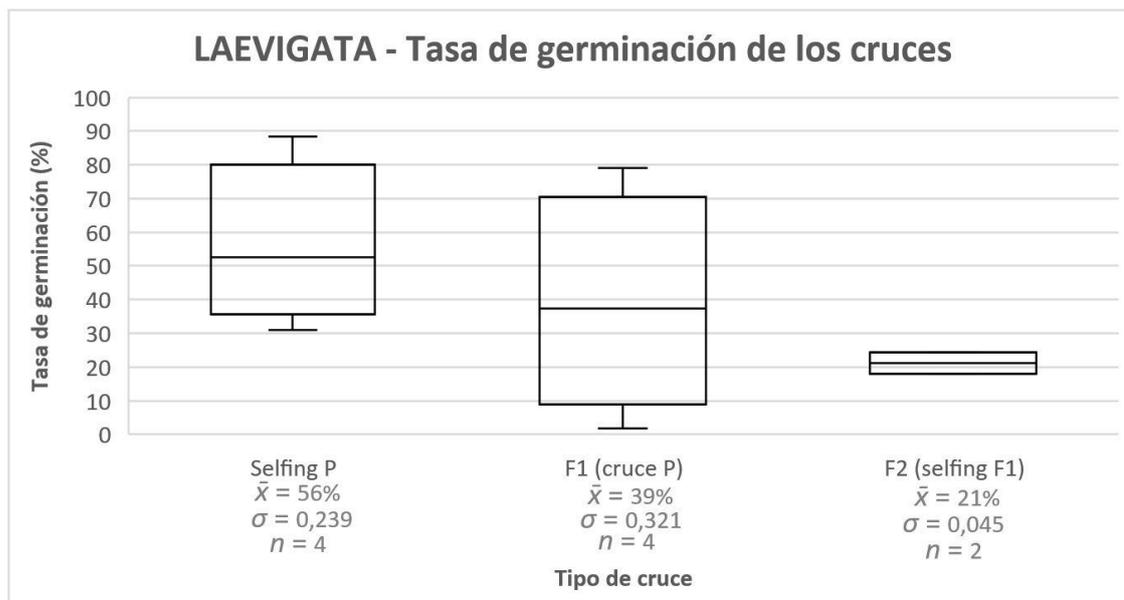


Figura 13: Diagrama de caja (bloxplot) de la tasa de germinación de los tres tipos de cruces distintos (Selfing P, F1 y F2) de *Carex laevigata*. Representación mediante una gráfica de tipo cajas y bigotes de las tasas de germinación de todos los cruces realizados en 2019 y 2021. \bar{X} es la media y n el número de cruces del tipo con el que se ha calculado (Tabla 4). La línea que aparece en la mitad de la caja es la mediana o cuartil dos, indicando dónde queda el valor central de los valores (el 50%). Los bigotes de la caja representan el valor máximo y mínimo si lo hubiese.

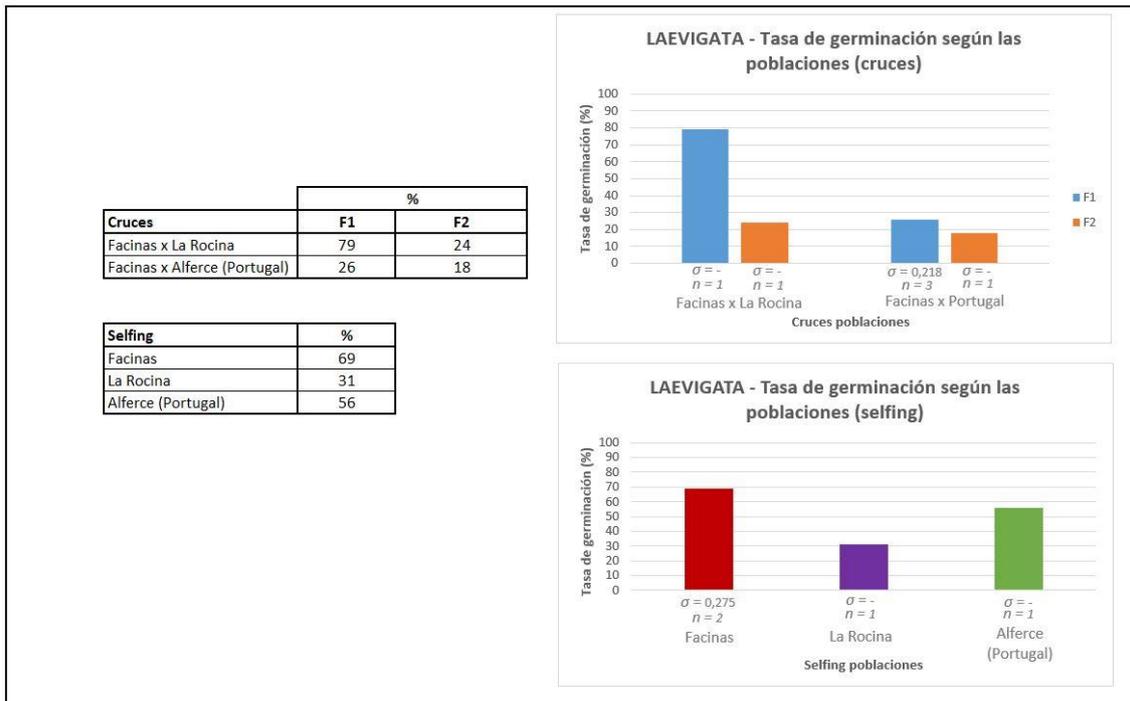


Figura 14: Tablas y gráficas de las tasas de germinación agrupadas según el origen de los individuos de *Carex laevigata*. En las tablas separadas por Selfing P por un lado y F1 y F2, donde se muestran las tasas de germinación calculadas a través de la media de las tasas de germinación del mismo tipo de cruce y de código. En las gráficas, se muestra el valor de las tablas de forma gráfica de barras.

Así mismo, se puede apreciar la misma tendencia de datos en los porcentajes de germinación de los utrículos (Fig. 15a, 15b y 15c), donde el porcentaje de utrículos germinados en selfing P (Fig. 15a), muestran unos valores cercanos entre sí, donde los autocruces de una de las poblaciones de Facinas-Los Barrios y de Alferce, muestran los porcentajes más altos (46% y 43%), mientras que otra de Facinas-Los Barrios y una de La Rocina muestran los más bajos (cerca del 30%). En F1 (Fig. 15b), tenemos que el cruce de Facinas-Los Barrios x La Rocina, es quien ha tenido un mayor número de utrículos germinados con un 45%, luego los tres cruces de Facinas-Los Barrios x Alferce (Portugal), donde uno no llega

apenas al 1%. Por último, para los selfing de F1 (F2) (Fig. 15c) tenemos los porcentajes de germinación más bajos. Tanto para el cruce de Facinas-Los Barrios x La Rocina, como para Facinas-Los Barrios x Alferce (Portugal), obtenemos unos porcentajes que no llegan al 20%.



Figura 15: Porcentaje de utrículos germinados en el cruce tipo Selfing P, F1 y F2 en *Carex laevigata*. Son los resultados de dividir el número de utrículos germinados entre el total. a) Selfing P: En las tablas se puede apreciar este porcentaje acumulado según pasan los días tras haber iniciado el experimento (del 0 al 90). En la gráfica se observa el porcentaje de utrículos germinados durante el transcurso del experimento. b) F1. c) F2.

4. DISCUSIÓN

Las poblaciones de *Carex helodes* tienen un número variable de cromosomas a lo largo de la península Ibérica, Portugal y Marruecos, que parece ajustarse a un patrón latitudinal (Escudero et al., 2008). Así, el número de cromosomas parece ascender conforme nos desplazamos a al sur de la península, demostrando que esta especie es originaria de la península ibérica y que fue desplazándose hasta terminar en Marruecos, resolución dada por un estudio de la red de haplotipos de la especie (Escudero et al., 2008), que justifica el aumento del número de cromosomas, siendo este, el principal mecanismo de evolución (Luceño & Castroviejo, 1991; Escudero et al., 2008), ya que gracias a esto es más probable que se produzca vigor híbrido.

Lo mismo ocurre con *C. laevigata*, aumentando el número de cromosomas conforme se baja hacia el sur (Luceño & Castroviejo, 1991; Escudero et al., 2008). Esto es debido a las distintas fisiones y posteriores fusiones de estos fragmentos de cromosomas que acaban dando lugar a un mayor número de cromosomas. A mayor número de cromosomas, habrá más heterosis o vigor híbrido, lo que se traduce en un fitness mayor para la especie, haciendo que esta se desarrolle mejor que otras poblaciones de la misma especie (Timberlake, 2013). Los resultados obtenidos, nos ayudarán a esclarecer si hay flujo génico entre estas poblaciones y si se da disfunción híbrida, lo que favorecería a la especiación.

Carex helodes

Los resultados obtenidos pueden diferir un poco en cuanto a lo que se esperaba de la disfunción híbrida en *C. helodes*, ya que en vez de arrojar una evidencia, ha planteado una duda de por qué los autocruces han resultado tener menos fitness que F1 y F2. Es posible que la variación de estos datos se deba a que en 2021, de los cruces tipo F1 realizados, no resultaran exitosos en su gran mayoría por error humano durante la polinización de las espigas femeninas, así mismo con los Selfing P. Sin embargo, también se plantea la idea de que las poblaciones de *C. helodes* de Rio Tinto estén sufriendo una autoincompatibilidad parcial, algo extraño viniendo de *Carex*, ya que esta especie suele presentar una autocompatibilidad muy elevada, demostrado en los experimentos de Narbona et al., (2013) donde las tasas de germinación eran siempre muy altas, sin llegar a bajar del 79%. El motivo de esta autoincompatibilidad parcial, puede deberse a una depresión por endogamia. Al ser una población pequeña, se

podría estar produciendo consanguineidad, lo que habría provocado una baja heterocigosidad en una de las poblaciones (Timberlake, 2013). En los autocruzamientos podrían estar expresándose genes que afectan negativamente a la tasa de germinación, reduciendo, por tanto, el fitness (depresión por endogamia). Sería un caso importante de estudiar ya que podría existir en un futuro un problema de conservación mucho mayor con la población de *C. helodes* de Río Tinto, ya que como se ha podido ver en la Tabla 3, Fig. 10 y Fig. 16, la tasa de germinación para los autocruces de los parentales en esta población es muy bajo, pudiendo ocasionar esto, que la población vaya reduciendo su tamaño poblacional debido al escaso fitness que tiene. Por otra parte, las poblaciones del sur de Portugal (Barranco do Velho), presentan una mayor autocompatibilidad, pero sin llegar a alcanzar porcentajes altos (37%) (Fig. 10 y Fig. 16) que es lo que se podría esperar. Esto se puede deber a que los individuos de las poblaciones de Portugal presentan una mayor heterocigosidad, aumentando su fitness. Los estudios de Escudero et al., (2008), sugieren que las poblaciones del suroeste de la península ibérica (Portugal) presentan una alta heterocigosidad entre los individuos de la misma población, dato que no se puede contrastar con las poblaciones de Huelva y Sevilla, ya que sólo se obtuvieron estos resultados para Portugal.



Figura 16: Mapa de tasa de germinación y dirección de los cruces realizados con sus respectivas tasas para *Carex helodes*. Se muestran las tres poblaciones de origen de los 3 tipos de individuos (Barranco do Velho en azul; Río Tinto en naranja y Aznalcóllar en amarillo), con sus respectivos porcentajes de tasa de germinación de los autocruces y cruces que fueron posible realizar.

Al contrario que en los cruces entre poblaciones (F1), donde la tasa de germinación es muy elevada (en el cruce Barranco do Velho x Aznalcóllar llegando al 96% y en el cruce Barranco do Velho x Río Tinto llegando al 86%) donde posiblemente se esté dando vigor híbrido (del cruce de la población de Portugal con cualquier otra de la península) al tener una tasa de germinación alta, siendo estas tasas, similares a las estudiadas en Narbona et al., (2013) para los selfing de *C. helodes*. Que, aunque se haya estudiado la germinación de la misma manera, es probable que hagan falta más estudios, ya que el experimento que hemos llevado a cabo, esté sujeto a diversos errores en cuanto a la metodología a la hora de realizar los distintos cruces y autocruces o a una mala praxis durante la fase de germinación de los utrículos. Que, de nuevo, no son los resultados esperados para una especie con una autocompatibilidad elevada. En cuanto a la F2, su fitness es menor que en F1, pero mayor que en los selfing P, dando valores bastante altos (60%, 52% y 38%). Aunque sea menor que en F1, no es menor que en los selfing P, dato que discrepa con la teoría de la disfunción híbrida (Ayala & Coluzzi, 2005; Lai et al., 2005). De acuerdo a esta teoría, se hubieran esperado unas tasas de germinación comparativamente más bajas, por lo que los resultados observados podrían ser consecuencia de un vigor híbrido entre los cruces realizados. En resumen, tenemos que el cruce tipo F1 más exitoso ha sido el de Aznalcóllar x Barranco do Velho ($2n=68$ x $2n=72$) con una tasa de germinación del 96% (Fig. 10 y Fig. 16), donde tenemos una mayor variación en el número de cromosomas (dos pares de cromosomas) y geográficamente son las dos poblaciones más alejadas. Por otra parte, el porcentaje de semillas germinadas para estos cruces ha sido siempre superior al 85% (Tabla 3 y Fig. 11b), una tasa comparativamente alta tratándose de la F1, resultados que, de nuevo, nos indican una anomalía con respecto a lo que se esperaba. El segundo cruce tipo F1 más exitoso ha sido el de Río Tinto x Barranco do Velho ($2n=70$ x $2n=72$) con una tasa de germinación del 86% (Fig. 10 y Fig. 16) y el tercero y último Aznalcóllar x Río Tinto ($2n=68$ x $2n=70$) con un 64% (Fig. 10 y Fig. 16). Como la distancia geográfica está estrechamente relacionada con el número de cromosomas en, *C. helodes*, se pueden hacer ciertas valoraciones. En primer lugar, tenemos que para las dos poblaciones más alejadas y por tanto con la mayor diferencia en su número de cromosomas ($2n=72$ en Portugal y $2n=68$ en Aznalcóllar (Fig. 16), hay un fitness para el cruce tipo F1 muy elevado. Para el resto de cruces, las cuales tienen la misma diferencia en el número de cromosomas ($2n=68$ x $2n=70$ y $2n=70$ x $2n=72$) y geográficamente no hay gran

diferencia entre las distancias de cada población, tenemos unas tasas de germinación para F1 que siguen siendo significativamente altas. Por lo que el número de cromosomas no parece ser un impedimento a la hora de producir una F1 y una posterior F2 (salvo en el cruce de Aznalcóllar x Río Tinto, donde da una F2 del 38% (Fig. 10 y Fig. 16)), puesto que sus tasas son más altas que los autocruces de los parentales (selfing P). Todos los cruces de las poblaciones de España con Portugal, han dado un fitness superior al 85%, resultados que refuerzan que la población de Portugal, podría tener más heterocigosidad. También, viendo el fitness del cruce Aznalcóllar x Río Tinto, se podría deducir que es posible que la población de Aznalcóllar también tenga una alta heterocigosidad. Por ello, resultaría interesante completar el estudio realizando los autocruces con individuos de esta población.

Carex laevigata

En *Carex laevigata*, tenemos unos resultados que se ajustan bastante mejor al modelo de disfunción híbrida (Ayala & Coluzzi, 2005; Lai et al., 2005). Los autocruces de los parentales (selfing P), tanto en las poblaciones de Facinas-Los Barrios como de Alferce (Portugal), nos dan un fitness medianamente elevado, a diferencia de La Rocina (no superando el 50%), el cual se deba posiblemente a un error en la metodología del experimento. Para los cruces F1 y F2, en las poblaciones de Facinas-Portugal obtenemos un fitness en F1 mayor que en F2, lo que se ajusta al modelo de disfunción híbrida, sin embargo, para el cruce de La Rocina x Facinas-Los Barrios, tenemos una F1 mayor que en los autocruces, pero que luego se reduce en la F2, siendo esta, menor que en los autocruces y que F1, dato que se ajusta mucho mejor al modelo que los anteriores resultados. Viendo el número de cromosomas, tenemos que, el mayor fitness para F1 se da en el cruce de Facinas-Los Barrios x La Rocina ($2n=78 \times 2n=76$) con un 79%, mostrando un resultado similar al que vemos en la especie *C. helodes*, pero sin tener un fitness de autocruce tan bajo. En el caso de *C. laevigata*, tenemos que el cruce con mayor fitness se da entre las dos poblaciones más cercanas (Facinas-Los Barrios x La Rocina) con una variación en el número de cromosomas de dos pares ($2n=78 \times 2n=76$) y con una tasa de germinación del 79% (Fig. 14 y Fig. 17).

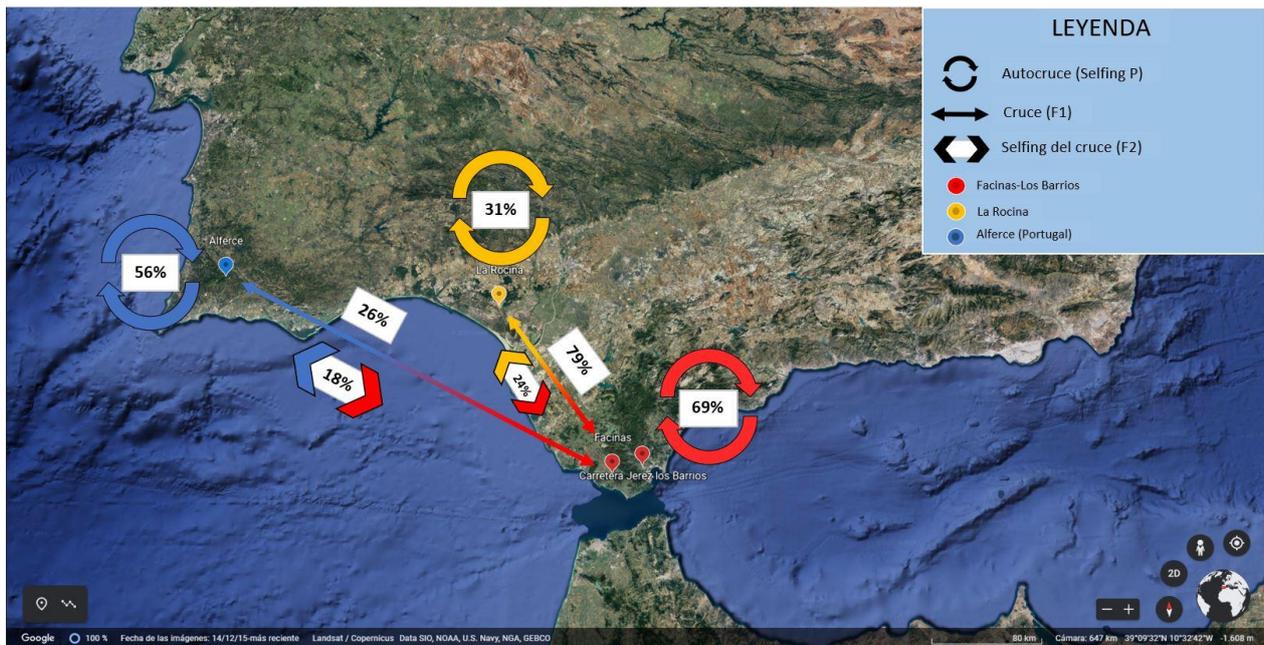


Figura 17: Mapa de tasa de germinación y dirección de los cruces realizados con sus respectivas tasas para *Carex laevigata*. Se muestran las tres poblaciones de origen de los 3 tipos de individuos (Alferce en azul; La Rocina en amarillo y Facinas-Los Barrios en rojo), con sus respectivos porcentajes de tasa de germinación de los autocruces y cruces que fueron posible realizar.

Sería interesante poder compararlo con el otro posible cruce, donde hay la misma variación en el número de cromosomas (La Rocina x Alferce; $2n=76$ x $2n=74$) pero no se han podido obtener los datos por problemas en la obtención de los utrículos de estos cruces. El cruce con el menor fitness (26%) (Fig. 14 y Fig. 17) es el de Facinas-Los Barrios x Alferce (Portugal), que es el que mayor distancia geográfica y mayor variación en el número de cromosomas entre poblaciones presenta. A pesar de estas diferencias en los cruces tipo F1, los tipo F2, dan valores muy bajos (cerca del 20%) (Fig. 14 y Fig. 17). Según la teoría de la disfunción híbrida, los cruces dados entre especies con un número de cromosomas distintos entre sí (a mayor diferencia, más afectará la disfunción híbrida), produciría inviabilidad en la F2, dándose un fitness muy bajo (Ayala & Coluzzi, 2005; Lai et al., 2005; Escudero et al., 2016), cosa que se comprueba al ver que la tasa de germinación para la F2 de este cruce es del 18%. Esto se puede comprobar sin ninguna duda para estas dos poblaciones, pero para el otro cruce realizado (Facinas-Los Barrios x La Rocina) aún hay dudas de por qué ha salido una F1 más elevada que los autocruces, de nuevo, es posible que exista algún tipo de autoincompatibilidad en la población de La Rocina.

5. CONCLUSIONES

Carex sigue siendo un género insuficientemente estudiado desde el punto de vista microevolutivo de la diferencia citogenética, a simple vista se ve con los resultados mostrados en este pequeño estudio. Es posible que se esté produciendo depresión por endogamia en la población de *C. helodes* de Río Tinto (Huelva), ya que presenta un fitness muy bajo para los autocruces, a diferencia de los cruces con individuos de otras especies, donde parece haber vigor híbrido, en concreto con los cruces realizados con la población de Barranco do Velho (Portugal). Todo lo contrario a *C. laevigata*, que presenta los mayores fitness para los autocruces, seguido de los cruces F1 y por último los autocruces de F1 (F2), cumpliendo con lo esperado de la disfunción híbrida, con menor viabilidad de los cruces entre dos poblaciones con un número de cromosomas más diferenciado. Centrándonos en los valores de germinación para la F2, en ambas especies, disminuye el fitness significativamente, lo que puede llegar a justificar de nuevo, la disfunción híbrida en estas dos especies. Es posible que los resultados se hayan podido ver afectados por el error humano a la hora de realizar los cruces tipo F1, y por tanto no haya habido suficiente material de estudio que sea representativo, ya que no se obtuvieron muchos de los cruces y autocruces realizados para ambas especies, por lo que para corroborar toda la información estudiada, haría falta realizar los cruces que faltan por realizar y verificar aquellos cuyos resultados sean poco claros.

6. AGRADECIMIENTOS

Todos los agradecimientos a mis tutores de TFG, por haberme ayudado siempre que lo he necesitado, en especial José Ignacio Márquez, que me ha acompañado desde el principio enseñándome lo básico, sabiendo explicar las partes más complicadas de la teoría de la genética de *Carex*. También agradecer a Antonio Marcial, que me ha aportado ideas concluyentes para escribir la discusión del artículo. Y por último a Pilar Pineda, que sin ella no podría haberse llevado la parte experimental durante el año 2021 debido a la inmensa carga de individuos que llegamos a tratar durante la germinación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ayala FJ, Coluzzi M (2005) Chromosome speciation: humans, *Drosophila*, and mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102 Suppl 1**: 6535–6542. DOI:10.2307/3375290.
- Bell G. (1992) *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality* (University of California Press, Berkeley).
- Bickerton, Holly (2014) Field Manual of Michigan Flora by EG Voss, AA Reznicek (2013) [book review]. *The Canadian Field-Naturalist*. **128**: 99. DOI:10.22621/cfn.v128i1.1537.
- Bureš P, Zedek F (2014) Holokinetic drive: centromere drive in chromosomes without centromeres. *Evolution; international journal of organic evolution* **68(8)**. 2412–2420. <https://doi.org/10.1111/evo.12437>.
- Chung K-S, Weber JA, Hipp AL (2011) Dynamics of chromosome number and genome size variation in a cytogenetically variable sedge (*Carex scoparia* var. *scoparia*, Cyperaceae). *American Journal of Botany*, **98**: 122–129. DOI:10.3732/ajb.1000046.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation*. Sinauer Associates (Oxford University Press).
- Escudero M, Vargas P, Valcárcel V, Luceño M (2008) Strait of Gibraltar: an effective gene-flow barrier for wind-pollinated *Carex helodes* (Cyperaceae) as revealed by DNA sequences, AFLP, and cytogenetic variation. *Botany*, **95**: 745–755. DOI:10.3732/ajb.2007342.
- Escudero M, Hipp AL, Hansen TF, Voje KL, Luceño M (2012) Selection and inertia in the evolution of holocentric chromosomes in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *The New phytologist*, **195**: 237–247. DOI:10.1111/j.1469-8137.2012.04137.x.
- Escudero M, Maguilla E, Luceño M (2013a) Selection by climatic regime and neutral evolutionary processes in holocentric chromosomes (*Carex* gr. *laevigata*: Cyperaceae): A microevolutionary approach. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **15**: 118–129. DOI:10.1016/j.ppees.2013.01.001.
- Escudero M, Weber JA, Hipp AL (2013b) Species coherence in the face of karyotype diversification in holocentric organisms: the case of a cytogenetically variable sedge (*Carex scoparia*, Cyperaceae). *Annals of Botany*, **112**: 515–526. DOI:10.1093/aob/mct119.
- Escudero M, Hahn M, Brown BH, Lueders K, Hipp AL (2016) Chromosomal

- rearrangements in holocentric organisms lead to reproductive isolation by hybrid dysfunction: The correlation between karyotype rearrangements and germination rates in sedges. *American Journal of Botany*, **103**: 1529–1536. DOI:10.3732/ajb.1600051.
- Escudero M, Hahn M, Hipp AL (2018) RAD-seq linkage mapping and patterns of segregation distortion in sedges: meiosis as a driver of karyotypic evolution in organisms with holocentric chromosomes. *Journal of Evolutionary Biology*, **31**: 833–843. DOI:10.1111/jeb.13267.
- Grant, V. (1950) The pollination of *Calycanthus occidentalis*. *American Journal of Botany* **37**: 294–296.
- Hipp AL (2007) Nonuniform processes of chromosome evolution in sedges (*Carex*: Cyperaceae). *Evolution; international journal of organic evolution*, **61**: 2175–2194. DOI:10.1111/j.1558-5646.2007.00183.x.
- Hipp AL, Rothrock PE, Roalson EH (2009) The Evolution of Chromosome Arrangements in *Carex* (Cyperaceae). *Botanical Review*, **75**: 96–109.
- Hipp AL, Rothrock PE, Whitkus R, Weber JA (2010) Chromosomes tell half of the story: The correlation between karyotype rearrangements and genetic diversity in sedges, a group with holocentric chromosomes. *Molecular Ecology*, **19**: 3124–3138. DOI:10.1111/j.1365-294X.2010.04741.x.
- Jiménez-Mejías P, Luceño M. (Eds.) (2011) *Euro+Med Plantbase – the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity*. <http://www.emplantbase.org>
- Lai Z, Nakazato T, Salmaso M *et al.* (2005). Extensive chromosomal repatterning and the evolution of sterility barriers in hybrid sunflower species. *Genetics*, **171**: 291–303. DOI:10.1534/genetics.105.042242.
- Luceño M, Castroviejo S (1991). Agmatoploidy in *Carex laevigata* (Cyperaceae). Fusion and fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. *Plant Systematics and Evolution*, **177**: 149–159.
- Luceño M (2008) *Carex* L. In: *Flora Iberica* (eds Luceño M, Castroviejo S, Jimenez Mejias P, cabezas, F., Medina, L.), pp. 146–151. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Márquez-Corro JI, Escudero M, Luceño M (2018) Do holocentric chromosomes represent an evolutionary advantage? A study of paired analyses of diversification rates of lineages with holocentric chromosomes and their

- monocentric closest relatives. *Chromosome Research* **26(3)**: 139–152. DOI:10.1007/s10577-017-9566-8.
- Márquez-Corro, J.I., Martín-Bravo, S., Pedrosa-Harand, A., Hipp, A.L., Luceño, M., Escudero, M (2019a) Karyotype evolution in holocentric organisms. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Márquez-Corro JI, Martín-Bravo S, Spalink D, Luceño M, Escudero M (2019b) Inferring hypothesis-based transitions in clade-specific models of chromosome number evolution in sedges (Cyperaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **135(4)**: 203–209. DOI:10.1016/j.ympev.2019.03.006.
- Narbona E, Delgado A, Encina F, Míguez M, Buide M.L (2013) Seed germination and seedling establishment of the rare *Carex helodes* Link depend on the proximity to water. *Aquatic Botany* **110**: 55–60. DOI:10.1016/j.aquabot.2013.05.005.
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**: 351–358. DOI:10.1016/s0169-5347(01)02187-5.
- Roalson E (2008) A Synopsis of Chromosome Number Variation in the Cyperaceae. *The Botanical Review*. **74**: 209–393. DOI:10.2307/40389292.
- Tanaka, N (1940) Chromosome studies in Cyperaceae, VIII: Meiosis in diploid and tetraploid forms of *Carex siderosticta* Hance. *Cytologia* **10**: 282–310.
- Tanaka, N (1949) Chromosome studies in the genus *Carex* with special reference to aneuploidy and polyploidy. *Cytologia* **15**: 15–29.
- Timberlake, WE (2013) Heterosis en S Maloy, K Hughes (Ed.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* **2**: 451–453. Academic Press. DOI:10.1016/B978-0-12-374984-0.00705-1.
- Whitkus R (1988) Experimental hybridizations among chromosome races of *Carex pachystachya* and the related species *C. macloviana* and *C. preslii* (Cyperaceae). *Systematic Botany*, **13**: 146–153.