Producción de frutos y semillas en *Diplotaxis eruroides* (L.) DC. sometida a diferentes tratamientos de polinización

F. XAVIER SANS & ANDREU BONET

Abstract

SANS, F. & BONET, A. (1993). Fruits and seeds production in *Diplotaxis eruroides* (L.) DC. under different pollination treatment. Collect. Bot. (Barcelona) 22: 49-54.

The breeding system of *Diplotaxis eruroides* (L.) DC. (*Brassicaceae*), a widespread Mediterranean weed found on arable fields and roadsides, is studied in this paper. The effects of different hand-pollination treatments on fruit and seed production are analysed. Results demonstrate that individuals of *Diplotaxis eruroides* are able to self-pollinate. There are significant differences in fertility, number of seeds produced per fruit and fruit size between treatments that produce allogamy and those that lead to autogamy. Fertility decreases progressively along the following sequence: geitonogamy, autogamy by induced self-pollination and autogamy by spontaneous pollination.

Keywords: *Diplotaxis eruroides*, Weeds, Breeding system, Pollination.

Resumen

SANS, F. & BONET, A. (1993). Producción de frutos y semillas en *Diplotaxis eruroides* (L.) DC. sometida a diferentes tratamientos de polinización. Collect. Bot. (Barcelona) 22: 49-54.

En este trabajo se estudia el sistema reproductivo de *Diplotaxis eruroides* (L.) DC. (*Brassicaceae*), una especie arvense ampliamente distribuida en los cultivos y los márgenes de caminos de la región mediterránea. Mediante polinizaciones manuales con polen procedente de la propia flor (autogamia), de flores del mismo individuo (geitonogamia) y de flores de individuos de otras poblaciones (alogamia) se analiza el efecto de los diferentes tratamientos de polinización sobre la producción de frutos y semillas. Los resultados obtenidos muestran que *Diplotaxis eruroides* es una especie con capacidad para autopolinizarse. Hay diferencias significativas en la fertilidad y en el número de semillas por fruto entre los tratamientos que generan alogamia y los que originan autogamia. Dentro de los tratamientos con autogamia, la fertilidad disminuye progresivamente en el paso de geitonogamia a autogamia por autopolinización inducida y a autogamia por autopolinización espontánea.

Palabras clave: *Diplotaxis eruroides*, Malas hierbas, Sistema reproductivo, Polinización.

F. SANS & A. BONET: Departament de Biologia Vegetal. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Avda. Diagonal 645. 08028-Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Diplotaxis eruroides (L.) DC. (*Brassicaceae*), con $2n=14$ (MANTON, 1932; JARETZKY, 1932), es una especie de distribución principalmente mediterránea que coloniza ambientes sometidos a periódicas perturbaciones como son los cultivos leñosos, tanto de secano como de regadío, y los márgenes de caminos. Las características de las especies arvenses, como el caso que nos ocupa, han sido ampliamente discutidas por diversos autores (BAKER & STEBBINS, 1965; BAKER, 1974). Muchas de ellas son plantas anuales con un corto ciclo de vida y generalmente con más de una generación por año lo que, unido a la elevada producción de semillas, les confiere una alta capacidad de colonización (HARPER, 1977). Su notable plasticidad y adaptabilidad les permite sobrevivir y producir semillas en un amplio espectro de condiciones ecológicas (EHRENDORFER, 1965). Los sistemas reproductivos en estos casos son, generalmente, poco especializados y presentan autocompatibilidad y polinización por vectores poco específicos o por el viento (ALLARD, 1965).

En los últimos años hemos llevado a cabo, por parte de uno de los autores, estudios sobre la demografía de *Diplotaxis eruroides* (SANS, 1991) y la falta de información sobre las características biológicas de la especie nos ha inducido a estudiar su sistema reproductivo. *Diplotaxis eruroides* es una especie anual de invierno que presenta crecimiento de tipo indeterminado (HARPER & WHITE, 1974) y cuyas floración y fructificación se inician en invierno y se prolongan hasta la primavera. Si las condiciones ambientales no son muy extremas, principalmente en lo que se refiere a la sequía, desarrolla nuevas generaciones durante la primavera y el verano. A lo largo del ciclo biológico de la especie se ha observado la presencia de algunos frutos infradesarrollados y con una baja producción de semillas que podrían estar relacionados con diferencias en la polinización. En este trabajo se ha estudiado hasta qué punto depende *Diplotaxis eruroides* de los vectores de polinización para producir frutos y semillas, de qué forma la fertilidad se ve afectada por los diferentes tipos de polinización, y qué relación existe entre el tipo de polinización y las características de los frutos. Los resultados obtenidos se discuten en relación con la ecología de la especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio del sistema reproductivo de *Diplotaxis eruroides* se recolectaron semillas de una población que colonizaba un cultivo de almendros de secano situado en el término municipal de Arbeca (UTM 31 TCG20), en la zona centro-occidental de Cataluña (NE de la Península Ibérica). Las semillas, que habían sido recolectadas en abril de 1988, fueron sembradas durante la primavera de 1989 en una parcela de 3 x 3 m que forma parte del Servicio de Campos Experimentales anexo a la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

La caracterización morfológica y funcional de las flores de *Diplotaxis eruroides* se realizó mediante el seguimiento diario de 10 botones florales desde el día anterior a la antesis hasta la desaparición de todas las piezas florales. Las variables analizadas han sido: la vida media de los sépalos y de los pétalos, los cambios de coloración de los filamentos de los estambres, la apertura de las anteras, la disponibilidad polínica y la posición de las anteras de los estambres superiores respecto al estigma.

La recompensa que ofrecen las flores a los insectos visitantes se ha evaluado mediante el cálculo del volumen de néctar en flores aisladas con tela de nylon durante el período comprendido entre el 9 y el 16 de marzo de 1990. La recogida de muestras que tuvo lugar sistemáticamente a las 9 horas de la mañana fue realizada mediante micropipetas de 0.5 µl. En este estudio no se ha medido la concentración de solutos del néctar ni se ha estimado la

cantidad de azúcares. También se han realizado observaciones puntuales, durante el período de experimentación, sobre la visita de los diferentes grupos de insectos.

Para el cálculo del cociente entre el número de granos de polen y el de primordios seminales (P/O; CRUDEN, 1977) se recolectaron, al azar, 10 botones florales correspondientes a diferentes individuos dos días antes de la antesis, y se cuantificó el número de primordios seminales y la producción polínica de cada flor. Para estimar la producción polínica se han utilizado métodos similares a los descritos por BALLERO & DE MARTIS (1983) y HERREIRA (1987). Se aislaron dos anteras por flor y se maceraron en agua destilada con unas gotas de detergente. Después de analizar la variabilidad entre alícuotas, se tomaron 3 submuestras de 5 μ l de cada suspensión y se contó el número de granos de polen presentes en cada submuestra. La estimación del número de granos de polen por flor se obtiene dividiendo la media de las submuestras por dos y multiplicando el resultado por el factor de dilución y por el número de anteras por flor. El número de primordios seminales se cuantificó bajo lupa binocular a partir de los ovarios de las mismas flores utilizadas en el cálculo de la producción polínica.

La determinación del sistema reproductivo se realizó mediante polinizaciones manuales en flores de 20 individuos aisladas de la visita de los insectos mediante tela de nylon con una trama de diámetro inferior a 1 mm. Las flores fueron escogidas al azar dentro de cada inflorescencia, marcadas y numeradas. Se realizaron polinizaciones manuales con polen procedente de la propia flor (autogamia), de flores del mismo individuo (geitonogamia) y de flores de individuos de otras poblaciones (alogamia). Un grupo de flores embolsadas se dejó sin manipular, como control, para comprobar la incidencia de autopolinizaciones espontáneas. Otro grupo, sin bolsa, fue polinizado libremente por los insectos. Una vez hubieron madurado las silicuas se procedió a medir su longitud y se cuantificó el número de primordios seminales fecundados y no fecundados (la suma de ambas cifras ha de coincidir con el número total de primordios seminales). No se ha considerado en este estudio la proporción de primordios fecundados que por abortos selectivos (SHAANKER et al. 1988) no llegaron a desarrollar semillas.

Los datos obtenidos han sido sometidos a un análisis de la varianza del tipo ANOVA mediante el paquete estadístico SPSSX; las diferencias estadísticas entre los tratamientos de polinización han sido verificadas mediante el Tukey test debido a que se disponía de un número diferente de repeticiones (SOKAL & RHOLF, 1981). Previamente al análisis, los valores del cociente entre el número de semillas y el número de primordios seminales han sido transformados en arcoseno de la raíz cuadrada y la longitud de las silicuas en sus logaritmos con el objetivo de normalizarlos.

RESULTADOS

Diplotaxis eruroides presenta diversos mecanismos florales para la atracción de insectos: las flores son grandes (diámetro $x = 0.72$ cm, s.d. = 0.072, $n = 19$) y vistosas, reunidas en inflorescencias, olorosas, con guías del néctar, con una elevada producción de polen que va desde 86100 a 213450 granos de polen por flor ($x = 136545$ granos de polen por flor, s.d. = 38030.78, $n = 10$) y una producción de néctar variable entre 0.09 y 0.36 μ l ($x = 0.24$ μ l diarios, s.d. = 0.090, $n = 14$). El cociente P/O obtenido varía entre 1793.75 y 3407.61 ($x = 2346.70$, s.d. = 483.15, $n = 10$). Durante la realización del estudio se observó la visita de diversas especies de insectos, principalmente himenópteros —mayoritariamente apoideos—, dípteros y lepidópteros.

El período funcional de las flores de *Diplotaxis eruroides* es de 3 días aunque el tiempo transcurrido entre las fases de botón floral y pérdida de las piezas del periantio es de 5 días. Los filamentos de los estambres pasan de color verde a morado durante el segundo y tercer día, la apertura de las anteras se produce el primer día mientras que la disponibilidad de polen, que

va desde el primer al tercer día, es máxima durante el segundo. A partir del tercer día el estigma se encuentra por encima del nivel de las anteras de los estambres superiores favoreciendo la polinización cruzada.

Los resultados obtenidos entre los diferentes tratamientos de polinización y su comparación estadística, mediante el análisis de la varianza, se resumen en la tabla núm. 1. Se observan diferencias significativas entre los tratamientos tanto en la producción de semillas como en el porcentaje de primordios seminales que llegan a cuajar semillas y en la longitud de la silicua. Hay una progresiva disminución del número de semillas por silicua en los tratamientos de polinización libre, de polinización cruzada inducida y en las autopolinizaciones inducidas con polen de diferentes flores (geitonogamia) y con polen de la propia flor (autogamia estricta). El porcentaje de fertilidad, expresado como la relación entre el número de semillas y el número de primordios seminales por fruto, disminuye significativamente en los tratamientos que originan autogamia respecto de los que provocan alogamia, y dentro de los tratamientos con autogamia hay una progresiva disminución en la fertilidad entre la geitonogamia, la autogamia por autopolinización inducida y la autogamia por autopolinización espontánea. Un comportamiento similar se ha observado en el porcentaje de silicuas con semillas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Según la propuesta de CRUDEN (1977), el cociente P/O obtenido sitúa a la especie entre las alógamas y las alógamas facultativas. PRESTON (1986) únicamente distingue alogamia y autogamia en el caso de las *Brassicaceae*, lo cual situaría a *Diplotaxis eruroides* entre las del primer grupo, con características similares a las descritas para *Barbarea orthoceras*, *Dentaria tenella* e *Hirschfeldia incana*. Los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos de polinización demuestran que, en las poblaciones de *Diplotaxis eruroides* estudiadas, los mecanismos de reproducción más efectivos son los que generan alogamia (polinización cruzada) aunque existe, en ausencia de vectores, la posibilidad de reproducirse mediante mecanismos que originan autogamia (autopolinización). Estos resultados coinciden con los obtenidos para otras *Brassicáceas* arvenses como *Sinapis arvensis* (MULLIGAN & KEVAN 1973) en que se ha definido el sistema reproductivo como alógamo pero con cierto grado de autogamia.

La baja producción de semillas por silicua y la baja proporción de primordios seminales que llegan a cuajar semillas en los controles embolsados induce a pensar en la existencia de una tasa de autopolinización espontánea baja. Ello coincide con las observaciones de diversos autores (BATEMAN, 1955; LLOYD, 1965; LEWIS, 1979), que han descrito casos de autoincompatibilidad esporofítica en las *Brassicaceae*; más concretamente, AL-SHEHBAB (1985) comenta que las poblaciones norteamericanas de *Diplotaxis eruroides* presentan generalmente autoincompatibilidad.

Las diferencias significativas en el número de semillas por silicua entre los tratamientos de polinización libre y polinización cruzada podrían explicarse por el efecto de los mecanismos de interacción alélica, comunes en *Brassicáceas* con un sistema de incompatibilidad esporofítica (RICHARDS, 1986), al realizar las polinizaciones cruzadas con polen procedente de flores de otra población próxima a los campos experimentales.

Considerando en sentido amplio los tratamientos que generan autogamia (autogamia espontánea, inducida y geitonogamia) se constata una creciente gradación en la fertilidad. Con la información de que disponemos actualmente, este incremento podría explicarse por la hipótesis de la limitación de polen, es decir, por la diferente intensidad de polinización a que pudieran haber sido sometidas las flores durante las manipulaciones. SILANDER & PRIMACK (1978) y SHORE & BARRET (1984) indican el efecto que la variación en la cantidad de polen depositado en el estigma ejerce sobre la producción de semillas. En la experiencia

realizada hay diferencias en la cantidad de granos de polen que se depositan sobre los estigmas de las flores sometidas a los tratamientos que generan autogamia. De este modo, en las flores control sólo hay aporte de polen por polinización espontánea, mientras que en las flores con autopolinización forzada se produce, además, un nuevo aporte de polen que procede de la propia flor, en el caso de autopolinización inducida, y de otras flores del mismo individuo, en el caso de autopolinización que genera geitonogamia. La confirmación de estas hipótesis solamente será posible mediante el desarrollo de una experimentación edecuada (SHAANKER & GANESHAIAH, en prensa).

La capacidad de autopolinización en sentido amplio que presenta *Diplotaxis eruroides* le confiere características cercana a las de un sistema reproductivo «equilibrado» (STEBBINS, 1950; GRANT, 1975). Este sistema presentaría las ventajas selectivas que proporciona la autogamia, como la adaptabilidad local favorecida por el incremento de la homocigosis, mientras que la alogamia aportaría variabilidad genética (heterocigosis) y flexibilidad evolutiva a largo plazo (WAYTT, 1983).

En las malas hierbas, tanto la alogamia como la autogamia pueden constituir estrategias idóneas para conseguir una eficiente colonización (MULLIGAN & KEVAN, 1973). Las características morfológicas y funcionales de las flores de *Diplotaxis eruroides* permiten la visita de diferentes insectos polinizadores. Los insectos se sienten particularmente atraídos por la gran cantidad de flores producidas por los numerosos individuos que emergen después de una perturbación. Estas características favorecen la alogamia en detrimento de la autogamia, lo que incrementa la eficacia (fitness) para la mayor producción de semillas; resultados similares fueron obtenidos por SOLBRIG (1976) en el estudio de algunas especies del género *Laewenworthia* (*Brassicaceae*). *Diplotaxis eruroides* presenta una elevada proporción de flores que cuajan silicuas bien desarrolladas (tabla núm. 1) lo que, teniendo en cuenta su dependencia de los vectores de polinización, permite suponer que en la población estudiada no ha existido limitación por los polinizadores. En estas situaciones con alta disponibilidad de polinizadores la alogamia facultativa no representa ninguna desventaja selectiva respecto a la autogamia (CRUDEN, 1976).

TABLA 1. Resultados y análisis de la varianza de los diferentes tratamientos de polinización.

Tratamiento	N	Nº. semillas/ silicua F=536.647 (***)	Nº. semillas/ p. seminales (%) F=427.659 (***)	Longitud silicua (cm) F=133.351 (***)	silicuas con semillas (%)
Polinización libre	71	46.68 ± 0.91 (a)	85.93 ± 1.22 (a)	2.61 ± 0.04 (a)	100.00
Polinización cruzada	28	41.18 ± 2.22 (b)	84.19 ± 3.75 (a)	2.97 ± 0.12 (a)	100.00
Autopolinización (flores diferentes)	40	8.88 ± 1.81 (c)	19.63 ± 4.12 (b)	1.66 ± 0.11 (b)	76.19
Autopolinización (propia flor)	22	3.23 ± 0.68 (d)	7.86 ± 1.93 (c)	1.30 ± 0.10 (c)	68.18
Control embolsado	99	0.51 ± 0.09 (d)	1.02 ± 0.20 (d)	1.16 ± 0.03 (c)	29.00

NOTA: Los valores del cociente número de semillas/primordios seminales han sido transformados en arcoseno de la raíz cuadrada. Los valores de la longitud de las silicuas han sido transformados logarítmicamente. (***) = $p < 0.001$. Dentro de cada columna, las medias con su correspondiente error estándar van seguidas por la misma letra cuando no son significativamente diferentes para $p < 0.05$ (Tukey test).

Bibliografia

- AL-SHEHBAZ, I. A. (1985). The genera of *Brassicaceae* (*Cruciferae*, *Brassicaceae*) in the South-eastern United States. *J. Arnold Arbor.* 66 (33): 3-351.
- ALLARD, R. W. (1965). Genetic systems associated with colonizing ability in predominantly self-pollinated species. In H. G. Baker & G. L. Stebbins, eds., *The Genetics of colonizing species*. 50-75. Academic Press. New York.
- BAKER, H. G. (1974). The evolution of weeds. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 5: 1-24.
- BAKER, H. G. & STEBBINS, G. L. (eds.) (1965). *The Genetics of colonizing species*. Academic Press. New York.
- BALLERO, H. & B. DE MARTIS (1983). Quantificazione dei granuli pollinici contenuti in una antera. *Giorn. Bot. Ital.* 117: 60-61.
- BATEMAN, A. J. (1955) Self-incompatibility systems in Agiosperms III. *Cruciferae*. *Heredity* 9: 53-68.
- CRUDEN, R. W. (1976) Intraspecific variation in pollen-ovule ratios and nectar secretion - preliminary evidence of ecotypic adaptation. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 63: 277-289.
- CRUDEN, R. W. (1977). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in plants. *Evolution* 31: 32-46.
- EHRENDORFER, F. (1965) Dispersal mechanisms, genetic systems and colonizing abilities in some flowering plant families. In H. G. Baker & G. L. Stebbins, eds., *The Genetics of colonizing species*. 331-351. Academic Press. New York.
- GRANT, V. (1975). *Genetics of flowering plants*. Columbia Univ. Press. New York.
- HARPER, J. L. (1977). *Population ecology of plants*. Academic Press. New York.
- HARPER, J. L. & J. WHITE (1974). The demography of plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 5: 419-463.
- HERRERA, J. (1987). Flower and fruit biology in Southern Spanish Mediterranean Shrublands. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 74: 69-78.
- JARETZKY, R. (1932) Beziehungen zwischen Chromosomenzahl und Systematik bei den Cruciferen. *Jahrb. Wissensch. Bot.* 76 (4): 485-527.
- LEWIS, D. (1979) Sexual incompatibility in plants. Edwards Arnold. London.
- LLOYD, D. (1965). Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Laewenworthia* (*Cruciferae*). *Contrib. Gray. Herb.* 195: 3-134.
- MANTON, I. (1932) Introduction to the general cytology of the *Cruciferae*. *Ann. Botany* 46 (183): 509-556.
- MULLIGAN, G. A. & P. G. KEVAN (1973). Color, brightness, and other floral characteristics attracting insects to the blossoms of some Canadian weeds. *Canad. J. Bot.* 51: 1939-1952.
- PRESTON, R. E. (1986) Pollen-ovule ratios in the *Cruciferae*. *Amer. J. Bot.* 73 (12): 1.731-1.740.
- RICHARDS, A. J. (1986). *Plant Breeding Systems*. George Allen & Unwin. London.
- SANS, F. X. (1991) Estudios sobre la dinámica de poblaciones de la flora arvense en conreus arboris de secà a la comarca de les Garrigues. Tesis doctoral inédita. Universidad de Barcelona.
- SAANKER, R.V.; GANESHAIAH, K.N. & K. S. BAWA (1988). Parent-offspring conflict, sibling rivalry, and brood size patterns in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 19: 177-205.
- SHAANKER, R.V.; GANESHAIAH (en prensa). Pollen grain deposition and stigma strategies. In K. S. Bawa & M. Hardley, eds., *Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants. Man and Biosphere. Serie 7*. Unesco Parthenon Publishing. California.
- SILANDER, J. A. & R. B. PRIMACK (1978). Pollination intensity and seed set in the evening primrose. *Amer. Midl. Nat.* 180: 213-216.
- SHORE, J. S. & C. H. BARRET (1984). The effect of pollination intensity and incompatible pollen on seed-set in *Turnera ulmifolia* (*Turneraceae*). *Canad. J. Bot.* 62: 1.298-1.303.
- SOKAL, R. R. & J. E. ROHLF (1981). *Biometry*. Freeman. San Francisco.
- SOLBRIG, O. T. (1976). On the relative advantages of cross and self-fertilization. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 63: 262-276.
- STEBBINS, G. L. (1950) *Variation and evolution of plants*. Columbia Univ. Press. New York.
- WYATT, R. (1983). Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. In L. Real, ed., *Pollination Biology*, 51-59. Academic Press. London.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer al Dr. Ramón M. Masalles la revisión y discusión del manuscrito original, al Prof. O. T. Solbrig y a dos revisores anónimos sus sugerencias y críticas y a Miquel A. Marcé Sallés la ayuda prestada durante la experimentación.