



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Aplicación de la micropropagación
y criopreservación a la
conservación *ex situ* de
especies vegetales de interés

Miriam Cano Castillo



Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE

UNIVERSIDAD DE ALICANTE

Instituto Universitario de Investigación CIBIO (Centro Iberoamericano de la Biodiversidad)

Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación *ex situ* de especies vegetales de interés.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Miriam Cano Castillo
2013



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



UNIVERSIDAD DE ALICANTE

Instituto Universitario de Investigación CIBIO (Centro Iberoamericano de la Biodiversidad)

Aplicación de la micropropagación
y criopreservación a la
conservación *ex situ* de especies
vegetales de interés.

Universitat d'Alacant

Memoria presentada para aspirar al Grado de
Doctora por la Universidad de Alicante

Miriam Cano Castillo
2013

EDUARDO GALANTE PATIÑO, Director del Instituto Iberoamericano de la Biodiversidad (CIBIO) de la Universidad de Alicante y responsable del Programa de Doctorado “Biodiversidad: Conservación y Gestión de las Especies y sus Hábitat”,

CERTIFICO:

Que la Memoria titulada “**Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación *ex situ* de especies vegetales de interés.**” que presenta la Licenciada MIRIAM CANO CASTILLO para optar al grado de Doctora, ha sido realizado en el Instituto Iberoamericano de la Biodiversidad (CIBIO) de la Universidad de Alicante bajo la supervisión del **Dr. D. José Luis Casas Martínez**, investigador de este Instituto, y la **Dra. D^a. Lourdes Georgina Iglesias Andreu**, investigadora del Laboratorio de Biotecnología y Ecología Aplicada de la Universidad Veracruzana (México).

Y para que conste firmo el presente certificado en Alicante, a veinticinco de marzo de dos mil trece.

El trabajo recogido en esta Memoria ha sido realizado gracias a una beca de investigación concedida por la Dirección General del Medio Natural de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia, convocada en virtud de un Convenio de Colaboración firmado entre la citada Consejería y la Universidad de Alicante para la *“Asistencia Científico-Técnica para la creación de un Banco de células y tejidos vegetales para la conservación y propagación de plantas de interés para la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia”*.

Asimismo, las actividades realizadas durante este periodo y que se recogen en la presente Memoria han formado parte de los siguientes proyectos financiados por la iniciativa comunitaria Interreg-IIIB en el espacio MEDOCC:

- “Red de centros de conservación de material genético de flora de las regiones mediterráneas del espacio MEDOCC” (GENMEDOC), ejecutado en 2004-2006.
- “Impacto del cambio climático sobre la flora mediterránea y acciones de conservación” (SEMCLIMED), ejecutado en 2006-2008.

PUBLICACIONES

Resultados incluidos en esta Memoria han sido objeto de las siguientes publicaciones:

- Cano-Castillo, M., Serrano-Martínez, F. y Casas, J.L. 2009. In vitro propagation of *Astragalus nitidiflorus* (Leguminosae), an endemic and endangered species from south-east of Spain. **Acta Horticulturae** 812: 545-550.
- Serrano-Martínez, F., Cano-Castillo, M. y Casas, J.L. 2012. In vitro propagation of *Helianthemum marminorensis*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology** 21(2): 300-304.
- Cano-Castillo, M. y Casas, J.L. 2012. Development of a vitrification-based cryopreservation protocol for the storage of saltcedar (*Tamarix boveana* Bunge). **CryoLetters** 33: 181-184.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Introducción general	10
La conservación vegetal en España	11
La Biotecnología como herramienta para la conservación vegetal	12
Estado de conservación de las plantas en estudio.....	13
i. <i>Helianthemum marminorense</i> Alcaraz, Peinado & Martínez Parras	14
ii. <i>Astragalus nitidiflorus</i> Jiménez Munuera et Pau	15
iii. <i>Tamarix boveana</i> Bunge	18
Capítulo 1. Aplicación de la micropropagación a la conservación de especies vegetales de interés.....	21
1.1. Introducción.....	22
1.1.1. Etapas de la micropropagación	23
1.1.1.1 Etapa 0: Selección de la planta madre y preparación	23
1.1.1.2 Etapa I: Inicio del cultivo	24
1.1.1.3 Etapa II: Multiplicación.....	26
1.1.1.4 Etapa IIIa: Elongación	26
1.1.1.5 Etapa IIIb: Enraizamiento.....	27
1.1.1.6 Etapa IV: Aclimatación	27
1.1.2. Conservación de especies raras, endémicas o amenazadas mediante la técnica de micropropagación	28
1.2. Objetivos.....	29
1.3. Material y métodos	29
1.3.1. Micropropagación de <i>Helianthemum marminorense</i>	29
1.3.1.1 Material vegetal, esterilización, e inicio del cultivo.....	29
1.3.1.2. Optimización del medio de cultivo.....	29
1.3.1.3. Multiplicación.....	30
1.3.1.4. Elongación y enraizamiento	30
1.3.1.5. Aclimatación.....	31
1.3.1.6. Datos complementarios	31
1.3.2. Micropropagación de <i>Astragalus nitidiflorus</i>	32
1.3.2.1. Material vegetal, esterilización y establecimiento <i>in vitro</i>	32
1.3.2.2. Optimización del medio de cultivo.....	32
1.3.2.3. Multiplicación.....	32
1.3.2.4. Elongación	33
1.3.2.5. Enraizamiento	33
1.3.2.6. Aclimatación.....	33
1.3.2.7. Datos complementarios	33
1.3.3 Micropropagación de <i>Tamarix boveana</i>	34
1.3.3.1. Material vegetal, esterilización e inicio del cultivo <i>in vitro</i>	34

1.3.3.2. Optimización del medio de cultivo.....	34
1.3.3.3. Multiplicación.....	35
1.3.3.4. Elongación y enraizamiento	35
1.3.3.5. Aclimatación.....	36
1.3.3.6. Datos complementarios	36
1.4. Resultados y discusión	37
1.4.1. Micropropagación de <i>Helianthemum marminorense</i>	37
1.4.1.1 Esterilización e inicio del cultivo	37
1.4.1.2. Optimización del medio de cultivo.....	37
1.4.1.3. Multiplicación.....	39
1.4.1.4. Elongación y enraizamiento	42
1.4.2. Micropropagación de <i>Astragalus nitidiflorus</i>	46
1.4.2.1. Esterilización e inicio del cultivo	46
1.4.2.2. Optimización del medio de cultivo.....	47
1.4.2.3. Multiplicación.....	48
1.4.2.4. Elongación.....	51
1.4.2.5. Enraizamiento.....	53
1.4.2.6. Aclimatación.....	55
1.4.3. Micropropagación de <i>Tamarix boveana</i>	56
1.4.3.1. Esterilización y establecimiento <i>in vitro</i>	56
1.4.3.2. Optimización del medio de cultivo.....	56
1.4.3.3. Multiplicación.....	57
1.4.3.4. Elongación y enraizamiento	62
1.4.3.5. Aclimatación.....	66
1.5. Conclusiones.....	67
1.5.1. Micropropagación de <i>Helianthemum marminorense</i>	67
1.5.2. Micropropagación de <i>Astragalus nitidiflorus</i>	68
1.5.3. Micropropagación de <i>Tamarix boveana</i>	69
Capítulo 2. Poliaminas y enraizamiento <i>in vitro</i>	70
2.1 Introducción.....	71
2.1.1. La problemática del enraizamiento <i>in vitro</i>	73
2.1.2. Poliaminas y enraizamiento	73
2.2. Objetivos.....	74
2.3. Materiales y métodos.....	74
2.3.1 Material vegetal y reactivos químicos	74
2.3.2 Extracción y análisis de PA	75
2.4 Resultados y discusión	77

2.4.1. Análisis del perfil de poliaminas durante el enraizamiento	77
2.4.1.1 Poliaminas libres	80
2.4.1.2 Poliaminas conjugadas	83
2.4.1.3 Poliaminas ligadas	85
2.4.2. Efecto de la aplicación de inhibidores del metabolismo de poliaminas	87
2.4.2.1. Efectos sobre el enraizamiento	87
2.4.2.2. Efectos sobre el perfil de poliaminas.....	88
2.4.2.2.1 Efecto de aminoguanidina (AG).....	88
2.4.2.2.2 Efecto de metilglioxal-bisguanilhidrazona (MGBG).....	97
2.4.2.2.3 Efecto de difluorometilornitina (DFMO)	105
2.6. Conclusiones.....	114
Capítulo 3. Desarrollo de técnicas de criopreservación para la conservación de especies vegetales de interés	116
3.1. Introducción.....	117
3.1.1. Técnicas clásicas	117
3.1.2 Nuevas técnicas	118
3.1.2.1 Precultivo.....	118
3.1.2.2 Deseccación.....	119
3.1.2.3 Precultivo-deseccación.....	119
3.1.2.4 Vitricación.....	119
3.1.2.5 Vitricación en gota	120
3.1.2.6 Encapsulación-deshidratación	121
3.1.2.7 Encapsulación-vitricación	121
3.2. Objetivos.....	122
3.3 Material y métodos	122
3.3.1. Criopreservación de <i>Astragalus nitidiflorus</i>	122
3.3.1.1. Material empleado	122
3.3.1.2. Precultivo.....	122
3.3.1.3. Osmoprotección con solución de carga (SC)	122
3.3.1.4. Deshidratación en PVS2 y congelación	123
3.3.1.5. Descongelación, descarga y recuperación	123
3.3.1.6. Uso de un sistema en doble capa post-recuperación	123
3.3.1.7. Estimación de la recuperación.....	123
3.3.2. Criopreservación de <i>Tamarix boveana</i>	124
3.3.2.1. Material empleado	124
3.3.2.2. Pretratamiento y precultivo	124
3.3.2.3. Osmoprotección de los tejidos con una solución vitrificante	124

3.3.2.4. Deshidratación en PVS2.....	125
3.3.2.5. Descongelación, descarga y recuperación	125
3.3.2.6. Uso de un sistema en doble capa post-recuperación	125
3.3.2.7. Estimación de la recuperación.....	125
3.3.2.8. Datos complementarios	126
3.4 Resultados y discusión	127
3.4.1. Crioconservación de <i>Astragalus nitidiflorus</i>	127
3.4.1.1. Efecto del tiempo de deshidratación sobre el crecimiento de los explantos.....	127
3.4.2. Crioconservación de <i>Tamarix boveana</i>	134
3.4.2.1. Efecto de la deshidratación con PVS2.....	134
3.4.2.2. Efecto de la solución de carga y deshidratación en PVS2.....	135
3.4.2.3. Efecto de la inclusión de una etapa de precultivo en el protocolo de crioconservación.....	137
3.4.2.4. Efecto de la presencia de tiazurón (TDZ) en el medio de recuperación	140
3.5. Conclusiones.....	147
3.5.1. Crioconservación de <i>Astragalus nitidiflorus</i>	147
3.5.2. Crioconservación de <i>Tamarix boveana</i>	147
Capítulo 4. Análisis de la estabilidad genética del material micropropagado y crioconservado.....	149
4.1 Introducción.....	150
4.1.1. Variación somaclonal. Conceptos	150
4.1.2. Técnicas de detección	151
4.1.3. RAPD y variación somaclonal	156
4.2. Objetivos.....	158
4.3. Materiales y Métodos	159
4.3.1. Extracción y cuantificación de ADN	159
4.3.2. Condiciones de amplificación y de electroforesis	159
4.4. Resultados y Discusión.....	161
4.4.1. Análisis molecular de plantas micropropagadas y crioconservadas de <i>T.</i> <i>boveana</i> mediante RAPDs.	161
4.4.2. Análisis molecular de plantas micropropagadas y crioconservadas de <i>Astragalus nitidiflorus</i> mediante RAPDs	167
4.5. Conclusiones.....	171
Bibliografía.....	173



Introducción general

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

La conservación vegetal en España

Aunque los intentos por conservar la riqueza biológica datan de principios del siglo XX, no fue hasta 1992 en la Conferencia de Naciones Unidas sobre Medio Ambiente cuando tuvo lugar la consolidación del concepto de conservación. En el marco de esa Conferencia se firmó la Convención sobre Diversidad Biológica que logró, además, introducir dicho concepto en la agenda política internacional.

España fue uno de los países comprometidos con el movimiento de conservación de la naturaleza que nació en EEUU y Europa a principios del siglo XX. Diferentes investigadores españoles estuvieron implicados en proyectos internacionales como *Flora Europaea*. El primer Libro Rojo sobre la Flora de la España Peninsular y de las Islas Baleares fue publicado en 1987, aunque la primera lista de endemismos ibéricos la había realizado con anterioridad el Departamento de Biología Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid (Moreno Saiz *et al.*, 2003). Desde el año 2000 se viene trabajando desde los Ministerios con competencias en la conservación del medio ambiente en el proyecto Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España (AFA), que finalmente fueron publicados en el año 2003. Este proyecto ya ha superado su cuarta fase con la publicación de la “Adenda 2010” (Bañares *et al.*, 2010).

Actualmente, la Administración Central mantiene pocas responsabilidades en lo que a gestión de la naturaleza se refiere puesto que la mayoría de tales competencias fueron transferidas a las 17 Comunidades Autónomas. La Ley de Conservación de Espacios Naturales y de la Fauna y la Flora Silvestre data de 1989 y definió las características del Catálogo Nacional de Especies Amenazadas de 1990 y sus categorías (Moreno Saiz *et al.*, 2003). Tras varias ampliaciones sucesivas negociadas con las Comunidades Autónomas este catálogo comprende actualmente 139 especies vegetales, de las que 112 están en peligro, 7 son sensibles a la alteración del hábitat, 9 son vulnerables y 11 de interés especial (Real Decreto 139/2011 de 4 de febrero de 2011).

Así, las Comunidades Autónomas están plenamente autorizadas para desarrollar y aprobar la legislación y/o políticas relacionadas con la conservación de especies y áreas naturales. Todas disponen actualmente de su propio Catálogo Regional de Flora Amenazada, dando como resultado en algunas de ellas a la publicación de obras sobre el estado de conservación de su flora.

La Biotecnología como herramienta para la conservación vegetal

La anteriormente citada Convención sobre Diversidad Biológica ya reconocía dos estrategias complementarias para abordar la conservación de la diversidad vegetal: estrategias de conservación *in situ*, que incluye la protección no de una sola especie, sino del hábitat completo donde se desarrolla de forma natural, y estrategias de conservación *ex situ*, dirigidas a la preservación de la diversidad genética existente en cada especie fuera ya de su hábitat natural. Los métodos de conservación *ex situ* surgen a partir de las complicaciones y deficiencias que derivan de la aplicación de medidas de conservación de especies en sus hábitats naturales y del hecho de reconocer que tales medidas de conservación *in situ* no resultan suficientes para luchar contra la galopante reducción de la diversidad biológica.

En este contexto, las herramientas de la biotecnología moderna, particularmente las derivadas de la tecnología del cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*, tienen, sin duda, un papel de enorme importancia en el apoyo a programas de conservación vegetal (Benson, 1999; Lynch, 1999). Existen antecedentes en nuestro país de la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* a la conservación de especies vegetales amenazadas como el caso de *Cistus heterophyllus* Desf. subsp. *carthaginensis* (Pau) M.B. Crespo & Mateo (Arregui *et al.*, 1993), *Centaurium rigualii* Esteve (Gonzalez-Benito *et al.*, 1997) o *Astragalus nitidiflorus* (Cano-Castillo *et al.*, 2009). Sin embargo, el valor de estas técnicas depende de que éstas sean aplicadas de forma efectiva y utilizadas como tecnologías complementarias a otras, como es el caso de los bancos de semillas.

Hay dos estrategias diferentes que permiten que las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ser aplicadas a la conservación de especies amenazadas. La primera es la *micropropagación*, cuyo objetivo es el de incrementar el número de individuos en especies con problemas reproductivos y/o con poblaciones extremadamente reducidas. Este tipo de material puede ser utilizado para investigación, colecciones vivas y, si se considera apropiado, para programas de introducción vegetal. La segunda es el desarrollo de técnicas de almacenamiento *in vitro*, particularmente la *crioconservación*,

que son particularmente útiles cuando la conservación de semillas no es posible (González-Benito, 1999).

Estas técnicas, aplicadas conjuntamente, presentan la ventaja de producir una gran cantidad de material vegetal a partir de escaso material de partida en un corto periodo de tiempo. Además, pueden constituir una alternativa de conservación a los bancos de semillas en el caso de algunas especies en las que el simple hecho de recolectar semillas en sus poblaciones naturales puede afectar a su supervivencia (González-Benito, 1999).

Sin embargo, en la aplicación de estas técnicas a la conservación de germoplasma vegetal es importante tener presente que su implementación también puede presentar inconvenientes, principalmente derivados de una posible pérdida de estabilidad genética del material en cuestión (Lynch, 1999).

Estado de conservación de las plantas en estudio

En este Memoria se han aplicado las técnicas de cultivo *in vitro* ya mencionadas a la conservación de tres especies: *Helianthemum marminorense* Alcaraz, Peinado & Martínez Parras, *Astragalus nitidiflorus* Jiménez Munuera et Pau y *Tamarix boveana* Bunge. La selección de estas especies se enmarcó dentro de las directrices emanadas desde la Dirección General de Medio Natural de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia, la cual, en virtud de un Convenio firmado con la Universidad de Alicante en 2003, participó desde ese año en dos proyectos europeos consecutivos dentro de la red INTERREG IIIB denominados: “Creación de una Red de Centros de Conservación de Material Genético de Flora de la Región Mediterránea del Espacio MEDOCC (GENMEDOC)” e “Impacto del Cambio Climático sobre la Flora Mediterránea y Acciones de Conservación (SEMCLIMED)”, en los que las citadas especies se incluyeron junto con otras como objeto de estudio para desarrollar tanto protocolos de germinación de semillas como protocolos de micropropagación y crioconservación de tejidos. Se tuvieron en cuenta tres criterios básicos para la selección de estas especies:

- El papel estructural que desempeña en la comunidad a la que pertenece.
- Su rareza o endemidad.
- Su nivel de protección, es decir, el grado de amenaza con el que está catalogada.

i. *Helianthemum marminorense* Alcaraz, Peinado & Martínez Parras

Helianthemum marminorense es un endemismo sabulícola del Mar Menor (Murcia) y territorios adyacentes del sur de la provincia de Alicante (Sánchez Gómez et. al, 2002). La población con mayor número de individuos se encuentra situada en el Lugar de Interés Comunitario (en adelante, LIC) ES0000175 de Salinas y Arenales de San Pedro del Pinatar, lugar amenazado por diferentes factores tales como la presión turística, vertidos ilegales en altamar, nitrificación procedente de cultivos adyacentes y especulación urbanística (Sánchez-Gómez et. al, 2005). En el Decreto 50/2003 de la Región de Murcia fue catalogada como “Vulnerable”, de acuerdo a las categorías de la IUCN, si bien ya en la Lista Roja 2008 de la Flora Vascular Amenazada fue considerada “En Peligro” (Moreno, 2008).

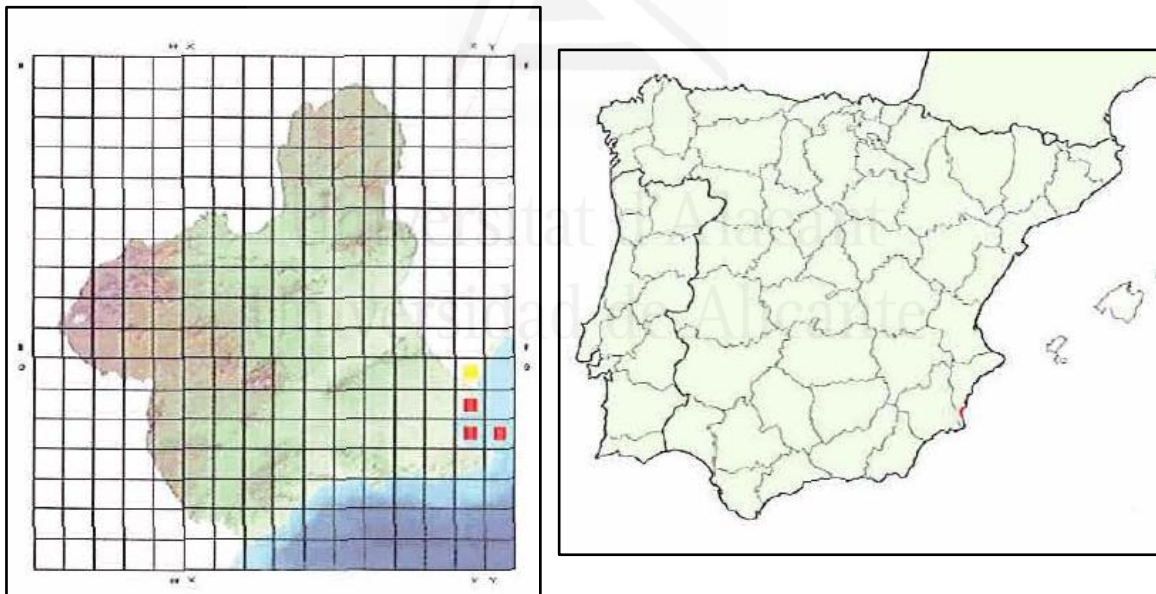


Figura1. Distribución de *H. marminorense*, según Sánchez-Gómez et al. (2002).

Se trata de una planta perenne que llega a alcanzar los 80 cm de altura. Presenta tallos ascendentes, blanquecinos. Las hojas alcanzan hasta los 12×2.5 cm, son agudas y acabadas en un mucrón hialino, pecioladas, carnosas, el indumento se compone de pelos estrellados; el nervio central está muy marcado por el envés y el margen es revoluto. Las estípulas miden hasta 2 mm de longitud y presentan de 1 a 3 pelos setáceos terminales. La inflorescencia está constituida en racimo, con un total de hasta

10 flores. Brácteas lineares, 2 sépalos externos, 5 sépalos internos con espacios intercostales glabros o con pelos estrellados esparcidos, 5 pétalos blancos. Con fruto en cápsula, hirsuto, de hasta 4 mm de longitud. Las semillas alcanzan hasta los 1.5 mm (Sánchez-Gómez et al., 2002).



Figura 2. Ejemplar de *Helianthemum marminorense* en floración.

ii. *Astragalus nitidiflorus* Jiménez Munuera et Pau

Astragalus nitidiflorus Jiménez & Pau es un endemismo exclusivo de la comarca del Campo de Cartagena (Murcia). Es una hierba perenne que fue inicialmente recolectada en 1909 y descrita por Pau en 1910 (Sánchez-Gómez et al., 2004). Desde entonces no había datos de nuevas observaciones hasta que en 2003 se identificaron algunos individuos en la comarca de Cartagena. Este taxón se encuentra localizado concretamente en el LIC-ES6200040 de Cabezos del Pericón y, aunque el número de poblaciones y fecha de descubrimiento es contradictorio (Vicente et al., 2011; Martínez-Sánchez et al., 2011), la situación del mismo es preocupante. De acuerdo a lo publicado por Vicente et al. (2011) la especie está compuesta por cinco poblaciones, la primera de ellas descubierta, como se ha dicho, en el año 2003 (Sánchez-Gómez et al., 2004) y, aunque inicialmente contenía 46 ejemplares, los últimos estudios hablan de un total de 69 individuos. Las poblaciones dos y tres se descubrieron en 2007 y desde entonces tan

solo se han encontrado 10 y 20 individuos, respectivamente. Las dos poblaciones más grandes, cuatro y cinco, con un tamaño aproximado de 1000 individuos cada una, fueron descubiertas en 2008 (Vicente et al., 2011). Esta especie se incluyó en el Decreto 50/2003 de la Región de Murcia como “De Interés Especial” a pesar de no haber sido detectada desde 1910. Su estado de protección mejoró tras su inclusión en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (BOE 12/07/2005) mediante Orden MAM/2231/2005. Actualmente esta especie está catalogada como “En Peligro Crítico” de acuerdo con las categorías de la IUCN (Sánchez-Gómez et al., 2006).

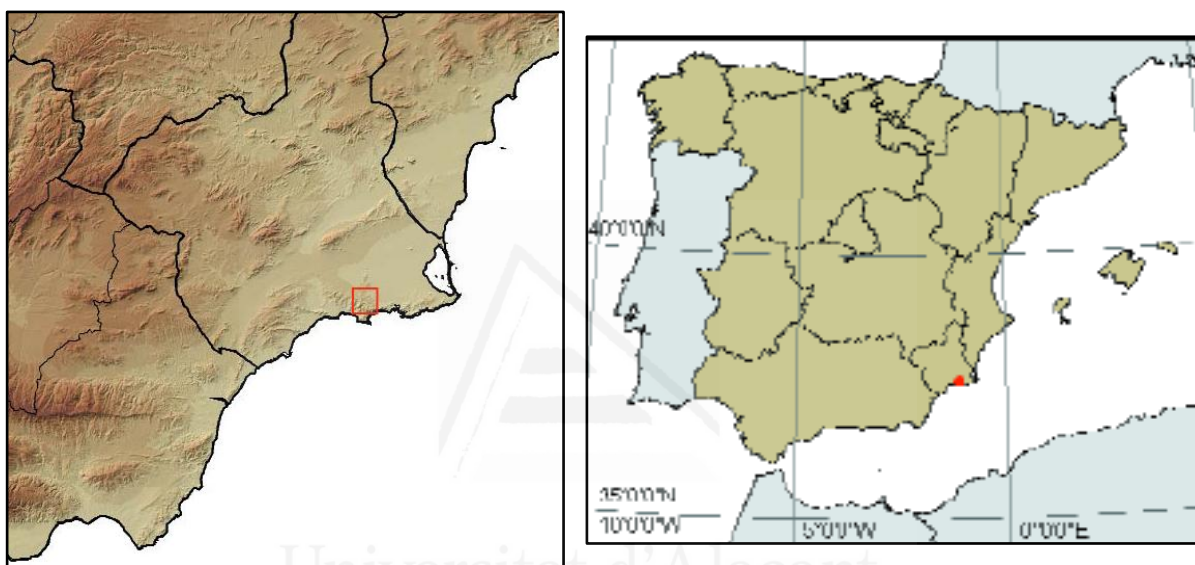


Figura 3. Distribución de *A. nitidiflorus*, según Sánchez-Gómez et al. (2004).

Entre las principales amenazas a la supervivencia de este especie están el escaso tamaño poblacional, que junto a las condiciones de aleatoriedad demográfica y condiciones climáticas extremas, podría desencadenar una reducción en el número de individuos o incluso a la desaparición de tales poblaciones (Martínez-Sánchez et al., 2011). Otras amenazas potenciales son aquellas como la urbanización y la transformación del modo de cultivo a un sistema de producción intensivo, lo que impide la dispersión de la especie a otras áreas (Sánchez Gómez et al., 2004; Martínez-Sánchez et al., 2011). Otro factor a tener en cuenta es la sucesión vegetal en el área, que en el caso de ser avanzada tampoco favorece la presencia de *A. nitidiflorus* que es una especie típica de estados de sucesión temprana (Martínez-Sánchez et al., 2011).



Figura 4. Ejemplar en floración de *Astragalus nitidiflorus* (de Sánchez-Gómez et al., 2004).

Se trata de una hierba perenne, de base leñosa, con tallos de hasta 80 cm, procumbentes o ascendentes, con denso indumento blanquecino. Sus hojas pueden alcanzar hasta los 14 cm, imparipinnadas, con 10-12 pares de folíolos elípticos o ligeramente truncados en el ápice, de hasta 20 x 9 mm, vilosos; estípulas 11-15 mm, soldadas a la base del pecíolo, verdes. El racimo es denso, con 20-25 flores, pedúnculos de hasta 6.5 cm. Cáliz 11-12 mm, ligeramente peloso, dientes 4.5-6 mm. Corola de hasta 2.1 cm; estandarte amarillo pálido, quilla y alas amarillo-verdosas, mucho más cortas que el estandarte. Fruto de hasta 18 x 7 mm, navicular, subsentado, curvo, aquillado (Sánchez-Gómez et al., 2004).

Habita en pastizales termófilos (*Aristido coerulescentis-Hyparrhenietum hirtae*) y relativamente nitrificados (*Stipion retortae*), sobre sustrato de origen metamórfico, en el piso termomediterráneo inferior con ombrotipo semiárido. Son especies

acompañantes: *Hyparrhenia sinaica*, *Lotus edulis*, *Ononis natrix*, *Bellardia trixago*, *Bituminaria bituminosa*, etc. (Sánchez Gómez et al., 2004).

iii. *Tamarix boveana* Bunge

Tamarix boveana es un iberoafricanismo ampliamente distribuido por zonas desérticas del norte de África. En la Península Ibérica se encuentra en poblaciones muy fragmentadas del Sudeste Ibérico y parte oriental hasta el Valle del Ebro, por ello este taxón se encuentra recogido bajo distintas figuras de protección en el territorio nacional. En la Comunidad Autónoma de Aragón está recogido como “Vulnerable” mediante Decreto 49/1995 por el que se regula el Catálogo de Especies Amenazadas de Aragón. Sin embargo, en el Catálogo Balear de Especies Amenazadas (Decreto 24/92) se encuentra recogido como “De Interés Especial”. También está protegido en Cataluña (Decreto 328/92) bajo la categoría de “Vulnerable” en el Catálogo de flora autóctona amenazada de Cataluña, así como en la legislación murciana (Decreto 50/2003) donde encontramos dicha especie con la misma categoría que en el caso anterior (Scholz et al., 2008).

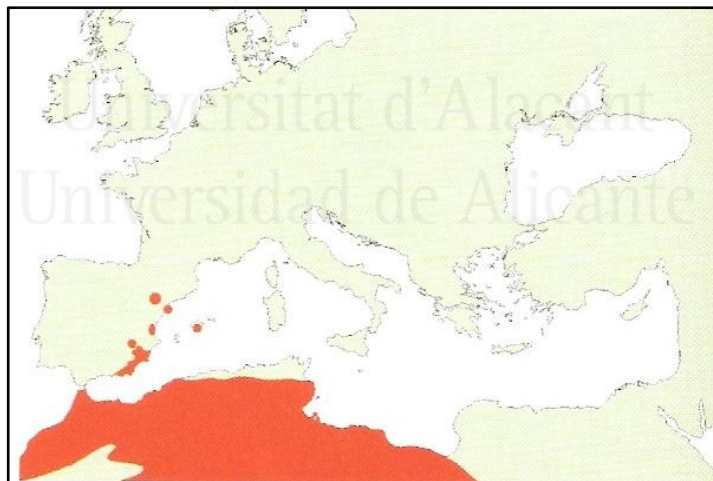


Figura 5. Distribución de *Tamarix boveana* (de Sánchez-Gómez et al., 2002).

Se trata de un arbusto o pequeño árbol muy ramificado con corteza pardo-rojiza. Posee hojas de 2-4 mm de longitud, alternas, escuamiformes, agudas, papilosas, sésiles. Inflorescencias en racimos espiciformes. Las flores son tetrámeras y de color blanco-rosado. Las brácteas llegan a alcanzar los 2.9 mm de longitud y son lineares, siendo más largas que el cáliz. Tiene estambres cuyos filamentos salen del ápice atenuado del disco nectarífero, dividido éste por cuatro o cinco lóbulos. Sus frutos son una cápsula con

numerosas semillas y éstas poseen un penacho de pelos largos en el ápice para facilitar la dispersión anemócora (Sánchez-Gómez et al., 2002; Martínez, 2007).

Tamarix es un género capaz de tolerar un amplio abanico de estreses abióticos tales como la sequía, las altas temperaturas y la sal, pudiendo excretar el exceso de ésta mediante glándulas presentes en las hojas (Saïdana et al., 2008). Además, se utiliza en la medicina popular como astringente, aperitivo, diurético y como estimulante de la transpiración. Se caracterizan también por presentar compuestos con actividad antioxidante y bacteriana (Saïdana et al., 2008). *T. boveana* podría contener otros usos ya que son varios los trabajos en los que se han detectado niveles interesantes de taninos en otras especies del mismo género, habiéndose demostrado el uso de éstas como terapia contra el cáncer (Orabi et al., 2010b; Sehwat & Sultana, 2006).

Buena parte de los ejemplares de *T. boveana* o de sus poblaciones se encuentran en lugares protegidos, además de que suelen ser minoritarios en aquellos hábitat dominados por *Tamarix canariensis* (Sánchez-Gómez et al., 2002). En general, las especies de este género son dignas de conservación por el papel ecológico que desempeñan en los hábitat de los que forman parte (Martínez, 2007). Su relevancia ecológica viene del hecho de prevenir la erosión y de servir de rompevientos, apareciendo asociados también a corrientes de agua y humedales (Saïdana et al., 2008), siendo además una de las especies estructurales del hábitat “Galerías y matorrales ribereños termomediterráneos [*Nerio-Tamaricetea* and *Securinegion tinctoriae*]” (Alcaraz et al., 2008). Forma parte de tarayales, y se encuentra de forma aislada en saladares, depresiones salobres y ramblas, en suelos hidromorfos dentro del piso termomediterráneo. La suelen acompañar *Arthrocnemum macrostachyum*, *Cynomorium coccineum*, *Halocnemom strobilaceum*, *Limonium cossonianum*, *Phragmites australis*, *Sarcoconia fruticosa*, *Suaeda vera*, *Tamarix canariensis*, etc.



Figura 6. Ejemplares de *Tamarix boveana* en la población de Saladares del Guadalentín (Murcia).

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 1. Aplicación de la micropropagación a la conservación de especies vegetales de interés

Universitat d'Alicant
Universidad de Alicante

1.1. Introducción

La propagación vegetativa de plantas mediante el uso de técnicas de cultivo *in vitro* se conoce comúnmente como **micropropagación**, término que hace referencia a que la cantidad de material vegetal necesaria para iniciar el cultivo es pequeña, mucho menor que en las técnicas tradicionales de propagación vegetativa, también conocidas colectivamente como macropropagación. Existen diferentes opciones para realizar propagación vegetativa mediante cultivo *in vitro* (figura 1):

- La multiplicación a partir de yemas ya existentes (apicales o axilares).
- La formación de brotes adventicios o embriones somáticos adventicios partiendo: a) de explantos constituidos por porciones de tejidos u órganos extraídos de la planta madre; o b) células desorganizadas (suspensiones celulares) o tejidos (cultivos de callo) establecidos por proliferación celular dentro del propio explanto.

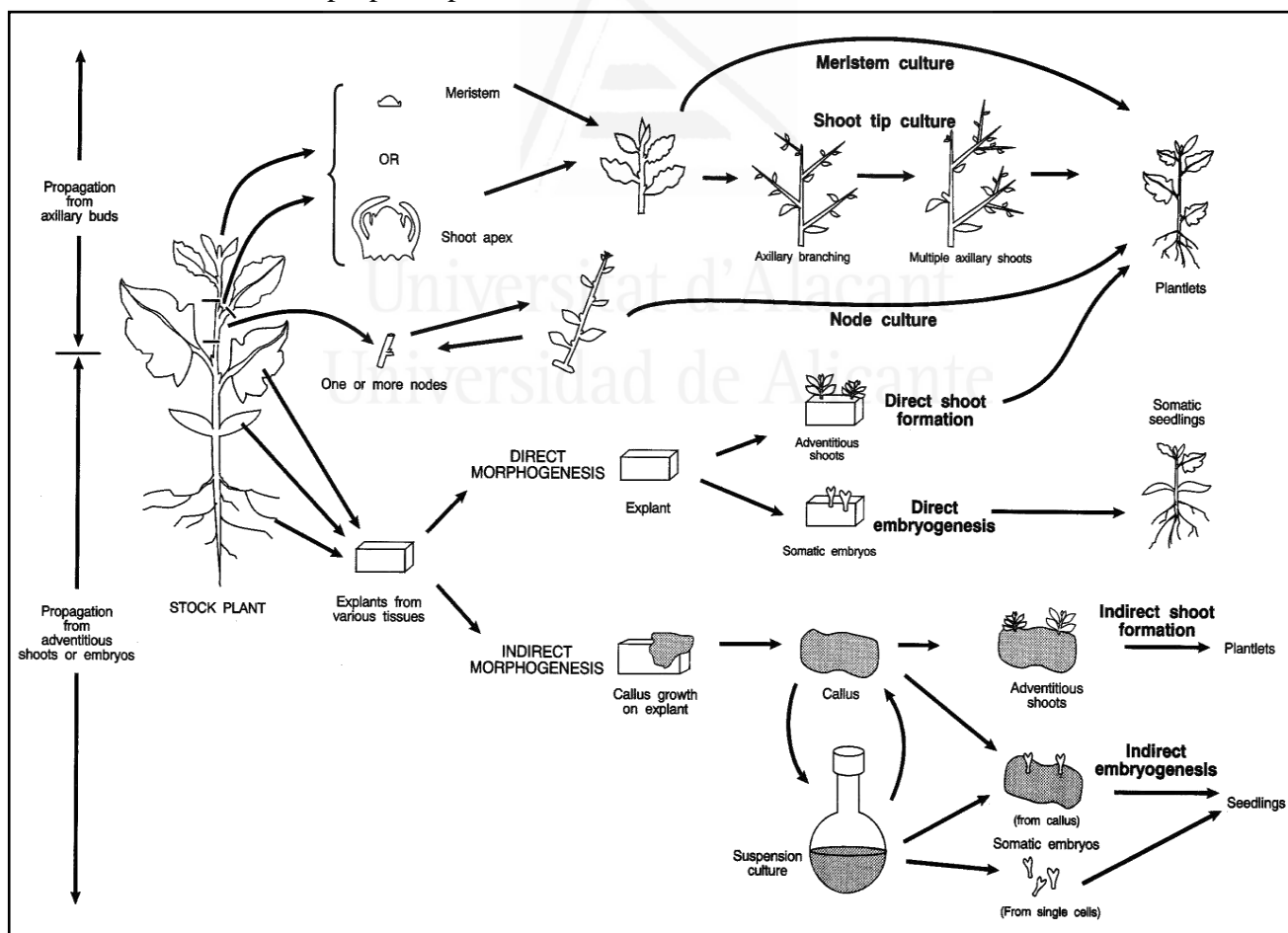


Figura 1. Los principales métodos de micropropagación (extraído de George et al., 2008).

1.1.1. Etapas de la micropropagación

La micropropagación de cualquier especie vegetal es un proceso en el que podemos distinguir generalmente 5 fases o etapas:

- Etapa 0: selección de la planta madre y preparación.
- Etapa I: inicio del cultivo.
- Etapa II: multiplicación.
- Etapa III: elongación y enraizamiento.
- Etapa IV: aclimatación.

La primera propuesta realizada para sistematizar el diseño de los protocolos de micropropagación se debió al Dr. Murashige e inicialmente contemplaba las etapas I, II y III (George et al., 2008). Posteriormente se aceptó la sugerencia realizada por Maene & Debergh (George et al., 2008) de añadir una etapa previa, a la que se denominó Etapa 0 porque incluía actuaciones a tener en cuenta antes de abordar la Etapa I. Más recientemente se incluyó una etapa final, la etapa IV, correspondiente a la transferencia de la planta a condiciones ambientales “naturales”.

Los principales detalles que caracterizan estas etapas se describen en los apartados siguientes.

1.1.1.1 Etapa 0: Selección de la planta madre y preparación

Esta etapa se incluyó dentro de la estrategia general de micropropagación algo más tarde, como ya hemos indicado antes, para tratar de solucionar los problemas de contaminación y las dificultades de establecer muchos cultivos *in vitro* cuando se parte de material silvestre (Debergh & Read, 1991). En cualquier proceso de micropropagación se recomienda una cuidadosa selección del material de partida, esto es, que la planta madre esté sana y que posea las características típicas de la especie o variedad (George et al., 2008). Este requisito no es siempre fácil puesto que con frecuencia no existe una disponibilidad ilimitada de material de partida, tal y como ocurre en el caso de las especies amenazadas (Sarasán *et al.*, 2006). Es esencial el hecho de que las plantas sean correctamente identificadas y que además se recolecte material suficiente como para asegurar la máxima representación de la diversidad genética de la especie (Lynch, 1999).

Para seleccionar el material de partida es importante tener en cuenta una serie de consideraciones:

- El genotipo y estado físico de la planta madre. El estado inicial de la planta madre puede determinar el éxito de la propagación *in vitro* de un determinado genotipo, pero, sobre todo, puede evitarnos problemas a la hora de esterilizar los explantos iniciales (Debergh & Read, 1991).
- El tipo de explanto. Este punto cobra mayor relevancia cuando el objetivo de la técnica es la conservación, ya que el uso de determinados tipos de explanto (sobre todo aquellos cuya ruta de propagación implica la formación de callo) puede incrementar el riesgo de que aparezca variación somaclonal. Es preferible el uso de ápices o meristemos, pues es sabido que este tipo de explantos (Karp, 1995; citado en Lynch, 1999) mantiene la fidelidad genética de la especie en cuestión (Lynch, 1999; Pence, 1999). Sin embargo, el uso de reguladores del crecimiento puede dar lugar a brotes adventicios que pueden originarse indirectamente del callo basal del explanto. Por todo ello es recomendable el uso controlado de estos reguladores, sobre todo cuando el objetivo principal de estas técnicas es la conservación de un determinado taxón.
- La edad fisiológica del explanto. Los meristemos apicales o yemas axilares de brotes jóvenes suelen responder mejor que aquellos que proceden de otras partes más maduras de la planta (George, 1993).
- La época o estación del año. Explantos recolectados durante estaciones húmedas presentan mayores tasas de contaminación que cuando son recolectados en estaciones secas (Enjalric *et al.*, 1988; citado en Lynch, 1999).
- El tamaño del explanto. Explantos más grandes ofrecen mejores resultados en cuanto a supervivencia y tasas de regeneración (Al Mazrooei, 1997; citado en Lynch, 1999). Sin embargo, explantos más pequeños ofrecen la ventaja de presentar tasas más bajas de contaminación (Karth, 1986; citado en Lynch, 1999).

1.1.1.2 Etapa I: Inicio del cultivo

El objetivo principal de esta etapa es iniciar el cultivo *in vitro* de explantos. El cultivo *in vitro* debe ser, por definición, un cultivo *axénico*, es decir nos interesa que nuestro explanto se desarrolle sin la presencia de otros organismos o microorganismos

que de manera natural acompañan a las plantas y que en este caso suponen “contaminación”. Por esta razón, el primer obstáculo que nos encontramos a la hora de iniciar cualquier cultivo *in vitro* es el de la presencia de dicha contaminación, ya sea superficial o endógena. Este hecho es de particular importancia si la especie que vamos a propagar se encuentra amenazada, ya que la cantidad de material vegetal de partida es limitada y además está creciendo en condiciones de campo no controladas (Sarasan *et al.*, 2006).

Los microorganismos que suelen vivir en la superficie de los órganos vegetales se eliminan con la ayuda de diversos tipos de agentes esterilizantes. Después es imprescindible lavar bien el material con agua destilada estéril para eliminar completamente el compuesto esterilizante. Sin embargo, la contaminación endógena, ya sea de origen fúngico o bacteriano, no resulta fácil de erradicar. Con frecuencia, este tipo de contaminaciones pueden ser reducidas hasta un nivel tolerable y compatible con el cultivo mediante el uso de fungicidas y antibióticos en el medio de cultivo (Pence, 1999).

Además del problema de la esterilización del material vegetal, la escisión o corte del explanto, junto con su posterior manipulación incluyendo el propio uso de agentes esterilizantes, puede generar la aparición de pardeamientos en el explanto como consecuencia de la liberación de fenoles, taninos y productos de la peroxidación de lípidos (Lynch, 1999). Para prevenirlo se suele recurrir al uso de antioxidantes o de carbón activo en el medio de cultivo (George *et al.*, 2008; Sarasan *et al.*, 2006).

Una vez esterilizado el material vegetal se procede al cultivo de éste. Existe una amplia gama de medios de cultivo comercialmente disponibles, diseñados en función de los requerimientos nutricionales de muchas especies de plantas. El medio de cultivo consiste en una mezcla de sales inorgánicas, una fuente de carbono, vitaminas y un agente gelificante que le dará consistencia. A ese medio de cultivo se le pueden añadir también reguladores del crecimiento u otras sustancias en función de la situación morfogénica por la que atraviesan las plántulas en crecimiento. Las fórmulas nutricionales más utilizadas son las de MS (Murashige & Skoog, 1962), WPM (Lloyd & Mc Cown, 1981) y SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), entre otras. La fuente de carbono usual es la sacarosa en un rango de concentraciones de 2-5% (p/v), mientras que el agente gelificante más utilizado es el agar, seguido de agarosa y gelrite (Bhojwani and Razdan, 1996; citado en Lynch, 1999).

1.1.1.3 Etapa II: Multiplicación

El objetivo principal de esta etapa de la micropropagación es incrementar el número de propágulos (es decir, de unidades individualizables con las que se pueda repetir el proceso de regeneración) por explanto. Existen diferentes rutas para la multiplicación de plántulas, como ya comentamos al principio de este capítulo. Sin embargo, cuando la finalidad principal es la conservación *in vitro* es casi obligado recurrir a la proliferación a partir de meristemas o yemas ya existentes, ya que con este tipo de explantos es altamente probable que se mantenga la fidelidad genética de la especie en cuestión a lo largo de todo el proceso de micropropagación. Aun así, no todos los brotes que se forman en un cultivo de este tipo se originan a partir de yemas axilares. Puede darse la aparición de brotes adventicios que surgen directamente del tejido del brote inicial o indirectamente del callo de la base del mismo (Lynch, 1999). La frecuencia de aparición de este tipo de brotes aumenta conforme lo hace la concentración de reguladores de crecimiento vegetal del tipo citoquinina en el medio por encima de una dosis umbral propia para cada especie. Las citoquininas son reguladores del crecimiento que promueven la formación de brotes inhibiendo la dominancia apical del explanto inicial (George et al., 2008).

Se debe tener en cuenta, además, que el efecto de los reguladores del crecimiento puede estar significativamente influenciado por la composición del medio de cultivo basal (agar, carbohidratos, sales, etc.) (Lynch, 1999).

1.1.1.4 Etapa IIIa: Elongación

La fase de multiplicación constituye en sí misma un ciclo cerrado que nos permite generar un número potencialmente infinito de nuevos brotes. Evidentemente, parte de esos brotes han de ser “extraídos” de dicho ciclo para completar su regeneración mediante la inducción de raíces. El enraizamiento es una etapa morfológicamente compleja cuya inducción en muchos casos se ha visto dependiente de una determinada longitud del explanto. Es por ello que esta etapa III suele dividirse en una primera fase de elongación y una posterior de inducción real de la rizogénesis. La elongación facilita, además de la formación de raíces, que la manipulación de los explantos resulte más sencilla. En muchas plantas su elongación se consigue transfiriéndolas desde el medio de multiplicación (que usualmente incluía citoquininas)

a un medio sin reguladores de crecimiento. Sin embargo, esta estrategia no siempre funciona y entonces es recomendable la búsqueda de un medio con una dosis óptima de giberelinas o la adición de medio líquido a cultivos ya establecidos, en lugar de subcultivarlos a medio fresco (Maene & Debergh, 1985). Para muchas plantas el uso de esta segunda estrategia requiere de un sistema de enfriamiento basal (*bottom cooling*) que, además, controla el desarrollo de síntomas no deseados de hiperhidratación (Piqueras *et al.*, 1998).

1.1.1.5 Etapa IIIb: Enraizamiento

El uso de citoquininas en la etapa de multiplicación de los brotes inhibe con frecuencia la formación de raíces, lo que refuerza la necesidad de una etapa de elongación en la que los explantos están en un medio ya sin reguladores. A partir de aquí, el enraizamiento de explantos *in vitro* suele ser dependiente de la adición al medio de auxinas. El descubrimiento de la producción de raíces adventicias en esquejes en respuesta a la aplicación de auxina data de 1930 y sigue siendo hoy día la estrategia más utilizada para el enraizamiento (De Klerk, 2002). Sin embargo, el enraizamiento puede ser particularmente problemático para especies leñosas cultivadas *in vitro* y taxones recalcitrantes (Sarasan *et al.*, 2006).

1.1.1.6 Etapa IV: Aclimatación

La manera en la que se transfieren las plantas desde el ambiente *in vitro* a condiciones *ex vitro* condiciona enormemente el éxito del proceso completo de la micropropagación. Existen dos razones básicas por las que esta etapa debe ser realizada con sumo cuidado:

- Riesgo de estrés hídrico severo. Ya que las plantas se han desarrollado *in vitro* en un microambiente en el que la humedad relativa es prácticamente del 100%, sus estomas suelen ser atípicos y su cierre es incompleto bajo condiciones de baja humedad relativa. De esta manera, este tipo de plantas pierden agua de forma rápida cuando son transferidas a condiciones *ex vitro*.
- Adaptación nutricional y fotosintética. Las plantas micropropagadas no dependen por completo de su propia fotosíntesis, ya que se les ha suministrado

sacarosa (u otro azúcar) y han sido mantenidas en condiciones de baja intensidad luminosa, lo que las hace también susceptibles a daños fotooxidativos.

En la práctica las plántulas se sacan de los recipientes donde han sido enraizadas y se lavan cuidadosamente sus raíces para eliminar los restos de agar. Entonces son transferidas a un sustrato estéril formado por turba, vermiculita, arena y/o perlita donde se mantienen durante días en condiciones de elevada humedad relativa y baja intensidad luminosa. Para que las plántulas se adapten a las futuras condiciones ambientales es necesario reducir la humedad relativa de forma progresiva. Una vez adaptadas se transferirán a macetas y se las expondrá a condiciones ambientales naturales.

1.1.2. Conservación de especies raras, endémicas o amenazadas mediante la técnica de micropropagación

Las técnicas de cultivo *in vitro* están siendo cada vez más utilizadas en la conservación de especies amenazadas (Sarasan, 2006) ya que, entre otras ventajas, permiten la producción de numerosas plantas a partir de escaso material inicial, lo que es de vital importancia cuando las poblaciones son reducidas (Fay, 1994). El material así obtenido puede ser de gran valor para colecciones vivas, para reducir la presión sobre las poblaciones naturales, para investigación y, si fuera necesario, para programas de introducción vegetal (González-Benito, 1999). Son numerosos los casos en los que el cultivo *in vitro* ha sido vital para evitar la pérdida de táxones en peligro crítico. Existen antecedentes en nuestro país en los que se ha aplicado la técnica de micropropagación a especies de esta categoría, *Cistus heterophyllus* Desf. subsp. *carthagenensis* (Pau) M.B. Crespo & Mateo (Arregui *et al.*, 1993), *Helianthemum polygonoides* (Iriondo *et al.*, 1995), o *Erica andevalensis* (Márquez-García *et al.*, 2009), entre otras. Igualmente la técnica de crioconservación se ha aplicado también con éxito a especies como *Centaurea ultraeiae* (Mallón *et al.*, 2008) o *Thymus moroderi* (Marco-Medina *et al.*, 2010a, 2010b).

1.2. Objetivos

El objetivo de este estudio es el desarrollo de un protocolo de micropropagación particularizado para cada una de las especies incluidas en esta memoria. Este protocolo servirá no sólo como estrategia de conservación en sí misma sino también para posibilitar la aplicación de la crioconservación como estrategia de conservación a largo plazo.

1.3. Material y métodos

1.3.1. Micropropagación de *Helianthemum marminorense*

1.3.1.1 Material vegetal, esterilización, e inicio del cultivo

Se recogieron segmentos de tallo en crecimiento de 5-7 cm de largo de varios individuos de *Helianthemum marminorense* en su hábitat natural (Salinas de San Pedro del Pinatar, Murcia) entre abril y julio de 2005 y 2007. Los tallos se lavaron con agua corriente para eliminar la suciedad y posteriormente se mantuvieron en agitación en agua corriente con unas gotas de jabón líquido durante una hora. La desinfección se realizó mediante la aplicación de HgCl₂ 0.2% (p/v) durante 10 min. Tras enjuagar 4 veces con agua destilada estéril se aplicó etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos y una solución de lejía comercial al 15% (v/v) con Tween-20 al 0.05% (v/v) durante 10 minutos. Finalmente se realizaron 4-5 lavados con agua destilada estéril. Segmentos nodales con 2-4 yemas axilares se cultivaron en medio MS (Murashige and Skoog, 1962), con 30 g l⁻¹ de sacarosa y 7 g l⁻¹ de Plant agar (Duchefa). Los explantos se dejaron en oscuridad a 25±2°C durante 10 días. Tras ese tiempo, los tubos se transfirieron a un fotoperiodo de 16 horas luz y una intensidad luminosa de 49 µmoles m⁻²s⁻¹ durante al menos cinco semanas.

1.3.1.2. Optimización del medio de cultivo

Para establecer el tipo de medio basal idóneo para el crecimiento, segmentos apicales con dos nudos extraídos de explantos establecidos durante 5-6 semanas *in vitro* se cultivaron en diferentes tipos y/o concentración de medios de cultivo (Duchefa):

WPM (Woody Plant Medium, Lloyd & McCown, 1980)

SH (Schenk & Hildebrandt, 1972)

MS

½ MS

¾ MS

Se realizaron 24 réplicas para cada tratamiento, con un explanto por réplica. Los tratamientos tuvieron una duración de 5 semanas. El medio de cultivo idóneo, decidido en función del incremento en altura de los explantos, se utilizó en los ensayos siguientes.

1.3.1.3. Multiplicación

Para optimizar la inducción de nuevos tallos en este cultivo evaluamos diferentes tipos y concentraciones de citoquininas:

6-bencialdenina (BA) (0.05-1 mg l⁻¹)

6-dimetilalil aminopurina (2iP) (0.1-1 mg l⁻¹)

Quinetina (Kin) (0.1-5 mg l⁻¹)

Además, probamos la combinación de 0.1 mg l⁻¹ Kin con dos auxinas: ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA), ambas a 0.05 y 0.1 mg l⁻¹. Se realizaron 24 réplicas por tratamiento y todos ellos se mantuvieron durante cinco semanas en presencia de hormonas y posteriormente se transfirieron a medio sin reguladores durante otras 5 semanas, tras las cuales se midieron altura, número de brotes y número de nudos.

1.3.1.4. Elongación y enraizamiento

Para inducir la elongación y/o enraizamiento de los tallos ensayamos un sistema en doble capa. Segmentos apicales con tres nudos se cultivaron en medio WPM, con 20 g l⁻¹ sacarosa y 6 g l⁻¹ Plant agar. Tras tres días se añadieron 2 ml de medio líquido consistente en sales de Knop (Knop, 1865) a la mitad de su concentración, 3 g l⁻¹ de carbón activo y diferentes concentraciones de sacarosa: 50, 35 y 20 g l⁻¹ a pH 5.0. El tratamiento tuvo una duración de cinco semanas. Se realizaron 24 réplicas por tratamiento.

Con los resultados obtenidos se realizó una segunda prueba de doble capa para dilucidar cuál de los 3 factores implicados en este sistema tenía un papel determinante en la elongación. Para ello se emplearon segmentos apicales con tres nudos. En este caso se añadió 1 ml de medio líquido con ninguno, uno o varios de los siguientes componentes: sales de Knop a la mitad de su concentración, 3 g l⁻¹ de carbón activo y 20 g l⁻¹ sacarosa. El tratamiento tuvo una duración de cinco semanas tras las que se midió la altura, el número de nudos, número de brotes y el número de explantos enraizados. Se realizaron 24 réplicas por tratamiento.

1.3.1.5. Aclimatación

Las plántulas enraizadas se sacaron de los tubos de cultivo, se lavaron las raíces para eliminar restos del medio de cultivo y se transfirieron a propagadores de plástico conteniendo una mezcla turba-vermiculita (1:1). Estos se colocaron en una cámara de cultivo Sanyo con fotoperiodo de 16h luz, 75% HR (humedad relativa), 43 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa y 25°C de temperatura. Dos semanas después se abrieron las ventanas para que las plántulas, aun con una HR superior al 95%, comenzaran a adaptarse paulatinamente a la HR de la cámara de cultivo. A las seis semanas se trasplantaron a maceta y se pasaron a condiciones de campo.

1.3.1.6. Datos complementarios

Todos los medios contenían 20 g l⁻¹ de sacarosa y 7 g l⁻¹ Plant agar (Duchefa), con excepción de los medios de elongación y enraizamiento que contenían 6 g l⁻¹ de Plant agar. Tanto citoquininas como auxinas se añadieron al medio de cultivo antes de que este fuera autoclavado. Todos los medios de cultivo se ajustaron a pH 5.8, excepto el medio líquido del sistema en doble capa que se ajustó a 5.0 antes del autoclavado. Todos los ciclos de autoclavado se realizaron durante 20 minutos a 121°C. Los explantos se dispusieron en tubos de cultivo (15×2.5cm) y se mantuvieron con un fotoperiodo de 16h a 25 ± 2°C y una intensidad lumínica de 49 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (EEM) excepto en el enraizamiento. Con el fin de analizar los datos estadísticamente se empleó el test de Duncan ($\alpha=0.05$).

1.3.2. Micropropagación de *Astragalus nitidiflorus*

1.3.2.1. Material vegetal, esterilización y establecimiento *in vitro*

Se usó como material de partida semillas de la colección perteneciente a la Dirección General del Medio Natural de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia. Las semillas se lavaron con agua corriente y se dejaron en agitación durante media hora con agua destilada. Una vez en el interior de la cabina de flujo se aplicó etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto. Seguidamente y tras retirarlo se añadió una solución de lejía comercial (5% de NaOCl aproximadamente) al 20% (v/v) con Tween-20 al 0.05% (v/v) durante 20 minutos. Se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril y se dejaron las semillas con agua caliente durante otros 30 minutos. Finalmente se sembraron en tubos con medio MS. Los ápices obtenidos de estas plántulas se fueron subcultivando durante más de un año hasta tener suficiente material para continuar con el desarrollo del protocolo de micropropagación.

1.3.2.2. Optimización del medio de cultivo

Se cultivaron segmentos apicales (1.2-1.6 cm) sin hojas durante cinco semanas en diferentes medios de cultivo (Duchefa):

WPM

MS

GD (Greshoff & Doy, 1972)

B5 (Gamborg et al., 1968)

En base a la respuesta observada (incremento en altura y número de hojas) en los explantos se seleccionó el medio de cultivo idóneo para ser utilizado en las etapas posteriores de la micropropagación.

1.3.2.3. Multiplicación

Ápices (1.4-1.6 cm) sin hojas se cultivaron en medio MS suplementado con diferentes concentraciones (0.1-1.0 mg l⁻¹) de BA y Kin. Tras cinco semanas los explantos se transfirieron a medio MS sin reguladores del crecimiento donde permanecieron otras cinco semanas. Finalmente se recogieron datos de número de brotes por explanto, altura de los brotes y número de hojas.

1.3.2.4. Elongación

Para la optimización de esta etapa se utilizó un sistema en doble capa. Se cultivaron ápices (1.4-1.6 cm) en medio MS y tres días después se añadió 1 ml de medio líquido (Piqueras *et al.*, 1998) consistente en una solución con sales Knop a la mitad de su concentración, 3 g l⁻¹ de carbón activo (CA) y diferentes concentraciones (50, 35 y 20 g l⁻¹) de sacarosa. Los tubos se rellenaron con la misma cantidad de medio líquido al comienzo de la tercera y sexta semanas. Se evaluó la respuesta morfogénica (incremento en altura, número de hojas nuevas, número de brotes nuevos y porcentaje de explantos enraizados) a las siete semanas.

1.3.2.5. Enraizamiento

Brotes ya elongados se transfirieron a medio MS a la mitad de su concentración suplementado con diferentes concentraciones (0.5-2.0 mg l⁻¹) de ácido indolacético (AIA) durante dos o cuatro días en condiciones de oscuridad. Tras este periodo los brotes se subcultivaron al mismo medio sin auxinas y suplementado con 0.9 g l⁻¹ CA. Se evaluó el porcentaje de enraizamiento a las 5 semanas.

1.3.2.6. Aclimatación

Plántulas enraizadas se sacaron de los tubos de cultivo para lavar las raíces y eliminar restos del medio de cultivo y se transfirieron a propagadores de plástico que contenían una mezcla turba-vermiculita (1:1). Estos se colocaron en una cámara de cultivo (Sanyo) con fotoperiodo de 16h de luz, 75% HR, 43 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa y 25°C de temperatura. Dos semanas después se abrieron las ventanas para que las plántulas, aun con una HR superior al 95%, comenzaran a adaptarse paulatinamente a la HR de la cámara de cultivo. A las seis semanas se trasplantaron a maceta y se pasaron a condiciones de campo.

1.3.2.7. Datos complementarios

Todos los medios contenían 30 g l⁻¹ de sacarosa, 10 mg l⁻¹ Fe-sequestrene[®] y 7 g l⁻¹ de Plant agar, con excepción de los medios de elongación y enraizamiento que contenían 6 g l⁻¹ de Plant agar. Para la germinación *in vitro* se suplementó el medio con 20 g l⁻¹ de sacarosa. Tanto BA como Kin se añadieron al medio de cultivo antes de que este fuese autoclavado, mientras que en los experimentos de enraizamiento el AIA se

esterilizó por filtración y fue añadido al medio después de ser autoclavado. Todos los medios se ajustaron a pH 5.8 excepto el medio líquido del sistema en doble capa que se ajustó a 5.0 antes del autoclavado. Todos los ciclos de autoclavado se realizaron a 121°C durante 20 minutos. Los explantos se cultivaron en tubos (15 × 2.5 cm) introduciendo un explanto por tubo y se mantuvieron con un fotoperiodo de 16h a 25 ± 2°C y una intensidad lumínica de 49 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (EEM) excepto en el enraizamiento. Con el fin de analizar los datos estadísticamente se empleó el test de Duncan ($\alpha=0.05$).

1.3.3 Micropropagación de *Tamarix boveana*

1.3.3.1. Material vegetal, esterilización e inicio del cultivo in vitro

Se seccionaron segmentos de tallo de árboles pertenecientes a la población situada en Saladares del Guadalentín entre abril y septiembre de todos los años comprendidos entre 2004 y 2007. Los tallos se lavaron con agua corriente para eliminar la suciedad y posteriormente se mantuvieron en agitación en agua corriente con unas gotas de jabón líquido durante una hora. La desinfección se realizó mediante la aplicación de Beltanol-L (quinosol 50%, Probelte, S.A.) al 0.1% (v/v) durante 15 min. Tras enjuagar 3 veces con agua destilada estéril se aplicó etanol al 70% (v/v) durante un minuto y una solución de lejía comercial al 15% (v/v) con Tween-20 al 0.05% (v/v) durante 15 minutos. Finalmente se realizaron 4-5 lavados con agua destilada estéril. Segmentos nodales y apicales se cultivaron en medio MS, con 30 g l⁻¹ de sacarosa y 7 g l⁻¹ de Plant agar. Los explantos se dejaron en oscuridad a 25±2°C durante 10 días. Tras ese tiempo los tubos se transfirieron a un fotoperiodo de 16 horas luz y una intensidad luminosa de 49 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante al menos cinco semanas.

1.3.3.2. Optimización del medio de cultivo

Se cultivaron segmentos apicales multinodales de 2-3 cm en diferentes medios de cultivo (Duchefa):

WPM + vitaminas WPM

MS + vitaminas MS

½MS + vitaminas MS

2MS + vitaminas MS

MS + vitaminas WPM

Todos los medios contenían, además, 30 g l⁻¹ de sacarosa y 7 g l⁻¹ de Plant agar. Se realizaron 24 réplicas por tratamiento. Los tratamientos tuvieron una duración de 8 semanas tras las que se recogieron los datos de altura en cada uno de los tratamientos.

1.3.3.3. Multiplicación

Se evaluaron, en total, 22 combinaciones de reguladores (18 tratamientos con los reguladores incluidos en el medio sólido y 4 combinaciones incluidas en un sistema en doble capa) utilizando como explantos segmentos apicales multinodales. En un primer ensayo se evaluaron diferentes concentraciones de citoquininas (0.25-1 mg l⁻¹) en medio sólido: BA, 2iP y tidiazurón (TDZ), con 12 réplicas por tratamiento. En un segundo ensayo se volvieron a probar esas mismas concentraciones de citoquininas, a excepción del TDZ (0.01-0.03 mg l⁻¹) pero con los explantos enraizados previamente. Además, se evaluó la combinación de 0.01 mg l⁻¹ TDZ con las siguientes auxinas: 0.01 y 0.03 mg/l ANA y 0.1 y 0.3 mg/l AIB; en este último caso se realizaron 24 réplicas por tratamiento. Se repitió de nuevo la multiplicación con TDZ, tanto en medio sólido (0.01-0.5 mg l⁻¹) como en doble capa (0.01-0.5 mg l⁻¹) y se hicieron 24 réplicas por tratamiento. En este último caso el medio líquido con TDZ se aplicó a las dos semanas de haber cultivado los explantos, con el fin de que éstos ya hubieran enraizado. Se recogieron datos de altura de los explantos, ramas totales y longitud de las mismas a las 8 semanas de permanecer en cultivo.

1.3.3.4. Elongación y enraizamiento

Para el desarrollo de esta fase de la micropropagación se realizaron dos ensayos diferentes empleando en ambos un sistema en doble capa y segmentos apicales de dos centímetros. A los tres días de haber cultivado los explantos en ese medio se añadió 1 ml de medio líquido, que en el caso del primer ensayo contenía sales Knop a la mitad de

su concentración, 0, 3 ó 6 g l⁻¹ de carbón activo y diferentes concentraciones (50, 30 ó 10 g l⁻¹) de sacarosa. En este mismo experimento se aplicó el mismo volumen de medio líquido a las 4 semanas de la primera adición. En el segundo ensayo el medio líquido contenía sales de Knop a la mitad de su concentración, 0, 3 ó 6 g l⁻¹ de carbón activo y diferentes concentraciones (30 ó 10 g l⁻¹) de sacarosa. Se volvió a añadir medio líquido en las semanas dos y cinco. En ambos experimentos se realizaron 24 réplicas por tratamiento y se recogieron datos de altura cada dos semanas durante un periodo de ocho semanas.

1.3.3.5. Aclimatación

Se utilizó como sustrato una mezcla de turba:vermiculita (1:1) a la que se roció un fungicida polivalente (Compo[®]) dos días antes del momento de aclimatar. Plántulas enraizadas se sacaron de los tubos de cultivo, se lavaron las raíces para eliminar restos del medio de cultivo y se transfirieron a propagadores de plástico que ya contenían la mezcla de sustratos indicada anteriormente. Los propagadores se colocaron en una cámara de cultivo (Sanyo) con fotoperiodo de 16h de luz, 75% HR, 43 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa y 25°C de temperatura. Dos semanas después se abrieron las ventanas para que las plántulas, aun con una HR superior al 95%, comenzaran a adaptarse paulatinamente a la HR de la cámara de cultivo. A las seis semanas se trasplantaron a maceta y se pasaron a condiciones de campo.

1.3.3.6. Datos complementarios

Todos los medios contenían 30 g l⁻¹ de sacarosa y 7 g l⁻¹ de Plant agar, con excepción de los medios sólidos pertenecientes a los experimentos con un sistema en doble capa que contenían 6 g l⁻¹ de Plant agar. Tanto las citoquininas como las auxinas se añadieron al medio de cultivo antes de ser autoclavado. Se ajustaron todos los medios a pH 5.8, excepto el medio líquido del sistema en doble capa que se ajustó a 5.0 antes del autoclavado durante 20 minutos a 121°C. Los explantos se cultivaron en tubos (15 × 2.5 cm) a un explanto por tubo y se mantuvieron con un fotoperiodo de 16h a 25 ± 2°C y una intensidad lumínica de 49 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (EEM) excepto en el enraizamiento. Con el fin de analizar los datos estadísticamente se empleó el test de Duncan ($\alpha=0.05$).

1.4. Resultados y discusión

1.4.1. Micropropagación de *Helianthemum marminorense*

1.4.1.1 Esterilización e inicio del cultivo

El porcentaje de explantos que sobrevivió al protocolo de esterilización fue de un 52%, siendo un 58% el porcentaje de explantos que se mantuvieron estériles. Este porcentaje de supervivencia resultó ser satisfactorio si lo comparamos con los resultados obtenidos tras la aplicación de otros protocolos de esterilización diferentes, basados en pequeñas modificaciones del actual. El uso de HgCl_2 resultó ser clave para la esterilización de los explantos, así como el uso de etanol al 70% y de lejía al 15% durante un tiempo máximo de 30 segundos y 10 minutos, respectivamente. Aun así se observaron claros signos de pardeamiento en el medio de cultivo de algunos explantos como consecuencia del proceso de esterilización (Lynch, 1999), lo que condujo a la muerte de una pequeña parte de ellos. Aunque el porcentaje de supervivencia no fue muy alto se logró regenerar material suficiente a partir de los explantos supervivientes para poder continuar con los experimentos.

1.4.1.2. Optimización del medio de cultivo

Las plantas cultivadas en el medio con sales y vitaminas de WPM mostraron un mayor crecimiento en altura debido a una mayor distancia internodal (figura 2) y una mejor tasa de proliferación de brotes axilares que con el resto de medios ensayados (tabla 1). Además, el empleo de formulaciones diferentes a las de WPM produjo amarillamiento de los explantos, hojas de menor tamaño e hiperhidratación en algunos casos. Así pues, el medio con sales y vitaminas de WPM se consideró como el más idóneo y fue, por tanto, la combinación utilizada en los sucesivos ensayos.

Tabla 1. Efecto del tipo de medio de cultivo empleado sobre diferentes parámetros de crecimiento en *Helianthemum marminorense*. Datos representados como media \pm EEM. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos (n=24).

Medio de cultivo	Δ Altura (cm)	Brotos/explanto
WPM	1.06 \pm 0.21 a	1.12 \pm 0.29 a
SH	0.39 \pm 0.07 b	0.87 \pm 0.26 a
MS	0.24 \pm 0.05 b	0.67 \pm 0.28 a
1/2 MS	0.24 \pm 0.05 b	0.79 \pm 0.19 a
3/4 MS	0.20 \pm 0.05 b	0.62 \pm 0.22 a

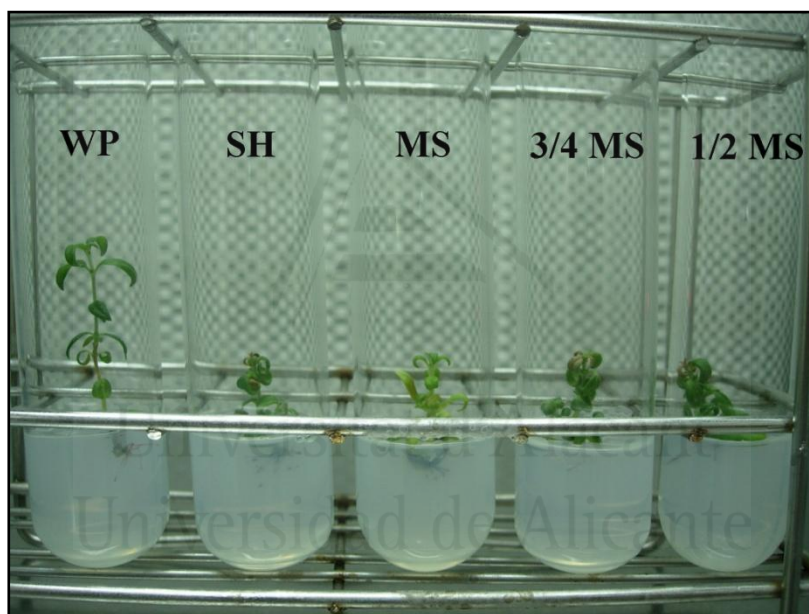


Figura 2. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento de explantos apicales de *Helianthemum marminorense*.

Según la información bibliográfica que hemos manejado, no se han hecho hasta el momento pruebas con diferentes combinaciones de sales para la micropropagación de otras especies de *Helianthemum*, habiéndose empleado siempre medio MS (Morte & Honrubia, 1992; Iriondo *et al.*, 1995; Santana *et al.*, 2004; Santana *et al.*, 2006). En otras especies (Manzanera & Pardos, 1990; Gómez & Segura, 1995; Morte & Honrubia, 1996), la combinación de sales empleada ha sido también esencial en la optimización del cultivo *in vitro*. Nuestros resultados demuestran la necesidad de optimizar la composición mineral del medio de cultivo, ya que éste determinará el crecimiento,

morfología y estado fisiológico de los explantos en cada una de las fases de la micropropagación.

1.4.1.3. Multiplicación

En la etapa de multiplicación, la aplicación de reguladores (excepto Kin a bajas concentraciones y 2iP a 0.1 mg l^{-1}) produjo callo basal en un elevado porcentaje de explantos, siendo mucho más acusado en presencia de BA y 2iP (figura 3).

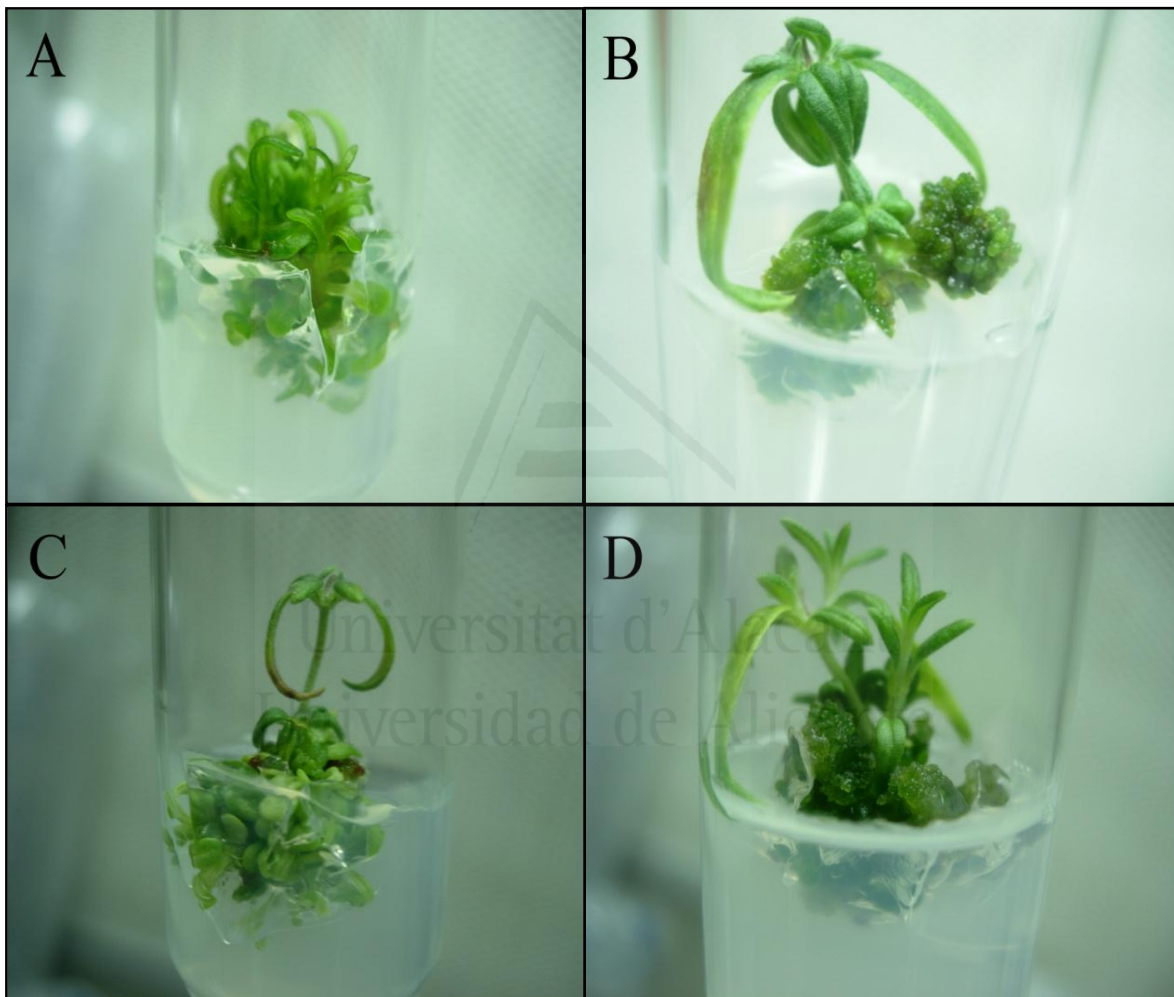


Figura 3. Efecto de la aplicación de citoquininas en la multiplicación de explantos apicales de *Helianthemum marminorensis*: (A) BA 0.5 mg l^{-1} ; (B) BA 0.1 mg l^{-1} ; (C) BA 1 mg l^{-1} ; (D) 2iP 0.5 mg l^{-1} .

De entre las combinaciones con citoquininas en solitario la que produjo el mayor número de brotes axilares fue 0.5 mg l^{-1} de 2iP (tabla 2). Sin embargo, apareció hiperhidratación y callo basal en la totalidad de los explantos (figura 3d).

Por otro lado, la aplicación de BA produjo un menor crecimiento en altura y número de nudos respecto al control. En estudios realizados con otras especies del género (Iriondo *et al.*, 1995; Santana *et al.*, 2004; Santana *et al.*, 2006), la mayor tasa de multiplicación se obtuvo al aplicar BA. En nuestro caso los datos se tomaron tras cinco semanas sin reguladores después de los tratamientos con citoquininas, a pesar de lo cual la tasa de multiplicación obtenida con BA también fue significativamente mayor que en el control. Sin embargo, el hecho de que la mayor parte de los explantos presentase hiperhidratación y callo, incluso tras cinco semanas en ausencia de reguladores, indica que el empleo de este regulador a estas concentraciones no es aconsejable en la multiplicación de la especie, especialmente si nuestro objetivo es la conservación. La aplicación de BA también afectó negativamente a la capacidad de enraizamiento de los explantos tras su traspaso a medio sin reguladores (datos no mostrados).

Tabla 2. Efecto de la aplicación de citoquininas y/o auxinas en la multiplicación y crecimiento de explantos de *Helianthemum marminorense*. Los datos se representan como media \pm EEM. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos (n=24).

Tratamiento (mg l ⁻¹)					Nudos	Δ Altura (cm)	Brotos / explanto	Callo (%)
BA	Kin	2iP	ANA	AIA				
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.50 \pm 0.62 a	3.98 \pm 0.33 a	3.58 \pm 0.19 abc	0
0.05					9.29 \pm 1.00 af	1.92 \pm 0.42 de	5.92 \pm 0.5 d	100
0.1					4.42 \pm 0.76 cd	1.05 \pm 0.23efg	4.08 \pm 0.39 bc	50
0.5					6.61 \pm 0.97 e	1.64 \pm 0.26def	6.0 \pm 0.52 d	87.5
		0.1			2.42 \pm 0.55 c	0.47 \pm 0.08 g	3.08 \pm 0.34 abc	0
		0.5			14.00 \pm 0.85 b	3.9 \pm 0.41 a	8.83 \pm 0.63 f	100
		1.0			9.29 \pm 0.51 af	2.17 \pm 0.24 d	7.29 \pm 0.34 e	100
	0.1				11.13 \pm 0.5 a	1.78 \pm 0.13def	3.96 \pm 0.1 abc	0
	0.5				11.37 \pm 0.46 a	2.28 \pm 0.18 d	3.96 \pm 0.04 abc	0
	1.0				9.96 \pm 0.6 a	1.72 \pm 0.14def	4.12 \pm 0.16 c	0
	2.5				7.29 \pm 0.71 ef	0.89 \pm 0.16 fg	4.17 \pm 0.29 c	37.5
	5.0				5.87 \pm 0.88 de	0.82 \pm 0.17 fg	3.96 \pm 0.46 abc	29.17
	0.1		0.01		10.00 \pm 0.98 a	4.97 \pm 0.55 bc	2.87 \pm 0.19 a	16.67
	0.1		0.05		14.29 \pm 0.63 b	5.43 \pm 0.33 c	3.79 \pm 0.08 abc	100
	0.1			0.01	11.42 \pm 0.53 a	5.51 \pm 0.35 c	3.62 \pm 0.18 abc	12.5
	0.1			0.05	10.42 \pm 0.85 a	4.32 \pm 0.49 ab	3.00 \pm 0.21 ab	16.67

Con concentraciones bajas de Kin en solitario no hubo diferencias en el número de nudos y en el número de brotes respecto al control, mientras que con concentraciones

elevadas el descenso en altura y número de nudos fue más acusado. Sin embargo, Morte y Honrubia (1992) observaron en *Helianthemum almeriense* que el uso de Kin a bajas concentraciones (0.1 y 0.2 mg l⁻¹) generaba un mayor número de brotes que el resto de citoquininas empleadas. En nuestro caso la aplicación de auxina en combinación con 0.1 mg l⁻¹ Kin produjo explantos de mayor altura que Kin en solitario. Así, 0.1 mg l⁻¹ Kin junto con 0.05 mg l⁻¹ ANA mejoró significativamente la altura y el número de nudos obtenidos respecto al control.

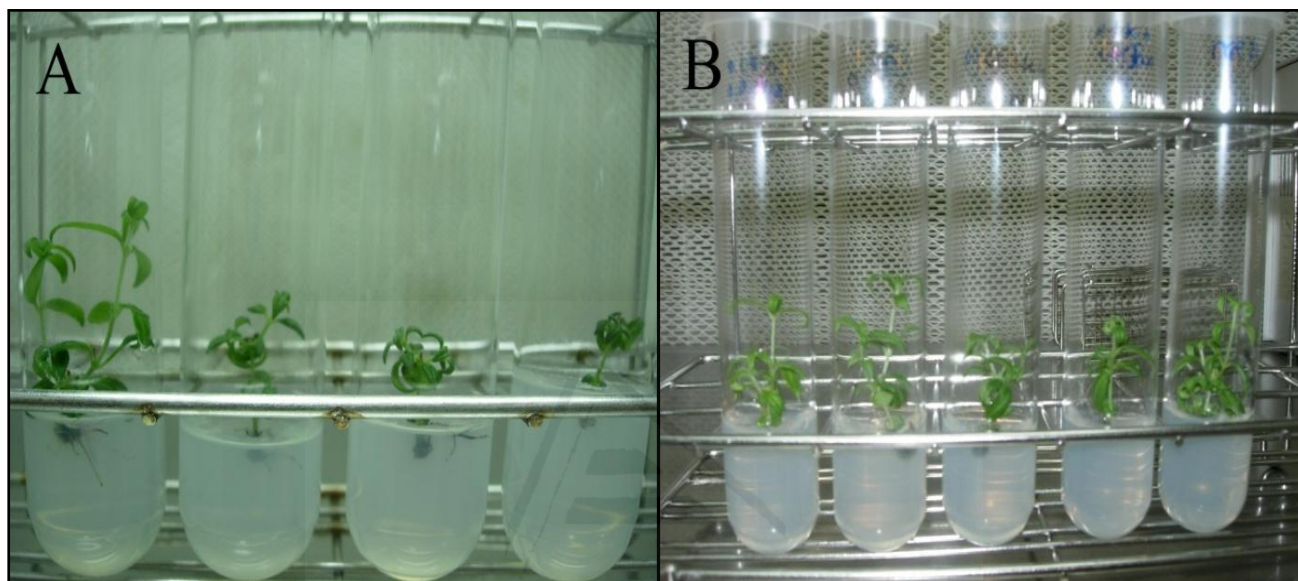


Figura 4. Explantos obtenidos tras la aplicación de Kin en solitario (A) y combinada con diferentes auxinas (B). De izquierda a derecha se representan: A): control, 0.1, 0.5 y 1 mg l⁻¹ Kin. B): 0.1 mg l⁻¹ Kin + 0.01 mg l⁻¹ ANA, 0.1 mg l⁻¹ Kin + 0.05 mg l⁻¹ ANA, 0.1 mg l⁻¹ Kin + 0.01 mg l⁻¹ AIA, 0.1 mg l⁻¹ Kin + 0.05 mg l⁻¹ AIA y control.

El medio basal sin reguladores permitió un buen crecimiento en cuanto a altura y número de nudos. Esto es importante cuando la multiplicación se realiza mediante el uso de segmentos nodales. El cultivo de nudos es de gran valor para la propagación de especies que poseen una buena elongación de tallos en cultivo (George et al., 2008). En nuestro caso, la tasa de multiplicación está directamente relacionada con la elongación y el número de segmentos nodales disponibles. Así pues, el elevado número de nudos obtenido en el control revela que se puede conseguir una óptima tasa de multiplicación en ausencia de reguladores, lo que resulta más aconsejable cuando el objetivo de la micropropagación es, como en nuestro caso, la conservación (Edson et al., 1996).

1.4.1.4. Elongación y enraizamiento

La aplicación de un sistema en doble capa produjo un mayor incremento de la altura y producción de nudos en comparación con el control (tabla 3). Estos aumentos fueron mayores a medida que disminuyó la concentración de sacarosa en el medio, obteniéndose los mejores resultados con 20 g l⁻¹.

En todos los tratamientos se obtuvo un porcentaje de explantos enraizados del 100%. La aplicación de doble capa con 35 g l⁻¹ de sacarosa produjo un mayor número de raíces por explanto aunque el resultado no fue significativamente diferente del obtenido con 20 g l⁻¹. Es importante destacar, además, que con 50 g l⁻¹ de sacarosa se obtuvo el mayor número de brotes por explanto, por lo que es importante optimizar la concentración en el medio líquido de este componente según el objetivo hacia el que va encaminado el uso de estos sistemas en doble capa.

Tabla 3. Efecto de la aplicación de un sistema en doble capa con diferentes concentraciones de sacarosa sobre el crecimiento de explantos de *Helianthemum marminorense*. Los datos se representan como media ± EEM. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos (n=24).

Tratamiento	Δ Altura (cm)	Número de nudos	Número de raíces	Brotos/explanto
Control	1.16 ± 0.18 a	3.03 ± 0.32 a	6.07 ± 0.44 a	2.55 ± 0.38 a
DC + 50 g l ⁻¹ sac	1.68 ± 0.21 a	4.25 ± 0.26 b	7.21 ± 0.50 a	3.67 ± 0.41b
DC + 35 g l ⁻¹ sac	3.81 ± 0.34 b	4.79 ± 0.20 b	8.92 ± 0.42 b	1.83 ± 0.29 a
DC + 20 g l ⁻¹ sac	4.72 ± 0.26 c	5.96 ± 0.27 c	8.12 ± 0.59 ab	1.62 ± 0.32 a

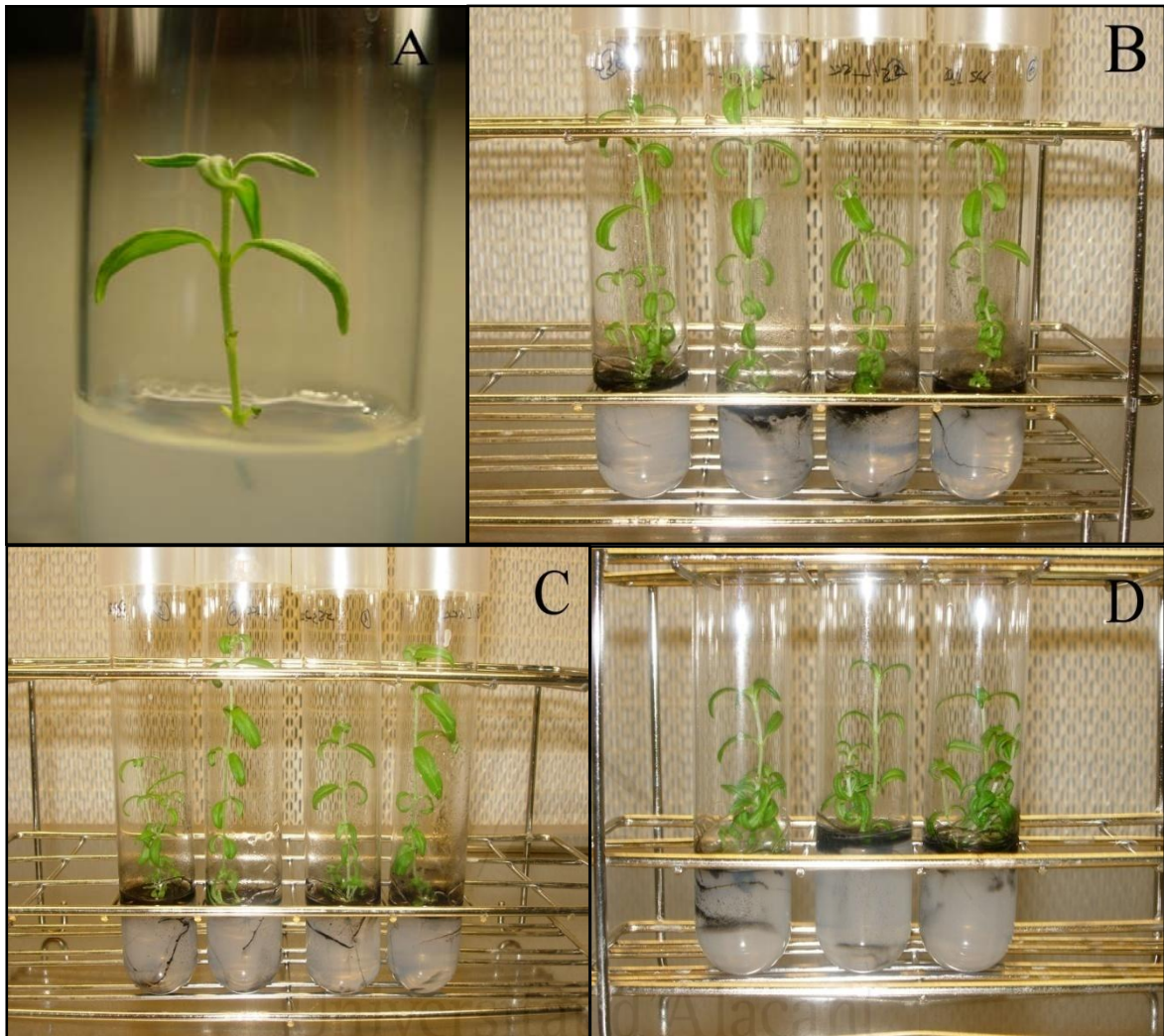
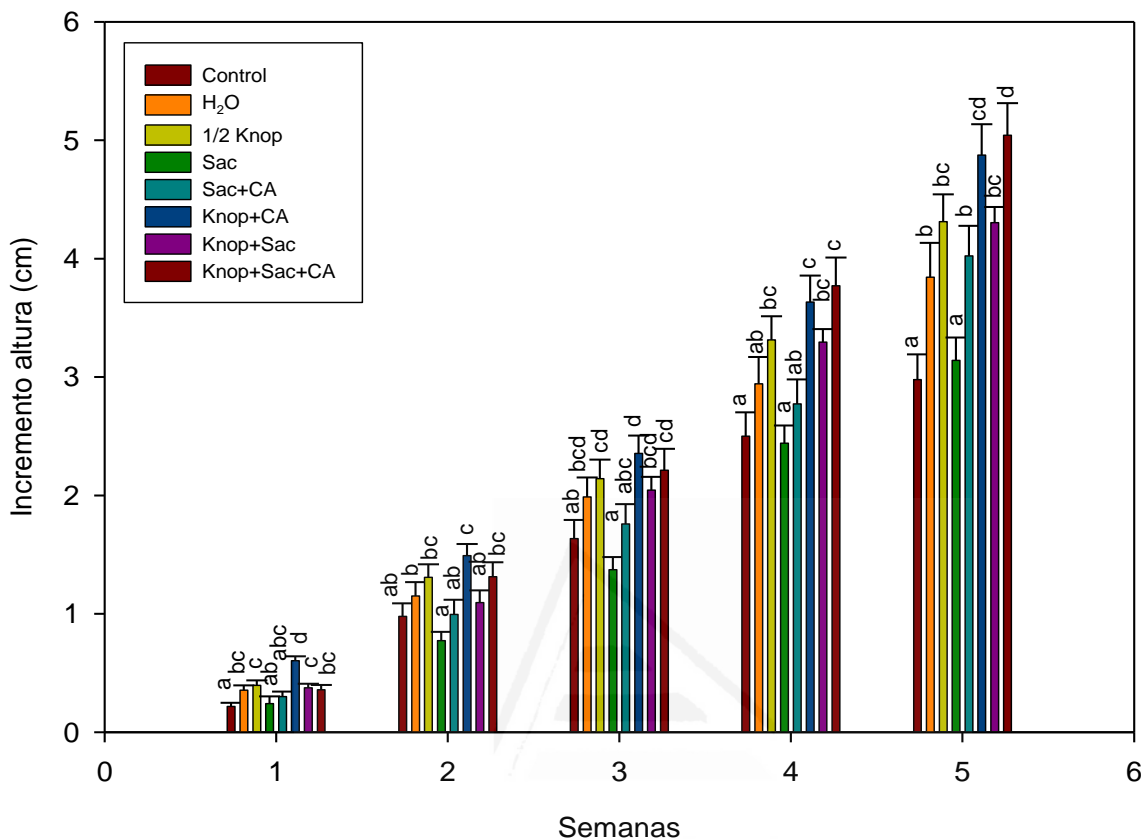


Figura 5. Efecto de la aplicación de un sistema en doble capa sobre el crecimiento de explantos de *Helianthemum marminorensis*. A) Explanto utilizado como material de partida para este experimento. B) DC+ sacarosa 20 g l⁻¹; C) DC + sacarosa 35 g l⁻¹; D) DC + sacarosa 50 g l⁻¹.

Observando los resultados del segundo ensayo (gráfica 1) se puede inferir que de los tres componentes que se incluyen en el medio líquido la sacarosa es el menos efectivo cuando se trata de optimizar la tasa de elongación. Aun así, el mejor resultado tras cinco semanas en cultivo se obtuvo con la aplicación de los tres componentes, si bien no resultó estadísticamente significativo de aquel que combinaba sales Knop y CA. Además, este último tratamiento fue significativamente el que mejor resultados proporcionó a lo largo de todo el experimento, de lo que se deduce que la aplicación de medio líquido con sales Knop a la mitad de concentración y 3 g l⁻¹ de CA sería, en principio, suficiente para conseguir una tasa óptima de elongación de explantos de *H. marminorensis*. Sin embargo, por los resultados de la quinta semana y debido a la falta

de información en lo que concierne al número de nudos y brotes en ésta última prueba se estableció como idónea la combinación de ½ sales Knop, 3 g l⁻¹ de CA y 20 g l⁻¹ de sacarosa para la elongación de explantos de esta especie.



Gráfica 1. Efecto de la aplicación de un sistema en doble capa sobre el crecimiento en altura de explantos apicales de *Helianthemum marminorense*. Se representa la media (n=24) ± ½ error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos.

Los sistemas en doble capa han sido empleados generalmente para promover la multiplicación (Díaz-Sala et al., 1990; Kozomara et al., 2008) elongación y enraizamiento de tallos micropropagados (De Rieck *et al.*, 1997; Maene & Debergh, 1985), además de prevenir desórdenes fisiológicos tales como la hiperhidratación (Kadota et al., 2001) y la necrosis apical (De la Viña et al., 2001). Se cree que estas diferencias en el crecimiento con respecto al medio en estado sólido pueden ser debidas a una mayor disponibilidad de los nutrientes en la fase líquida. En nuestro caso, además, la presencia de carbón activo podría posibilitar el secuestro de elementos inhibidores del crecimiento, como es el caso de algunos compuestos fenólicos (Fridborg et al., 1978). También es importante el papel que juega la sacarosa en el medio líquido. En este caso se ha observado un mayor incremento en altura con la concentración más baja de entre

las empleadas pero un incremento en el número de brotes en presencia de 50 g l^{-1} . Nuestros resultados muestran que este sistema mejora la elongación de *H. marminorensis*, pudiendo ser un método eficaz y rápido para la multiplicación de la especie sin el empleo de reguladores del crecimiento, ya que la longitud de los explantos está directamente relacionada con la aparición de nuevos nudos disponibles para nuevos subcultivos (tabla 3).



Figura 6. Efecto de diferentes combinaciones de los componentes del medio líquido de un sistema en doble capa sobre el crecimiento de explantos de *Helianthemum marminorensis*.
Leyenda: 1: Control; 2: agua; 3: sales Knop; 4: sacarosa; 5: sacarosa + CA; 6: sales Knop + CA; 7: sacarosa + Knop; 8: sacarosa+ sales de Knop + CA.

1.4.1.5. Aclimatación

Las plántulas se aclimataron con éxito consiguiéndose una tasa de supervivencia del 97% a las ocho semanas en las condiciones anteriormente descritas. Las plantas obtenidas no presentaron anomalías morfológicas (figura 7).



Figura 7. Ejemplares de *H. marminorensis* tras 8 semanas de aclimatación.

1.4.2. Micropropagación de *Astragalus nitidiflorus*

1.4.2.1. Esterilización e inicio del cultivo

El porcentaje de semillas germinadas tan sólo fue de un 15.62%. En algunos tubos se observó además la aparición de hongos cuando las semillas habían comenzado a germinar. Debido al escaso número de plántulas obtenidas de la germinación hubo que

esperar un año hasta obtener la cantidad de material necesaria para comenzar con los ensayos.

1.4.2.2. Optimización del medio de cultivo

Las plantas cultivadas en medio con sales de MS mostraron un mayor crecimiento en altura. Por otro lado, el medio con el que se obtuvo mayor número de hojas por explanto fue el que contenía sales y vitaminas de B5, aunque no se detectaron diferencias significativas con el resto. Sin embargo, las hojas formadas tanto en medio B5 como en GD eran de menor tamaño que las obtenidas en los medios WPM y MS (figura 8), además de presentar claros síntomas de clorosis. El medio B5 se distingue del MS por presentar niveles más bajos de NH_4^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . El medio GD, por otro lado, se compone de concentraciones más bajas de Mg^{2+} , Mn, Zn y S que el medio MS. En *Hibiscus rosa-sinensis* (Christensen et al., 2008) se ha visto que con bajos niveles de calcio el área foliar disminuye. En rosa se comprobó también que la adición de Ca^{2+} y Mg^{2+} a un medio solidificado con agar suponía la obtención de brotes de buena calidad y hojas de gran tamaño; además, cuando esos elementos eran añadidos a un medio con gelrite la tasa de multiplicación aumentaba significativamente (Podwyszynska & Olszewski, 1995). En otra especie de la familia de las leguminosas, *Lens culinaris*, se observó que el medio MS era mejor para el crecimiento que el medio B5, además de que era necesaria la adición de Ca^{2+} para evitar la necrosis apical (Ye et al., 2002).

La composición mineral del medio de cultivo es un factor determinante a la hora de obtener un buen crecimiento, desarrollo morfogénico y estado fisiológico de los explantos en cada una de las fases de la micropropagación (Ramage & Williams, 2002). A tenor de los resultados obtenidos es evidente que los explantos de *A. nitidiflorus* presentan deficiencias nutricionales, visibles principalmente en las hojas, cuando son cultivados en los medios B5 y GD.

Tabla 4. Efecto de diferentes medios de cultivo en el crecimiento de explantos de *Astragalus nitidiflorus* tras 5 semanas en cultivo. Se representa la media \pm EEM. Medias con letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos (n=24).

Medio de cultivo	Δ Altura (cm)	Número de hojas
GD	0.19 \pm 0.04a	2.83 \pm 0.30a
B5	0.40 \pm 0.05b	3.50 \pm 0.30a
WP	0.50 \pm 0.03bc	3.25 \pm 0.30a
MS	0.53 \pm 0.04c	2.88 \pm 0.22a

Así pues, seleccionamos el medio con sales de MS para el desarrollo de las siguientes etapas del protocolo de micropropagación. El uso de estas sales ya ha sido utilizado anteriormente para propagar una especie del mismo género (Turgut-Kara & Ari, 2006).

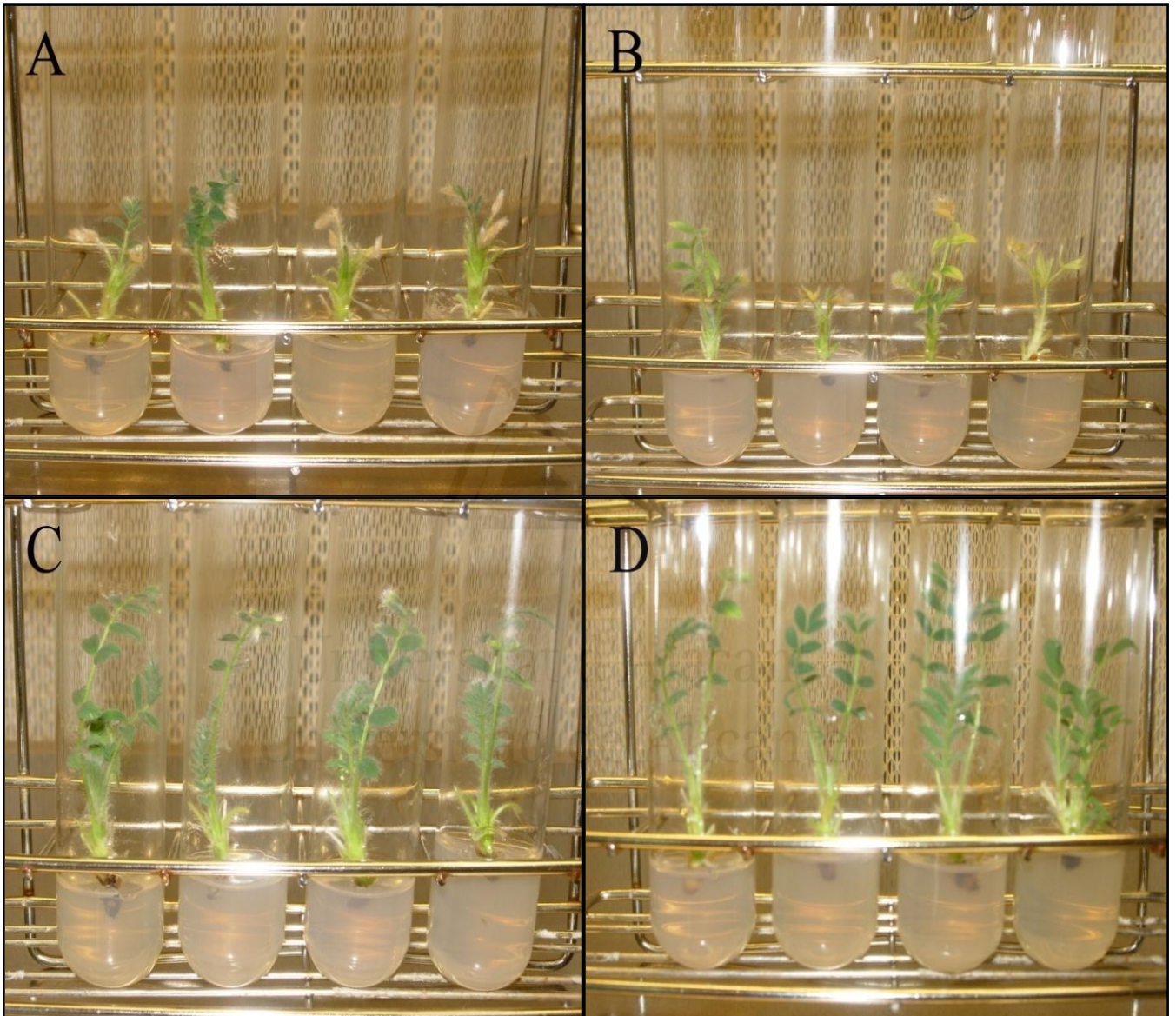


Figura 8. Efecto del tipo de medio de cultivo sobre el crecimiento de explantos apicales de *Astragalus nitidiflorus*. A) B5; B) GD; C) MS; D) WPM.

1.4.2.3. Multiplicación

Los resultados obtenidos en el ensayo de multiplicación se muestran en la tabla 5. Aunque conseguimos multiplicar el número de brotes inicial en todos los casos, la

respuesta obtenida estuvo claramente influenciada por el tipo de citoquinina empleada. Los datos muestran que en presencia de BA la proliferación de brotes fue superior a la obtenida con Kin, tal y como ocurre con otras especies de esta misma familia (Rout *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2002). Sin embargo, los brotes obtenidos con Kin fueron de mayor altura que los obtenidos con BA, respuesta observada también en otras especies (Amo-Marco & Ibañez, 1998; Ye *et al.*, 2002).

La dosis de BA que mayor tasa de multiplicación produjo fue 0.1 mg l⁻¹, siendo ésta significativamente diferente de todos los tratamientos excepto el de 0.5 mg l⁻¹ BA. Tras cinco semanas en medio sin reguladores el mayor número de brotes por explanto se consiguió en los tratamientos de 0.5 y 1 mg l⁻¹ de BA, aunque estos resultados no fueron significativamente diferentes de los obtenidos con la concentración más baja de BA (tabla 6). Es de destacar la formación de un único brote al final de las cinco semanas en medio con reguladores en la mayor parte de los tratamientos con BA, en contraste con la múltiple proliferación de brotes que suele producirse en respuesta a esta citoquinina (Ye *et al.*, 2002; Rout *et al.*, 2000). Este hecho ha sido descrito también en otras leguminosas como *Acacia senegal* (Badji *et al.*, 1993). Además se observó una reducción proporcional en el número de brotes y la altura de los mismos conforme aumentaba la concentración de BA.

Se detectaron también diferencias en la altura, siendo superior la detectada en presencia de Kin 1 mg l⁻¹ (tabla 5). De entre los tratamientos donde mayor tasa de multiplicación se obtuvo el que mayor incremento en altura produjo fue BA 0.1 mg l⁻¹.

Tabla 5. Efecto de la aplicación de citoquininas sobre la respuesta morfo genética tras cinco semanas de cultivo. Los datos se representan como media ± EEM. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos (n=24).

Tratamiento (mg l ⁻¹)		Altura (cm)	Δ Altura (cm)	Hojas nuevas	Brotes nuevos	Callo (%)
BA	Kin					
0	0	1.80 ± 0.08ab	0.20 ± 0.04a	3.4 ± 0.3a	0 ± 0a	0
0.1	0	1.76 ± 0.07ab	0.29 ± 0.04ab	7.3 ± 0.6d	1.5 ± 0.1d	12.5
0.5	0	1.64 ± 0.07a	0.25 ± 0.07ab	5.6 ± 0.7c	1.2 ± 0.1cd	12.5
1	0	1.75 ± 0.06ab	0.17 ± 0.03a	5.7 ± 0.7c	1.0 ± 0.2c	4.17
0	0.1	1.87 ± 0.10a	0.29 ± 0.05ab	3.5 ± 0.4ab	0.2 ± 0.1ab	0
0	0.5	1.83 ± 0.06ab	0.21 ± 0.04ab	3.5 ± 0.3ab	0.2 ± 0.1ab	0
0	1	1.89 ± 0.04b	0.34 ± 0.03b	5.0 ± 0.5bc	0.5 ± 0.1bc	0

La aplicación de BA desencadenó la aparición de callo (figura 9), sobre todo tras 5 semanas en medio basal después de los tratamientos, siendo este aumento más

acusado en presencia de BA 1 mg l⁻¹. Como en nuestro caso, la adición de citoquininas en el medio de multiplicación de explantos de *Limonium cavanillesii* desencadenó la aparición de callos de reducido tamaño (Amo-Marco & Ibañez, 1998). No es frecuente la aparición de modificaciones genéticas a partir de callos recién formados pero éstas pueden originarse si se subcultivan masas de brotes arrastrando el callo basal con ellas (George et al., 2008). Aunque en nuestro caso hay un elevado porcentaje de callo en el tratamiento con BA 0.1 mg l⁻¹ tras cinco semanas en medio sin reguladores (tabla 6), el callo formado es pequeño y puede ser fácilmente eliminado, lo que evitaría problemas como el anteriormente mencionado.

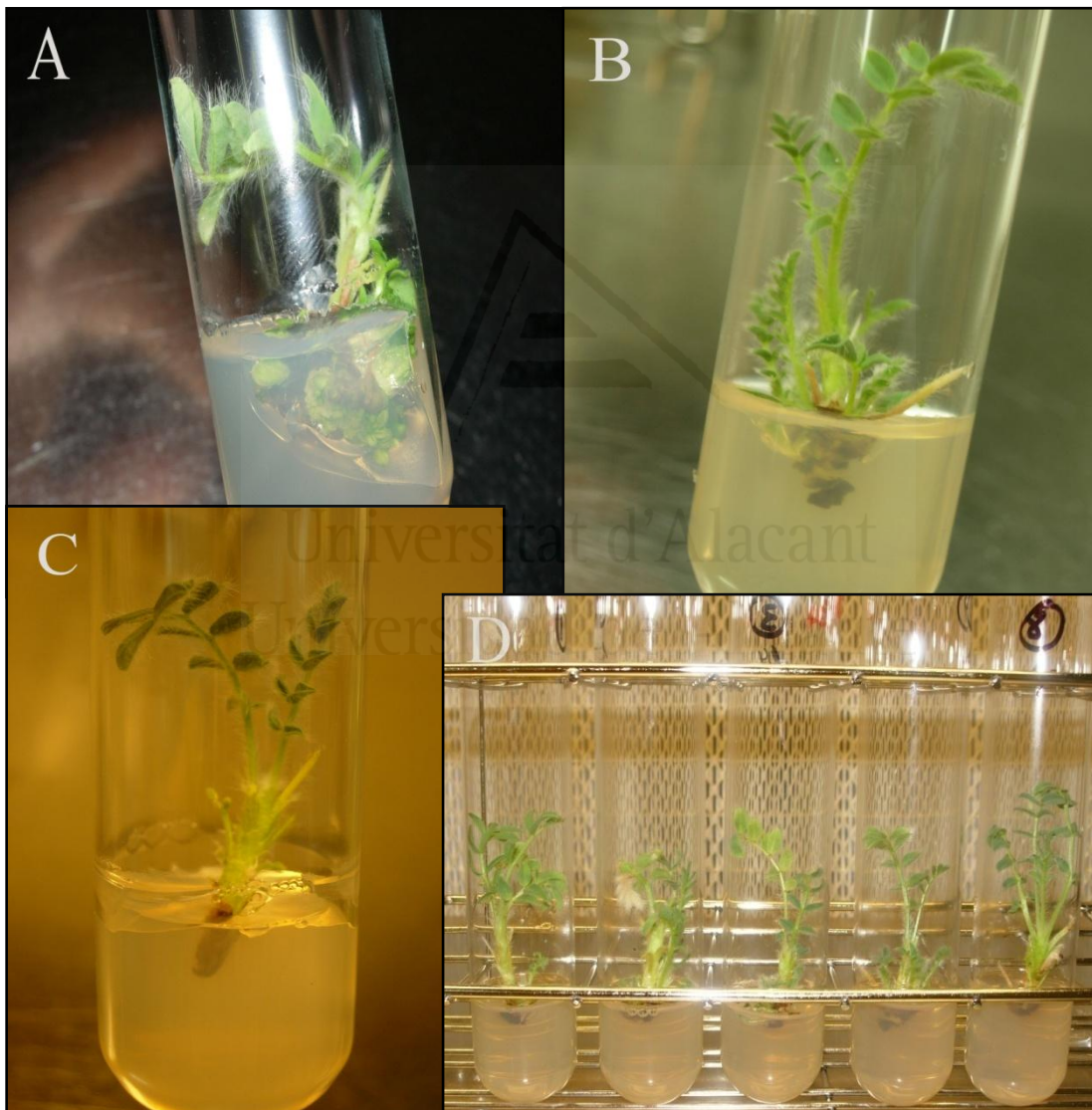


Figura 9. Efecto de la aplicación de citoquininas durante cinco semanas sobre la multiplicación y el crecimiento de explantos apicales de *Astragalus nitidiflorus*. A) BA 1 mg l⁻¹; B) BA 0.1 mg l⁻¹; C) Kin 0.5 mg l⁻¹; D) BA 0.1 mg l⁻¹.

Tabla 6. Características morfológicas de explantos tratados con citoquininas tras cinco semanas en medio libre de reguladores del crecimiento. Los datos se presentan como media \pm EEM. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos (n=24).

Tratamiento (mg l ⁻¹)		Altura (cm)	Δ Altura (cm)	Hojas nuevas	Brotes nuevos	Callo (%)
BA	Kin					
0	0	2.05 \pm 0.11a	0.25 \pm 0.06a	2.0 \pm 0.2a	0.1 \pm 0.1a	0
0.1	0	1.94 \pm 0.11ab	0.20 \pm 0.07a	2.9 \pm 0.3a	0.3 \pm 0.1ab	59.09
0.5	0	1.79 \pm 0.08b	0.15 \pm 0.04a	4.4 \pm 0.5b	0.5 \pm 0.2b	54.17
1	0	1.88 \pm 0.05ab	0.13 \pm 0.04a	5.4 \pm 0.7b	0.5 \pm 0.2b	83.33
0	0.1	2.06 \pm 0.11a	0.19 \pm 0.04a	2.9 \pm 0.3a	0.2 \pm 0.1ab	9.09
0	0.5	1.95 \pm 0.07ab	0.11 \pm 0.03a	2.0 \pm 0.2a	0.1 \pm 0.1a	8.33
0	1	2.09 \pm 0.05a	0.20 \pm 0.04a	1.7 \pm 0.2a	0.1 \pm 0.1a	0

1.4.2.4. Elongación

Ya vimos que el uso de un sistema en doble capa (DC) aumentó significativamente la altura de los explantos con respecto al control (sin medio líquido) tras cinco semanas en cultivo (tabla 3), observación que coincide con lo descrito en otras especies (De Riek *et al.*, 1997; Piqueras *et al.*, 1998). Este aumento se dio con todas las concentraciones de sacarosa probadas, no existiendo diferencias significativas entre ellas. Se observó también que el número de brotes por explanto aumentaba de forma proporcional a la concentración de sacarosa en el medio, así como el porcentaje de explantos enraizados (figura 10, tabla 7), tal y como han descrito otros autores (De Klerk, 2002).

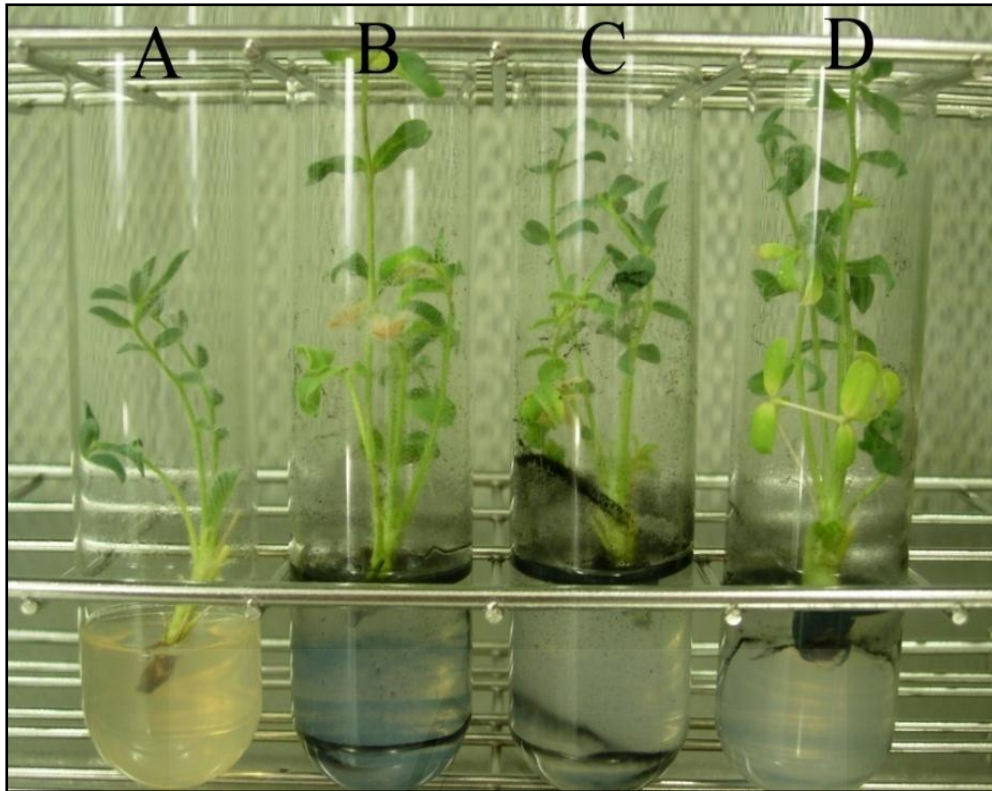


Figura 10. Efecto de la aplicación de un sistema en doble capa sobre el crecimiento de explantos apicales de *Astragalus nitidiflorus*. A) Control; B) sacarosa 20 g l⁻¹; C) sacarosa 35 g l⁻¹; D) sacarosa 50 g l⁻¹.

Las razones que justifican la mejora en la respuesta morfológica de los explantos a la DC pueden ser varias. Probablemente la más importante de ellas sea que la presencia de medio líquido en un sistema como éste permite una mejor difusión del sustrato una vez que se produce la rotura de la matriz de agar durante el crecimiento del explanto (De Riek *et al.*, 1997). El medio de cultivo sólido utilizado en nuestro caso no contenía reguladores, por lo que se deduce que en la elongación de los brotes de *Astragalus nitidiflorus* es importante tanto la presencia de carbón activo, compuesto relacionado con la adsorción de moléculas potencialmente inhibitoras del crecimiento (Fridborg *et al.* 1978), como de sacarosa. En el caso de la sacarosa es importante optimizar la concentración ya que, como se ha visto en esta especie, concentraciones más elevadas pueden suponer además una mejora en las tasas de multiplicación y de enraizamiento (George *et al.*, 2008).

Tabla 7. Efecto de la concentración de sacarosa presente en el medio líquido de un sistema en doble capa aplicado durante siete semanas sobre el crecimiento de explantos de *Astragalus nitidiflorus*. Medias con letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos (n=24).

Sacarosa (g l ⁻¹)	Δ Altura (cm)	Hojas nuevas	Brotes nuevos	Enraizamiento (%)
Control	0.35 ± 0.05 a	6.21 ± 0.41 a	0.12 ± 0.09 a	4.20
20	0.72 ± 0.12 b	7.58 ± 0.48 ab	0.25 ± 0.14 a	8.30
35	0.66 ± 0.07 b	7.26 ± 0.62 ab	0.39 ± 0.15 ab	13.0
50	0.80 ± 0.10 b	8.65 ± 0.63 b	0.74 ± 0.20 b	34.80

1.4.2.5. Enraizamiento

El enraizamiento de los brotes generados en la multiplicación constituye la etapa más crítica en las técnicas *in vitro*. Por ello, uno de los logros más importantes en el estudio del enraizamiento adventicio fue el reconocimiento de fases sucesivas en este proceso: inducción, iniciación y expresión (Hausman *et al.*, 1997), cada una de las cuales se ha asociado a determinados cambios en la concentración de hormonas, principalmente auxinas (De Klerk, 2002). Durante la fase de inducción tiene lugar un aumento rápido y breve en la concentración endógena de estas hormonas. La fase de iniciación se caracteriza por ser la fase de división y diferenciación celular, en la que la concentración de auxina es mínima, mientras que la fase de expresión está asociada a otro aumento en los niveles de auxina libre. Es en esta última fase cuando tiene lugar la formación y el crecimiento del primordio radicular (Gaspar *et al.*, 1994; citado en Heloir *et al.*, 1996). Teniendo en cuenta las fases fisiológicas del enraizamiento y los resultados obtenidos en la prueba anterior, se decidió emplear dos medios de enraizamiento (inducción y expresión).

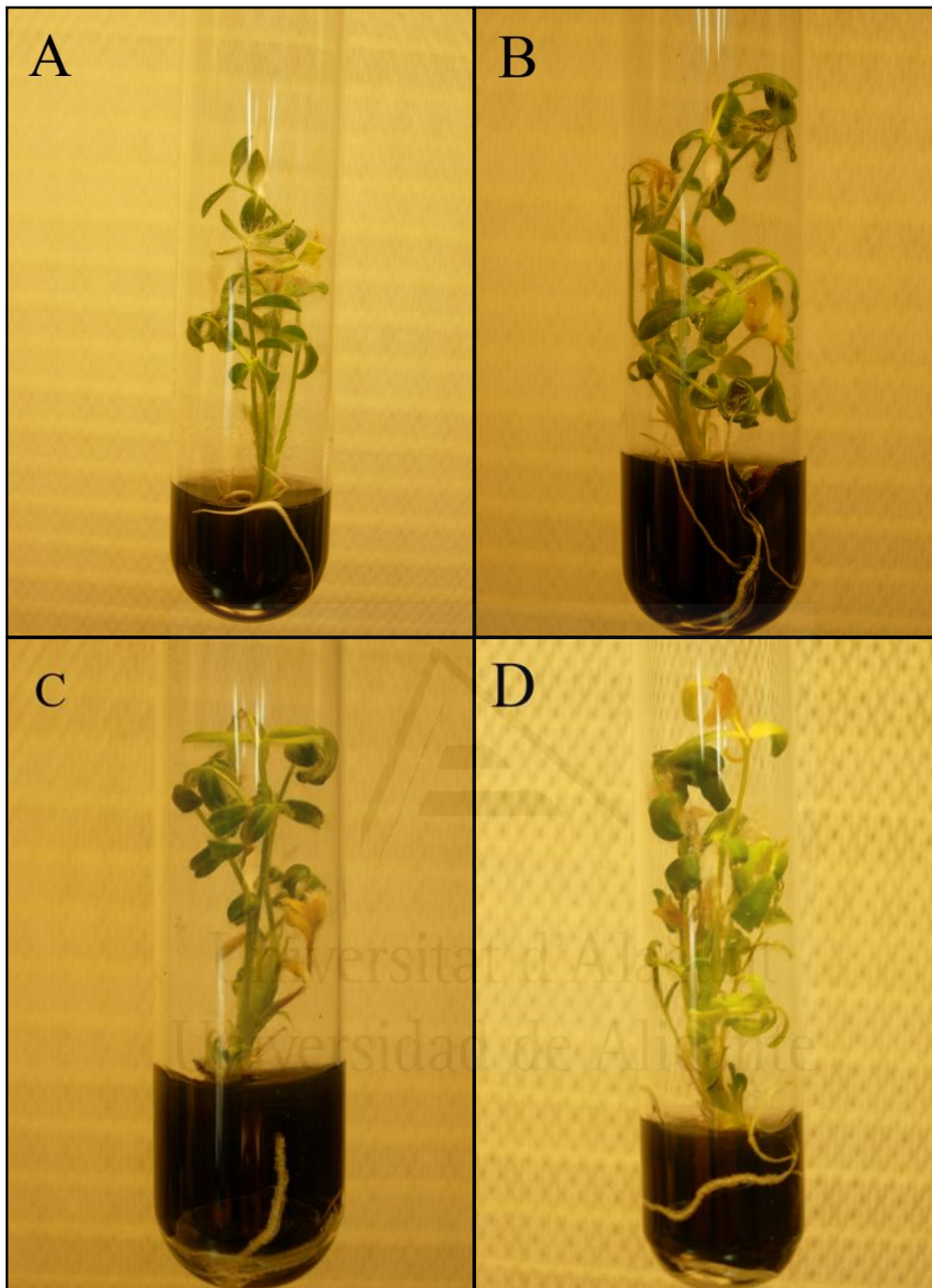


Figura 11. Explantos enraizados mediante la aplicación de diferentes tratamientos de inducción: A) Control, B) Dos días con 0.5 mg l⁻¹ AIA, C) Cuatro días con 0.5 mg l⁻¹ AIA; D) Dos días con 2 mg l⁻¹ AIA.

El mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo tras la aplicación de 0.5 mg l⁻¹ de AIA en un medio de inducción durante 4 días (tabla 8). Sin embargo se obtuvieron resultados similares en el tratamiento control (41.2%), lo que nos lleva a pensar que tanto la composición mineral como el carbón activo podrían ser esenciales en el

enraizamiento de explantos de esta especie. El papel de la concentración mineral en esta fase ha sido descrito con anterioridad (Gonçalves et al., 2005; Morte & Honrubia, 1992), siendo muy común el uso de diluciones de la composición mineral inicial con el objetivo de favorecer el enraizamiento (Joshi & Dhar, 2003; Díaz-Sala et al., 1990). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Turgut-Kara y Ari (2006) con *Astragalus maximus* donde solo se obtuvo enraizamiento con MS a la mitad de su concentración. El carbón activo, por su parte, ha sido utilizado en numerosas ocasiones para optimizar el enraizamiento (George et al., 2008; De la Viña et al., 2001; Sujatha & Hazra, 2007). En *Paeonia suffruticosa* (Bouza et al., 1994), la adición de este compuesto al medio de enraizamiento no solo supuso una mejora en el crecimiento radicular y en el número de raíces por explanto, sino que también redujo la aparición de callo. Además de oscurecer el medio, pudiendo favorecer así la acumulación de auxinas fotosensibles en la base del explanto (Pan & Van Staden, 1998), se ha demostrado que este compuesto adsorbe los reguladores del crecimiento que pudiera haber en el medio de cultivo (Pan & Van Staden, 1998; Thomas, 2008) y compuestos inhibidores del crecimiento (Sánchez et al, 1996).

Tabla 8. Efecto de la concentración de AIA y el periodo de inducción sobre el enraizamiento de brotes de *Astragalus nitidiflorus* (n=20).

Concentración de AIA (mg l ⁻¹)	Enraizamiento (%)	
	Periodo de inducción (días)	
	2	4
0	41.2	30
0.5	20	46.7
1.0	25	40
2.0	35	26.7

1.4.2.6. Aclimatación

El porcentaje de plántulas que sobrevivieron a la aclimatación fue de un 75%. Esta especie no presentó problemas al comienzo de la aclimatación pero sí se observó que tras un periodo de 4 ó 6 semanas algunas de las plántulas se secaron.



Figura 12. Plántulas de *Astragalus nitidiflorus* tras 1 (izquierda) y 2 (derecha) meses de aclimatación.

1.4.3. Micropropagación de *Tamarix boveana*

1.4.3.1. Esterilización y establecimiento *in vitro*

El porcentaje de esterilización obtenido con el protocolo descrito en Material y métodos fue de un 92.2%. No obstante, muchos explantos se secaron en las horas siguientes y el porcentaje de supervivencia descendió a un 43.6% en promedio. Los explantos supervivientes fueron subcultivados a medio fresco tras 6-8 semanas.

1.4.3.2. Optimización del medio de cultivo

La mejor respuesta se obtuvo tanto con WPM como con MS y este último diluido a la mitad, con resultados similares en las dos variables estudiadas (incremento de altura y de número de brotes) (tabla 9). Aunque el contenido en sales del medio WPM es menor que el de MS, la respuesta de esta especie en ambos medios no fue significativamente diferente. De los resultados obtenidos en el medio MS con vitaminas de WPM se desprende que la tiamina añadida a una concentración 10 veces superior a la presente en MS (1 mg l^{-1}) no favorece el crecimiento de explantos de *Tamarix boveana*. En el desarrollo del protocolo de micropropagación de *T. gallica* (Lucchesini et al.,

1993) se utilizó medio Linsmaier & Skoog (1965), cuya diferencia con respecto al medio MS radica principalmente en la concentración de tiamina, siendo cuatro veces superior en el primero. Sin embargo, la ausencia de datos sobre la respuesta de *T. gallica* a otras composiciones minerales nos impide establecer comparaciones. Es de destacar que la mitad de los explantos cultivados en presencia de MS al doble de concentración se secaron. Empleamos esta composición mineral para comprobar si esta especie, que en condiciones naturales es halófito, podía funcionar mejor en medios con alta concentración de sales. Por las similitudes encontradas en las dos variables analizadas entre los medios MS y WPM y debido a que el primero presenta una concentración de sales más parecida al medio natural en el que se encuentra la especie, se seleccionó el medio con sales y vitaminas de MS para la realización de posteriores ensayos.

Tabla 9. Efecto de la combinación de sales del medio de cultivo en el crecimiento de explantos de *Tamarix boveana*. Los datos se representan como media \pm EEM. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (n=24).

	Δ Altura	Δ Número brotes
MS	3.60 \pm 0.31 abc	16.05 \pm 1.20 a
2MS	2.24 \pm 0.51 a	14.73 \pm 1.43 ab
1/2MS	3.75 \pm 0.50 bc	13.50 \pm 1.17 ab
WPM	4.37 \pm 0.49 c	16.00 \pm 1.26 a
MS+vit WPM	2.79 \pm 0.47 ab	11.75 \pm 1.19 b

1.4.3.3. Multiplicación

Como ya comentamos en el apartado 1.3.3.3 de este capítulo, en un primer ensayo evaluamos diferentes concentraciones de citoquininas (0.25-1 mg l⁻¹) en medio sólido: BA, 2iP y tidiazurón. Los explantos tratados con BA y 2iP no mostraron crecimiento alguno (datos no mostrados). Además se observó ausencia de raíces, cuya aparición fue completamente inhibida por la presencia de citoquininas, tal y como también se ha descrito en el caso de *T. gallica* (Lucchesini et al., 1993). Esto es un problema muy importante porque hemos visto que en *T. boveana* la falta de enraizamiento desencadena directamente la muerte del explanto. En el caso de los explantos tratados con TDZ aunque no murieron presentaron malformaciones debidas

probablemente a que la concentración aplicada no resultó óptima para esta especie (Huetteman & Preece, 1993).

En vista de los resultados negativos obtenidos realizamos un segundo experimento con explantos ya enraizados en medio MS basal estudiando las mismas concentraciones de citoquininas, a excepción del TDZ (0.01-0.03 mg l⁻¹). De nuevo, la mayor tasa de multiplicación tras 8 semanas la obtuvimos en el tratamiento control (datos no mostrados), en el cual también observamos una mayor elongación de los explantos, lo cual permitió la obtención de mayor número de explantos nodales capaces de enraizar por sí mismos. En *T. gallica* se vio que los brotes generados en un primer ciclo con BA no respondían a esta citoquinina en el siguiente subcultivo. La mayor tasa de multiplicación se obtuvo, sin embargo, mediante el uso de AIB a 0.2 mg l⁻¹ (Lucchesini et al., 1993). En *T. boveana* el uso combinado de citoquininas y auxinas en el medio de multiplicación tampoco supuso una mejora en la tasa de multiplicación respecto al tratamiento sin reguladores.

Debido a los malos resultados obtenidos en estos dos experimentos realizamos un tercero en el que volvimos a probar el efecto de TDZ en medio sólido y también formando parte del medio líquido de un sistema en doble capa. Como se observa en la tabla 10, la presencia de TDZ en el medio de cultivo no mejoró el crecimiento y la multiplicación con respecto al control, lo que difiere de la mayoría de trabajos donde se ha aplicado este mismo compuesto en medio sólido (Upreti & Dhar, 1996; Mondal et al., 1998; Chand et al., 1999). El uso de un medio de cultivo sin reguladores ha ofrecido mejores resultados que con ellos, lo que coincide con lo observado por Arrabal et al. (2002) en su trabajo con *Crypthantus sinuosus* (Arrabal et al., 2002), donde el uso de un medio de cultivo sin reguladores generaba elevadas tasas de multiplicación, comparables a las obtenidas en presencia de citoquininas y/o auxinas, lo que resulta beneficioso a la hora de preservar la estabilidad genética de las plantas a conservar (Edson et al., 1996). De esta forma, el cultivo en medio MS sin reguladores continúa siendo la opción más adecuada.

Tabla 10. Efecto de la aplicación de TDZ en medio sólido sobre el crecimiento y la multiplicación de explantos apicales de *Tamarix boveana*. Los datos se representan como media \pm EEM. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos (n=24).

	Δ Altura	Δ Número brotes
Control	2.8 \pm 0.4 a	12.8 \pm 6.4 a
0.01 mg l⁻¹ TDZ	0.24 \pm 0.12 b	1.48 \pm 1.78 b
0.05 mg l⁻¹ TDZ	0.13 \pm 0.11 b	0.78 \pm 1.06 b
0.1 mg l⁻¹ TDZ	0.13 \pm 0.1 b	1.22 \pm 1.35 b
0.5 mg l⁻¹ TDZ	0.11 \pm 0.05 b	0.7 \pm 1.25 b

El empleo de estos sistemas en doble capa permite una mayor disponibilidad de los nutrientes y los reguladores del crecimiento presentes en él (Smith & Spomer, 1995). Estos sistemas han sido aplicados en otras especies con el fin de promover la multiplicación de brotes, dando buenos resultados en peral japonés (Kadota et al., 2001) y en *Chimonantus praecox* (Kozomara et al., 2008). En aguacate Barceló et al. (1999) encontraron que el uso de doble capa tras un periodo de cultivo en medio líquido generaba mejores tasas de multiplicación y explantos de mayor calidad que el cultivo continuo en doble capa.

Los resultados de aplicar TDZ en un sistema en doble capa (tabla 11) muestran que la aplicación de 0.01 mg l⁻¹ de TDZ en la fase líquida condujo a una mejora en altura, con respecto al control, mientras que no se vieron diferencias en el número de brotes generados. El uso de concentraciones superiores a 0.01 mg l⁻¹ TDZ provocó la aparición de explantos de menor altura y menor número de brotes. El uso de bajas concentraciones de TDZ para promover la multiplicación ha tenido buenos resultados en *Pongamia pinnata* (Sujatha & Hazra, 2007) y *Bauhinia vahlii* (Upreti & Dhar, 1996).

Tabla 11. Efecto de la aplicación de TDZ en un sistema de doble capa sobre el crecimiento y multiplicación de explantos apicales de *Tamarix boveana*. Los datos se representan como media \pm EEM. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos.

	Δ Altura	Δ Número brotes
Control	3.62 \pm 2.06 a	11.59 \pm 5.42 a
0.01 mg l⁻¹ TDZ	4.78 \pm 1.93 b	11.35 \pm 3.86 a
0.05 mg l⁻¹ TDZ	1.14 \pm 0.87 c	4.65 \pm 3.07 b
0.1 mg l⁻¹ TDZ	0.69 \pm 0.46 c	2.43 \pm 2.86 c
0.5 mg l⁻¹ TDZ	0.46 \pm 0.38 c	2.16 \pm 2.19 c

En general, el uso de TDZ ha tenido gran éxito en la multiplicación cuando es aplicado en inmersiones durante periodos variables de tiempo (Prathanturarug et al., 2005; Siddique & Anis, 2007; Singh & Syamal, 2001). En té (Sandal et al., 2001) se encontró que la inmersión en TDZ a una concentración de entre 0.55 y 1.1 mg l⁻¹ durante 6-8 semanas aumentaba progresivamente la tasa de multiplicación. Por otro lado, y aunque menos frecuentemente, también se ha aplicado este regulador en sistemas de doble capa. Tal es el caso de *Fraxinus*, donde se ha visto que el empleo de TDZ tanto en el medio sólido como en el líquido favorece la proliferación de brotes axilares (Van Sambeek & Preece, 2007). Aunque en nuestro caso se suplementó el medio líquido con sales Knop diluidas a la mitad y 50 g l⁻¹ sacarosa, a tenor de los resultados obtenidos en las dos últimas pruebas, sobre todo en los controles, se puede inferir que el TDZ ejerce algún efecto sobre el crecimiento, en nuestro caso la altura, lo que coincide con lo observado por Chand et al. (1999) en *Colocasia esculenta*. Sin embargo, el efecto principal del TDZ sobre la elongación ha sido inhibitorio en la inmensa mayoría de las condiciones ensayadas en este trabajo, es decir, su uso ha supuesto la obtención de brotes de menor longitud que los obtenidos con otras citoquininas (Bosela & Michler, 2008). Aun así, es necesario destacar que en nuestro caso se aplicó el medio líquido con TDZ cuando los explantos ya habían comenzado a enraizar, lo que facilita, como ya se ha dicho anteriormente, el crecimiento de esta especie sin necesidad de aplicar reguladores del crecimiento.

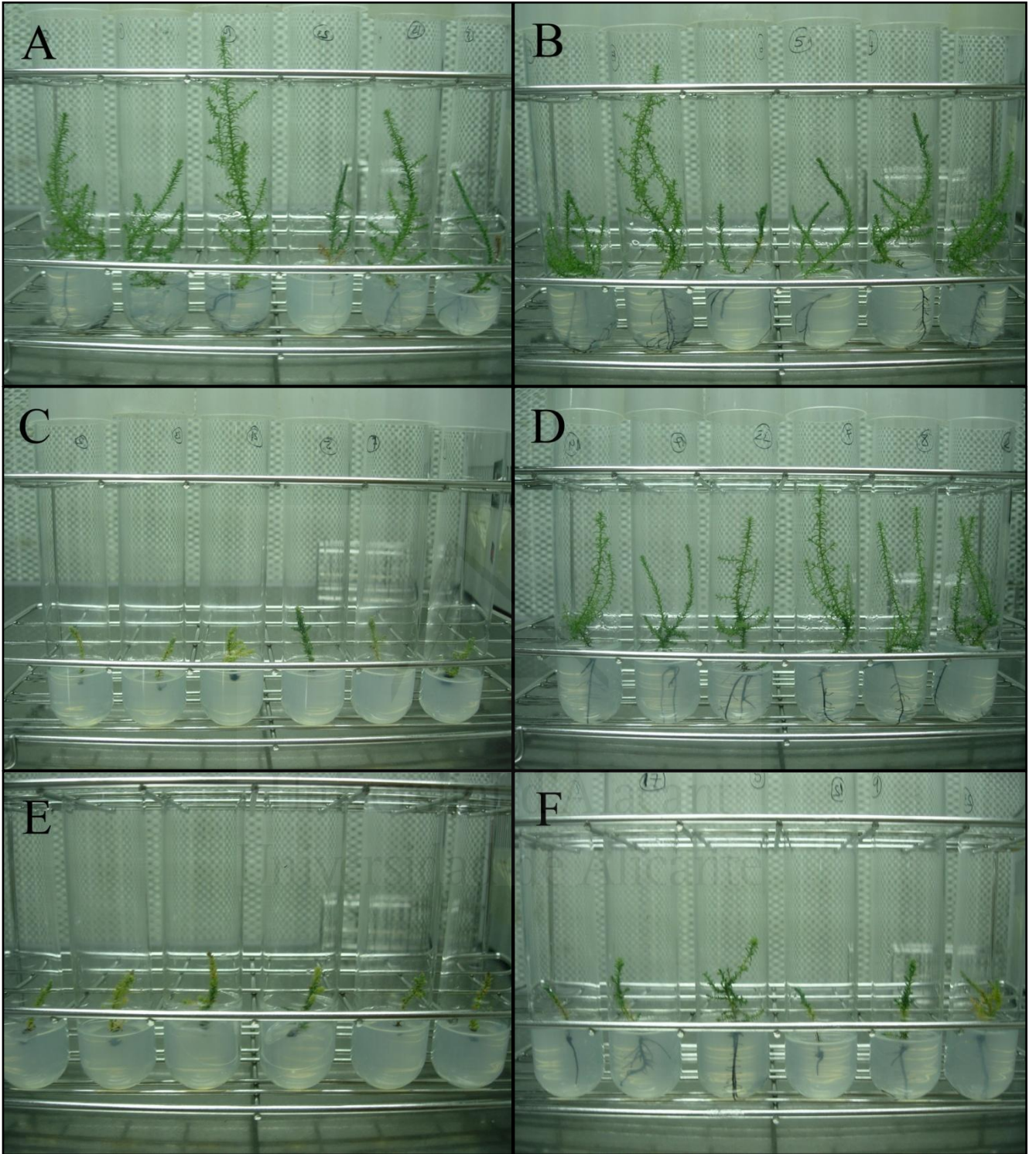


Figura 13. Efecto de la aplicación de TDZ en la multiplicación de *Tamarix boveana*. El TDZ se aplicó tanto en medio sólido (columna izquierda) como en un sistema de doble capa (columna de la derecha): A y B) Control en medio sólido y en doble capa, respectivamente; C y D) TDZ 0.01 mg l⁻¹; E y F) TDZ 0.05 mg l⁻¹.

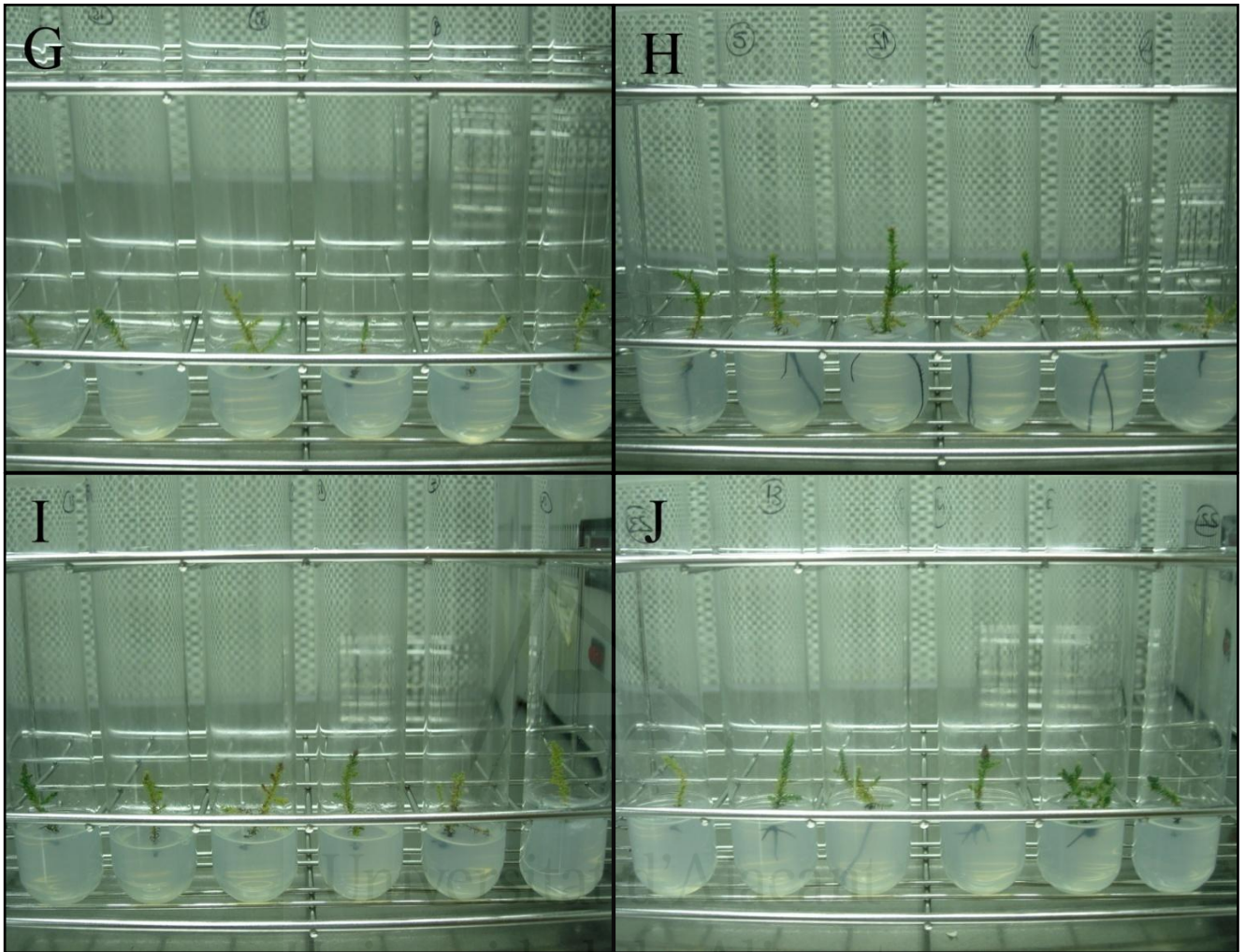
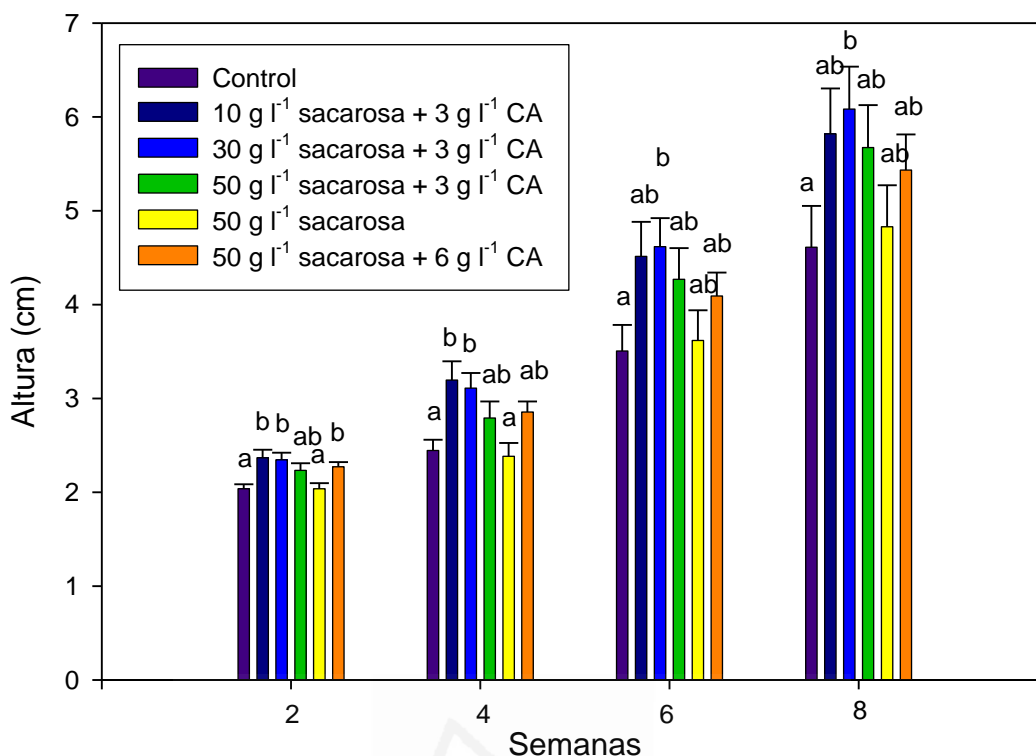


Figura 13 (cont.). Efecto de la aplicación de TDZ en la multiplicación de *Tamarix boveana*. El TDZ se aplicó tanto en medio sólido (columna izquierda) como en un sistema de doble capa (columna de la derecha): G y H) TDZ 0.1 mg l⁻¹; I y J) TDZ 0.5 mg l⁻¹.

1.4.3.4. Elongación y enraizamiento

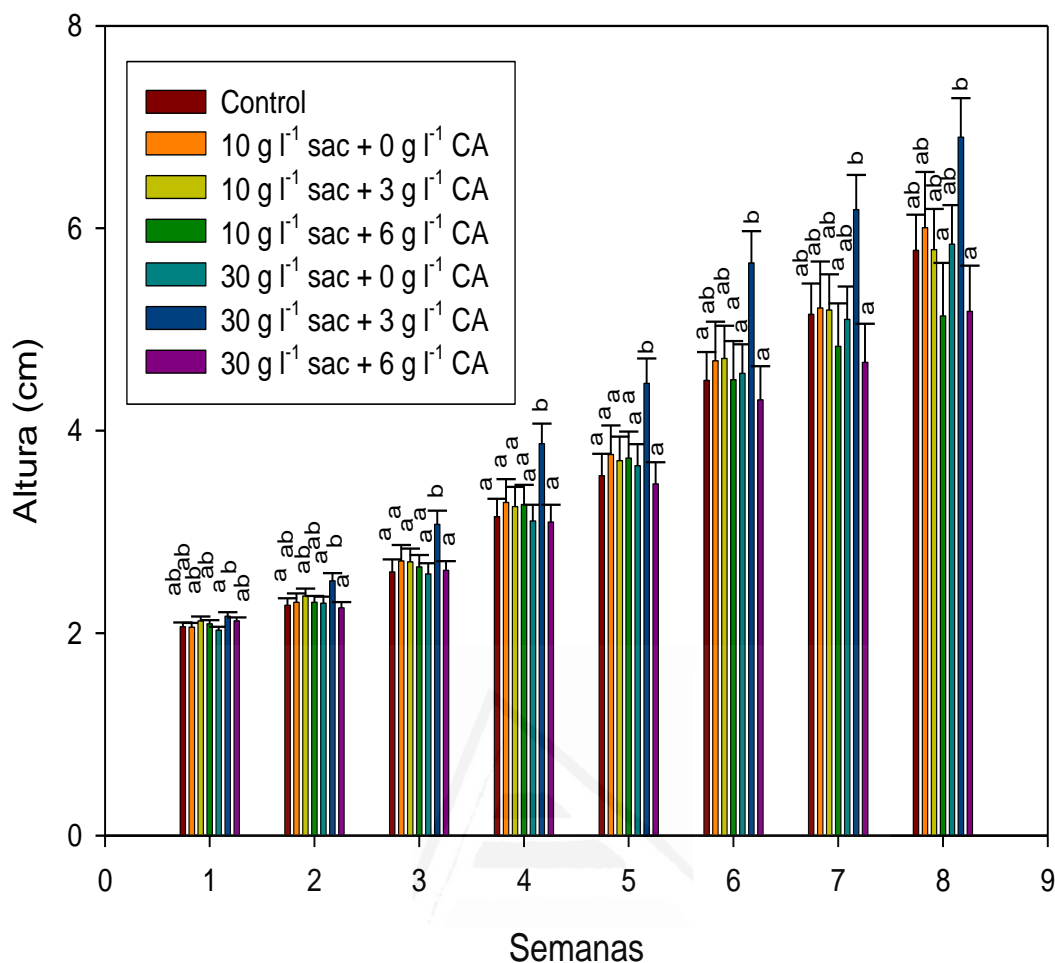
En el primer ensayo de doble capa las concentraciones de sacarosa más bajas fueron las que proporcionaron mejores resultados (gráfica 2), siendo los incrementos en altura significativamente distintos desde las primeras semanas del experimento. Para optimizar la tasa de elongación se realizó un segundo experimento en el que se combinaron los niveles más bajos de sacarosa con diferentes concentraciones de carbón activo. Los resultados se muestran en la gráfica 3.



Gráfica 2. Efecto de la aplicación de un sistema en doble capa sobre la elongación de explantos apicales de *Tamarix boveana*. Se representa el valor medio (n = 24) + ½ error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos.

Así, el único tratamiento que mostró diferencias significativas respecto al resto fue el que contenía 30 g l⁻¹ de sacarosa y 3 g l⁻¹ de carbón activo, al igual que en el experimento anterior. El carbón activo empleado a elevada concentración no dio buenos resultados, a excepción de lo observado en el primer experimento donde la aplicación de 6 g l⁻¹ de carbón activo con 50 g l⁻¹ de sacarosa generó un incremento de altura significativamente distinto al obtenido en el control. Los resultados obtenidos sugerirían que el CA a esa concentración podría estar adsorbiendo determinadas sustancias potencialmente inductoras del crecimiento, como algunos reguladores del crecimiento (Pan & Van Staden, 1993; Thomas, 2008). Sin embargo, considerando colectivamente los resultados obtenidos en los dos ensayos hemos de concluir que el uso de CA a una concentración moderada es esencial a la hora de promover la elongación. En este sentido también hay que recordar que se le ha atribuido la capacidad de adsorción de moléculas potencialmente inhibidoras del crecimiento, como es el caso de determinados compuestos fenólicos (Fridborg et al., 1978).

Además, y como se ha demostrado anteriormente, es necesario optimizar la concentración de sacarosa en el medio líquido, ya que los efectos que ésta ejerce varían según la especie. Piqueras et al. (1998) observaron en *Nicotiana tabacum* que el uso de altas concentraciones de sacarosa (50 g l^{-1}) en el medio líquido favorecía la elongación de los brotes debido, probablemente a la reducida tasa de absorción de citoquinina como consecuencia del efecto osmótico generado. En nuestro caso no había citoquininas en ninguno de los medios. Además, tal y como hemos visto en las tres especies estudiadas, el uso de sacarosa a la misma concentración en ambos medios ha aportado incrementos en las tasas de elongación, de lo que se deduce que 1) no se han producido cambios de potencial osmótico que pudieran estar limitando la tasa de absorción de nutrientes y 2) el aumento en la elongación esta favorecido, en nuestro caso, por una mayor absorción de nutrientes y/ o agua. En relación a esto último, se ha comprobado también que la adición de sacarosa en el medio líquido fue la responsable del incremento en la actividad de las invertasas y de la sacarosa sintasa y, en definitiva, de la activación del metabolismo de carbohidratos en *Nicotiana tabacum* (Piqueras et al., 1998).



Gráfica 3. Segundo ensayo para estudiar el efecto de un sistema en doble capa sobre la elongación de explantos apicales de *Tamarix boveana*. Se representa el valor medio (n = 24) + ½ error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos.

En algunos casos se ha observado, por el contrario, que el uso de sistemas en doble capa desencadena efectos adversos como hiperhidratación (Barceló et al., 1999; Gaspar et al., 2004), estomas anormales, depósitos de cera epicuticular anómalos y baja capacidad de enraizamiento (De la Viña et al., 2001). Mientras que el crecimiento se ve favorecido por la elevada disponibilidad de nutrientes en el medio líquido, la presencia de tan elevada cantidad de agua puede provocar, en ocasiones, la aparición de esos inconvenientes (De la Viña et al., 2001).

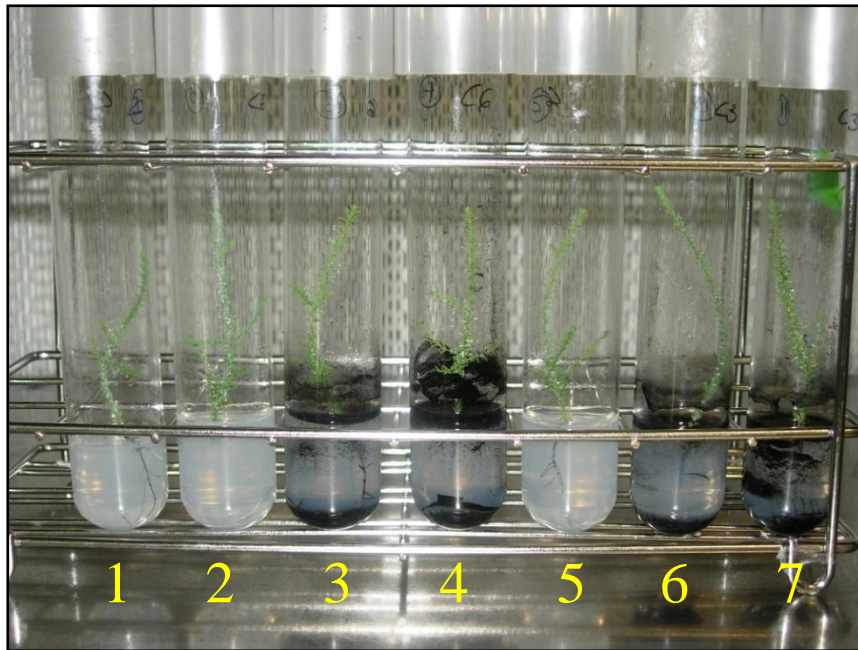


Figura 14. Efecto de la composición del medio líquido en un sistema en doble capa sobre la elongación de explantos de *Tamarix boveana*:

- | | |
|---|---|
| 1) Control | 2) 10 g l ⁻¹ sacarosa |
| 3) 10 g l ⁻¹ sacarosa + 3 g l ⁻¹ CA | 4) 10 g l ⁻¹ sacarosa + 6 g l ⁻¹ CA |
| 5) 30 g l ⁻¹ sacarosa | 6) 30 g l ⁻¹ sacarosa + 3 g l ⁻¹ CA |
| 7) 30 g l ⁻¹ sacarosa + 6 g l ⁻¹ CA | |

1.4.3.5. Aclimatación

Fue necesario el uso de una solución fungicida por la aparición masiva de hongos durante los primeros días de aclimatación de esta especie (datos no mostrados). A pesar de ello, alcanzamos una tasa de supervivencia del 85% tras ocho semanas de aclimatación.



Figura 15. Ejemplares de *T. boveana* tras 1 (arriba) y 3 meses (abajo) de aclimatación.

1.5. Conclusiones

1.5.1. Micropropagación de *Helianthemum marminorensis*

1) El protocolo de esterilización consistente en el uso de HgCl_2 al 0.2% durante 10 minutos, etanol al 70% durante 30 segundos y lejía comercial al 15% durante 10 minutos es eficaz para la obtención de explantos libre de agentes contaminantes.

2) El uso sales y vitaminas de WPM es idóneo para el establecimiento de esta especie *in vitro*, además de ofrecer buenos resultados en lo que a crecimiento se refiere

3) El cultivo sin reguladores es un método de multiplicación efectivo, que además evita efectos negativos por la aplicación de reguladores.

4) El sistema en doble capa favorece la elongación y enraizamiento de la especie. El medio sólido contiene sales y vitaminas de WPM, 20 g l⁻¹ de sacarosa y 6 g l⁻¹ de agar. El medio líquido se compone de sales Knop a la mitad de su concentración, 20 g l⁻¹ de sacarosa y 3 g l⁻¹ de CA.

5) Las plántulas se aclimataron con éxito en una mezcla de turba-vermiculita 1:1 a temperatura, humedad y fotoperiodo controlados en un periodo de seis semanas.

1.5.2. Micropropagación de *Astragalus nitidiflorus*

1) La aplicación de etanol al 70% durante 1 minuto y lejía comercial al 20% durante 20 minutos fue eficaz para la esterilización de semillas. Para la germinación de las mismas fue necesaria la escarificación en agua caliente durante 30 minutos.

2) El uso de sales y vitaminas de MS es idóneo para el establecimiento de esta especie *in vitro*, además de ofrecer buenos resultados en altura y número de hojas por explanto.

3) El cultivo con 0.1 mg l⁻¹ de BA ofrece la mejor opción para la multiplicación de esta especie, tanto por el número de brotes formados como por la altura de los mismos.

4) El sistema en doble capa es un método que favorece tanto la elongación y enraizamiento de la especie como la formación de nuevos brotes. El medio sólido contiene sales y vitaminas de MS, 30 g l⁻¹ de sacarosa, 6 g l⁻¹ de agar y 10 mg l⁻¹ de Fe-sequestrene[®]. El medio líquido se compone de sales Knop a la mitad de su concentración, 50 g l⁻¹ de sacarosa y 3 g l⁻¹ de CA.

5) Es necesario el uso de un medio de inducción y otro de expresión para optimizar el enraizamiento. El medio de inducción contiene sales y vitaminas de MS diluidas a la mitad, 30 g l⁻¹ de sacarosa, 10 mg l⁻¹ de Fe-sequestrene[®], 6 g l⁻¹ de agar y 0.5 mg l⁻¹ de AIA. El medio de expresión tiene los mismos componentes que el de inducción menos el AIA que es reemplazado por 0.9 g l⁻¹ de CA.

6) Las plántulas se aclimataron con éxito en una mezcla de turba-vermiculita 1:1 a temperatura, humedad y fotoperiodo controlados en un periodo de seis semanas.

1.5.3. Micropropagación de *Tamarix boveana*

1) El protocolo de esterilización consistente en el uso de un fungicida (Beltanol-L) al 0.1% durante 15 minutos, etanol al 70% durante 1 minuto y lejía comercial al 15% durante 15 minutos es eficaz para la obtención de explantos libres de microorganismos.

2) El uso de sales y vitaminas de MS es idóneo para el establecimiento de esta especie *in vitro*, ofreciendo óptimos resultados en altura y número de brotes por explanto.

3) El cultivo en doble capa es un método de multiplicación efectivo tanto para optimizar la altura como para la formación de nuevos brotes. El medio sólido debe contener sales y vitaminas de MS, 30 g l⁻¹ de sacarosa y 6 g l⁻¹ de Plant agar. Sales de Knop a la mitad de su concentración, 50 g l⁻¹ de sacarosa y 0.01 mg l⁻¹ de TDZ constituyen la combinación adecuada para el medio líquido.

4) El sistema en doble capa es un método que favorece la elongación y enraizamiento de la especie. El medio sólido contiene sales y vitaminas de MS, 30 g l⁻¹ de sacarosa y 6 g l⁻¹ de Plant agar. El medio líquido se compone de sales Knop a la mitad de su concentración, 30 g l⁻¹ de sacarosa y 3 g l⁻¹ de CA.

5) Las plántulas se aclimataron con éxito en una mezcla de turba-vermiculita 1:1 rociada con una solución de fungicida comercial (Compo) a temperatura, humedad y fotoperiodo controlados en un periodo de ocho semanas.

Capítulo 2. Poliaminas y enraizamiento *in vitro*

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

2.1 Introducción

Las poliaminas (PA) son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que intervienen en numerosos procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular tanto en organismos procariotas como en eucariotas (Baron & Stasolla, 2008). Su actividad biológica diversa se ha atribuido a la naturaleza policatiónica de estas moléculas, derivada de la presencia de 2 o más grupos $-NH_2$, que a pH fisiológico pueden mostrar carga positiva (Martín-Tanguy, 2001).

Las PA pueden aparecer en las células en forma libre pero también, y como consecuencia de la reactividad derivada de sus cargas eléctricas, unidas a moléculas pequeñas como los ácidos fenólicos (originando lo que se conoce como formas conjugadas), pero también a macromoléculas como proteínas o incluso a estructuras como membranas, pared u orgánulos (formas ligadas) (Martin-Tanguy, 1997).

Las PA se han relacionado con numerosas facetas del crecimiento y desarrollo vegetal entre las que se incluyen la división celular, rizogénesis, embriogénesis, senescencia, floración y maduración de frutos, así como con la respuesta de la planta a numerosos estreses (Kakkar & Sawhney, 2002). En muchas de estas situaciones se han encontrado alteraciones tanto en los niveles celulares de PA (libres y/o conjugadas) como en el de las enzimas que las sintetizan (Bouchereau *et al.*, 1999). Además, la aplicación exógena de PA estimula el desarrollo en varias plantas superiores, sugiriendo así que la concentración endógena de estos compuestos podría limitar el crecimiento (Martin-Tanguy & Carre, 1993).

En plantas las PA más frecuentes son putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) (Yao *et al.*, 2010). Put es una diamina y puede ser sintetizada en las células vegetales por dos vías: a través de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) y de la arginina descarboxilasa (ADC) (figura 1). Sin embargo no todas las especies poseen ambas vías de síntesis, como ocurre con *Arabidopsis thaliana* que carece de la ruta de ODC (Kusano *et al.*, 2008). Put se convierte en Spd mediante la adición de un grupo aminopropilo por la enzima espermidina sintasa, mientras que la adición de un nuevo grupo aminopropilo a Spd provoca la formación de Spm, en este caso por la enzima espermina sintasa. Todos estos grupos aminopropilo utilizados en la síntesis de PA proceden de la descarboxilación de S-adenosilmetionina (AdoMet) por la acción de S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMdc). Otra PA menos frecuente pero también

descrita en diversas especies vegetales es cadaverina (Cad), una diamina sintetizada a partir del aminoácido lisina mediante la enzima lisina descarboxilasa (LDC). Esta diamina se ha encontrado en varias familias de plantas superiores como Gramineae, Poaceae, Solanaceae y, principalmente, en Leguminosae (Ohe et al., 2009).

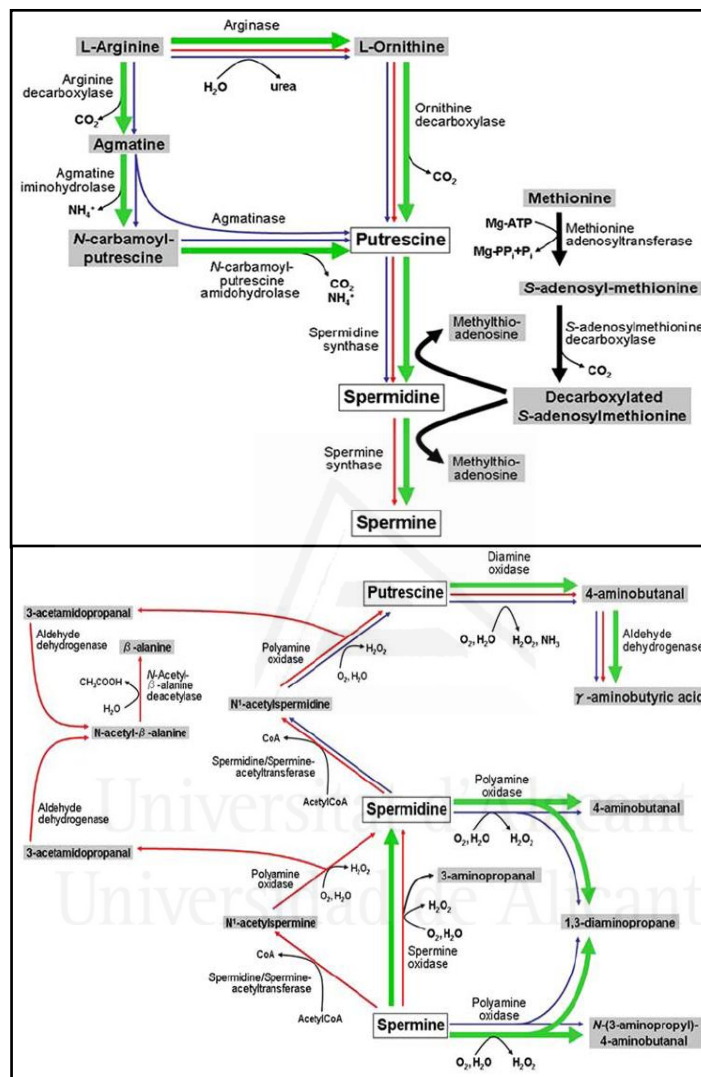


Figura 1: Ruta anabólica (arriba) y catabólica (abajo) de PA. Las flechas verdes indican las rutas en plantas, mientras que las azules y rojas indican las rutas en bacterias y animales, respectivamente (extraído de Kusano et al., 2008).

Los niveles endógenos de PA en las células también se ven modulados por rutas catabólicas que, en este caso, llevan a cabo las enzimas diamino-oxidasa (DAO) y poliamino-oxidasa (PAO). DAO muestra preferencia por las diaminas Put y Cad mientras que PAO oxida aminas de mayor peso molecular, tales como Spd y Spm (Moschou et al., 2008). DAO es una enzima que contiene cobre y cataliza la oxidación de Put a 4-aminobutanoal, que es posteriormente convertido en ácido γ -aminobutírico

(GABA) con producción neta de NH_3 y H_2O_2 . En cuanto a PAO, existen dos tipos: las que llevan a cabo la desaminación de Spd y Spm, generando 4-aminobutanal y (3-aminopropil)-4-aminobutanal, respectivamente, junto con 1,3-diaminopropano y H_2O_2 , y las que utilizan la ruta inversa de la biosíntesis, como PAO1 o PAO3 que catalizan la conversión de Spm a Spd (Tavladoraki et al., 2006) y de Spm a Put a través de Spd (Moschou et al., 2008), respectivamente.

2.1.1. La problemática del enraizamiento *in vitro*

El enraizamiento constituye una etapa clave en cualquier protocolo de micropropagación. De hecho, muchas especies no logran enraizar o lo hacen en muy bajo porcentaje en condiciones *in vitro*, lo que amenaza seriamente el éxito de dicho protocolo y, en conjunto, puede perjudicar gravemente la aplicación de las técnicas de conservación *in vitro* (Benson, 2000). Por todo ello, el proceso de enraizamiento adventicio constituye un reto a superar en un gran número de especies leñosas de interés económico (Neves et al., 2002).

Un logro significativo en el estudio del enraizamiento adventicio lo constituyó la identificación de una serie de fases morfológica y fisiológicamente relacionadas entre sí: *inducción*, *iniciación* y *expresión* (Gaspar et al., 1997). Básicamente, en la fase de inducción se produce un incremento en la concentración endógena de auxina libre; mientras que en la de iniciación se detecta ya división y diferenciación celular acompañadas de una disminución en la concentración de auxinas. Finalmente, la fase de expresión se caracteriza por la aparición y crecimiento del primordio radicular y está asociada a un nuevo aumento en la concentración de auxina libre (Heloir et al., 1996).

El proceso global de enraizamiento trae consigo cambios no sólo en los niveles de auxinas, sino en el de enzimas como peroxidasas y de otros reguladores de crecimiento como las poliaminas (Gaspar et al., 1997).

2.1.2. Poliaminas y enraizamiento

Como ya hemos indicado, las PA han sido relacionadas con numerosos procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, entre los que se encuentra la rizogénesis. Los efectos de estos compuestos descritos hasta el momento en el crecimiento de raíces incluyen desde la estimulación del crecimiento de la raíz principal a las raíces

adventicias y/o formación de raíces laterales (Couée et al., 2004; Yao et al., 2010). En numerosas especies leñosas se ha observado, por ejemplo, una correlación positiva entre la acumulación de PA y la inducción del enraizamiento adventicio (Baraldi et al., 1995; Biondi et al., 1990; Hausman et al., 1995; Heloir et al., 1996), sugiriendo de esta forma el posible uso de estas moléculas como marcadores del proceso de enraizamiento (Neves *et al.*, 2002). No obstante, esto no es siempre así y en otros casos se ha registrado un descenso en el nivel de PA, particularmente Put, asociado a un incremento en las tasas de enraizamiento (Baraldi et al., 1995).

Son varias las especies en las que se ha visto que el crecimiento de raíces mejoraba tras la aplicación exógena de PA. Tal es el caso de *Pinus virginia* (Mill.) (Tang & Newton, 2005) en el que la adición de Put, Spd y Spm 0.001 mM mejoraba la tasa de enraizamiento y promovía la elongación de las raíces. De la misma forma, la adición de agmatina y tiramina 0.06 mM, de Put 0.12 mM o de Spd 0.25 mM supuso un incremento en la longitud radicular y en el número de raíces por plántula en uva (Martin-Tanguy & Carre, 1993). La aplicación de Put, Spd o Spm a concentraciones entre 10 y 100 μ M a microplantas de *Nothofagus nervosa* también mejoró la rizogénesis *in vitro* (Martínez-Pastur et al., 2007).

2.2. Objetivos

El objetivo de este capítulo es profundizar en el conocimiento del enraizamiento *in vitro* de plantas describiendo los cambios temporales que se producen en la concentración endógena de las distintas fracciones fisiológicas de poliaminas a lo largo de dicho proceso.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1 Material vegetal y reactivos químicos

Los explantos de *H. marminorensis* se obtuvieron por propagación *in vitro* mediante subcultivos realizados cada 5-7 semanas en medio WPM (Lloyd & McCown, 1981) suplementado con sacarosa al 2% y Plant agar al 0.7% (Duchefa) durante tres años. Los explantos de *T. boveana* se subcultivaron en intervalos de 8-10 semanas durante 1 año y medio en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con

sacarosa al 3% y Plant agar al 0.7%. En ambos casos el pH se ajustó a 5.8 antes de autoclavar a 121°C durante 20 min.

Con el fin de intentar dilucidar el papel de las PA en el enraizamiento hemos empleado diferentes inhibidores de enzimas implicados en su metabolismo: metilglioxal-bis-(guanilhidrazona) (MGBG), inhibidor de S-adenosilmetionina descarboxilasa (Williams-Ashman & Schenone, 1972), aminoguanidina (AG), inhibidor de diamino oxidasa (Schuler, 1952; citado en Schayer et al., 1954) y difluorometilornitina (DFMO), inhibidor de ornitina descarboxilasa (Metcalf et al., 1987). Los inhibidores se esterilizaron por filtración (tamaño de poro del filtro: 0.22 µm) y se añadieron al medio de cultivo tras el autoclavado de éste en un rango de concentración entre 0.5 y 2 mM. Los cultivos se mantuvieron a 25±2°C con un fotoperiodo de 16-h bajo intensidad lumínica de 42 µmol m⁻² s⁻¹. En el caso de *H. marminorensis* los explantos consistieron en segmentos apicales con dos nudos y en *T. boveana* en segmentos apicales de 1.5-2 cm. Para todos los ensayos se colocaron dos explantos por tubo.

2.3.2 Extracción y análisis de PA

Las diferentes fracciones de PA (libres, conjugadas y ligadas) se extrajeron de las *porciones basales* del tallo (0.5 cm desde la zona de corte) y del tejido radicular (cuando ya fue evidente a partir del día 10) a lo largo de un periodo de 13 días de cultivo en el medio correspondiente. Cada muestra contenía 8-10 segmentos de porción de tallo basal o de tejido radicular y se realizaron cuatro réplicas por tratamiento y día de muestreo.

La extracción de las diferentes fracciones de PA de los tejidos vegetales se realizó según el método de Sharma y Rajam (1995). Las muestras de tejido (4-10 mg en el caso de las porciones basales de los tallos y 1-5 mg en el caso de raíces, en todos los casos peso seco) se homogeneizaron en 1 ml de ácido perclórico (APC) al 5% que contenía 1,6-hexanodiamina 0.025 mM como patrón interno y se mantuvieron durante 1 hora en un baño de hielo. Posteriormente se centrifugaron a 15000 × g durante 20 min y se separaron precipitado y sobrenadante que fueron utilizados independientemente. El sobrenadante se usó directamente para la determinación de la fracción libre de PA y para la hidrólisis de la conjugada (o fracción soluble en APC), mientras que el

precipitado se utilizó para la hidrólisis y posterior determinación de la fracción ligada (o insoluble en APC) de PA.

Para la hidrólisis de la fracción conjugada se mezclaron 150 μ l del sobrenadante con el mismo volumen de HCl 12N y se mantuvo a 110° C durante 16-18 h en tubos de vidrio cerrados. Tras la hidrólisis ácida se abrieron los tubos para permitir la evaporación del HCl a la misma temperatura y el residuo, conteniendo tanto las poliaminas libres como las conjugadas, se resuspendió en 150 μ l de APC al 5%.

Para la extracción de PA ligadas el precipitado obtenido anteriormente se lavó con APC 5% un total de cuatro veces para eliminar los restos de PA libres y conjugadas. Las PA ligadas presentes en el precipitado se extrajeron entonces con 1 ml de NaOH 1 N y agitación vigorosa en un vórtex durante 1 minuto. La mezcla se centrifugó a 15000 \times g durante 20 min y el sobrenadante, que incluye las PA ligadas, se sometió a hidrólisis ácida en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Para poder cuantificar las diferentes fracciones de PA extraídas procedimos a realizar una reacción de derivación de las mismas consistente en tomar 100 μ l del sobrenadante final de cada fracción y neutralizarlo con un volumen suficiente (20-40 μ l) de una disolución de carbonato sódico saturado hasta obtener un pH lo más cercano posible a 7.0. Posteriormente se añadieron 200 μ l de tampón borato 1 M pH 7.7. La mezcla se agitó unos segundos y se adicionaron 200 μ l de 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC) 3 mM en acetona, reactivo que proporciona la fluorescencia a las poliaminas. La mezcla se volvió a agitar durante 30 segundos y se dejó reposar un minuto. A continuación se añadieron 200 μ l de 1-adamantanamina 40 mM en acetona:agua (3:1) para retirar el exceso de FMOC que no hubiera reaccionado, se agitó durante 15 segundos y dejamos reposar la mezcla un minuto, procediendo a filtrarla a través de filtros de 0.45 μ m antes de su análisis.

La separación de las PA se realizó mediante HPLC con un detector de fluorescencia (longitud de onda de excitación de 260 nm y de emisión 325 nm). Las muestras se eluyeron en una columna de fase reversa C-18 (4.6 \times 250 mm, tamaño de partícula 5 μ m) con una fase móvil constituida por acetonitrilo:ácido acético (100 mM, pH 4.4) con un gradiente de 50% a 95% de acetonitrilo durante 60 min a un flujo constante de 1 ml min⁻¹. Las PA presentes en los extractos vegetales se identificaron a partir de la comparación de sus tiempos de retención con el de PA comerciales (Sigma-Aldrich Ltd.) y se cuantificaron por el método del patrón interno.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1. Análisis del perfil de poliaminas durante el enraizamiento

Como comentamos en la introducción, el enraizamiento transcurre a través de una fase de inducción, iniciación y expresión, cada una de ellas caracterizadas por diferentes aspectos moleculares y morfológicos. Para el presente estudio hemos seleccionado dos especies: *Helianthemum marminorense* y *Tamarix boveana* ya que ambas han mostrado una considerable facilidad para el enraizamiento *in vitro* si bien muestran una pauta morfogenética distinta: *Tamarix* desarrolla una raíz principal de la que posteriormente se originan raíces secundarias, mientras que *Helianthemum* desarrolla varias raíces de forma simultánea (de 4 a 7). Hemos definido, además, un periodo de 13 días para el estudio durante el cual se tomaron muestras los días 0, 3, 5, 7, 10 y 13. En las dos especies escogidas parece claro que la fase de expresión comenzaría en el día 7, momento en el que ya son visibles las primeras raíces. Hasta el día 7, por tanto, extrajimos y analizamos las PA presentes en la porción basal de los explantos (0.5 cm desde la base) y a partir del día 10 pudimos analizar por separado tanto las secciones basales del tallo como las raíces en formación.

En primer lugar describimos la concentración total de PA y su distribución en las distintas fracciones fisiológicas indicadas (libres, conjugadas y ligadas), a lo largo del periodo en estudio y en las dos especies seleccionadas. Estos resultados se muestran en la gráfica 1. Detectamos PA en las tres fracciones en ambas especies, si bien mostraron un patrón muy distinto. Durante la primera fase del enraizamiento (cuando aun no son visibles las raíces) predominó la fracción ligada tanto en *Helianthemum* como en *Tamarix*, aunque la concentración fue mucho más elevada en *Tamarix*. En esta última especie la fracción ligada volvió a ser muy relevante durante la fase de expresión o de morfogénesis de raíces, mientras que en *Helianthemum* se hizo prácticamente indetectable, pasando a ser la fracción libre la predominante.

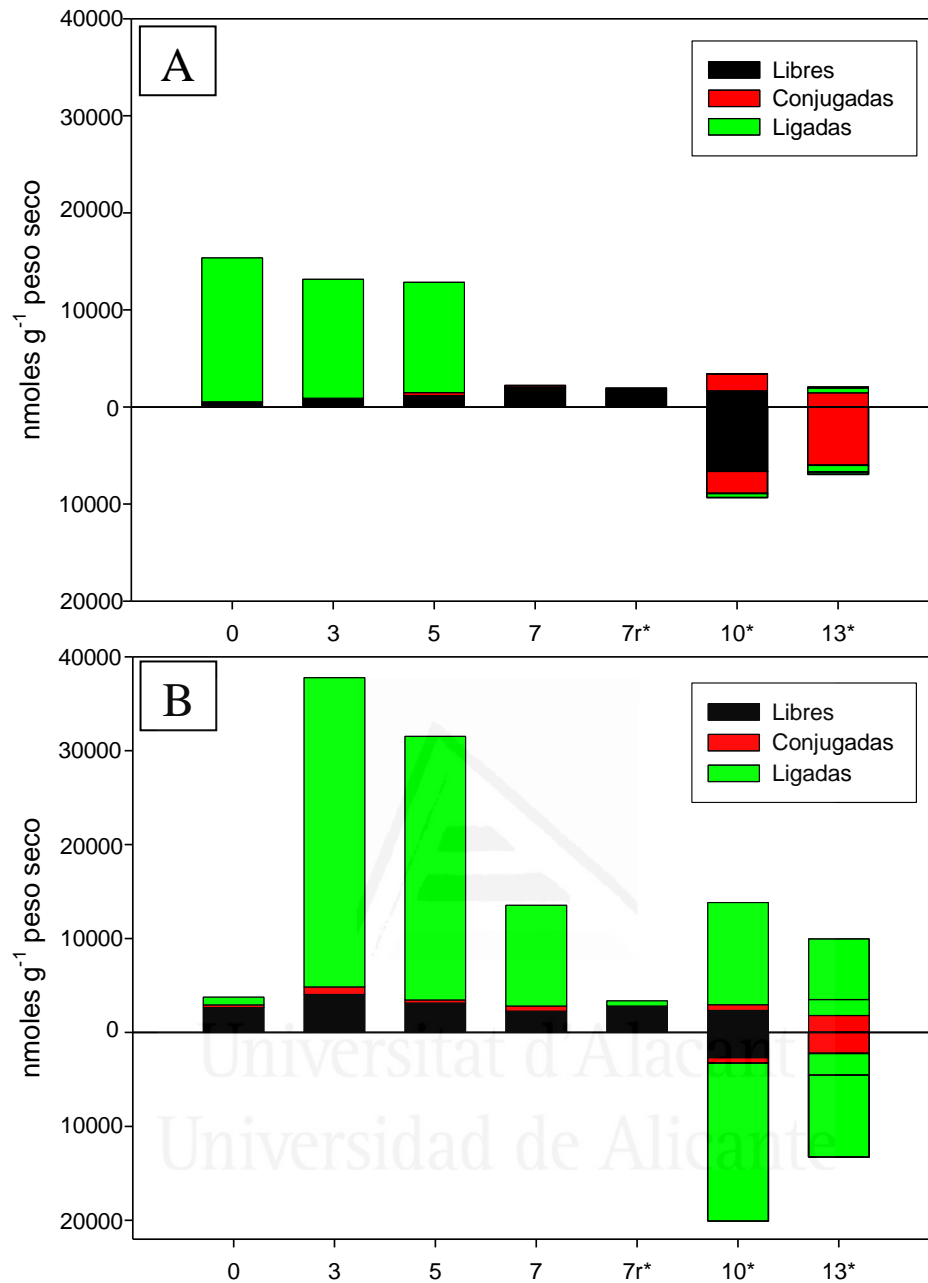
Las principales diferencias en el perfil de PA se observaron en los primeros días (gráfica 1). Mientras que en *Tamarix* los niveles totales aumentaron un 90% en el día 3 (gráfica 1B), en *Helianthemum* disminuyeron un 14% con respecto a los detectados al inicio del experimento (día 0) (gráfica 1A). Se ha descrito que el final de la fase de inducción se caracteriza por un aumento en el *pool* de PA (Arenas et al., 2003; Martínez-

Pastur et al., 2007; Tonon et al., 2001), lo que, a tenor del perfil de PA observado nos permitiría sugerir que en *Tamarix* la fase de inducción se prolongaría hasta el día 3. En el caso de *Helianthemum* resulta más difícil definir la frontera entre inducción y expresión juzgando exclusivamente la evolución de PA. No obstante, hay que tener en cuenta que en los trabajos citados anteriormente solo se analizó la fracción libre de PA (Arena et al., 2003; Martínez-Pastur et al., 2007; Tonon et al., 2001).

Después del día 3 se inicia en ambas especies una importante disminución en el contenido total de PA que podría caracterizar la fase de iniciación de las raíces (días 3-7), ya que como ya hemos dicho anteriormente, los primeros explantos enraizados aparecieron en el día 7 en ambos casos.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



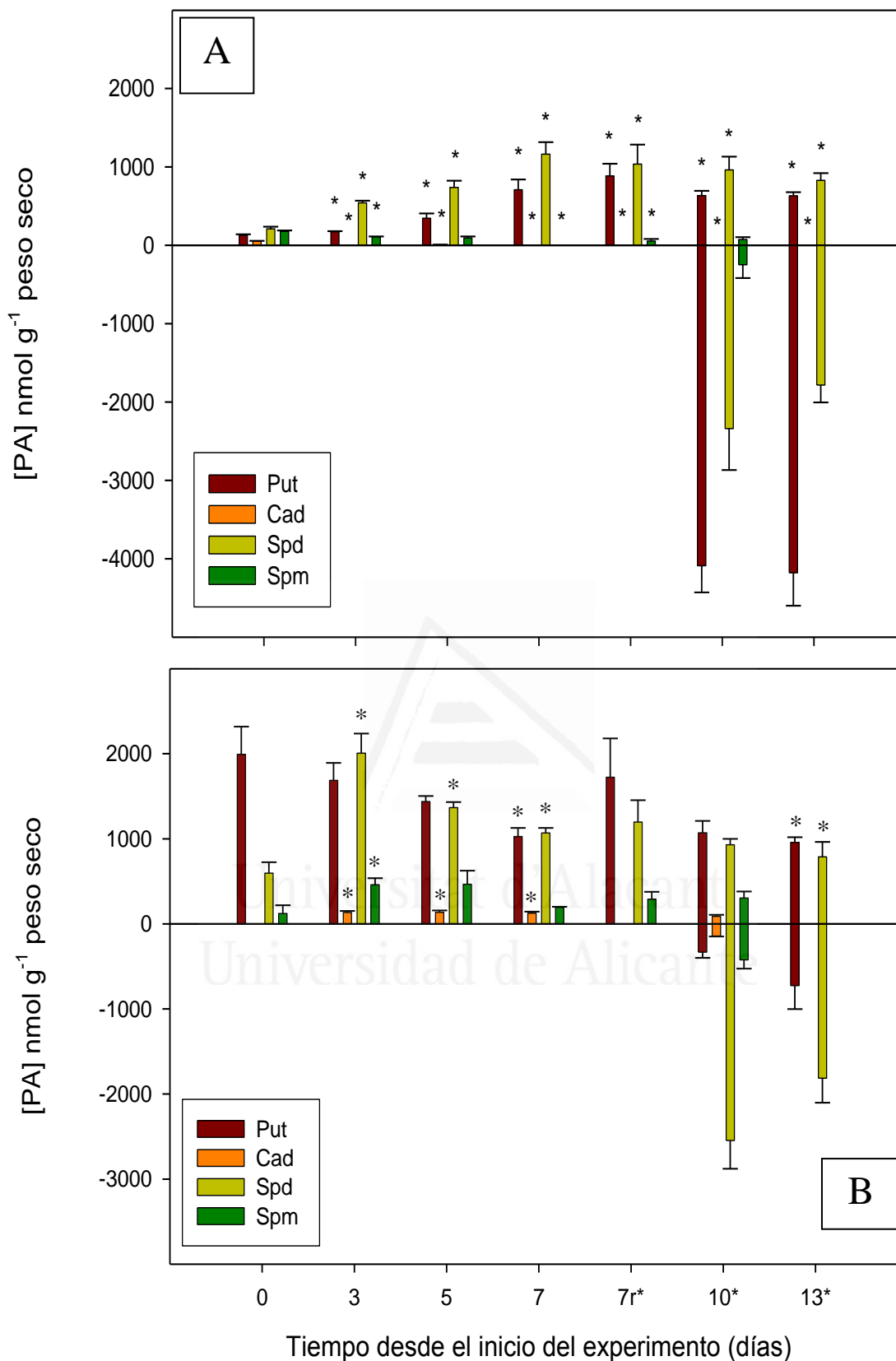
Gráfica 1: Distribución del contenido total de PA durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). Los valores por encima del eje horizontal corresponden a la concentración de PA en la porción basal del tallo mientras que los de la parte inferior corresponden a la concentración en raíces. La columna correspondiente al día 7 representa los explantos que en ese día aún no mostraban raíces, mientras que la del día 7r incluye los explantos en los que sí son visualmente distinguibles las raíces.

En el día 7 se analizaron por separado tanto los explantos no enraizados (7) como aquellos que sí lo habían hecho (7r), aunque en este último caso aún no era posible separar la porción basal del tallo de las raíces y, por tanto, analizamos igualmente todo el explanto en conjunto. Cuando las raíces son ya visibles se registró en las dos especies una drástica reducción en los niveles totales de PA que alcanzaron los valores más bajos de todo el periodo estudiado (gráfica 1). Es destacable la práctica inexistencia de las fracciones conjugada y ligada en explantos enraizados de *H. marminorensis*. De la misma forma, los niveles detectados en explantos enraizados de *T. boveana* en el día 7 fueron más bajos que los detectados en los que no habían enraizado, especialmente por lo que respecta a la fracción ligada, y desapareciendo además la conjugada. Así, la fase de expresión, que comenzó en ambas especies a partir del día 7, se caracterizó por el menor contenido en PA de todo el periodo estudiado, hecho que coincide con lo observado en especies como *Fraxinus angustifolia* (Tonon et al., 2001) y *Vigna radiata* (Nag et al., 2001). Una vez más hay que tener en cuenta que en estos casos referenciados solo se cuantificó la fracción libre.

Los cambios en PA observados a partir del día 10 fueron similares entre ambas especies. En general, los niveles detectados en raíces fueron superiores a los de las partes basales de tallo, contrariamente a lo observado en alcachofa (Le Guen-Le Saos & Hourmant, 2001). Además, tanto en tallos como en raíces los niveles de PA descienden entre los días 10 y 13. Sin embargo, sí se observan diferencias en la distribución de PA entre fracciones, siendo casi inexistente, como ya se ha dicho, la fracción ligada en *Helianthemum*.

2.4.1.1 Poliaminas libres

Una vez que la descripción del contenido total de PA nos reveló diferencias a lo largo del enraizamiento pasamos a analizar la evolución de las PA individuales en el proceso. En la gráfica 2 se muestran los resultados relativos a la fracción libre.



Gráfica 2: Distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y espermina (Spm) libre durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). Los valores por encima del eje horizontal corresponden a la concentración de PA en la porción basal del tallo, mientras que los de la parte inferior, que deben ser leídos en valor absoluto, corresponden a los niveles en raíces. Las barras representan la media ± EE (n = 4). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T (α = 0.05).

En porciones basales de tallo de *Helianthemum* la PA mayoritaria en la fracción libre fue Spd. Tanto Spd como Put aumentaron progresivamente hasta el día 7 estabilizándose a partir de ese momento. Cad no siempre fue detectada y cuando la encontramos apareció en niveles que estaban bordeando el límite de detección del equipo, mientras que Spm mantuvo igualmente una concentración muy baja, en los periodos en que pudo ser detectada, y prácticamente invariable, aunque con una tendencia a disminuir, a lo largo del periodo en estudio (gráfica 2A). La concentración más alta de Spd se registró en el día 7 y fue 4,5 veces superior a la concentración al inicio del experimento (día 0). Aunque son varios los trabajos (Torrighiani et al., 1989,1991; Geneve & Kester, 1991; citados en Ballester et al., 1999) donde se ha registrado un aumento conjunto de Put y Spd, en la mayoría de ellos no se dio la presencia mayoritaria de Spd que hemos encontrado en *Helianthemum*. Así, Hausman et al. (1995a) observaron que la inducción del enraizamiento en chopo iba acompañada de un aumento de Put muy por encima de los niveles de Spd y Spm. Incluso, la aplicación de Spd provocó la inhibición del enraizamiento de los explantos. Sin embargo, en otros casos como *Nothofagus nervosa* sí se ha descrito un predominio de Spd libre de casi tres veces su concentración sobre la de Put y Spm (Martinez-Pastur et al., 2007) y apareciendo como la poliamina libre mayoritaria durante todo el proceso de enraizamiento, coincidiendo con nuestros resultados. A partir del momento en que ya aparecieron las raíces de manera evidente, hay que destacar que las raíces se convirtieron en el órgano donde se concentraron los mayores niveles de PA, siendo en este caso Put la forma mayoritaria encontrada, lo que coincide con los resultados obtenidos en alcachofa (Le Guen-Le Saos, 2001).

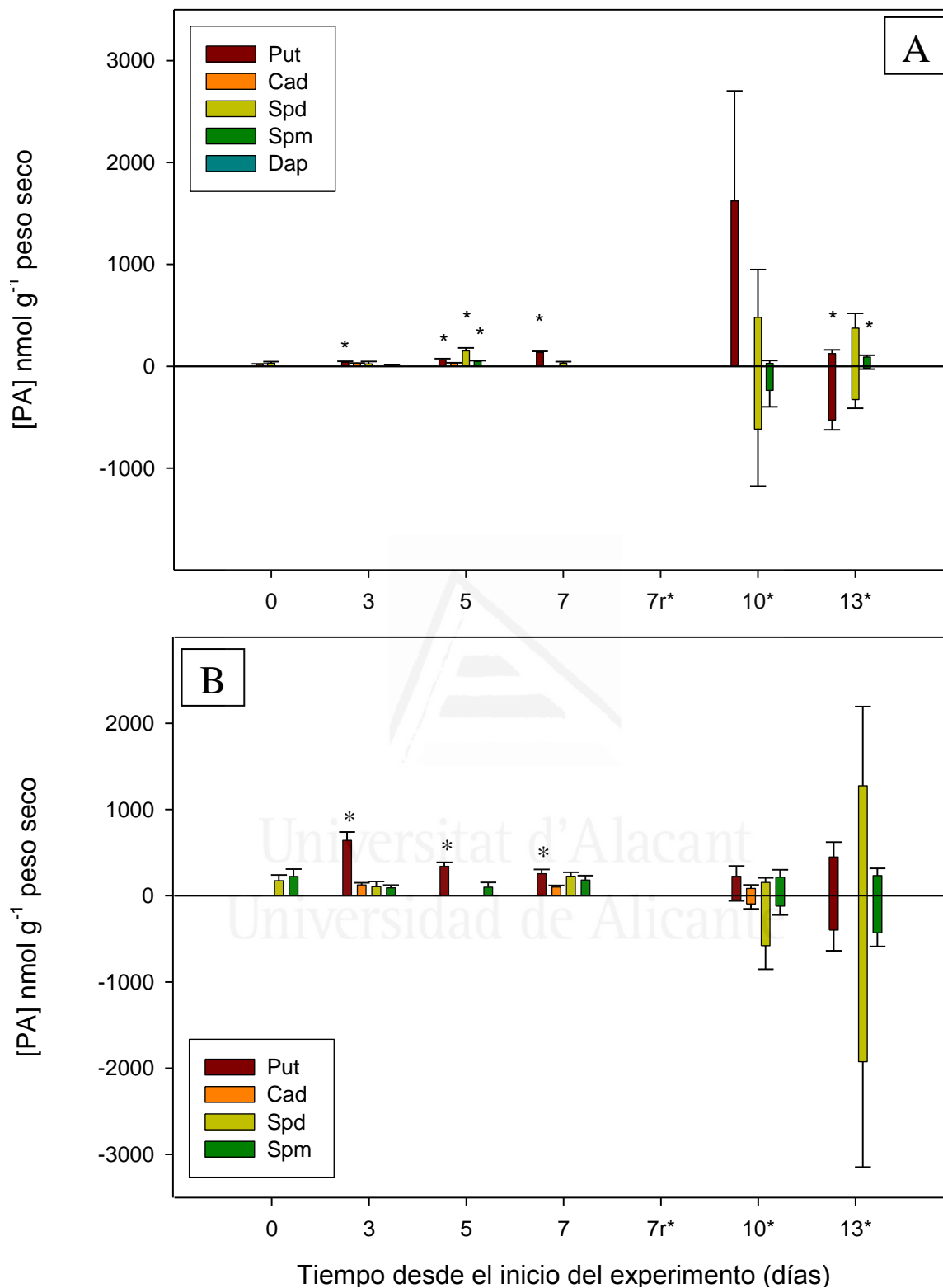
En *Tamarix boveana* el perfil de PA encontrado fue distinto (gráfica 2B). La PA mayoritaria encontrada en porciones basales de tallo fue en esta especie Put, con una tendencia a disminuir durante la fase de inducción que duró hasta el día 7, momento en el que su nivel se estabilizó. No obstante, las variaciones más importantes en PA durante las fases de inducción e iniciación afectaron tanto a Spd como a Spm. El mayor incremento de Spd se registró en el día 3 que aumentó 2,3 veces con respecto a la concentración en el día 0. A partir de ese día los niveles fueron disminuyendo hasta estabilizarse en el día de aparición de las raíces. Mientras tanto, en los días 3 y 5 se registraron concentraciones de Spm 3,2 y 2,8 veces superiores a las detectadas en el día 0. Contrariamente a lo observado en *Helianthemum*, la PA mayoritaria en las raíces recientemente formadas de *Tamarix* fue Spd.

En *Pringlea antiscorbutica* (Hummel et al., 2002) también se registró un aumento de Spd y Spm libres que estaba positivamente relacionado con el crecimiento de la raíz principal. Una evolución similar a la descrita en las raíces de *Tamarix* fue encontrada por Couée et al. (2004) en guisante, tomate y maíz, donde la concentración de Put aumentaba conforme elongaba la raíz, mientras que Spd y Spm se mostraban más abundantes cerca de los ápices radiculares. El hecho de que la PA mayoritaria en las raíces de *Tamarix* sea Spd podría correlacionarse con el hecho de que esta especie desarrolla gran cantidad de raíces secundarias.

2.4.1.2 Poliaminas conjugadas

Por lo que respecta a la fracción conjugada conviene destacar en primer lugar que en ambas especies la concentración de esta fracción de PA en segmentos basales de tallo fue mucho menor que la de la fracción libre. En *H. marminorensis* observamos un leve incremento de Put durante los primeros 7 días (gráfica 3A), pasando a ser la PA mayoritaria, de la misma forma que Spd también sufrió un pequeño incremento hasta el día 5. Cabe destacar la ausencia de PA conjugadas en el día 7 en explantos enraizados.

En *T. boveana* (gráfica 3B) se observó un aumento de Put en el día 3, y aunque después fue disminuyendo progresivamente, se convirtió en la PA mayoritaria de las fases de inducción e inicio del enraizamiento. Por el contrario, Spd fue la mayoritaria en la fase de expresión, tanto en tallos como raíces.



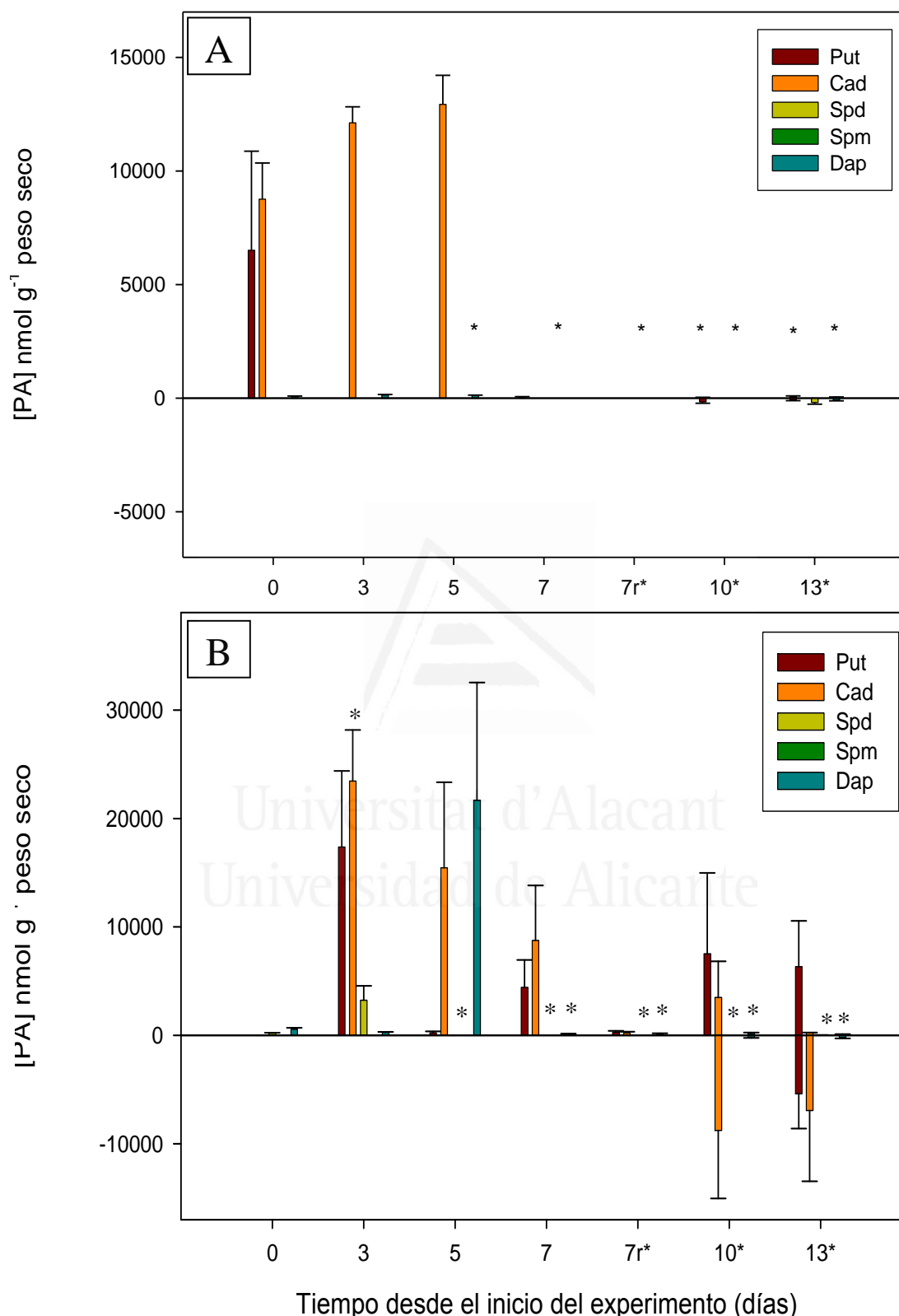
Gráfica 3: Distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd), espermina (Spm) y diaminopropano (Dap) conjugadas durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). Los valores por encima del eje horizontal corresponden a la concentración de PA en la porción basal del tallo, mientras que los de la parte inferior, que deben ser leídos en valor absoluto, corresponden a los niveles en raíces. Las barras representan la media \pm EE (n=4). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T ($\alpha = 0.05$).

2.4.1.3 Poliaminas ligadas

En cuanto a la fracción ligada (gráfica 4) cabe destacar que en ambas especies se encontró una alta concentración de Cad, especialmente durante los primeros 5 días del proceso, y que se detectó por primera vez 1,3-diaminopropano (Dap), un producto de la oxidación de PA. En *Helianthemum* la PA mayoritaria con gran diferencia fue Cad y a partir del día 7 apenas se detectaron PA ligadas. En *Tamarix* la concentración de Cad detectada en el día 3 fue significativamente superior a la cuantificada en el día 0, siendo ésta también la PA mayoritaria en esta fracción tanto en tallos como en raíces.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Gráfica 4: Distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd), espermina (Spm) y diaminopropano (Dap) ligadas durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). Los valores por encima del eje horizontal corresponden a la concentración de PA en la porción basal del tallo, mientras que los de la parte inferior, que deben ser leídos en valor absoluto, corresponden a los niveles en raíces. Las barras representan la media ± EE (n = 4). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T ($\alpha = 0.05$).

2.4.2. Efecto de la aplicación de inhibidores del metabolismo de poliaminas

2.4.2.1. Efectos sobre el enraizamiento

Existen diversos métodos para perturbar las rutas de síntesis de PA con el fin de estudiar sus funciones fisiológicas y muchas otras características: uso de inhibidores, inductores, organismos transgénicos y mutantes o variantes somaclonales (Watson et al., 1998). En el presente trabajo hemos utilizado la primera de estas opciones: inhibidores de determinados enzimas implicados en el metabolismo de PA. Así hemos empleado *aminoguanidina* (AG), un inhibidor de DAO, enzima que cataliza la conversión de Put a GABA; *metilglioxal-bisguanilhidrazona* (MGBG), un inhibidor de SAMdc, enzima implicada en la síntesis de Spd y Spm; y *difluorometil-ornitina* (DFMO), un compuesto que impide la síntesis de Put actuando sobre ODC. Hay numerosos datos que avalan el empleo de estos compuestos como herramienta de investigación. Por ejemplo, la adición de AG al medio de cultivo afectó negativamente al enraizamiento de *Fraxinus angustifolia* (Tonon et al., 2001) y chopo (Hausman et al., 1994, 1995a), sugiriendo así el posible papel de Put en el enraizamiento a través de la ruta Δ^1 -pirrolina. La adición de MGBG a *Phaseolus* provocó una reducción en los niveles endógenos de Spd y Spm, al tiempo que se producía un aumento en los niveles de Put y la inhibición del enraizamiento inducido por ácido indolbutírico (Jarvis et al., 1985; citado en Pal-Bais y Ravishankar, 2002). MGBG también provocó la inhibición del enraizamiento en *Vigna radiata* (Friedman et al., 1982) y en *Arabidopsis* (Tassoni et al., 2000), en donde provocó un 100% de inhibición, confirmando de nuevo que este compuesto se comporta como un análogo de Spd. Por su parte, DFMO ha sido el compuesto que ha mostrado mayor variabilidad en sus efectos cuando se aplica exógenamente: en chopo apenas influyó en la tasa de enraizamiento (Hausman et al., 1994); en *Pringlea antiscorbutica* provocó un aumento en la longitud de las raíces primarias (Hummel et al., 2002); en guisante provocó una importante reducción en el desarrollo de raíces laterales (Nissen, 1996). Aun así es importante tener en cuenta también la concentración del compuesto, si bien en *A. thaliana* el uso de DFMO 1 mM apenas inhibió la formación de raíces, pero a concentraciones más elevadas los efectos fueron más drásticos llegando, con una concentración de 20 mM, a sólo un 6.2% del enraizamiento registrado en los controles no tratados (Mirza & Bagni, 1991).

En *Helianthemum marminorense* (tabla 1) la adición de AG inhibió completamente el enraizamiento, mientras que con MGBG se produjo una reducción en el número de explantos enraizados, alcanzándose un 66.67% a los 13 días frente a un 85% en ausencia del inhibidor. Por otro lado, con DFMO no se observaron diferencias en el porcentaje de enraizamiento respecto al control a los 13 días de tratamiento pero, sorprendentemente, aparecieron algunos explantos enraizados en el día 3 (8.33%), no observándose nuevos explantos enraizados hasta el día 7.

Tabla 1. Efecto de la aplicación de inhibidores del metabolismo de PA sobre el porcentaje de enraizamiento en *Helianthemum marminorense*.

Tratamiento	Día 7	Día 10	Día 13
Control	31.25%	82.29%	84.72%
AG (2 mM)	0%	0%	0%
MGBG (0.5 mM)	7.14%	60%	66.67%
DFMO (1 mM)	27.5%	75%	85%

En *Tamarix boveana* (tabla 2) la presencia de AG también inhibió el enraizamiento si bien, a diferencia de la especie anterior, un 27% de los explantos consiguió enraizar a los 13 días. La mayor inhibición en esta especie se produjo con MGBG, alcanzando tan solo un 12.5% de explantos enraizados al final del periodo. DFMO tampoco produjo en esta especie diferencias significativas respecto al control, pero sin embargo, podemos decir que fue algo más efectivo en la inducción de raíces que en *H. marminorense*, puesto que en el día 7 se observó un porcentaje más elevado de explantos enraizados que en el control.

Tabla 2. Efecto de la aplicación de inhibidores del metabolismo de PA sobre el porcentaje de enraizamiento en *Tamarix boveana*.

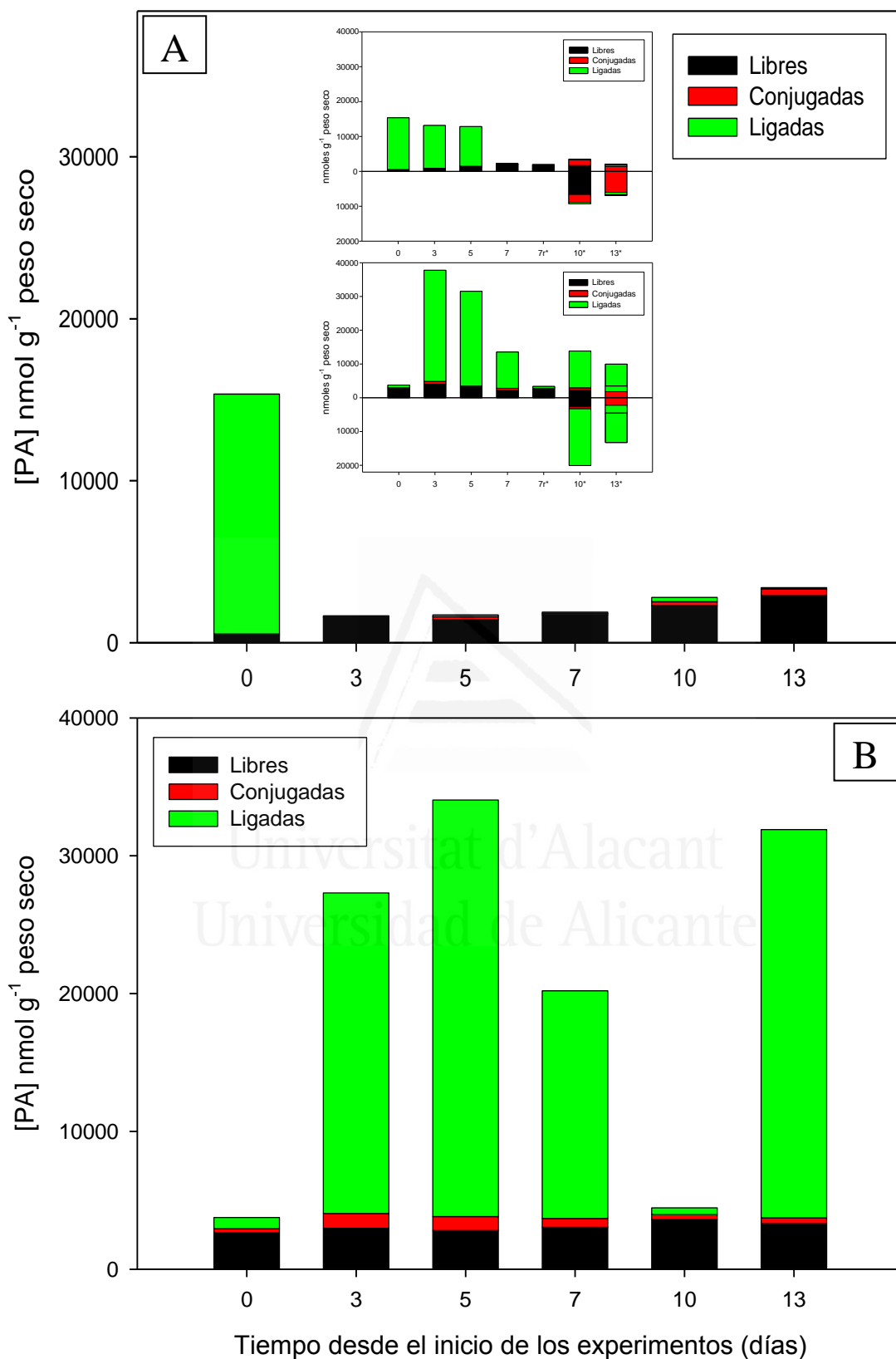
Tratamiento	Día 7	Día 10	Día 13
Control	6.66%	47.06%	63.56%
AG (1 mM)	0%	0%	27.1%
MGBG (0.5 mM)	0%	6.25%	12.5%
DFMO (1 mM)	37.5%	50%	57.5%

2.4.2.2. Efectos sobre el perfil de poliaminas

2.4.2.2.1 Efecto de aminoguanidina (AG)

La aplicación de AG al medio de cultivo condujo a una reducción en los niveles de PA en el caso de *Helianthemum* (gráfica 5), con ausencia durante casi todo el

proceso tanto de PA conjugadas como ligadas. Esta pérdida de PA podría estar relacionada con la inhibición del enraizamiento ejercida por este inhibidor. En *Phaseolus vulgaris* se comprobó que una disminución en los niveles de Put, Spd y Spm, debido a una reducción en la actividad ADC, condujo a una menor longitud radicular (Palavan-Ünsal, 1987; citado en Hummel et al., 2002). En el caso de *Tamarix* se observó un retraso en la aparición del nivel máximo de poliaminas totales, apareciendo dicho pico en el día 5 y no en el día 3 como se observó en ausencia del inhibidor (gráfica 5). Sin embargo, a partir del día 7, los cambios en los niveles totales son más acusados que los detectados en ausencia de inhibidores, disminuyendo en el día 10 y aumentando bruscamente en el día 13 debido especialmente a los cambios en la fracción ligada. En el caso de la variedad mutante *rac* (recalcitrante al enraizamiento), la ausencia de enraizamiento se ha atribuido a un retraso en la acumulación de Put libre y conjugada (Faivre-Rampant et al., 2000). Efectivamente, los autores encontraron que mientras que en la variedad silvestre se registraba un aumento de Put durante la primera semana (los primeros explantos enraízan a los siete días), en la variedad mutante dicho aumento aparecía en la segunda semana de cultivo. De la misma forma, la inhibición del enraizamiento encontrada en *Tamarix* podría deberse a un retraso en la acumulación de PAs, principalmente Put ligada.

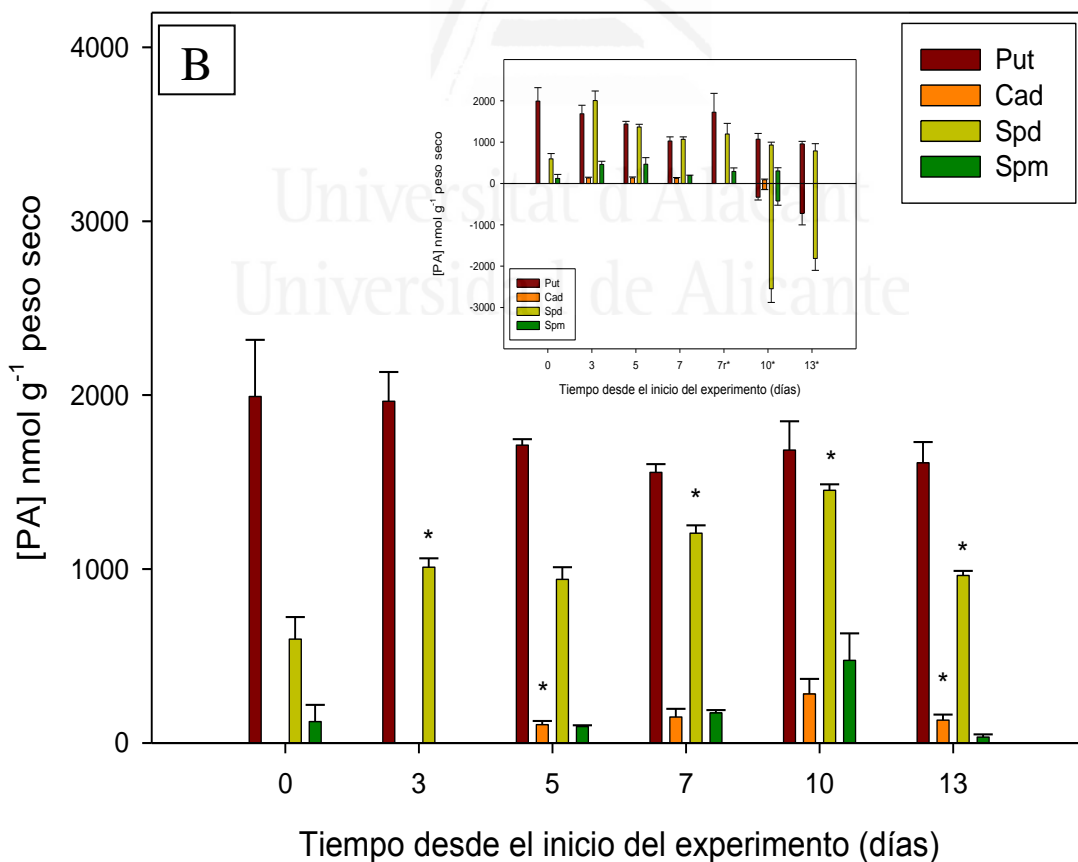
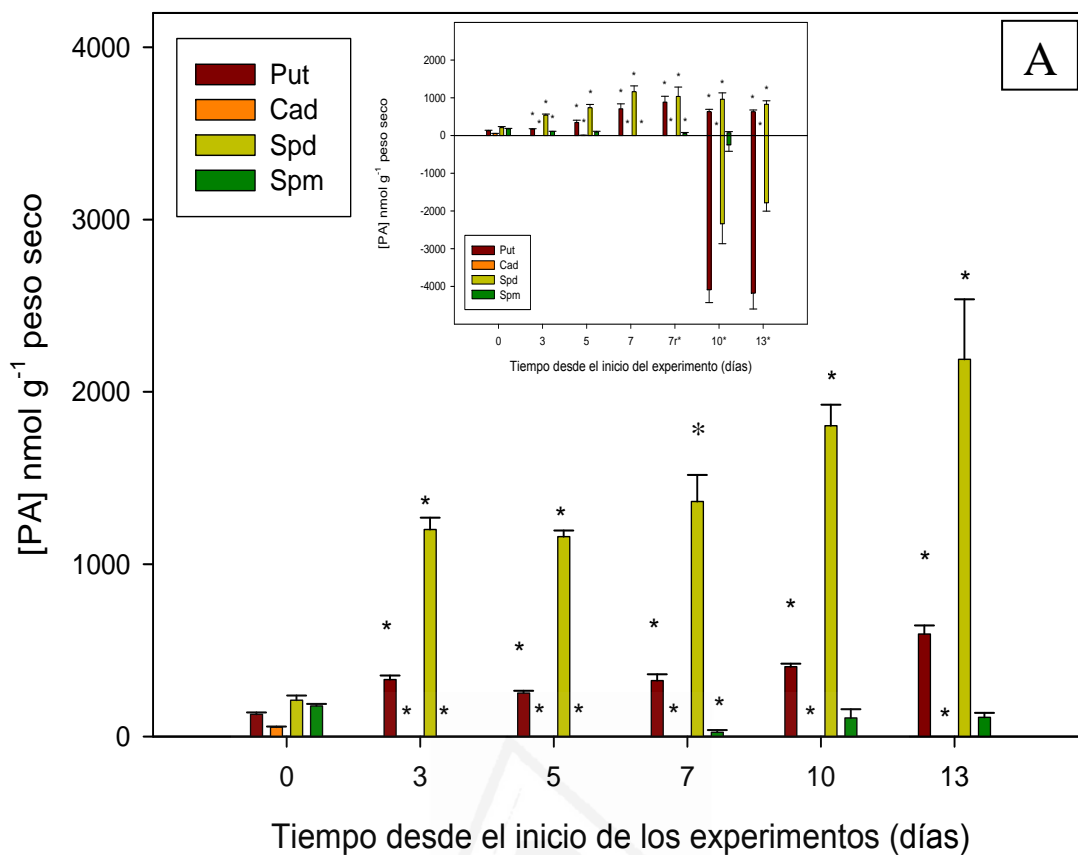


Gráfica 5: Efecto de AG en la distribución del contenido total de PA durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). En el inserto de la figura 6A se vuelven a presentar los datos correspondientes al contenido total de PA de *H. marminorense* (arriba) y *T. boveana* (abajo) sin tratar con el inhibidor (gráfica 1 de este capítulo).

En *H. marminorensis* se detectó en el día 3 una concentración de Put libre del doble de la detectada en el control. La concentración de Put se estabilizó a partir de ese momento hasta volver a aumentar al final del periodo en estudio (gráfica 6A). Spd resultó ser la PA mayoritaria. Su concentración aumentó 1,2 veces en el día 3 y continuó aumentando a partir del día 7 (gráfica 6A). Esta evolución en ambas poliaminas podría sugerir que Put podría estar siendo utilizada en la síntesis de Spd, al menos durante los días 3 y 5. La acumulación de Spd en presencia de AG ya ha sido descrita con anterioridad (Hausman et al., 1995a; Tonon et al., 2001). Quizá este exceso de Spd frente a Put podría estar inhibiendo el enraizamiento o también el hecho de que AG inhiba no solo a DAO sino también a PAO (Moschou et al., 2008).

Sin embargo, en *T. boveana* la PA mayoritaria en la fracción libre fue Put. En este caso se observó un descenso de Put libre en los primeros 7 días, más lento que en los explantos no tratados. En el día 3 se registró un aumento en Spd casi dos veces superior al detectado en el día 0 pero menor al visto en ausencia de AG y, de la misma manera que ocurrió en aquel caso, la tendencia observada a partir de este momento fue la de aumentar muy levemente hasta estabilizarse en el día en que las raíces ya eran visibles. Ya que AG es el más eficaz de todos los inhibidores empleados en ambas especies nos lleva a pensar, como proponen Hausman et al. (1995a) y Nag et al. (2001), que los productos derivados de la oxidación de PA (GABA y H₂O₂) podrían ser cruciales en el enraizamiento de ambas, tal y como ya se ha descrito en soja (Su et al., 2006).

En ambas especies se observó un retraso en el pico de Spm y, en el caso de *Tamarix* también de Cad.

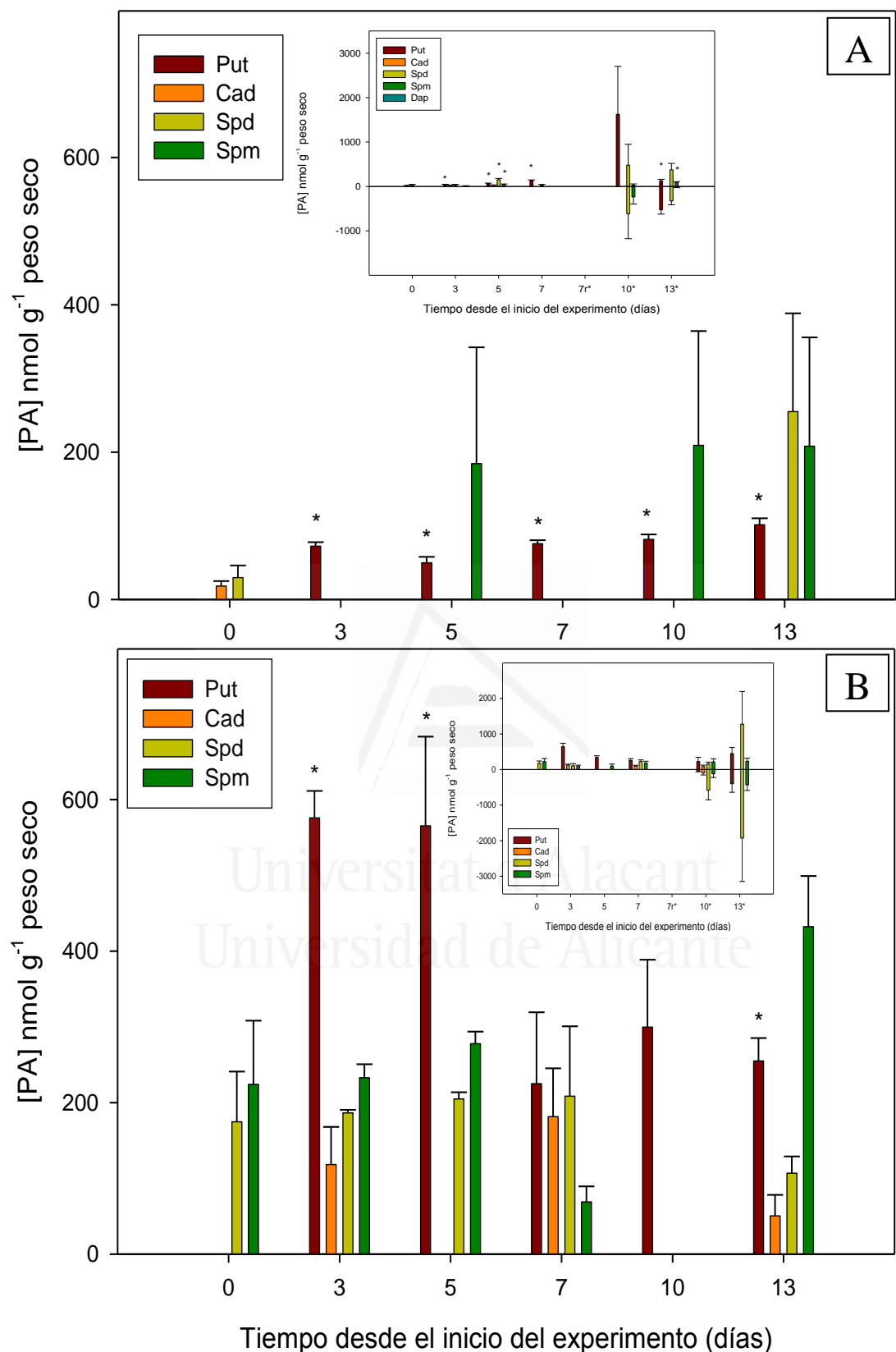


Gráfica 6: Efecto de AG en la distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y espermina (Spm) libre durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). Los insertos recuperan los resultados obtenidos para cada especie en esta fracción sin inhibidor (gráfica 2 de este capítulo). Las barras representan la media \pm EE ($n = 4$). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T ($\alpha = 0.05$).

En la fracción conjugada de *Helianthemum* es destacable la ausencia de Cad durante la fase de inducción, que sí aparecía en el control, y de Spd hasta el día 13, siendo Spm la PA mayoritaria en esta fracción. La ausencia de Spd conjugada coincide con el aumento que habíamos detectado en la fracción libre de esta PA. Put conjugada se acumuló en el día 3, se igualó al tratamiento control en el día 5 y apareció en menor concentración a partir del día 7. Además, no se detectó Spm en la inducción.

En *T. boveana* la PA mayoritaria fue Put, aunque no sufrió variaciones importantes con respecto al control, a excepción del aumento registrado en el día 5. Los niveles de Spd solo se acumularon en el día 5, llegando incluso a desaparecer en el día 10. El nivel de Spm en los días 3 y 5 fue 2,8 y 3,1 veces superior al detectado en el control, respectivamente, y a partir de aquí fue disminuyendo también. Es interesante destacar que los aumentos y descensos de Spm conjugada siguen la pauta contraria a lo observado para la fracción libre de esta PA.

La aplicación de AG no solo afecta a la oxidación de PA, y por tanto a los niveles de PA libres, sino que afecta también a los niveles de PA conjugadas. La inhibición del enraizamiento de estas especies mediante el uso de AG conlleva una reducción en el nivel de PA conjugadas, de forma contraria a lo descrito en otros trabajos (Burtin et al., 1990).

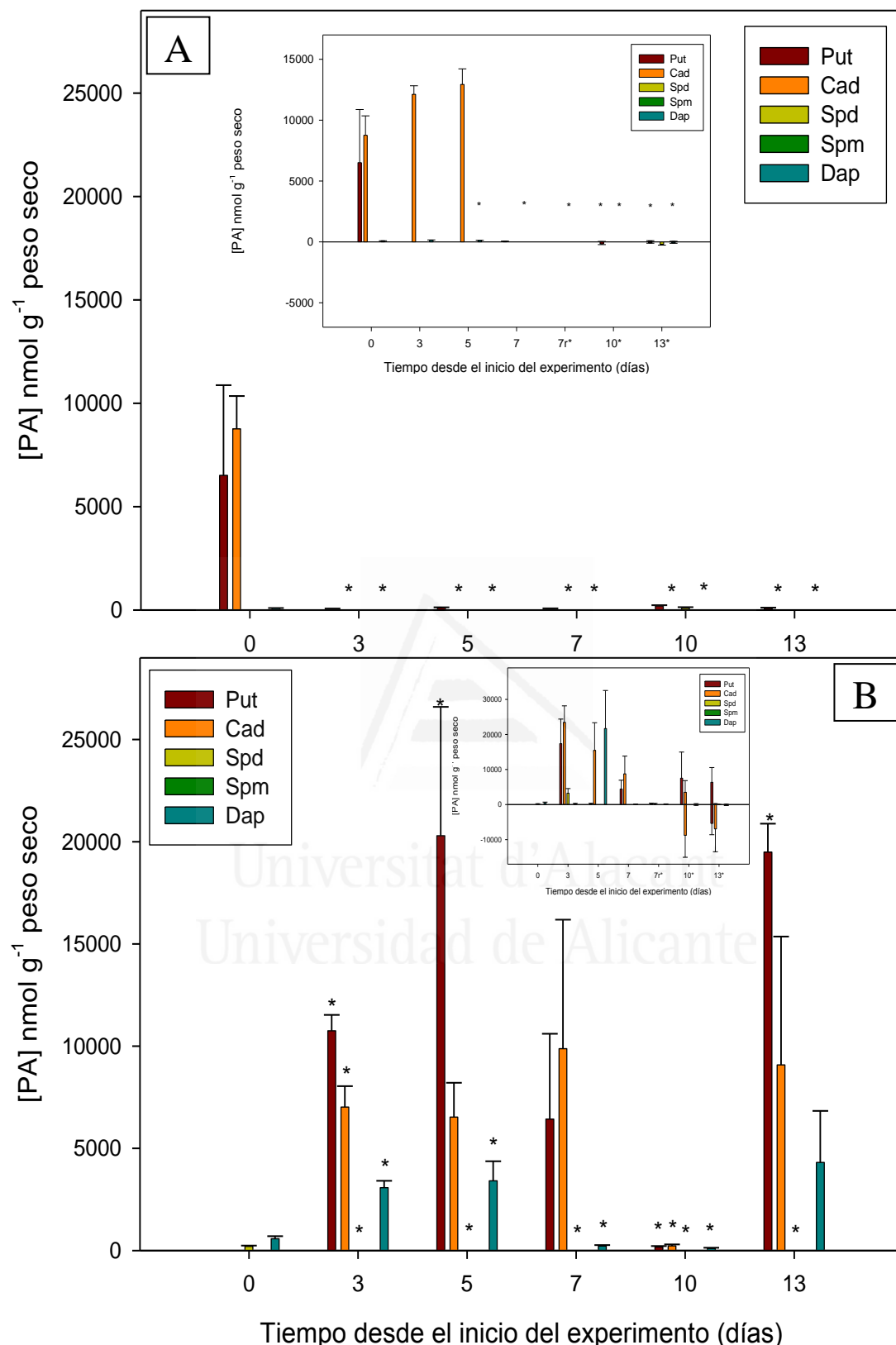


Gráfica 7. Efecto de AG en la distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y espermina (Spm) conjugada durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). Los insertos representan los resultados obtenidos en cada especie para esta fracción sin inhibidor (gráfica 3 de este capítulo). Las barras representan la media \pm EE (n = 4). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T ($\alpha = 0.05$).

En *H. marminorensis* apenas se detectaron PA ligadas, lo que justifica las grandes diferencias observadas en el contenido total de PA en presencia de AG respecto al control en los primeros días (gráfica 8). Cad disminuyó considerablemente y de esta forma, Dap pasó a ser la PA mayoritaria de la fracción ligada. Por otro lado, las variaciones en PA ligadas con AG respecto al tratamiento control fueron mucho más acusadas en *T. boveana*, detectándose una disminución en la concentración de Cad y la aparición de Dap con mayor frecuencia aunque con niveles mas bajos en general. Además, Put experimentó aumentos significativos en los días 5 y 13.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



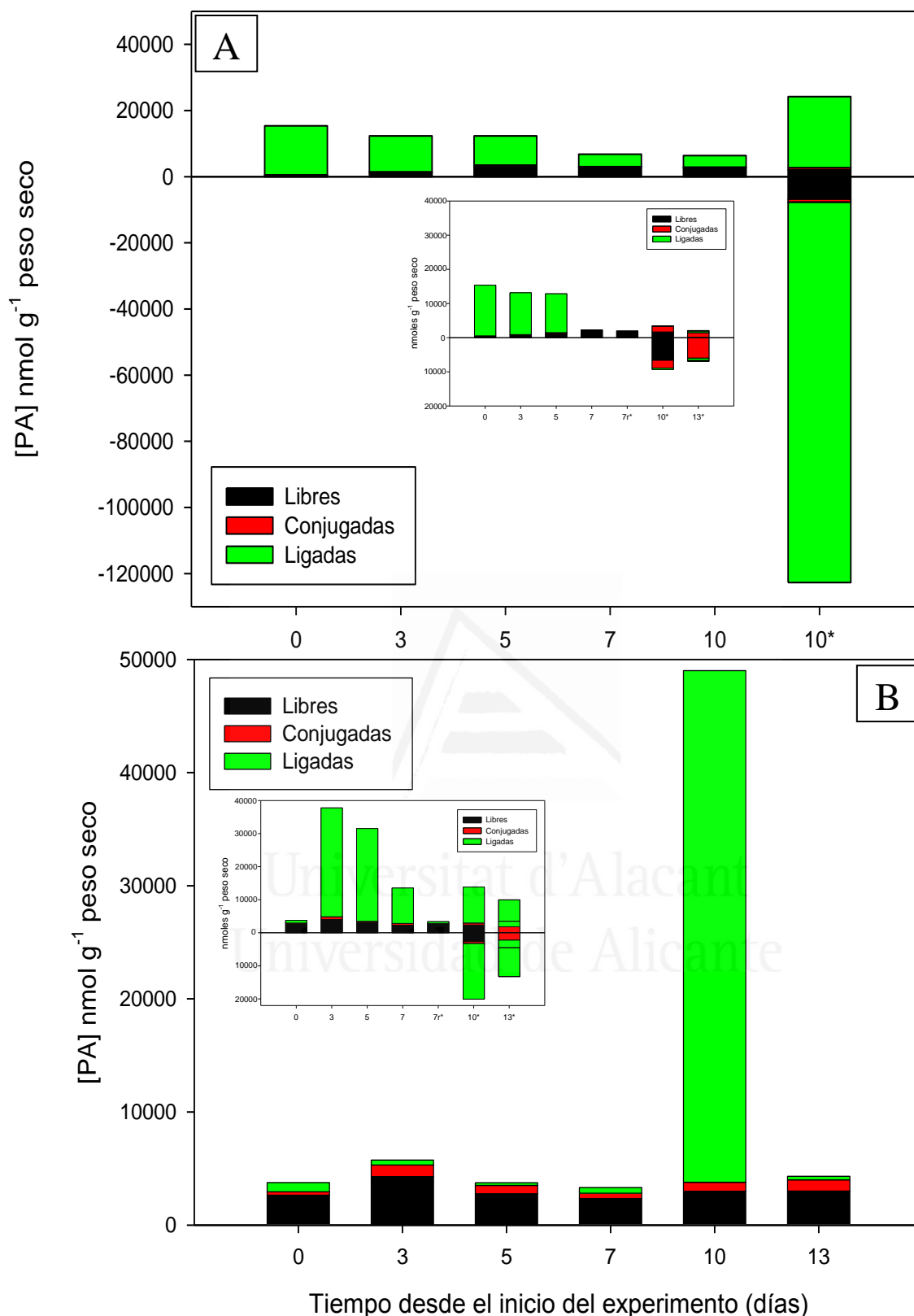
Gráfica 8. Efecto de AG en la distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd), espermina (Spm) y diaminopropano (Dap) ligada durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). Los insertos recuperan los resultados obtenidos en cada especie para esta fracción sin inhibidor (gráfica 4 de este capítulo). Las barras representan la media \pm EE (n = 4). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T ($\alpha = 0.05$).

2.4.2.2.2 Efecto de metilglioxal-bisguanilhidrazona (MGBG)

La aplicación de MGBG, un inhibidor no específico de S-adenosilmetionina descarboxilasa (Watson et al., 1998), apenas influyó en los niveles de PA detectados en *Helianthemum*, que resultaron muy parecidos a los obtenidos en ausencia de este inhibidor (gráfica 9A), que hemos de recordar que tampoco generó una diferencia significativa en el porcentaje de enraizamiento, salvo a los 7 días (tabla 1). La única diferencia encontrada en los niveles de PA totales en ese día es la presencia de PA ligadas, fracción que en ese día ya había desaparecido en los controles.

Dado que el porcentaje de enraizamiento en presencia de este inhibidor a los 10 días resultó más elevado que el esperado (tabla 1), nos decidimos por evaluar en ese día tanto los tallos no enraizados como los enraizados (gráfica 9A). Es de destacar, en este sentido, que el contenido en PA ligadas tanto de tejido radicular como de tallo en explantos enraizados en el día 10 fue muy superior al detectado en ausencia de dicho inhibidor, lo que nos llevaría a sugerir que la fracción ligada de PA podría jugar un papel relevante en las fases de inducción-iniciación, pero no tanto en la de expresión, al menos en lo que se refiere a esta especie.

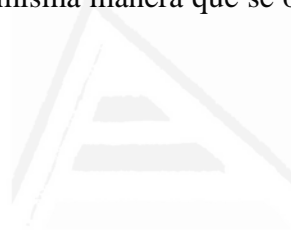
En el caso de *Tamarix*, la aplicación de MGBG condujo a una importante reducción en el nivel de PA a lo largo de todo el proceso de enraizamiento excepto en el día 10 de muestreo, donde se observó un gran aumento de la fracción ligada (gráfica 9B). En esta especie, MGBG provocó una disminución significativa del porcentaje de enraizamiento (tabla 2), que podría ser explicada por la ausencia de la fracción ligada durante los primeros días del periodo de enraizamiento, coincidentes con las fases de inducción-iniciación. La reducción en el nivel de PA tras la adición de este inhibidor concuerda con lo observado por Hummel et al. (2002) en *Pringlea antiscorbutica*, en cuyo caso se observó además una gran reducción en la tasa de crecimiento de la raíz principal.



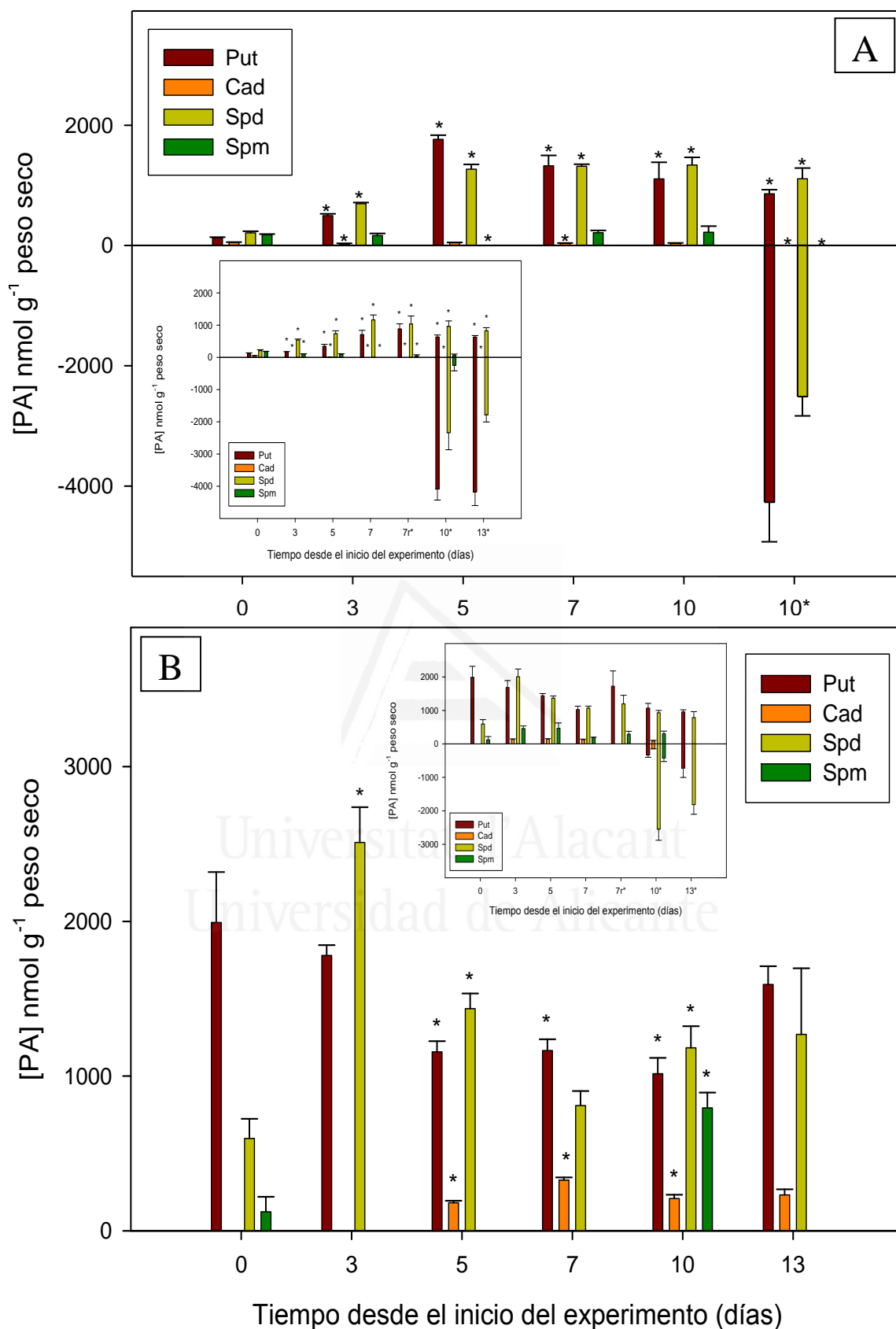
Gráfica 9. Efecto de MGBG en la distribución del contenido total de PA durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). En la gráfica 9A, los valores por encima del eje corresponden a los niveles de PA en los segmentos basales de tallo, mientras que los de la parte inferior, que deben ser leídos en valor absoluto, corresponden a los niveles en raíces. En el inserto se recuperan los valores encontrados en las dos especies sin la presencia del inhibidor (gráfica 1 de este capítulo).

Por lo que respecta a la fracción libre (gráfica 10), la aplicación de MGBG supuso un aumento de Put libre en *Helianthemum* 4,1 y 0,9 veces superior al registrado en el tratamiento control en los días 5 y 7, dejando de ser Spd la PA más abundante como sucedió en el control a lo largo de todo el periodo estudiado. Sin embargo, y de forma sorprendente, Spd experimentó un leve aumento con respecto al control a lo largo de todo el periodo estudiado, siendo superior (71%) el aumento detectado en el día 5. Por el contrario, Spm desapareció tanto en tallos como en raíces, coincidiendo con lo observado por Hummel et al. (2002) en *P. antiscorbutica*.

En *Tamarix* la PA mayoritaria fue Spd, seguida muy de cerca por Put. Los mayores cambios se observaron en los niveles de Cad, ya que no se detectó esta diamina el día 3 y a partir del día 5 los niveles comenzaron a aumentar, acumulándose de forma significativa en el día 7. En el día 5 se detectó además un descenso en la concentración de Put. Es de destacar también, la ausencia de Spm libre durante los días 3 y 5 y la acumulación en el día 10, de la misma manera que se observó un descenso de Spd en el día 7.



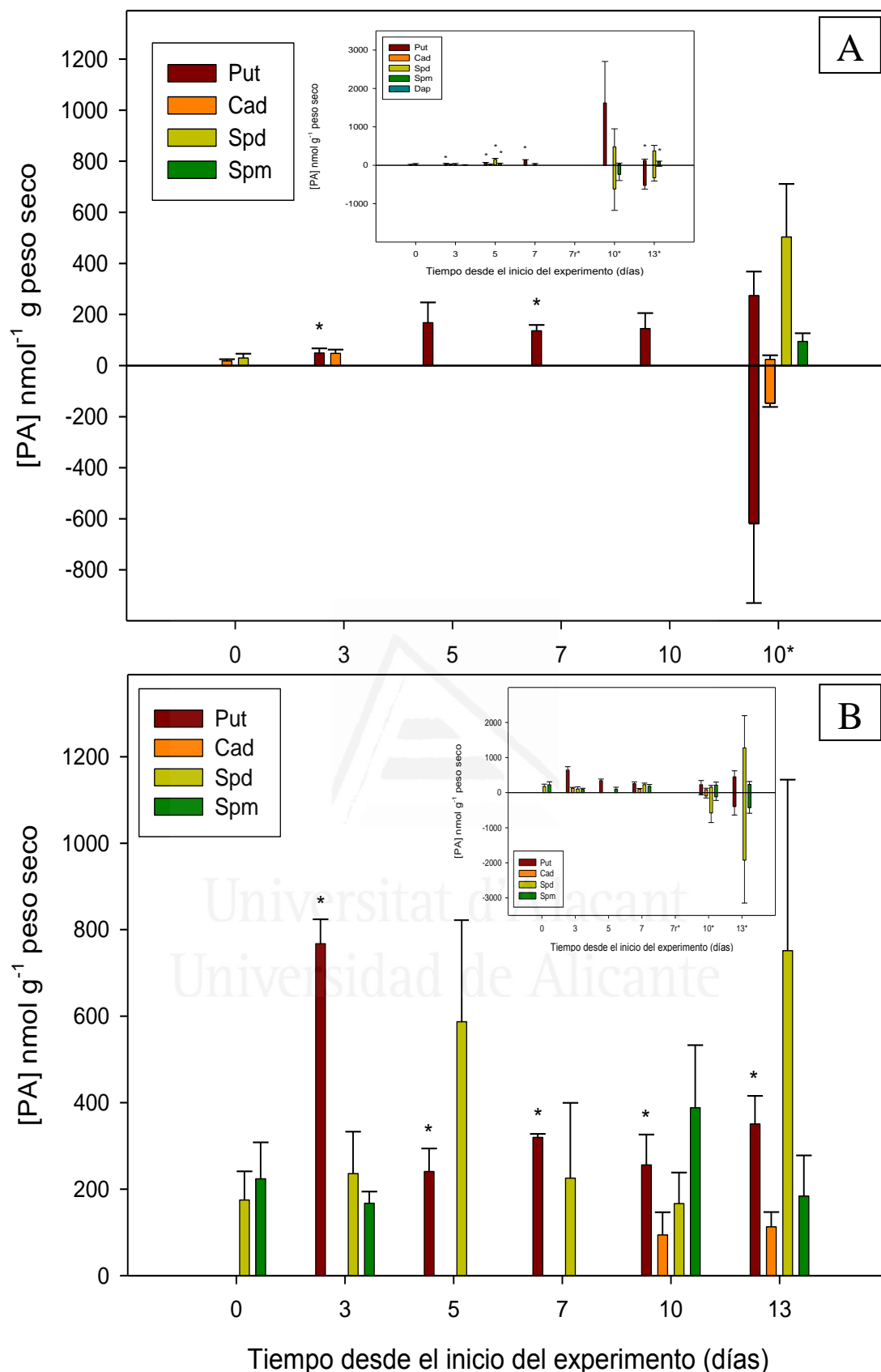
Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Gráfica 10. Efecto de MGBG en la distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y espermina (Spm) libre durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). En la gráfica 10A los valores por encima del eje corresponden a los niveles de PA en los segmentos basales de tallo, mientras que los de la parte inferior, que deben ser leídos en valor absoluto, corresponden a los niveles en raíces. En los insertos se recuperan los valores encontrados en las dos especies para esta fracción sin la presencia del inhibidor (gráfica 2 de este capítulo). Las barras representan la media \pm EE (n = 4). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T ($\alpha = 0,05$).

Así pues, en ambas especies es destacable el hecho de que contrariamente a lo esperado, el efecto de MGBG sobre los niveles de Spd y Spm no ha sido especialmente acusado, con la excepción comentada de la ausencia de Spm en *Tamarix* los días 3 y 5 y del descenso de Spd en el día 7. Hay que recordar que las diferencias en el porcentaje de enraizamiento respecto al control fueron mucho más importantes en *Tamarix* que en *Helianthemum* (tablas 1 y 2), lo que nos llevaría a sugerir la importancia de Spm para la inducción del enraizamiento en *Tamarix*. En el caso de *Helianthemum* puede que la concentración del inhibidor no sea la necesaria, pues ya se ha postulado (Dias et al., 2009) sobre el hecho de que la inhibición de la biosíntesis de PA resulte dependiente de la especie. La síntesis de SAMdc se inhibe por la presencia de Spd pero aumenta en respuesta a elevados niveles de Put (Buchanan et al., 2000; citado en Dias et al., 2009), lo que explicaría el aumento de Spd libre en *Helianthemum*.

Como ya hemos comentado, el tratamiento con MGBG no inhibió la formación de Spd y/o Spm de forma clara tal y como cabría esperar a partir de la acción del inhibidor. Sin embargo, sí detectamos cambios importantes en la fracción conjugada respecto al control en *Helianthemum*. Así, aunque la concentración de PA conjugadas fue muy baja en relación con el resto de fracciones, observamos ausencia de Spd y Spm a lo largo de todo el estudio con la excepción de los explantos que sí enraizaron el día 10, y siendo Put la PA mayoritaria en esta fracción. A ello habría que añadir la ausencia de Spd y Spm y la presencia de Cad en raíces. Sin embargo, en *Tamarix* no se vieron diferencias muy acusadas respecto al control, aunque sí habría que destacar la acumulación de Spd en el día 5, la ausencia de Cad durante la inducción y la de Spm en los días 5 y 7. De nuevo Spm aparece en muy baja concentración durante la inducción, lo que nos lleva a pensar en la importancia de esta PA para la inducción del enraizamiento. Put y Spd fueron las PA mayoritarias en esta fracción, aunque la primera fue algo superior.



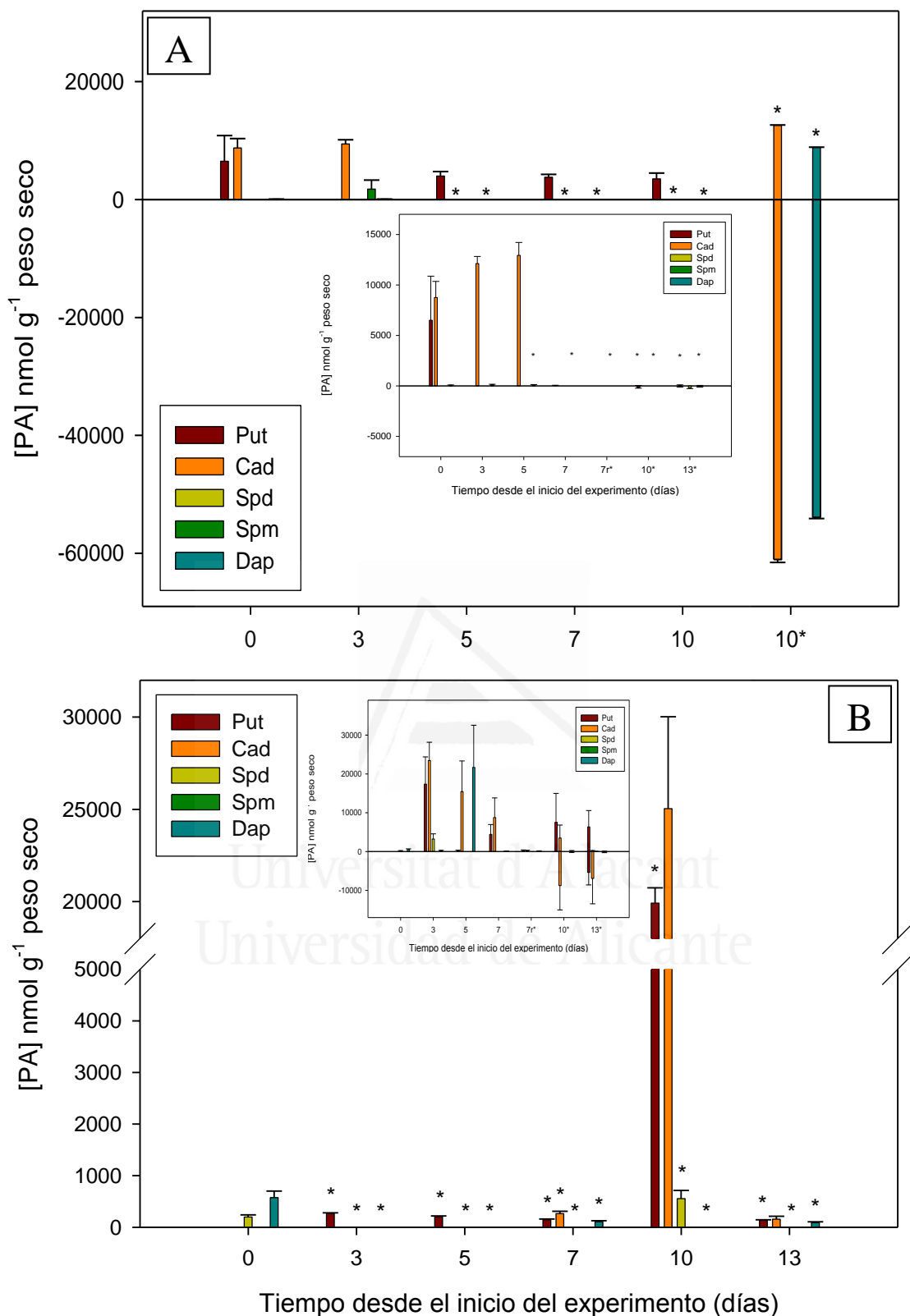
Gráfica 11. Efecto de MGBG en la distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y espermina (Spm) conjugadas durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). En la gráfica 11A la parte superior del eje corresponde a los niveles de PA en segmentos basales de tallo mientras que la parte inferior corresponde a los niveles (leídos en valor absoluto) en raíces. Los insertos recuperan los valores encontrados en las dos especies para esta fracción sin la presencia del inhibidor (gráfica 3 de este capítulo). Las barras representan la media \pm EE (n = 4). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T ($\alpha = 0.05$).

Finalmente, la presencia de MGBG también desencadenó algunas diferencias en la fracción ligada (gráfica 12). En *Helianthemum* cabe destacar que Cad fue la PA mayoritaria en dicha fracción aunque experimentó una leve disminución en el día 3, desapareciendo completamente a partir del día 5 y acumulándose de nuevo en explantos ya enraizados tanto en tallos como, sobre todo, en raíces. También es destacable el elevado contenido en Dap registrado en presencia de este inhibidor con respecto al tratamiento control, y la alta concentración de Put desde el día 5 hasta el 10 en el caso de los explantos no enraizados, contrastando en este último caso con su ausencia en los explantos que sí presentaban raíces.

En *Tamarix* la PA mayoritaria fue también Cad, aunque es de destacar su ausencia durante la inducción, así como la de Spd y de Dap. La concentración de Cad aumentó a partir del día 7, en especial en el día 10, aumento que estuvo acompañado por un incremento de Put.

En general podemos ver que MGBG ha sido algo más efectivo sobre *Tamarix* ya que los niveles de Spm son mucho más bajos que en control, lo que resultó especialmente destacable durante la fase de inducción. También habría que señalar la gran reducción de Put, Dap y Cad durante esa fase (inducción), si bien la ausencia de esta última PA se observa también para *Helianthemum*. Además, la ausencia de Put en la inducción también se observó en el tratamiento con DFMO en *Tamarix* (ver apartado siguiente) y la ausencia de Dap en los tratamientos con AG y DFMO, de lo que se deduce que éstas PA no son esenciales para inducir la formación de raíces.

Ya comentamos anteriormente que MGBG no es un inhibidor específico de SAMDC sino que puede reprimir también a ADC (Watson et al., 1998; Hummel et al., 2002; Kakkar & Kaur-Sawhney, 2002) e incluso inhibir a PAO (Watson et al., 1998), con lo que la ausencia de especificidad supone un problema a la hora de interpretar los resultados. La falta de efectividad de MGBG reduciendo de manera completa los niveles de Spd y Spm, como hubiera sido de esperar, puede deberse tanto a la falta de especificidad ya mencionada como al hecho de que cuando SAMdc es limitante, tanto homoserina como ácido aspártico pueden servir de precursores alternativos para la biosíntesis de Spd y Spm (Dias et al., 2009).

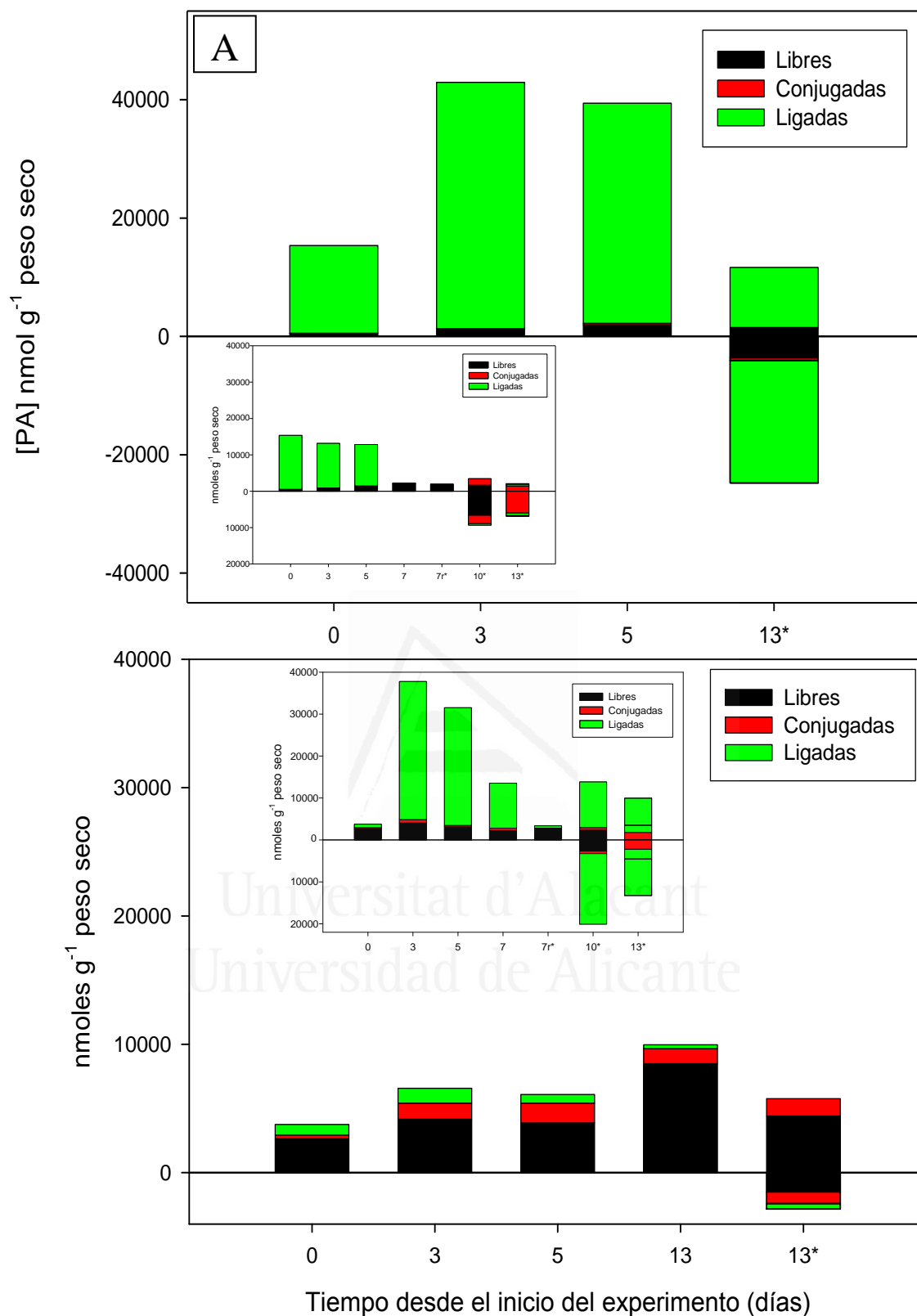


Gráfica 12. Efecto de MGBG en la distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd), espermina (Spm) y diaminopropano (Dap) ligadas durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). En la gráfica 12A, la parte superior del eje corresponde a los niveles de PA en segmentos basales de tallo mientras que la parte inferior corresponde a los niveles (que deben ser leídos en valor absoluto) en raíces. Los insertos recuperan los datos correspondientes a esta fracción en las dos especies sin inhibidor (gráfica 4 de este capítulo). Las barras representan la media \pm EE (n = 4). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T ($\alpha = 0.05$).

2.4.2.2.3 Efecto de difluorometilornitina (DFMO)

El último de los inhibidores ensayados fue DFMO, un inhibidor específico de ornitina descarboxilasa (ODC), que es una de las actividades enzimáticas que genera putrescina en las células. En este caso, y como consecuencia de limitaciones en las existencias del inhibidor, se analizaron PA en la fase de inducción (3-5 días) y luego a los 13 días, cuando se observó en la mayoría de los tratamientos que ya habían salido las raíces. En general hemos de decir que el efecto de este compuesto resultó bastante variable. Mientras que en *Helianthemum* no se inhibió el proceso de enraizamiento, el porcentaje de explantos enraizados en *T. boveana* fue ligeramente menor respecto al control al disminuir casi un 10% (tablas 1 y 2). Así pues, de entre los tres inhibidores estudiados fue el que menos diferencias en el porcentaje de enraizamiento produjo. Sin embargo, sí se observaron marcadas diferencias en los niveles totales de PA en ambas especies (gráfica 13).

En el caso de *Helianthemum*, los niveles totales de PA detectados fueron sorprendentemente muy superiores a los de los controles sin inhibidor, siendo la fracción ligada la mayoritaria. Esto indica que a pesar de que el DFMO es un inhibidor de la síntesis de putrescina, no se produce el efecto esperado, quizás porque la inhibición de ornitina descarboxilasa inducida por DFMO pueda provocar la estimulación de la vía de la arginina descarboxilasa (ADC) para la síntesis de putrescina. Esta posibilidad requiere ser investigada de manera concreta, ya que hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que existe con esta especie en cuanto al metabolismo de PA se refiere.

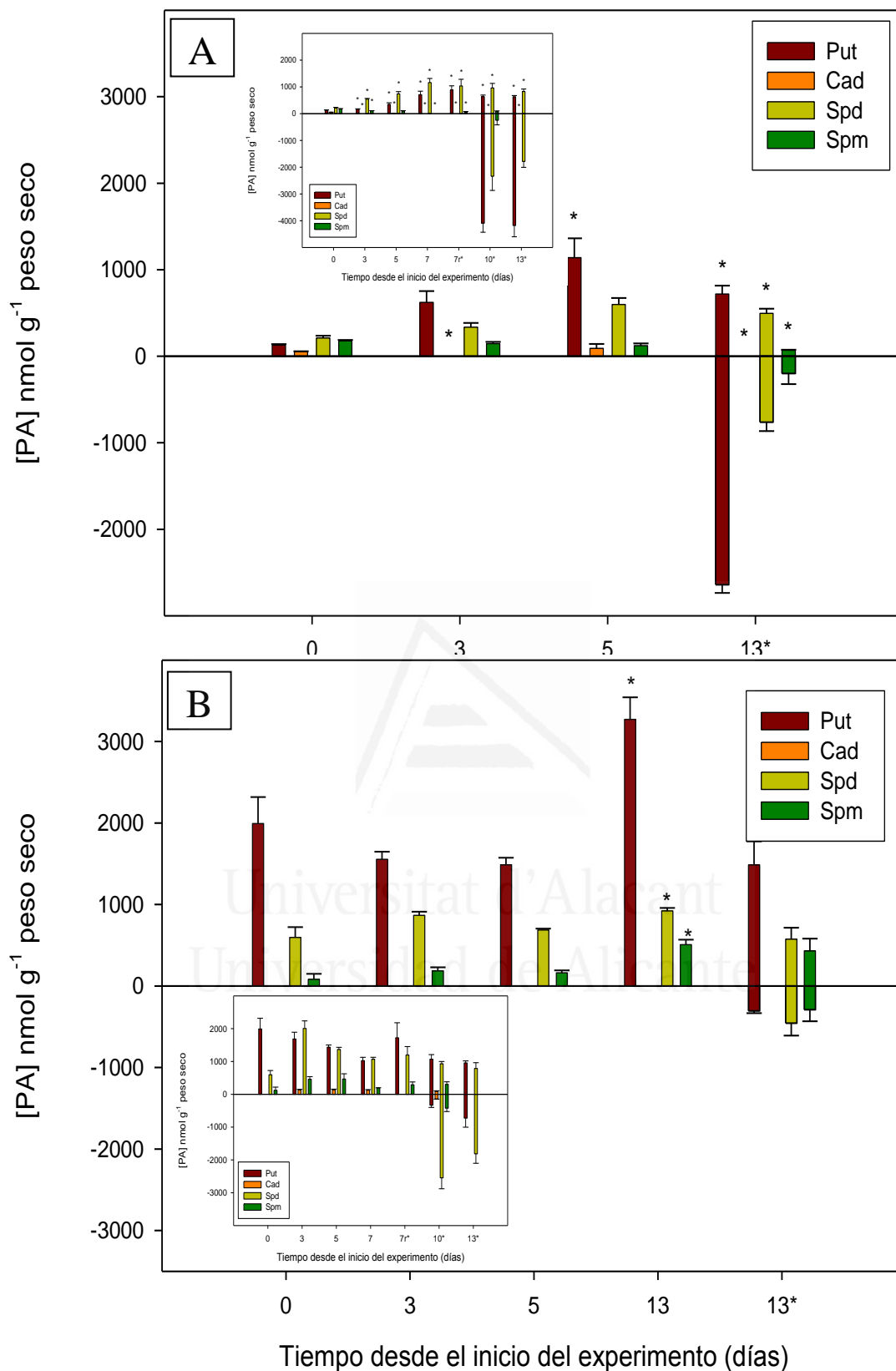


Gráfica 13. Efecto de DFMO en la distribución del contenido total de PA durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B) tratados con DFMO. La parte superior del eje corresponde a los niveles de PA en segmentos basales de tallo mientras que la parte inferior corresponde a los niveles en raíces. Los insertos recuperan los datos correspondientes a esta misma fracción en cada especie sin inhibidor (gráfica 1).

Un incremento en el *pool* de PA en presencia de DFMO también fue descrito en *Pringlea antiscorbutica* (Hummel et al., 2002) si bien en este trabajo solo analizaron la fracción libre. Sin embargo, una tendencia opuesta ocurre en el caso de *Tamarix*, donde sí disminuyeron los niveles totales de PA, demostrando que efectivamente el DFMO inhibe la síntesis de PA, aunque como hemos comentado, y al igual que sucede con *Helianthemum*, las variaciones en los niveles totales no se tradujeron en grandes cambios en el porcentaje de enraizamiento con respecto al control.

En la gráfica 14 se muestran los resultados obtenidos en relación a los efectos de DFMO sobre la fracción libre de PA. En *Helianthemum* aparecieron diferencias significativas en los niveles de PA individuales (gráfica 14A). De hecho, se registró mayor cantidad de Put libre en presencia de DFMO durante los primeros cinco días que en el control, siendo ésta la PA mayoritaria, mientras que los niveles de Spd fueron inferiores. Esto parece indicar que, o bien se está metabolizando Spd a Put (Moschou et al., 2008; Dias et al., 2009), o bien que la producción de Put está teniendo lugar vía arginina descarboxilasa (ADC), como ya se ha visto en otros trabajos (Tiburcio et al., 1987, 1989). Los niveles de PA en raíces, esencialmente Put y Spd, si fueron muy inferiores a los detectados en ausencia de DFMO.

En *T. boveana* Put también fue la PA mayoritaria en la fracción libre (gráfica 14B). En general, los niveles de PA libres no decrecieron con respecto al control, ya que por ejemplo, la concentración de Put libre encontrada en el día 13 fue muy superior, así como también Spm. Por otro lado, se registró un descenso en Spd libre respecto al control en los días 3 y 5, desapareciendo posteriormente y volviendo a aparecer en el día 13. Si se vio un descenso acusado en el nivel de Put y Spd libre en raíces. También hay que resaltar la ausencia de Cad libre durante todo el periodo.

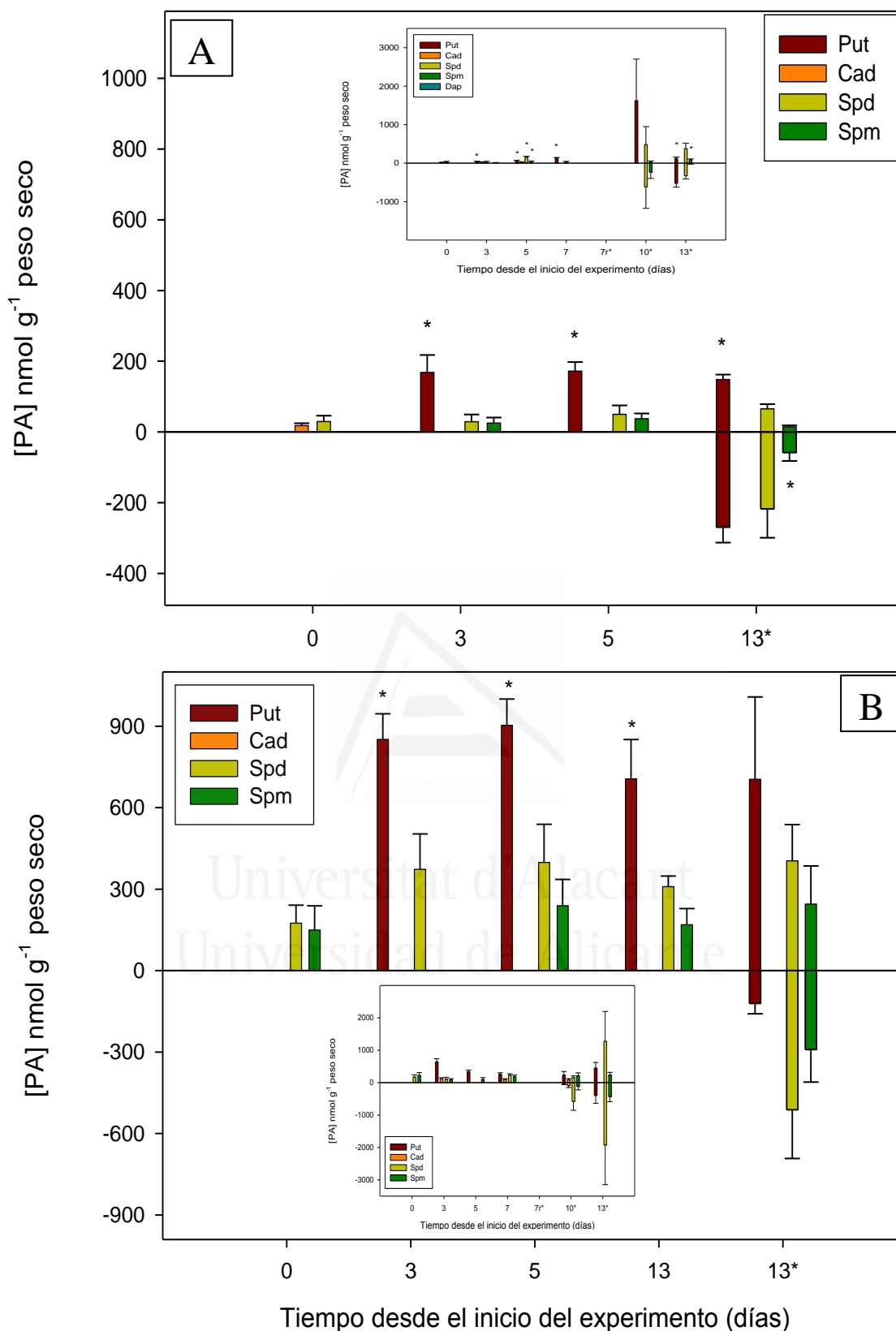


Gráfica 14. Efecto de DFMO en la distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y espermina (Spm) libre durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). La parte superior del eje corresponde a los niveles de PA en segmentos basales de tallo mientras que la parte inferior corresponde a los niveles (que deben ser leídos en valor absoluto) en raíces. Los insertos recuperan los datos obtenidos para esta misma fracción en las dos especies sin inhibidor (gráfica 2). Las barras representan la media \pm EE (n = 4). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T ($\alpha = 0.05$).

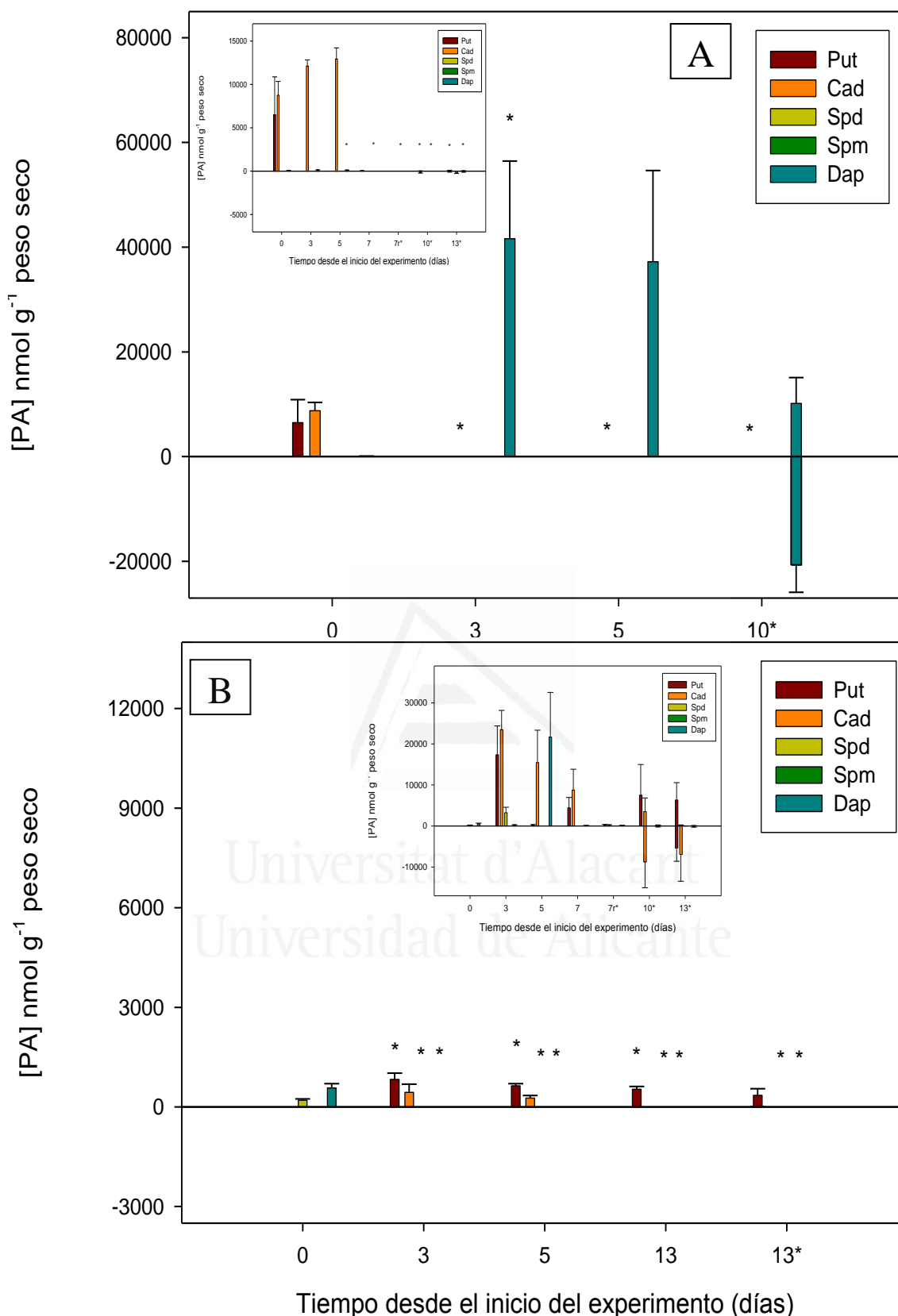
En general podemos ver que la cantidad de Put fue superior a la de Spd, de forma contraria a lo que ocurre en el control. Se cree que la inhibición de la actividad ODC por DFMO podría causar la activación de la ruta ADC (Aribaud et al., 1999), generando así un aumento general en el *pool* de PA (Hummel et al., 2002). Sin embargo, hay trabajos que atribuyen a la ornitina descarboxilasa un papel activo en procesos como la inducción floral, diferenciación sexual, formación de callos o el enraizamiento, mientras que la arginina descarboxilasa estaría más implicada en procesos de desarrollo vegetativo (Faivre-Rampant et al, 2000). En Tiburcio et al. (1989) se atribuye a la actividad ADC un papel principal en la biosíntesis de PA durante la diferenciación.

En la fracción conjugada hay que subrayar que tanto en *Helianthemum* como en *Tamarix* los niveles de Put detectados fueron menores que los de Put libre, a pesar de que éstos fueran significativamente distintos a los observados en el día 0 (gráfica 15). Además, la concentración de Put conjugada fue superior a la detectada en el control, especialmente en la inducción, con aumentos de 3,1 y 1,7 veces en *Helianthemum* y de 0,3 y 1,6 en *Tamarix* en los días 3 y 5, siendo ésta la PA mayoritaria en ambas especies. También en ambas los niveles de Put y Spd conjugada encontrados en raíces fueron menores que los detectados en el control. Le Guen-Le Saos & Hourmant (2001) defienden que los elevados niveles de Put libre detectados en raíces podrían derivar de la liberación de Put de sus conjugados. Durante la inducción de *Tamarix*, además, los niveles de Spd conjugada en tallos fueron superiores a los del control. Finalmente, y por lo que respecta a Spm, en *Helianthemum* se detectó la presencia de esta tetraamina en el día 3, a diferencia de lo visto en el control, mientras que en *Tamarix* desapareció en dicho día y casi triplicó su concentración en el día 5. .

En la fracción ligada (gráfica 16) de *Helianthemum* no se detectó Cad cuando los explantos se trataron con DFMO, como sí sucedió en el control, mientras que se observó una gran concentración de Dap a partir del día 3, siendo ésta la PA mayoritaria en este caso. Las diferencias fueron mucho más acusadas en *Tamarix*, donde se observó una disminución drástica en el contenido de poliaminas de esta fracción respecto a lo detectado en el control, siendo Put la PA mayoritaria, aunque sufrió un descenso muy acusado, especialmente en el día 3 (concentración 20 veces inferior a la del control). Lo mismo ocurrió con Cad, siendo el descenso mucho más drástico para esta diamina (52 y 57 veces inferior en los días 3 y 5) y Dap ligado desapareció durante todo el proceso.



Gráfica 15. Efecto de DFMO en la distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y espermina (Spm) conjugada durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). La parte superior del eje corresponde a los niveles de PA en segmentos basales de tallo mientras que la parte inferior corresponde a los niveles (que deben ser leídos en valor absoluto) en raíces. Los insertos recuperan los datos obtenidos para esta misma fracción en las dos especies sin inhibidor (gráfica 3 de este capítulo). Las barras representan la media \pm EE (n = 4). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T ($\alpha = 0.05$).



Gráfica 16. Efecto de DMFO en la distribución de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd), espermina (Spm) y diaminopropano (Dap) ligado durante el enraizamiento de *Helianthemum marminorense* (A) y *Tamarix boveana* (B). La parte superior del eje corresponde a los niveles de PA en segmentos basales de tallo mientras que la parte inferior corresponde a los niveles (que deben ser leídos en valor absoluto) en raíces. Los insertos recuperan los datos correspondientes a esta misma fracción en las dos especies estudiadas sin inhibidor (gráfica 4 de este capítulo). Las barras representan la media \pm EE (n = 4). Los asteriscos representan diferencias significativas para cada PA con respecto al nivel detectado en el día 0 según la prueba T ($\alpha = 0.05$).

En resumen, el proceso de enraizamiento en las dos especies estudiadas conlleva cambios en los niveles de PA, viéndose afectados dichos niveles tras el uso de inhibidores. En plántulas control (en ausencia de inhibidores) de ambas especies la fracción predominante fue la ligada (sobre todo en los primeros días), así como en los tratamientos con inhibidores, a excepción del uso de AG en *Helianthemum* y DFMO en *Tamarix*, donde la fracción libre fue la predominante. Sin embargo, el uso de MGBG en *Tamarix* supuso también una mayor presencia de la fracción libre durante todos los días del periodo, a excepción del día 10. Lo que nos indica que la fracción ligada parece jugar un papel importante en el enraizamiento de *Helianthemum* pero que la misma no lo es en el caso de *Tamarix*, ya que las tasas de enraizamiento obtenidas tras el uso de DFMO y MGBG son muy dispares.

El día en que ya son visibles las raíces en ambas especies se caracteriza por un nivel muy bajo de PA. Además, las raíces mostraron mayor concentración de PA que los tallos, concentración que se mostró tremendamente afectada por el uso de inhibidores.

La PA mayoritaria en los tallos de ambas especies fue Cad, debido esencialmente a la gran concentración detectada en la fracción ligada, sin embargo, ésta no parece ser determinante en el enraizamiento. Mientras que en el control de *Helianthemum* se detectaron niveles muy elevados en los primeros 5 días, ésta desapareció tanto en presencia de AG como de DFMO, siendo completamente contrarios los efectos de ambos compuestos en lo que a porcentaje de enraizamiento se refiere. En *Tamarix* tampoco parece tener esta diamina un papel relevante. Sus niveles aumentaron al final del periodo en presencia de AG y MGBG, junto con un bajo porcentaje de explantos enraizados en ese momento, sin embargo, fue prácticamente indetectable en presencia de DFMO durante todo el proceso, habiéndose encontrado en este caso mayor número de explantos enraizados.

Si atendemos a cada una de las fracciones por separado, Spd y Put fueron los compuestos predominantes en las fracciones libre y conjugada de *Helianthemum*, respectivamente, mientras que en *Tamarix* predominó Put. Debido a la adición de inhibidores los niveles de PA se vieron afectados y, en consecuencia, Put apareció de forma mayoritaria en la fracción libre de *Helianthemum* por el uso de DFMO y Spm pasó a ser la PA predominante en la fracción conjugada tras el uso de AG. En el caso de *Tamarix* Spd predominó en la fracción libre tras el tratamiento con MGBG.

Las raíces, como se ha dicho anteriormente, mostraron elevadas concentraciones de PA, siendo Put mayoritaria en las fracciones libre y ligada de raíces de *Helianthemum* y Spd en la fracción conjugada. La PA predominante en las raíces de *Tamarix* fue Spd, tanto en la fracción libre como en la conjugada, mientras que Cad apareció como mayoritaria en la fracción ligada. La aplicación de DFMO al cultivo supuso que Put fuera mayoritaria en las raíces de *Tamarix*.

De forma contraria a lo descrito en otras especies (Gaspar et al., 1997; Hausman et al., 1994, 1995a, 1995b; Tiburcio et al., 1989; Tonon et al., 2001) Put no puede considerarse un marcador del enraizamiento en *Helianthemum*, ya que los niveles de Put detectados en el momento de aparecer las raíces son incluso superiores a los registrados con anterioridad. En el caso de *Tamarix*, aunque los niveles detectados en la fase de inducción e inicio son superiores a los encontrados al comienzo de la fase de expresión, los niveles de Put encontrados en los tratamientos con inhibidores rechazaría también esta posibilidad. Aunque las concentraciones con MGBG no se corresponden con las del control, sí que se asemejan a las detectadas con DFMO y, sin embargo, los porcentajes de enraizamiento son muy superiores en el último caso. Por otro lado, los niveles encontrados en presencia de AG indican un retraso en los niveles detectados en la fase de inducción del control y, como ya se ha comentado, este podría ser la causa principal de inhibición.

Pudiera ser que el enraizamiento estuviera relacionado con una fracción de PA en particular más que con el contenido total. Se ha visto en algunos trabajos no solo la importancia de la fracción libre, sino también el papel de las PA conjugadas en procesos de diferenciación y desarrollo (Martin-Tanguy & Carre, 1993). Si nos centramos en las fracciones libre y conjugada de los tallos vemos que, mientras que en el control de *Helianthemum*, Spd y Put son las PA mayoritarias, Spd y Spm son claramente predominantes en el tratamiento con AG. Los elevados niveles de Spd libre se tradujeron en la ausencia de esta PA en la fracción conjugada durante casi todo el proceso, de lo que se desprende que, o bien se produce una movilización de Spd conjugada a Spd libre en presencia de AG, o bien que AG inhibe también a PAO provocando la acumulación de Spd libre. En este último caso se estaría inhibiendo también la conjugación de PA, más concretamente Spd. Además no se detectó Cad conjugada en los primeros 5 días, a diferencia del control.

En *Tamarix*, Put fue mayoritaria en la fracción libre del control y en los tratamientos con AG y DFMO y Spd en el tratamiento con MGBG. También Put

predominó en la fracción conjugada tanto del control como de los tratamientos con inhibidores.

El catabolismo de PA, o los productos derivados de ella, parecen jugar un papel importante en el enraizamiento, ya que AG fue el más eficaz de los inhibidores empleados. Sin embargo, serían necesarias más pruebas para poder aceptar esta hipótesis.

A tenor de los resultados obtenidos en ambas especies con DFMO podríamos pensar que la enzima ODC no es la principal responsable de la síntesis de Put, aunque es necesario experimentos adicionales para comprobar esta hipótesis. ADC es la enzima implicada en la biosíntesis de Put en otras especies como *Pringlea antiscorbutica* (Hummel et al., 2002), *Arabidopsis thaliana* (Watson et al., 1998) y uva (Martin-Tanguy & Carre, 1993). Por otro lado, es poco probable que la concentración de DFMO empleada no fuese suficiente para inhibir el enraizamiento. En *Pringlea* se observó que una concentración de 2 mM fue suficiente para provocar algún efecto biológico y en otros trabajos se han descrito efectos del DFMO sobre el crecimiento y desarrollo a concentraciones inferiores a 2 mM (Martin-Tanguy & Carre, 1993). Además, otro hecho que parece apoyar el que sea ADC la principal responsable de la síntesis de Put en *Helianthemum* y *Tamarix* es la reducción en los niveles de esta diamina en presencia de MGBG, inhibidor que podría inhibir a ADC (Hiatt & Malmberg, 1988).

2.6. Conclusiones

1. Durante el proceso de enraizamiento la fracción ligada fue mayoritaria en ambas especies, sin embargo, a tenor de los resultados obtenidos tras el empleo de inhibidores de PAs, esta fracción parece ser indicadora de dicho proceso solo en el caso de *Helianthemum*.
2. El crecimiento de las raíces “demanda” altos niveles de PA en comparación con las zonas basales del tallo.
3. El predominio de una fracción de PA u otra es dependiente de la especie. Así, en *Tamarix* predomina la fracción ligada durante la morfogénesis radicular, mientras que en *Helianthemum* esta fracción desaparece a favor de las libres.

4. La PA mayoritaria en ambas especies fue Cad, debido principalmente a una elevada presencia de la forma ligada. Sin embargo, ésta no puede ser considerada marcador del proceso de enraizamiento.
5. Los efectos observados en el enraizamiento en presencia de los inhibidores del metabolismo de PA fueron dependientes de la especie.
6. De los tres inhibidores ensayados (aminoguanidina, metilglioxal-bis-guanilhidrazona y difluorometilornitina), el único que resultó eficaz inhibiendo completamente el enraizamiento en *Helianthemum* durante el periodo de tiempo analizado fue aminoguanidina, un inhibidor de la oxidación de PA.
7. Aminoguanidina también inhibió eficazmente el enraizamiento en *Tamarix*, pero al final del periodo estudiado se observaron ya explantos enraizados, indicando que de alguna manera esas plantas habían conseguido superar o eliminar el efecto del inhibidor.
8. El catabolismo de PA y los productos derivados de este, parecen jugar un papel importante en el enraizamiento, a juzgar por los resultados obtenidos con los inhibidores.
9. Tanto en *Helianthemum* como en *Tamarix*, la inducción/iniciación de raíces parece ser dependiente de espermina principalmente libre.

Capítulo 3. Desarrollo de técnicas de criopreservación para la conservación de especies vegetales de interés

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

3.1. Introducción

La criopreservación o criopreservación consiste en la conservación de material biológico en estado viable a la temperatura del nitrógeno líquido (-196°C). En estas condiciones todos los procesos metabólicos y la mayoría de los procesos físicos que pueden ocurrir en las células se detienen (González-Benito et al., 2004; Panis & Lambardi, 2005), lo que la convierte en la única técnica que hoy día nos permite hablar de una conservación segura de material vivo por tiempo indefinido.

La criopreservación como herramienta de conservación ha sido integrada dentro de las estrategias de conservación *ex situ* (Touchell et al., 2002a), proporcionando de esta manera un método adecuado de almacenamiento a largo plazo de recursos fitogenéticos que, en muchos casos, no podrían ser conservados mediante técnicas convencionales (Benson, 1999).

El tipo de material (explanto) que es objeto de criopreservación depende de la especie y de las razones por las que va a ser conservado (Reed, 2008). Así, la criopreservación se ha aplicado con éxito en semillas (Cho et al., 2002; Dussert et al., 1998; Pérez-García & González Benito, 2008), ejes embrionarios (González-Benito & Pérez, 1992; Kim et al., 2002; Malik & Chaudhury, 2006), embriones somáticos (Jekkel et al., 2002; Suranthran et al., 2012), suspensiones celulares (Dumet et al., 1994; Wang et al., 2002b), brotes apicales (González-Benito et al., 1997; Mallón et al., 2008; Turner et al., 2001a) y polen (Quat & Daniel, 2000). Por otro lado, el tipo específico de procedimiento de criopreservación empleado dependerá también del tipo de explanto y, en el caso de material cultivado *in vitro*, de la disponibilidad de un sistema de cultivo *in vitro* eficiente y repetible (Wilkinson et al., 2003).

A continuación describiremos brevemente las principales técnicas disponibles para llevar a cabo la criopreservación:

3.1.1. Técnicas clásicas

Se basan en lo que se conoce como enfriamiento lento o enfriamiento convencional, que consiste en enfriar de manera progresiva los explantos dentro de una solución crioprotectora mediante la utilización de un criostato programable. Durante esta reducción gradual de temperatura las células se deshidratan progresivamente debido

a la pérdida del agua que se destina a la formación de hielo extracelular. La velocidad de enfriamiento óptima para asegurar el nivel apropiado de deshidratación con el objetivo de poder criopreservar células vegetales suele ser de $0.5-2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta alcanzar una temperatura intermedia de -30 ó -40°C , a partir de la cual se introducen ya en nitrógeno líquido (González-Arno et al., 2008). Este método ha resultado útil para especies que se adaptan al frío pero no ha dado niveles aceptables de supervivencia con otras, sobre todo con las especies tropicales (Towill, 2002). Con esta técnica se han crioconservado principalmente suspensiones celulares y callos (Cyr, 2000), además de ápices (Ryynänen & Aronen, 2005b; Reed & Uchendo, 2008, citado en Engelmann, 2011).

3.1.2 Nuevas técnicas

En la actualidad las técnicas de crioconservación buscan directa o indirectamente conseguir la *vitrificación* de las células, un proceso en el que, a diferencia del caso anterior, la deshidratación celular tiene que ocurrir con anterioridad a la exposición del explanto a la temperatura de congelación. La deshidratación se puede conseguir mediante el empleo de soluciones crioprotectoras altamente concentradas y/o por desecación por aire (Engelmann, 2011). Estas técnicas ofrecen una alternativa a la congelación tradicional, cuyo principal riesgo para la integridad de las células es la formación de hielo, minimizando así los posibles daños celulares causados por el mismo. Usualmente la congelación tiene lugar por inmersión directa en NL, de forma que no se requiere un sistema de congelación especial, lo cual es sin duda también una ventaja.

3.1.2.1 Precultivo

Consiste en el cultivo del explanto deseado en un medio con una concentración elevada de sacarosa (u otro compuesto osmóticamente activo) durante un periodo de tiempo variable (horas o incluso días). Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el que esta técnica aumenta la supervivencia tras la congelación, se supone que el cultivo en las condiciones indicadas reduce el contenido en agua y aumenta el contenido endógeno de azúcares (Towill, 2002), que actúan protegiendo a las membranas de los procesos de desecación que son inherentes a los protocolos de crioconservación.

Algunos autores han encontrado que polialcoholes derivados de azúcares (como sorbitol o manitol) aportan mejores beneficios en este sentido que los propios azúcares (Turner et al., 2001a, 2001b). Esta técnica ha sido aplicada en banana (Panis et al., 1996).

3.1.2.2 Desecación

Consiste en la deshidratación de los explantos mediante aire, que puede proceder de una cabina de flujo laminar o, de forma más precisa y reproducible, de un flujo de aire comprimido estéril o previamente deshidratado mediante gel de sílice (Engelmann, 2004). Seguidamente los explantos son congelados rápidamente mediante inmersión directa en NL. Esta técnica se usa principalmente para crioconservar embriones somáticos o ejes embrionarios extraídos directamente de la semilla (Shimonishi et al., 2000), por ejemplo, en el caso de semillas recalcitrantes (Normah & Makeen, 2008; citado en Reed, 2011).

3.1.2.3 Precultivo-desecación

Combinación de las dos anteriores, en este caso los explantos son tratados con crioprotectores y después deshidratados en la cabina de flujo laminar o con gel de sílice. La velocidad de congelación debe ser rápida. Con esta técnica se han crioconservado segmentos de tallo de espárrago (Uragami et al., 1990) y cultivos poliembriónicos de palma (Dumet et al., 2000)

3.1.2.4 Vitrificación

El término vitrificación hace referencia al proceso físico que ocurre cuando una solución altamente concentrada se enfría a muy bajas temperaturas alcanzando entonces un estado vítreo metaestable, en lugar de cristalizar en forma de hielo y convertirse en sólido (Fahy et al., 1984). Actualmente es una de las técnicas más utilizadas y que mejores resultados ha proporcionado en la crioconservación de especies vegetales en los últimos diez años.

También conocida como *vitrificación completa* (Panis et al., 2001), esta técnica se basa en el uso de una solución vitrificante formada por una combinación de compuestos crioprotectores a elevada concentración, como por ejemplo la PVS2 (*Plant*

Vitrification Solution 2), descrita en 1990 por Sakai et al. (1990) y una de las más utilizadas. Esta solución sobreenfría a -100°C y adquiere el estado vítreo metaestable a -115°C . En esta opción es frecuente también la inclusión de una fase de precultivo así como de tratamiento con solución de carga (SC), todo ello para tratar de incrementar la tolerancia del tejido a la deshidratación, antes de aplicar la solución vitrificante, con la que se persigue deshidratar suficientemente los tejidos de manera que se concentren los componentes permeables y otros contenidos citoplasmáticos en el interior celular. Como consecuencia de esta alta concentración intracelular, al enfriar bruscamente los tejidos estos se vitrifican en lugar de solidificar bajo la forma de cristales de hielo. Con esta técnica se han crioconservado suspensiones celulares (Sakai et al., 1990; Tsukazaki et al., 2000), ápices (Takagi et al., 1997; Turner et al., 2001a, 2001b) y embriones zigóticos (Ishikawa et al., 1997). En la figura 1 se esquematiza un protocolo completo de vitrificación.

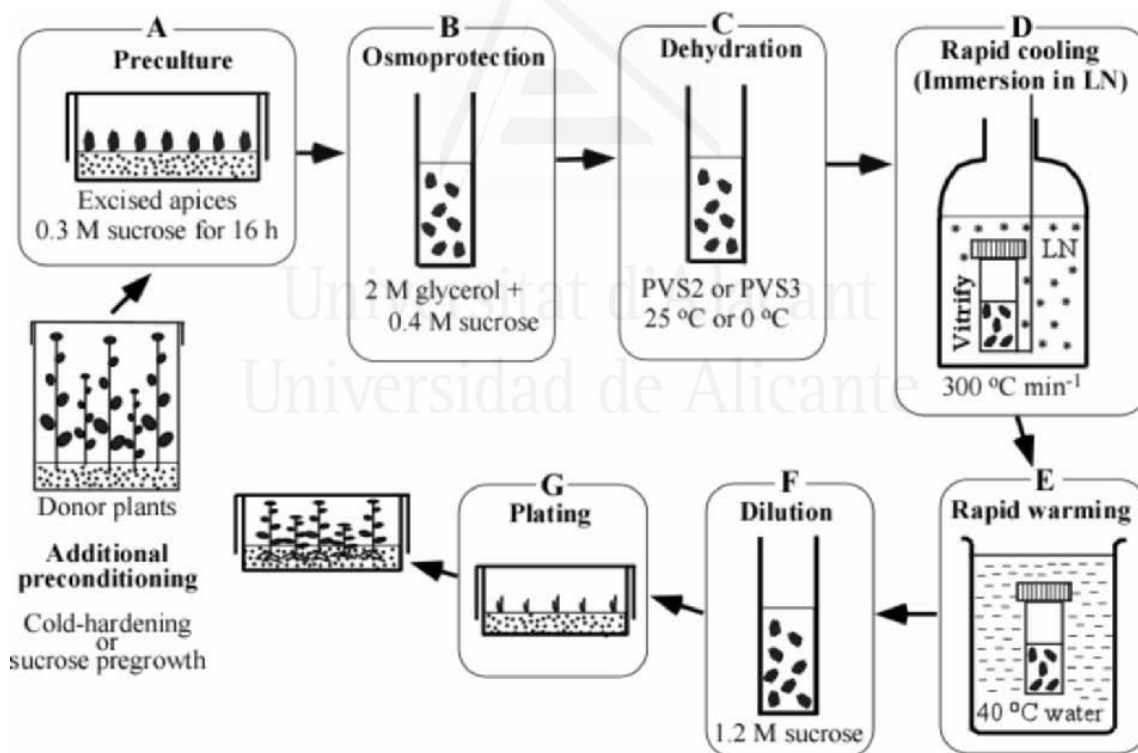


Figura 1. Representación esquemática de un protocolo de vitrificación (Sakai et al., 2008).

3.1.2.5 Vitrificación en gota

Es una versión de la vitrificación en la que el explanto se vitrifica en una gota de solución vitrificante (PVS2 o similar) dispuesta sobre una tira de papel aluminio. Al

sumergir el conjunto en el NL se consigue que la transferencia de temperatura sea mucho más rápida por la presencia del metal y por tanto la velocidad de enfriamiento resulta más eficaz para conseguir la vitrificación. Se ha utilizado para la criopreservación de ápices y meristemas (Panis et al., 2005; Halmagyi & Pinker, 2006, Marco-Medina et al., 2010a).

3.1.2.6 Encapsulación-deshidratación

Se basa en la tecnología desarrollada para la producción de semillas artificiales. Se trata de encapsular a los explantos en cápsulas de alginato y someterlos posteriormente a concentraciones crecientes de sacarosa. Posteriormente las cápsulas son desecadas parcialmente en una cabina de flujo laminar o mediante el uso de gel de sílice hasta un contenido de agua aproximado del 20%. En este caso la congelación debe ser también rápida. Se han conseguido buenos resultados en ápices (González Arnao et al., 1998; Reed et al., 2006), suspensiones celulares (Shibli et al., 2001) y embriones somáticos (Fang et al., 2004).

3.1.2.7 Encapsulación-vitrificación

Esta técnica deriva de la combinación de las técnicas de encapsulación-deshidratación y vitrificación. Tras encapsular a los explantos éstos son sometidos a deshidratación mediante inmersión en una solución vitrificante y rápidamente congelados. Se ha aplicado con éxito en la criopreservación de lirio (Matsumoto et al., 1996), patata (Hirai & Sakai, 1999a) y wasabi (Matsumoto et al., 1995).

En el presente capítulo describimos los resultados obtenidos en el desarrollo de protocolos de criopreservación basados en la técnica de vitrificación para *Astragalus nitidiflorus* y *Tamarix boveana*. Como se va a criopreservar material cultivado *in vitro*, es esencial el desarrollo previo del protocolo de micropropagación completo de la especie a conservar. En cualquier método de vitrificación, los meristemas deben estar lo suficientemente deshidratados para ser capaces de vitrificar cuando son rápidamente sumergidos en nitrógeno líquido. Así, la clave para una criopreservación exitosa mediante vitrificación es la de valorar la tolerancia de los explantos que van a ser criopreservados a la deshidratación inducida por la solución de vitrificación. En muchos

casos que los tejidos adquieran cierta tolerancia a las soluciones de vitrificación requiere la optimización de las fases de acondicionamiento y/o osmotolerancia de los tejidos (Charoensub et al., 2004; Matsumoto, 2002; Vidal et al., 2005; Wang et al., 2002a).

3.2. Objetivos

El objetivo de este capítulo es el desarrollo de un protocolo de crioconservación para *Astragalus nitidiflorus* y otro para *Tamarix boveana*, a fin de poder constituir a partir de ellos una estrategia de conservación a largo plazo para las especies citadas.

3.3 Material y métodos

3.3.1. Crioconservación de *Astragalus nitidiflorus*

3.3.1.1. Material empleado

Meristemos (1-1.5 mm de longitud) procedentes de explantos apicales crecidos en medio con sales y vitaminas de MS, sacarosa 0.09 M, 7 g l⁻¹ Plant agar y 10 mg l⁻¹ de Sequestrene® mantenidos durante 4 semanas a una intensidad luminosa de 42 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y fotoperiodo de 16 h a 25 \pm 2°C.

3.3.1.2. Precultivo

Se cortaron los meristemos y se cultivaron en placas Petri con medio MS suplementado con sacarosa 0.09 M, 6 g l⁻¹ de Plant agar, 10 mg l⁻¹ de Sequestrene® y 0.1 mg l⁻¹ de BA, durante una noche en oscuridad.

3.3.1.3. Osmoprotección con solución de carga (SC)

Al día siguiente se transfirieron los meristemos a crioviales de plástico de 2 ml, colocando 10 meristemos por criovial. En primer lugar se trataron con solución de carga (SC) consistente en medio MS + 2 M de glicerol + 0.4 M de sacarosa durante 20 minutos a temperatura ambiente.

3.3.1.4. Deshidratación en PVS2 y congelación

Posteriormente fueron deshidratados con solución de vitrificación PVS2, consistente en glicerol al 30%, etilenglicol al 15% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 15%, todo ello en medio MS con sacarosa 0.4 M. En esta solución se mantuvieron durante tiempos variables entre 0 y 90 minutos a 0°C y a continuación se introdujeron directamente en nitrógeno líquido (NL), donde permanecieron al menos 1 día.

3.3.1.5. Descongelación, descarga y recuperación

La descongelación se llevó a cabo por inmersión en un baño de agua a 40°C durante 2 minutos. Tras retirar la PVS2 del criovial con ayuda de una micropipeta se añadió solución de descarga (SD), consistente en medio MS + sacarosa 1.2 M, y se mantuvieron allí durante 10 minutos antes de ser transferidos a un papel de filtro estéril colocado sobre medio MS + sacarosa 0.3 M, 6 g l⁻¹ Plant agar, 10 mg l⁻¹ Sequestrene® y 0.1 mg l⁻¹ BA, manteniéndolos en oscuridad durante 24 horas. Posteriormente se pasaron a medio MS + sacarosa 0.09 M + Plant agar 6 g l⁻¹ + Sequestrene® 10 mg l⁻¹ y BA 0.1 mg l⁻¹, donde permanecieron otros 6 días en oscuridad hasta ser transferidos a luz a 25±2°C con fotoperiodo de 16h e irradiancia de 49 μmol m⁻² s⁻¹.

3.3.1.6. Uso de un sistema en doble capa post-recuperación

Para mejorar la recuperación de los meristemas congelados estos se transfirieron a tubos de vidrio (15 × 2.5 cm) con medio MS + sacarosa 0.09 M + Plant agar 6 g l⁻¹ y Sequestrene® 10 mg l⁻¹ tras tres semanas en medio con BA. Dos días después se les añadió medio líquido consistente en sales Knop a la mitad de su concentración, 50 g l⁻¹ de sacarosa y 3 g l⁻¹ de carbón activo (CA). Este medio líquido se añadió de forma que no cubriera al meristemo en su totalidad y fue repuesto de nuevo al comienzo de la tercera semana de cultivo.

3.3.1.7. Estimación de la recuperación

A las 3 semanas de permanecer en el medio anterior se recogieron datos de crecimiento, estimado como el número de explantos en los que se habían formado hojas nuevas. Debido a la presencia de un único meristemo en cada explanto solo se pudieron

realizar tres réplicas de este experimento. Cada réplica constaba de 20 meristemos para cada uno de los tratamientos, 10 de ellos para la muestra control y otros 10 para la muestra a congelar. Los datos se expresan como media (porcentaje) y error estándar.

3.3.2. Crioconservación de *Tamarix boveana*

3.3.2.1. Material empleado

El material utilizado para este experimento corresponde al individuo número 2 perteneciente a la población de Saladares del Guadalentín. Al comienzo de los experimentos el material de este individuo llevaba dos años en condiciones *in vitro*. En todas las pruebas se emplearon explantos con cuatro semanas desde el último subcultivo realizado en medio MS con sacarosa 0.09 M, 7 g l⁻¹ de Plant agar y mantenidos a una intensidad luminosa de 42 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$ con un fotoperiodo de 16h a 25±2°C.

3.3.2.2. Pretratamiento y precultivo

Para el precultivo se seccionaron explantos de 0.3-0.5 cm de longitud y se sembraron en medios que incluían diferentes concentraciones (0.09, 0.3 y 0.5 M) de sacarosa o glicerol (0.4 y 0.8 M) donde permanecieron durante 16 horas hasta que tanto los meristemos apicales como los axilares fueron escindidos. También se probó el efecto del acondicionamiento en frío (3-5°C) en condiciones de oscuridad durante una semana. En todos los casos los medios de cultivo contenían adicionalmente sales y vitaminas de MS y Plant agar 7 g l⁻¹.

3.3.2.3. Osmoprotección de los tejidos con una solución vitrificante

Se seccionaron meristemos de 0.5-1 mm de longitud de explantos procedentes o no de la etapa de precultivo compuestos por el domo apical más 6 u 8 hojas. Se transfirieron los mismos a crioviales de plástico de 2 ml, colocando 10 meristemos por criovial, a los que se añadió 1 ml de solución de carga (SC), consistente en medio MS + glicerol 2 M + sacarosa 0.4 M durante periodos variables entre 0 y 40 minutos a temperatura ambiente.

3.3.2.4. Deshidratación en PVS2

A continuación los meristemos fueron deshidratados con solución de vitrificación PVS2 (Sakai et al., 1990) en medio MS + sacarosa 0.4 M durante periodos variables entre 0 y 90 minutos a 0° C y sumergidos a continuación directamente en nitrógeno líquido donde permanecieron al menos un día.

3.3.2.5. Descongelación, descarga y recuperación

La descongelación de los explantos se llevó a cabo en un baño de agua a 40°C durante 2 minutos. Tras retirar la PVS2 y añadir solución de descarga (SD) durante 10 minutos, los meristemos se transfirieron a un papel de filtro estéril dispuesto sobre medio sólido MS + sacarosa 0.3 M donde permanecieron 24 horas en condiciones de oscuridad. Entonces se subcultivaron a medio MS sin reguladores donde permanecieron otros 4-5 días en las mismas condiciones. Tras ese periodo se transfirieron a condiciones de 49 moles m⁻² s⁻¹ de intensidad luminosa y fotoperiodo de 16 h de luz.

También probamos el efecto de TDZ en la recuperación post-congelación. Las concentraciones de TDZ ensayadas fueron 0.005 y 0.01 mg l⁻¹, que se adicionaron al medio antes de autoclavar. Los meristemos fueron subcultivados a medio fresco con concentraciones decrecientes de TDZ cada dos semanas.

3.3.2.6. Uso de un sistema en doble capa post-recuperación

Para mejorar la recuperación de los meristemos congelados se transfirieron los mismos a tubos de vidrio (15 × 2.5 cm) con medio MS + sacarosa 0.09M y 6 g l⁻¹ Plant agar tras dos semanas en medio sin reguladores. Dos días después se les añadió medio líquido consistente en sales de Knop a la mitad de su concentración, sacarosa 0.09M y 3 g l⁻¹ de carbón activo. Como en el caso anterior, el medio líquido fue añadido de forma que no cubriera al meristemo en su totalidad y se repuso a intervalos de dos semanas hasta que los explantos hubiesen elongado lo suficiente para ser aclimatados.

3.3.2.7. Estimación de la recuperación

Cuatro semanas después de la descongelación se evaluó el crecimiento de los meristemos, definido como porcentaje de explantos que habían desarrollado hojas

nuevas. Se realizaron 6 réplicas por experimento con 10 meristemos en cada una de ellas. Los datos se expresan como media (porcentaje) y error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y con el fin de detectar las posibles diferencias estadísticas entre tratamientos un test de Duncan ($\alpha=0.05$). Antes del análisis el porcentaje inicial se transformó de la siguiente manera: ($y'=\arcsin y^{1/2}$, y = porcentaje inicial/100).

3.3.2.8. Datos complementarios

Las condiciones del cultivo de meristemos en medio sólido eran de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 h de luz a $49 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, salvo que se indique lo contrario. Cuando se transfirieron a tubos se modificó la intensidad luminosa a $42 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

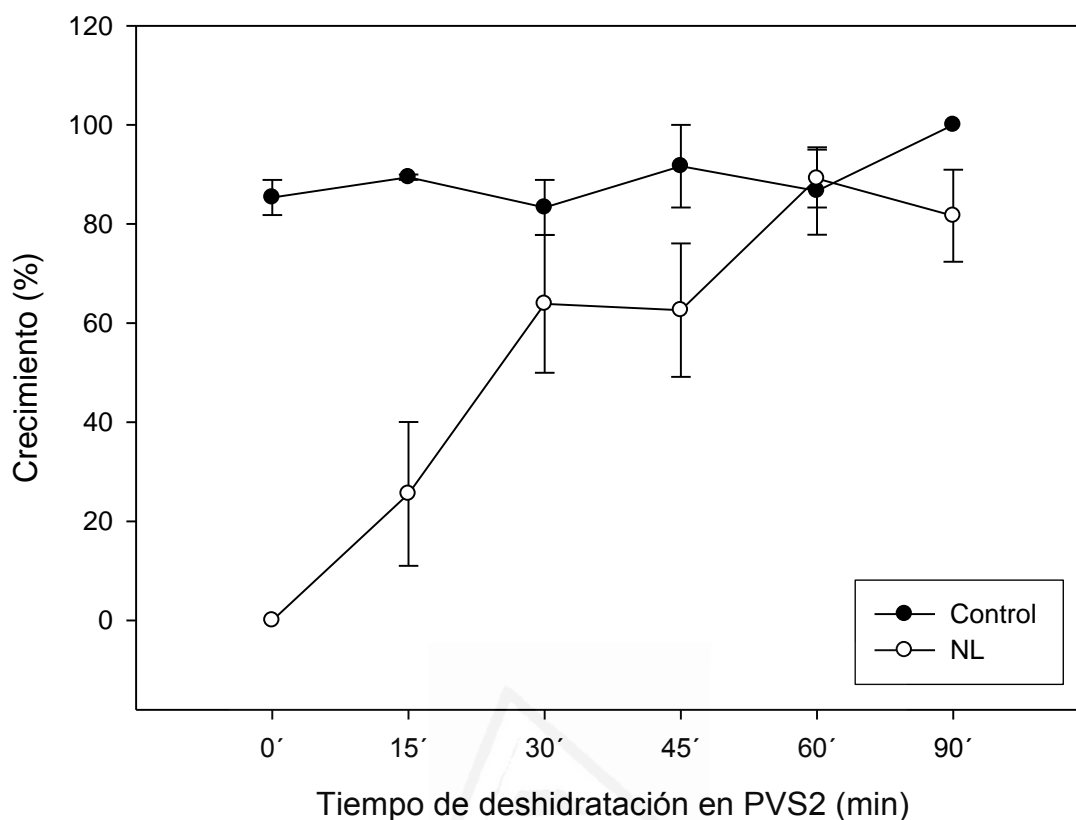
3.4 Resultados y discusión

3.4.1. Crioconservación de *Astragalus nitidiflorus*

3.4.1.1. Efecto del tiempo de deshidratación sobre el crecimiento de los explantos

Un primer inconveniente con el que nos encontramos para desarrollar el protocolo de crioconservación de *A. nitidiflorus* fue la sustancial escasez de material de esta especie, lo que nos limitó el número de pruebas que podíamos hacer con este material.

Puesto que el uso de una solución osmoprotectora ha dado muy buenos resultados en especies como menta (Hirai & Sakai, 1999b) espárrago (Nishizawa et al., 1993), taro (Takagi et al., 1997) o wasabi (Matsumoto, 2002), optamos por aplicarla a esta especie como paso previo a la deshidratación con PVS2. Durante el tratamiento con esta solución las células se deshidratan osmóticamente y se plasmolizan. Además, la presencia de esta solución en el espacio periprotoplasmático de las células plasmolizadas podría mitigar el estrés mecánico causado por una deshidratación severa (Matsumoto et al., 1998). Relacionado con esto se ha sugerido también que la plasmolisis podría actuar reduciendo el estrés mecánico sobre la membrana, cuyo origen estaría en la deformación de la pared celular durante la congelación extracelular (Jitsuyama et al., 1997).



Gráfica 2. Curva de crecimiento de los explantos tras la deshidratación con PVS2. Inicialmente se aplicó un precultivo con sacarosa 0.09 M y 0.1 mg l⁻¹ de BA en medio sólido durante un día. La solución de carga se aplicó durante 20 minutos y ésta fue seguidamente reemplazada por PVS2, en la que se mantuvieron los meristemos durante los tiempos indicados a 0°C.

Como se deduce del trazo control de la gráfica 2, los meristemos de *Astragalus* muestran una alta tolerancia a la deshidratación por PVS2 ya que exhiben un porcentaje de crecimiento similar independientemente del tiempo de exposición (de 15 a 90 min) a PVS2 (figura 2a). Ahora bien, la crioprotección efectiva sólo se demostró a partir de 30 min de exposición a PVS2 con un 60% de supervivencia de los explantos tras la congelación en LN (figura 2b). Aumentar el tiempo en PVS2 a 90 min aumentó también la crioprotección hasta situarse en torno al 80%. La optimización tanto del tiempo de exposición a PVS2 como de la temperatura a la que se aplica es una de las claves para el éxito de la técnica. En nuestro caso se ha aplicado dicha solución a 0°C para minimizar los efectos tóxicos ya conocidos de su uso a temperatura ambiente (Matsumoto, 2002; Volk et al., 2006) además de que las tasas de recuperación son superiores a baja temperatura (Wang et al., 2002a.). Además, el uso de esta solución a 0°C requiere un tiempo más prolongado de exposición para que se produzca la deshidratación, lo que permite la manipulación de mayor número de muestras durante el desarrollo del

experimento (Wang et al., 2002a). Con el uso de SC durante 20 minutos y PVS2 a 0°C durante 60 minutos se han obtenido muy buenos resultados en esta especie. Además existen otros factores que pueden haber jugado un papel crucial en la recuperación post-congelación y que serán comentados a continuación.

La obtención de tan elevados porcentajes de crecimiento tras 3 semanas en medio de recuperación no hace, en principio, necesaria la implementación de etapas adicionales en el protocolo de crioconservación. Sin embargo, sí que observamos la muerte de numerosos explantos a partir de las cuatro semanas tras la descongelación, lo que nos llevó a plantearnos la optimización de este último paso. Touchell et al. (2002b) describieron este mismo problema en sus trabajos con algunas especies australianas como *Lambertia orbifolia* y *Conostylis wonganensis*. En *Gravillea scapigera* ocurrió este mismo fenómeno y se consiguió solventar añadiendo zeatina al medio de recuperación.

La combinación de reguladores del crecimiento en el medio de recuperación puede influir tanto en la supervivencia como en la capacidad de brotación de los meristemas. Así, las citoquininas son los reguladores más usados en los medios de recuperación con el objetivo de mejorar el crecimiento (Yamada et al., 1991; Lambardi et al., 2000; Wang et al. 2003). Aunque en nuestro caso la adición de BA dio buenos resultados durante las primeras semanas de cultivo, se han visto diferencias en los requerimientos hormonales entre los meristemas control, no sumergidos en nitrógeno líquido, y los meristemas congelados. En el caso de *Astragalus* la aplicación de 0.1 mg l⁻¹ de BA resultó óptima para la recuperación de meristemas congelados pero no fue adecuada para la recuperación de los meristemas control, ya que muchos de ellos generaron síntomas de hiperhidratación (datos no mostrados). Estas diferencias en los requerimientos hormonales podrían deberse a las diferentes situaciones de estrés a las que fueron sometidos (Wang et al., 2003).

También se ha visto que el momento de aplicación de los reguladores en el medio de recuperación puede resultar crítico. En *A. viridis* el momento clave para la introducción de los mismos es la primera semana, mientras que en *Gravillea scapigera* la mayor tasa de regeneración tuvo lugar con la transferencia de los ápices a medio con zeatina una semana después de la descongelación (Touchell et al., 2002b). En nuestro caso los meristemas se ponen en contacto con BA desde el primer día tras la descongelación. Para Towill (1983), la adición de reguladores podría ser necesaria por

la rotura en las interacciones celulares del meristemo a causa del daño producido durante la congelación.

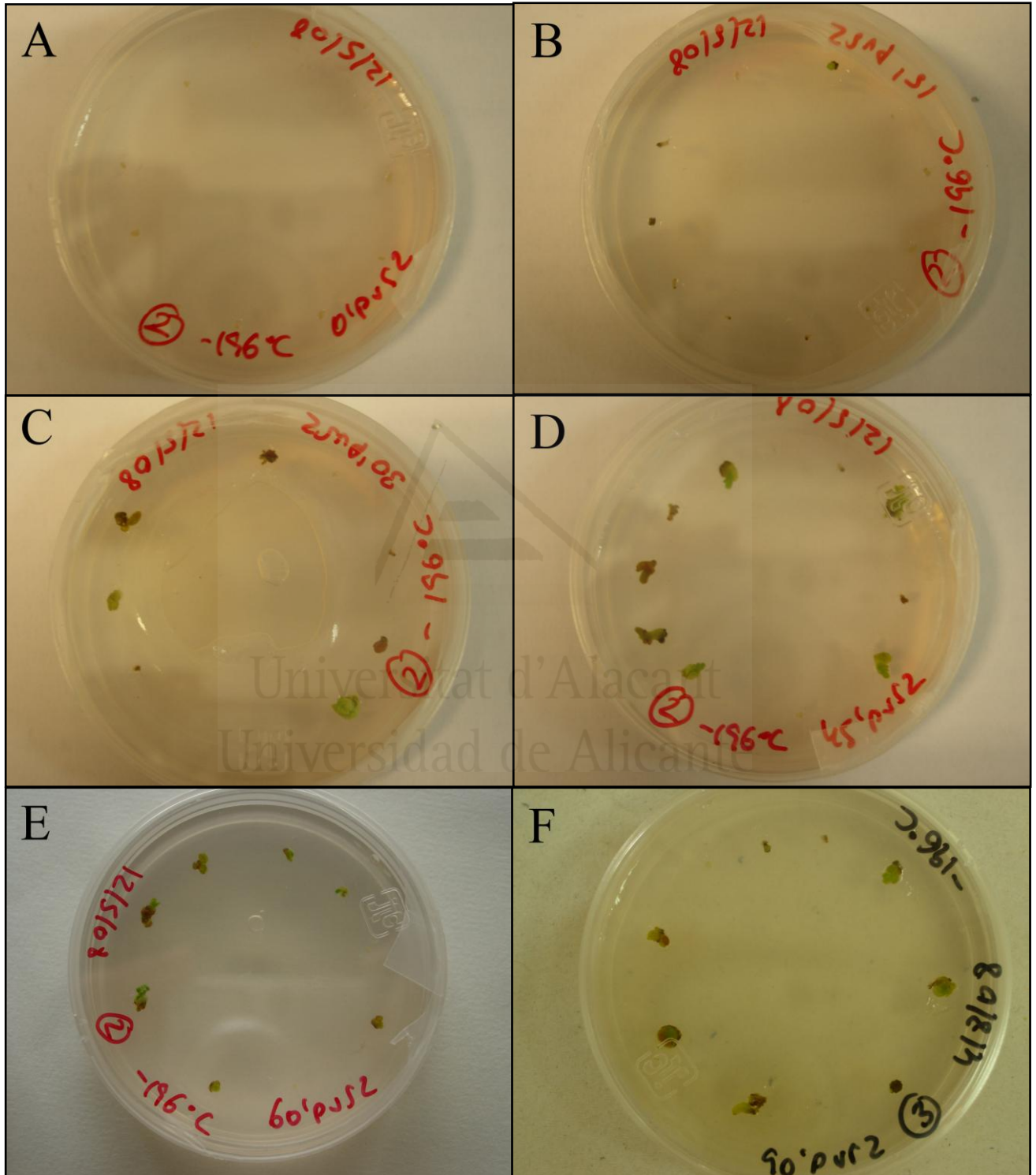


Figura 1. Explantos crioconservados mediante vitrificación y mantenidos en medio de recuperación durante tres semanas. A los meristemos se les aplicó solución de carga durante 20 minutos y PVS2 durante 0 (A), 15 (B), 30 (C), 45 (D), 60 (E) y 90 (F) minutos.

Igualmente eficaz, o incluso mejor, resultó la adición de reguladores al medio de cultivo previo a la escisión de los meristemas, si bien el número de estudios donde se han incorporado reguladores del crecimiento en esta fase previa a la crioconservación es aún limitado (Touchell et al., 2002b). En *Beta vulgaris* la adición de 0.2 mg l⁻¹ de quinetina al medio de cultivo previo al acondicionamiento en frío mejoró el crecimiento post-congelación y la calidad de los explantos (Vandenbussche et al., 2000). En *G. scapigera* se observó que la supervivencia post-congelación dependía tanto del tipo como de la concentración de citoquinina aplicada en el medio de cultivo antes de la escisión, siendo superior la obtenida con bajos niveles de BA (Touchell et al., 2002b). El uso de BA 0.1 mg l⁻¹ nos ha dado también buenos resultados en *A. nitidiflorus*, aunque el tiempo de aplicación fue diferente, siendo de 21 días en el caso de la especie anterior.

Como se ha visto, los reguladores del crecimiento podrían ser esenciales en el medio de cultivo antes de la escisión para obtener óptimas tasas de recuperación post-congelación. Su presencia en el medio de recuperación podría condicionar, además, el porcentaje de crecimiento posterior.

Con el uso de un sistema en doble capa (DC) conseguimos obtener explantos lo suficientemente elongados como para ser transferidos al medio de enraizamiento. Los explantos elongaron en una media de 5 semanas. La aplicación de un sistema de doble capa en la etapa de elongación, mejora además la capacidad de enraizamiento de los brotes (De Klerk, 2002), como ocurrió en algunos de los explantos de *A. nitidiflorus* tras la descongelación.

Las razones que justifican la mejora en la respuesta morfogénica de los explantos a la DC pueden ser varias. La presencia de medio líquido en un sistema como éste permite una mejor difusión del sustrato una vez que se produce la rotura de la matriz de agar durante el crecimiento del explanto (De Riek et al., 1997). Además, y aunque el medio de cultivo sólido utilizado en nuestro caso no contenía reguladores la presencia de carbón activo podría haber influido en la eliminación de los restos de BA que pudieran quedar en los explantos, puesto que es bien conocida la capacidad de este compuesto de adsorber reguladores del crecimiento (Pan & Van Staden, 1998).

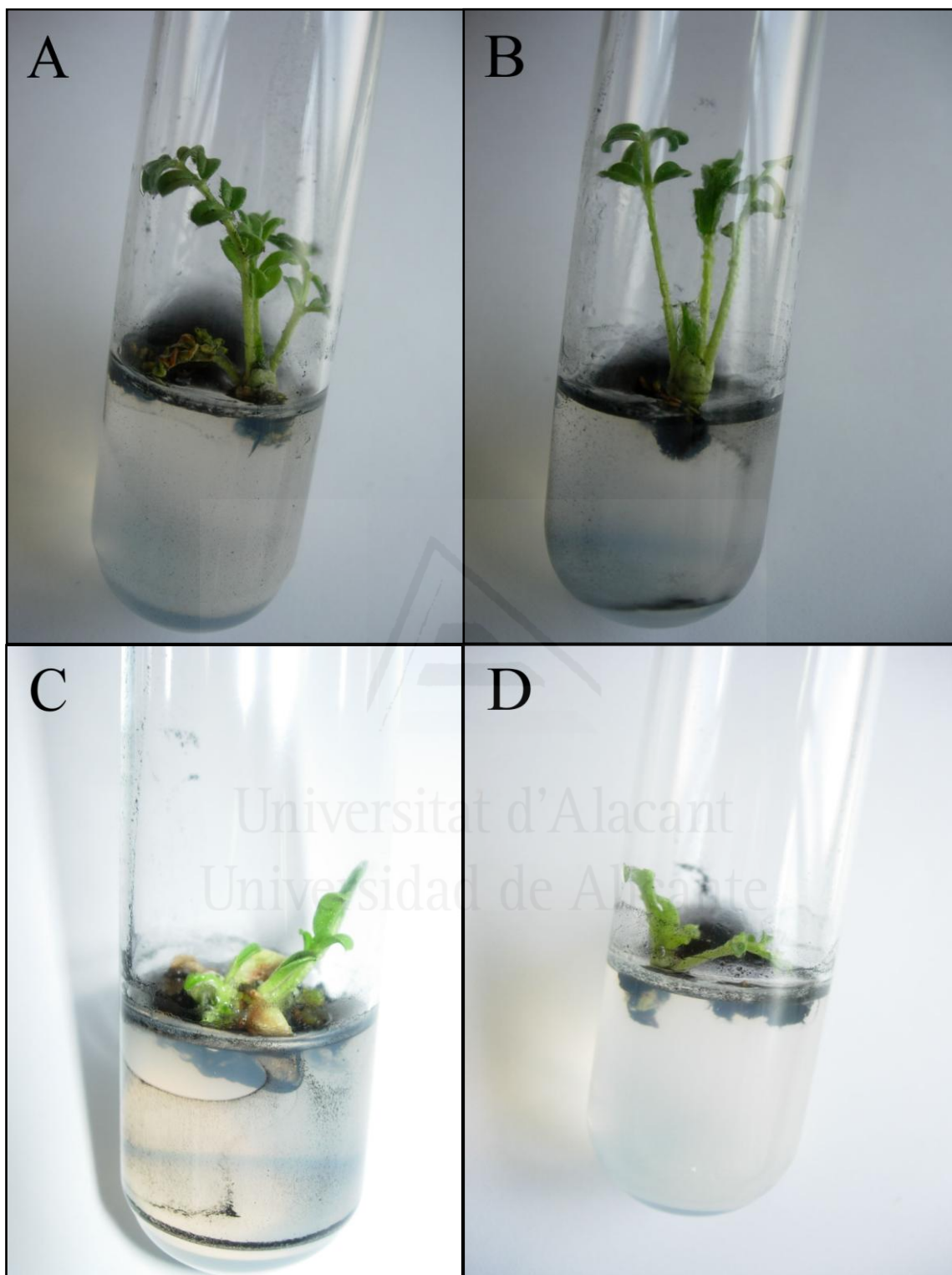


Figura 2a. Aspecto de explantos control (no congelados) de *A. nitidiflorus* sometidos a 0 (A), 30 (B), 45 (C) y 60 (D) minutos de deshidratación en PVS2, tras ser transferidos a condiciones habituales de crecimiento.

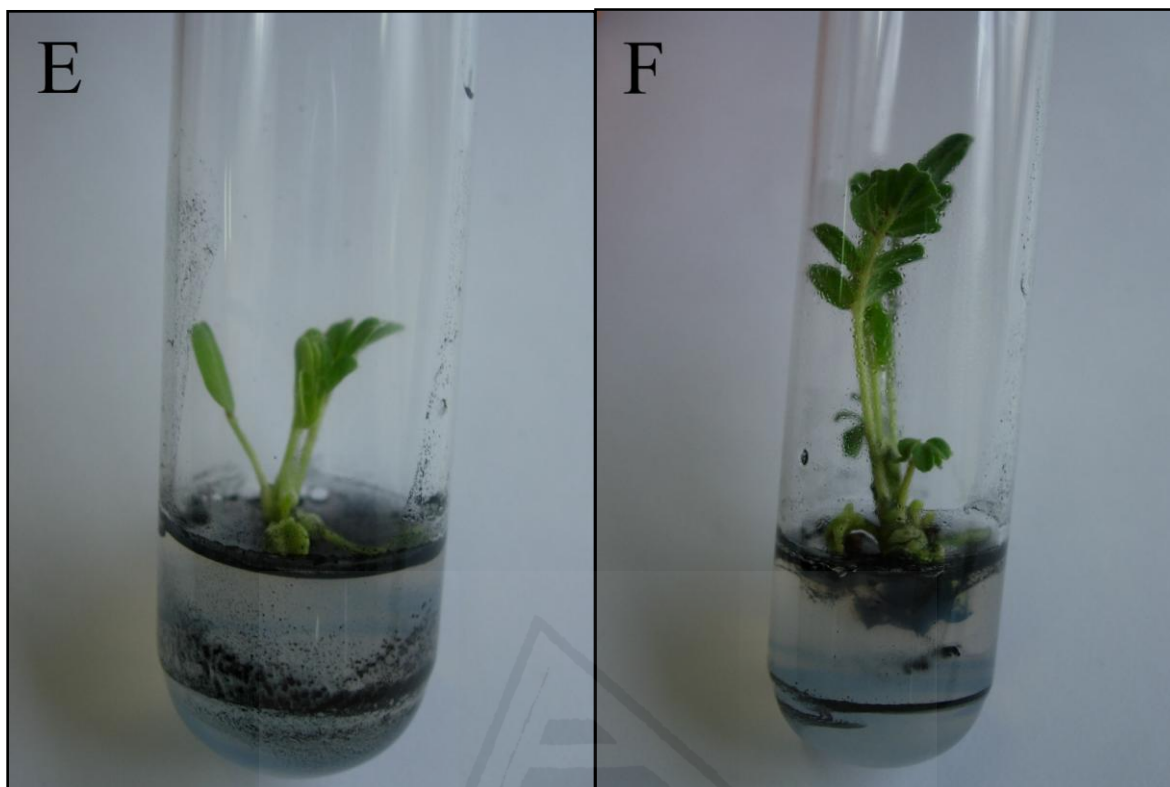


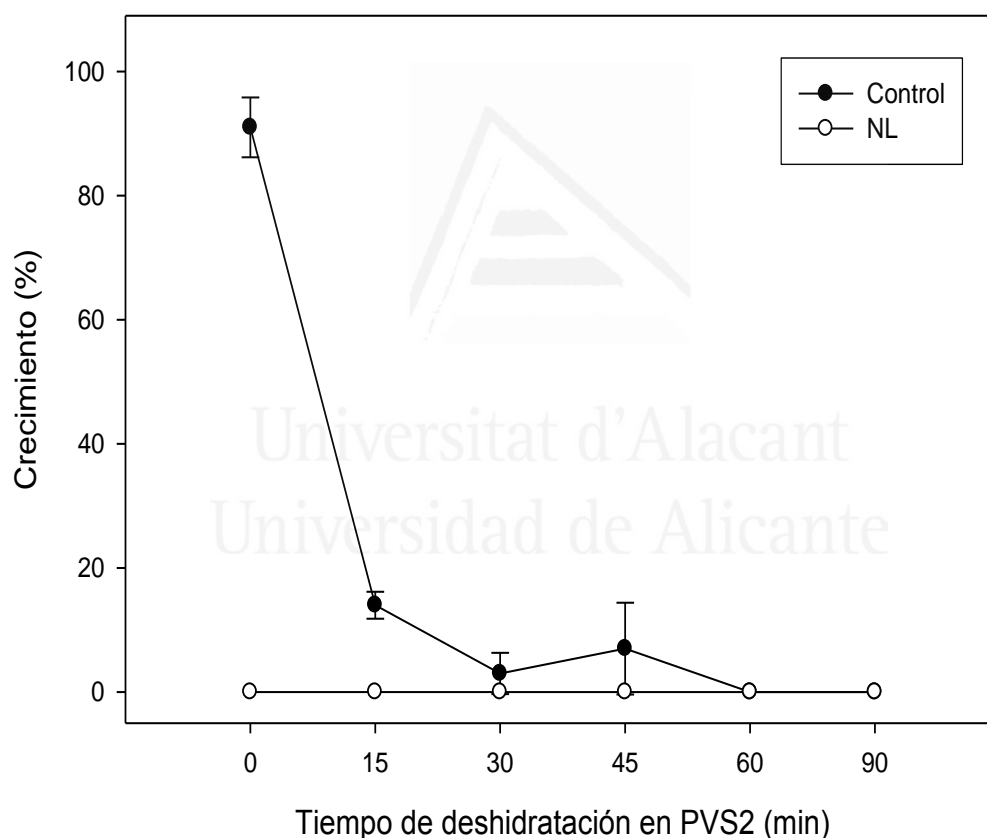
Figura 2b. Explantos de *A. nitidiflorus* crioconservados mediante deshidratación en PVS2 durante 15 (E) y 45 min (F). Posteriormente fueron introducidos en NL durante 1 día, descongelados y restaurados a condiciones de crecimiento durante nueve semanas.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

3.4.2. Crioconservación de *Tamarix boveana*

3.4.2.1. Efecto de la deshidratación con PVS2

En el caso de *Tamarix boveana*, la exposición directa de los meristemos a PVS2 durante más de 15 minutos produjo una reducción drástica en los porcentajes de crecimiento de los mismos (gráfica 3) revelando así una elevada sensibilidad de esta especie a dicha solución, contrariamente a lo observado en el caso de *Astragalus nitidiflorus*. Además, la congelación de los meristemos a -196°C supuso en todos los casos la muerte de los mismos.



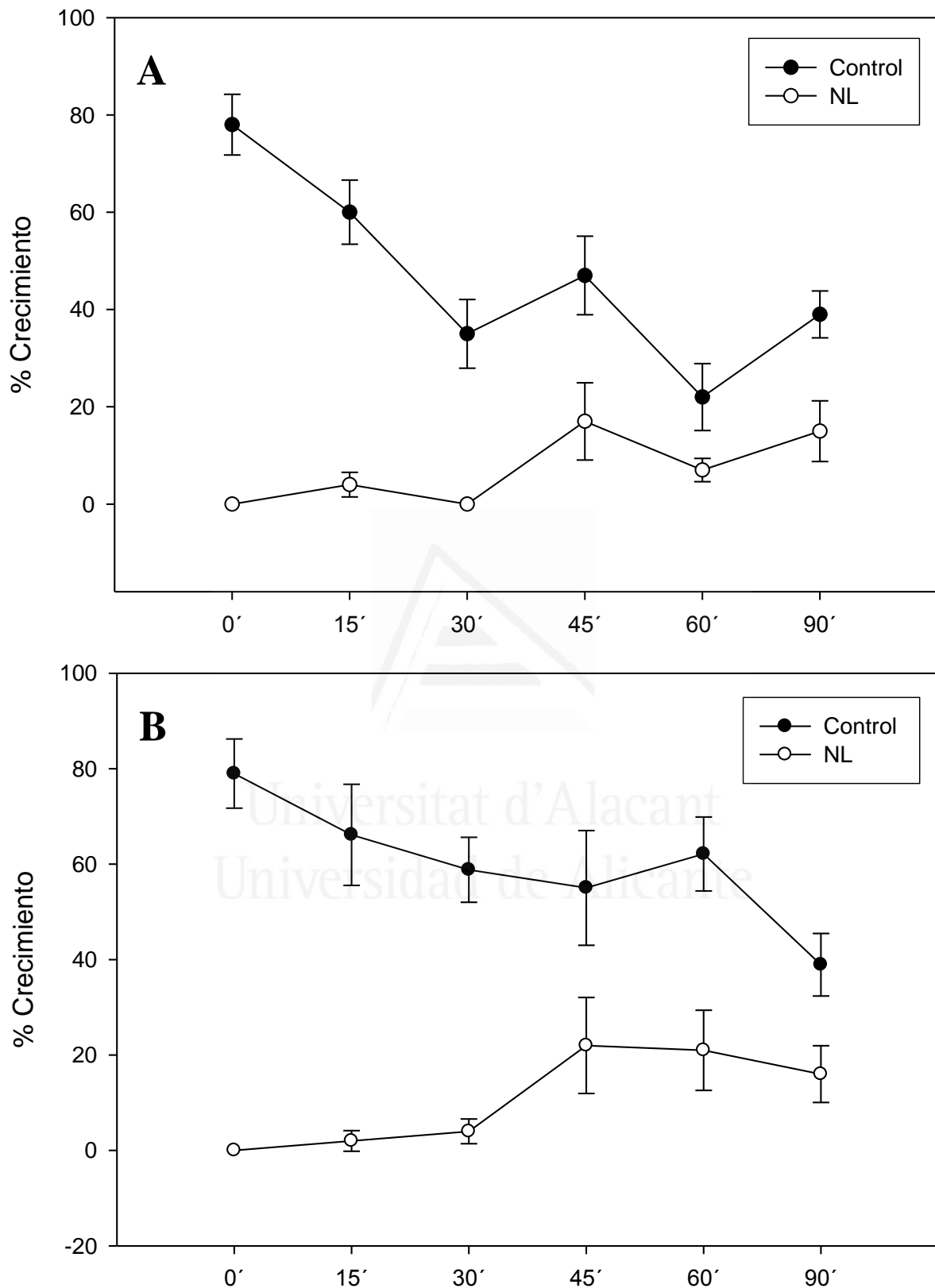
Gráfica 3. Efecto de la duración de exposición a PVS2 en el crecimiento de meristemos de *Tamarix boveana*. Los puntos representan los valores medios y las barras el error estándar de la media.

3.4.2.2. Efecto de la solución de carga y deshidratación en PVS2

Como ya indicamos anteriormente la exposición directa de células y ápices sensibles a soluciones vitrificantes muy concentradas puede generar efectos perjudiciales (Wang et al., 2002a; Lambert et al., 2009) debido a estrés osmótico y/o toxicidad química (Towill & Jarret, 1992). En menta (Volk et al., 2006) se ha comprobado que la combinación de glicerol junto con etilenglicol y/o DMSO afecta gravemente a la supervivencia de los meristemos. Se observó además que la temperatura de aplicación condicionaba la supervivencia, de forma que a 22°C esas combinaciones resultaban ser mucho más dañinas que a 0°C.

Como se muestra en la gráfica 4 la solución de carga fue moderadamente efectiva a la hora de aumentar las tasas de crecimiento, y en definitiva, de supervivencia, en comparación con aquellos meristemos que no fueron tratados. Con el objetivo de optimizar el tiempo para la osmoprotección se probó la SC por tiempos variables antes de someter a los meristemos al tratamiento de deshidratación. Como resultado, la mayor tasa de crecimiento se obtuvo tras 40 minutos de exposición junto con 45 minutos de deshidratación con PVS2.

En el caso de *Tamarix*, la aplicación de SC fue esencial para obtener supervivencia post-congelación, de manera similar a como se ha descrito en cassava (Charoensub et al., 2004), castaño (Vidal et al., 2005), citrus (Wang et al., 2002a) o wasabi (Matsumoto, 2002). Se ha sugerido que el papel de la SC podría ser el de permitir la entrada individual de solutos de forma que la deshidratación posterior en presencia de una solución de vitrificación favorecería la vitrificación durante el enfriamiento (Pennycooke & Towill, 2001). Sin embargo, se ha comprobado que a 0°C la entrada de glicerol a las células es bastante lenta (Pitt et al., 1997), por lo que los efectos beneficiosos de la aplicación de SC estarían más relacionados con el efecto protector de la plasmolisis, ya que la acumulación de esta solución en el espacio periprotoplastmático de las células plasmolizadas podría mitigar el estrés mecánico causado por una deshidratación severa (Sakai, 2004). Además se ha comprobado que la presencia de glicerol en la solución de carga es esencial para inducir un alto nivel de osmotolerancia/osmoprotección (Hirai & Sakai, 1999b; Matsumoto, 2002; Wang et al., 2002a; Charoensub et al., 2004), siendo ineficaz la presencia de sacarosa en solitario.



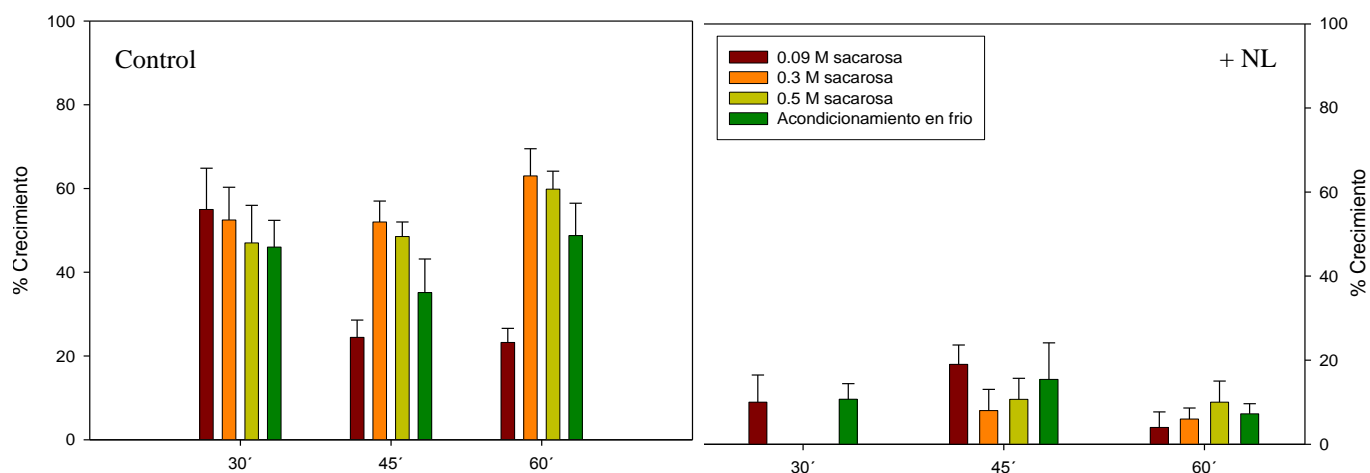
Gráfica 4. Efecto de la duración del tratamiento con SC en el crecimiento de meristemos crioconservados. Los meristemos se trataron con SC (medio MS + glicerol 2 M + sacarosa 0.4 M) durante 20 (A) ó 40 minutos (B) a temperatura ambiente y se deshidrataron en PVS2 a 0°C durante los tiempos indicados en el eje de abscisas antes de ser introducidos en NL. Los puntos representan los valores medios y las barras el error estándar de la media.

3.4.2.3. Efecto de la inclusión de una etapa de precultivo en el protocolo de crioconservación

Con el objetivo de mejorar las tasas de crecimiento obtenidas hasta el momento nos planteamos ensayar la inclusión en el protocolo de una etapa de precultivo, así como variar el tiempo en SC, todo ello combinado a su vez con tres periodos de deshidratación en PVS2: 30, 45 y 60 minutos.

En la gráfica 5 se muestran los resultados obtenidos tras la combinación de 20 minutos en SC más un precultivo realizado bien en presencia de sacarosa o bien abordando un acondicionamiento en frío. Aunque el porcentaje de crecimiento post-congelación obtenido en el caso del precultivo con sacarosa 0.09 M fue el mayor de todos, éste solo fue ligeramente superior a aquel obtenido en ausencia de precultivo (19 ± 4.6 y 17 ± 7.9 , respectivamente). Además no se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los distintos precultivos para los 20 minutos de aplicación de la solución de carga. Al comparar entre tiempos de aplicación de PVS2 solo se observaron diferencias en 0.09 M y 0.5 M de sacarosa, siendo la recuperación obtenida a los 45 minutos significativamente mayor que la obtenida a los 60 en sacarosa 0.09 M y de la de 30 minutos en sacarosa 0.5 M.

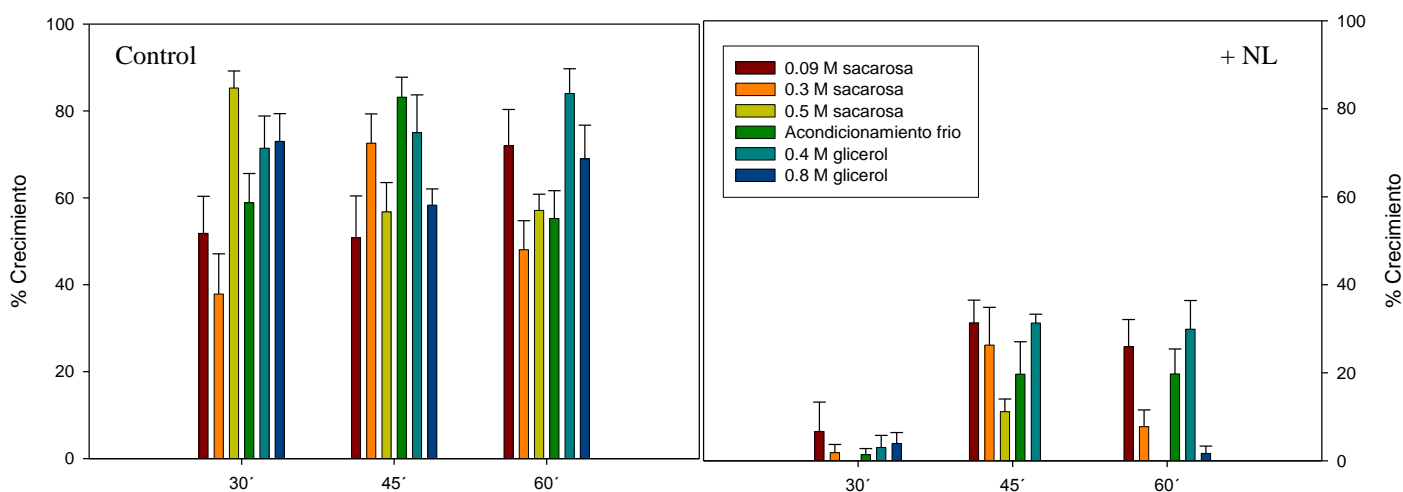
En este experimento resultó llamativa la baja tasa de crecimiento obtenida en el tratamiento control, lo que nos estaría sugiriendo que tanto la aplicación de SC durante 20 minutos como los crioprotectores utilizados en el precultivo y el acondicionamiento en frío no están ejerciendo la protección necesaria en los explantos para tolerar la posterior deshidratación con PVS2.



Gráfica 5. Efecto de diferentes medios de precultivo previos a solución de carga durante 20 minutos en la recuperación de meristemos sometidos a crioconservación en función del tiempo de deshidratación en PVS2 (en el eje de abscisas). En el gráfico control los meristemos no fueron introducidos en nitrógeno líquido. Las barras representan el error estándar de la media.

En vista de estos resultados decidimos aumentar el tiempo de aplicación de la SC y ensayamos dos precultivos adicionales: glicerol 0.4 M y 0.8 M (gráfica 6).

No se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre precultivos en el caso de los 30 minutos de deshidratación en PVS2. Sin embargo, al aumentar el tiempo de aplicación de PVS2 a 45 minutos aparecieron diferencias entre los tratamientos de sacarosa 0.09 M y glicerol 0.4 M con respecto a glicerol 0.8 M y sacarosa 0.5 M, siendo superior el porcentaje de recuperación en los dos primeros casos. Además, los dos primeros resultaron ser estadísticamente idénticos. A los 60 minutos esos dos mismos precultivos, junto con el acondicionamiento en frío, resultaron ser significativamente mejores que el resto.



Gráfica 6. Efecto de diferentes medios de precultivo previos a solución de carga durante 40 minutos en la tasa de crecimiento de meristemos sometidos a crioconservación en función de diferentes tiempos de deshidratación en PVS2 (eje de abscisas). En el gráfico control los meristemos no fueron introducidos en nitrógeno líquido. Las barras representan el error estándar de la media.

Cuando se analizaron las posibles diferencias entre los tiempos de aplicación de PVS2 para cada precultivo y los 40 minutos en SC se vio que la aplicación de PVS2 tanto durante 45 como 60 minutos era significativamente mejor que la de 30 minutos en el caso de los precultivos con sacarosa 0.09 M, glicerol 0.4 M y con acondicionamiento en frío.

Una vez más hay que destacar la baja recuperación de los explantos control, lo que subraya de nuevo la elevada sensibilidad de esta especie a la deshidratación.

Se ha descrito en numerosas ocasiones la mejora en la recuperación post-congelación tras una etapa de precultivo en medio con elevadas concentraciones de sacarosa (Takagi et al., 1997; Pennycooke & Towill, 2001; Rynänen & Aronen, 2005b), sobre todo en especies tropicales, aunque no siempre ha sido así y en ocasiones el precultivo en alta concentración de sacarosa ha resultado ser perjudicial, como en chopo (Lambardi et al., 2000), lo que coincide con lo observado en nuestro caso con *Tamarix*, donde la concentración de sacarosa que mejor resultado proporcionó en el precultivo fue la más baja (0.09 M).

Sin embargo, el uso de un crioprotector diferente, en este caso glicerol, mejoró levemente el porcentaje de crecimiento en ausencia de reguladores. A este respecto, se han descrito los beneficios derivados de la presencia de este polialcohol bien sea en el precultivo, tanto en solitario (Turner et al., 2001b; Touchell et al., 2002a) como en combinación con sacarosa (Wang & Deng, 2004; Schoenweiss et al., 2005), en la solución de carga o incluso en la solución de deshidratación (PVS2), sugiriéndose que dichos beneficios pueden ser debidos tanto al número de grupos -OH presentes en la molécula como a la disposición estereoquímica de éstos en la misma (Turner et al., 2001a, b). Compuestos con mayor número de grupos -OH dispuestos a lo largo de un mismo lado de la molécula proporcionan mayores tasas de recuperación post-congelación, lo que podría ser resultado de la interacción de estos grupos con los fosfolípidos y proteínas de la membrana mediante enlaces de hidrógeno, mejorando así la estabilidad de la misma durante la deshidratación. Relacionado con los beneficios del sorbitol, Criel et al (2008; citado en Kaczmarczyk et al., 2011) encontraron que las tasas de recuperación post-congelación de ápices de *Solanum tuberosum* aumentaban (de un 50 hasta un 80%) conforme lo hacía la concentración de sorbitol en el precultivo. Tras un análisis proteómico se determinó que 63 y 15 proteínas se expresaban

diferencialmente en ápices y hojas, respectivamente, mostrando una importante modificación en el metabolismo primario y en la fijación del carbono.

Por otro lado, también se ha descrito en numerosas especies, principalmente leñosas, el beneficio en la recuperación post-congelación de tratamientos de acondicionamiento en frío (Niino et al., 1992; González Benito, 2007). Se ha comprobado que durante este tipo de pretratamiento se produce la acumulación de sacarosa, molécula con cualidades crioprotectoras, que podría resultar un factor primordial en la adaptación a estrés por frío (Hausman et al., 2000). En nuestro caso, aunque se observó una mejor recuperación de los meristemos control a las 4 semanas de haber aplicado el protocolo de vitrificación, la tasa de crecimiento de los meristemos congelados fue inferior a la obtenida con un precultivo con sacarosa a 0.09 M o glicerol a 0.4 M. Aunque no se analizaron los niveles de azúcares, los resultados obtenidos en chopo y otras especies como café indican que las plantas crecidas *in vitro* y sometidas a frío no sintetizan los niveles de sacarosa necesarios para afrontar nuevas situaciones de estrés (Hausman et al., 2000), como es, en este caso, la inmersión en nitrógeno líquido. También es de destacar que el acondicionamiento frío aplicado en nuestro caso consistió en someter a las plántulas a una temperatura de 3-5°C en oscuridad durante una semana. En la mayoría de los casos donde este tipo de pretratamiento ha proporcionado buenos resultados se han aplicado temperaturas alternas (Keller, 2005; Leunufna & Keller, 2005) y/o un fotoperiodo de 16 horas de iluminación (Keller, 2005; González-Benito, 2007).

3.4.2.4. Efecto de la presencia de tiazurón (TDZ) en el medio de recuperación

En los primeros ensayos de crioconservación que realizamos con *Tamarix* observamos que los meristemos que sobrevivían durante las primeras semanas morían sin embargo pasadas las ocho semanas post-congelación. Tal y como hemos visto en el apartado 1.4.3.3 de esta memoria, los resultados de crecimiento en altura de explantos de esta especie fueron significativamente mejores con la adición de TDZ al medio líquido de un sistema en doble capa. Por ello decidimos probar el efecto de la presencia de este regulador del crecimiento en el medio de recuperación de los explantos sometidos a crioconservación. Los resultados (tabla 1) arrojaron mejoras significativas con 0.01 mg l⁻¹ de TDZ ($\alpha=0.05$), por lo que seleccionamos dicha concentración para la realización de los ensayos posteriores.

Tabla 1. Efecto de la adición de tiazurón (TDZ) en el medio de recuperación de meristemos crioconservados. Los meristemos control no fueron sumergidos en nitrógeno líquido (NL). Los datos se representan como media \pm EEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

Medio de recuperación	Regeneración de los explantos (%)	
	Control	NL
MS	57.41 \pm 13.46 a	14.16 \pm 8.70 a
MS + TDZ 0.005 mg l ⁻¹	86.92 \pm 4.97 b	23.83 \pm 5.99 ab
MS + TDZ 0.01 mg l ⁻¹	85.75 \pm 8.99 b	39.53 \pm 6.93 b

En nuestro caso no se ha cuantificado supervivencia sino crecimiento/regeneración puesto que es el único parámetro de valor en la conservación de germoplasma (Panis et al., 2005). Es posible que los porcentajes de supervivencia tanto en ausencia como en presencia de reguladores en el medio de recuperación sea el mismo pero con el tiempo, y en ausencia de reguladores, los meristemos no son capaces de crecer, lo que se traduce en bajos porcentajes de regeneración en ausencia de reguladores. Es por ello que los porcentajes de regeneración se han visto incrementados tras el uso de reguladores en el medio de recuperación. Se ha postulado sobre la alteración de los niveles endógenos hormonales como consecuencia de cualquier daño o estrés producido durante el tratamiento de crioconservación (Wang et al., 2003), lo que podría suponer requisitos hormonales diferentes para los meristemos control que para los congelados. Las citoquininas se han empleado con éxito para mejorar la tasa de recuperación en numerosas especies (Yamada et al., 1991; Bachiri et al., 2001; Pennycooke & Towill, 2001; Wang et al., 2003).

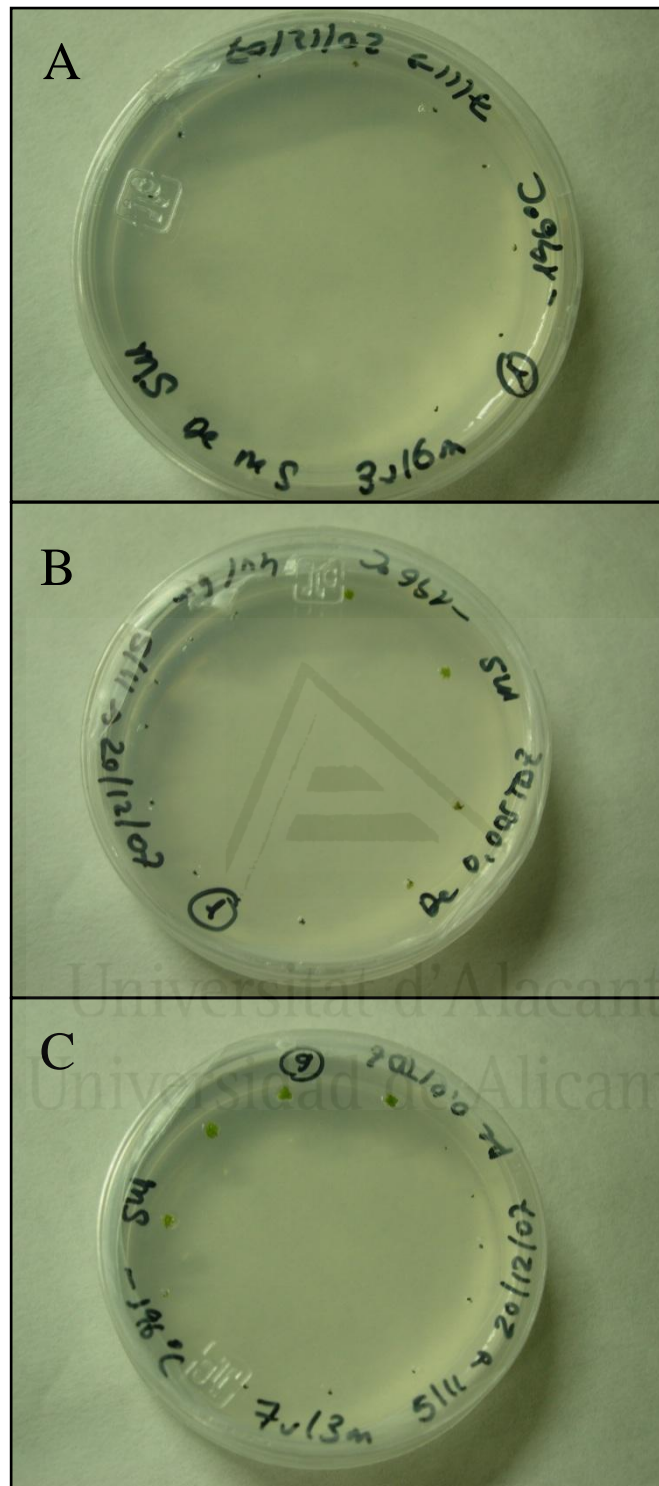


Figura 3. Efecto de la presencia de TDZ en el medio de recuperación. En todos los casos se aplicó SC durante 40 minutos y PVS2 durante 45 minutos. Tras la descongelación se mantuvieron en MS (A) MS+0.005 mg l⁻¹ TDZ (B) o MS+0.01 mg l⁻¹ TDZ (C) durante nueve semanas.

Con el objetivo de mejorar el crecimiento de los explantos crioconservados, y debido a que observamos un claro estancamiento del mismo con el tiempo (figura 4), decidimos aplicar un sistema en doble capa (DC).



Figura 4. Explantos crioconservados y cultivados en tubo con medio MS sin reguladores. La imagen de la izquierda corresponde al genotipo 2 y la de la derecha al genotipo 6, ambas se tomaron seis meses después de la descongelación.

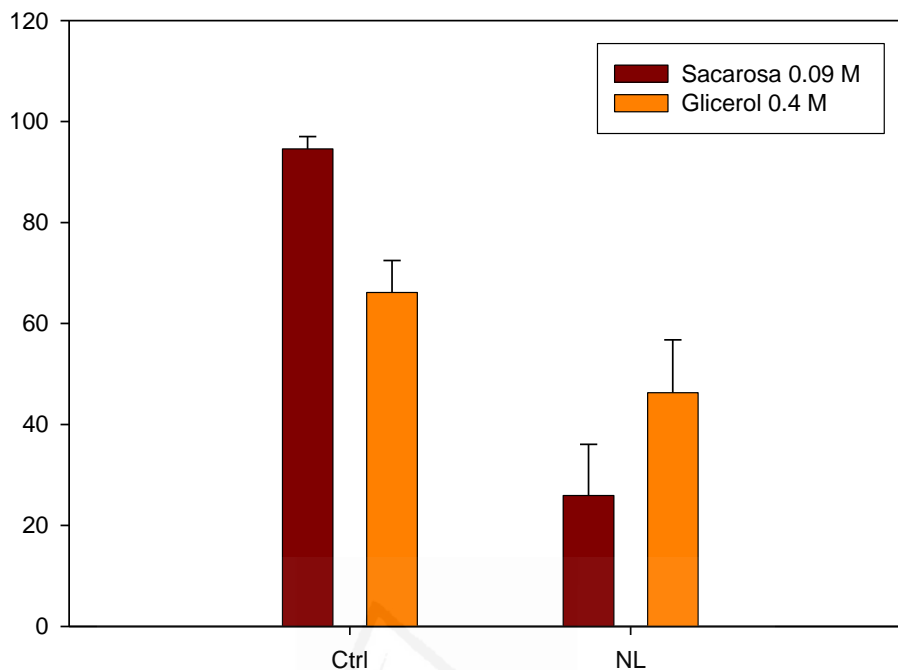
Como ya discutimos en el capítulo 1, la DC mejora en muchos casos claramente la elongación y enraizamiento de los explantos (De Klerk, 2002). De acuerdo a la información de que disponemos no se han utilizado previamente los sistemas en DC para optimizar el crecimiento post-congelación, aunque sí hay experiencia con otros sistemas como la adición de carbón activo (CA) con este mismo objetivo. Por ejemplo, Lambardi et al. (2000) encontraron que con CA tres semanas después de la descongelación se disparó la elongación de los brotes. Parece claro que la capacidad del CA de adsorber tanto reguladores del crecimiento (Pan & Van Staden, 1998) como posibles inhibidores del mismo (Fridborg et al., 1978) es lo que le confiere a este compuesto su operatividad en sistemas *in vitro*. En nuestro caso es vital la eliminación de TDZ del medio para el crecimiento en altura de los explantos, cuya propiedad de permanecer en los tejidos a lo largo del tiempo es sobradamente conocida (Muthy et al., 1998; Zaffari et al., 2000). En el caso de *T. boveana*, además, todos los explantos elongados enraizaron con éxito (figura 5). Con la adición de medio líquido con CA se alcanzó así el objetivo perseguido. Sería interesante realizar un experimento probando

estos dos tipos de medio con el objetivo de descubrir posibles diferencias en el tiempo de elongación y de enraizamiento de explantos crioconservados.



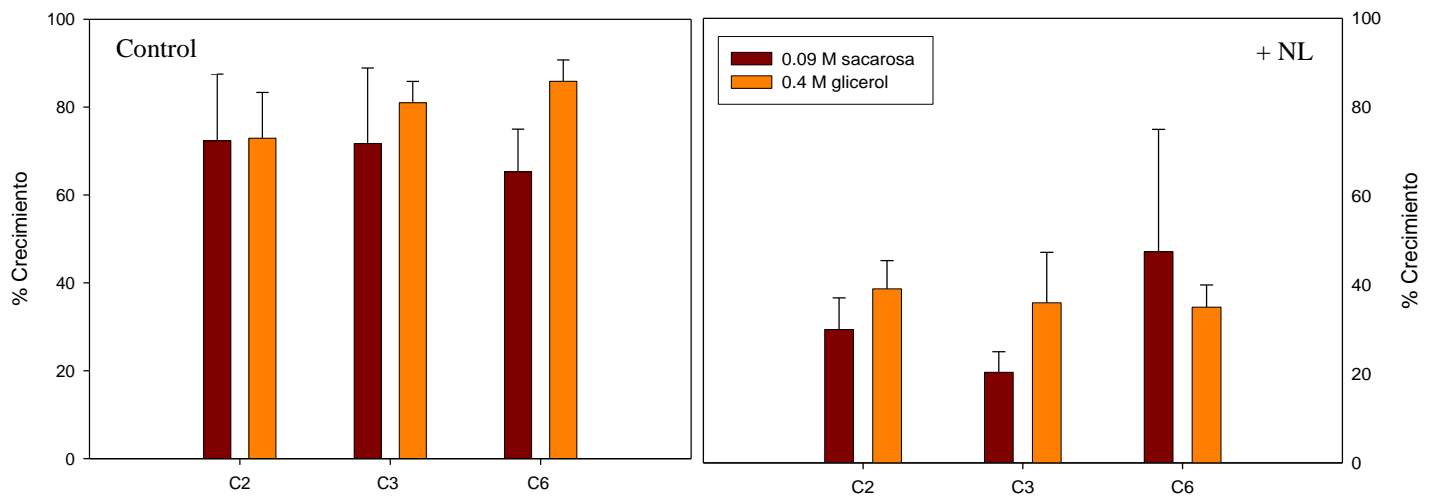
Figura 5. Efecto de la adición de doble capa a explantos del genotipo 3 sometidos a crioconservación. La imagen de la izquierda corresponde a un explanto control y la de la derecha a un explanto recuperado tras la congelación en nitrógeno líquido.

Con los resultados obtenidos decidimos realizar una prueba adicional combinando el uso de TDZ 0.01 mg l^{-1} en el medio de recuperación y los precultivos con sacarosa 0.09 M y glicerol 0.4 M (gráfica 7). El crecimiento con glicerol 0.4 M fue algo superior al obtenido sin TDZ en el medio de recuperación (gráfica 5). Por el contrario, la respuesta con sacarosa 0.09 M en el precultivo y TDZ en el medio de recuperación fue similar a la obtenida sin TDZ (gráfica 5). Aun así, no se detectaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos.



Gráfica 7. Efecto de la combinación de precultivo en sacarosa 0.09 M o glicerol 0.4 M junto con la adición de TDZ en el medio de recuperación.

Cuando repetimos el mismo experimento pero con explantos procedentes de diferentes genotipos se vieron algunas diferencias en la respuesta al uso de glicerol o sacarosa en el precultivo (gráfica 8). En el caso del genotipo 6 la recuperación post-congelación tras la aplicación de sacarosa en el precultivo fue superior a la obtenida con glicerol. Sin embargo, el error estándar desprendido en el primer caso es muy elevado, lo que indica la elevada variabilidad entre experimentos. Por otro lado, las respuestas obtenidas con este último genotipo y el número 3 para el precultivo con glicerol son similares a la obtenida con el genotipo 2. Adicionalmente, la recuperación post-congelación obtenida tras aplicar sacarosa en el precultivo del genotipo 3 fue sustancialmente inferior a las obtenidas con los otros dos genotipos. Con estos resultados se llega a la conclusión de que el uso de glicerol en la etapa de precultivo es el que proporciona resultados más estables y con mayor similitud entre diferentes genotipos.



Gráfica 8. Efecto de la combinación de precultivo en sacarosa 0.09 M o glicerol 0.4 M junto con la adición de TDZ en el medio de recuperación de explantos de diferentes genotipos de *Tamarix boveana*. En el gráfico control los meristemos no fueron introducidos en nitrógeno líquido. Las barras representan el error estándar de la media.

Sin embargo, hay que destacar que el genotipo 2 llevaba un número de subcultivos mayor que el resto. Mientras que los genotipos 3 y 6 llevaban tan solo unos 18 meses *in vitro*, el 2 llevaba unos 48 meses. Aunque en algunos trabajos se ha visto que un menor número de subcultivos favorece la recuperación post-congelación (Ryynänen & Haggman, 1999; Keller, 2005), en nuestro caso apenas se han visto diferencias significativas en los resultados.

3.5. Conclusiones

3.5.1. Crioconservación de *Astragalus nitidiflorus*

- 1) Tras la escisión de los meristemos (1-1.5 mm) éstos han de ser cultivados en medio MS + sacarosa 0.09 M + Plant agar 6 g l⁻¹ + Sequestrene® 10 mg l⁻¹ + BA 0.1 mg l⁻¹ durante un día.
- 2) La solución de carga (SC) se aplica durante 20 minutos a temperatura ambiente y después es sustituida por PVS2, solución en la que han de permanecer a 0°C, siendo el tiempo óptimo de deshidratación 60 minutos. La descongelación tiene lugar a 40°C durante dos minutos y la solución de descarga (MS + sacarosa 1.2 M) se deja actuar durante diez minutos. Finalmente los meristemos son cultivados sobre un papel de filtro estéril colocado sobre medio MS + sacarosa 0.3 M + 6 Plant agar g l⁻¹ + Sequestrene® 10 mg l⁻¹ + BA 0.1 mg l⁻¹ donde permanecerán un día en oscuridad.
- 3) El medio de recuperación consiste en medio MS + sacarosa 0.09 M+ Plant agar 6 g l⁻¹ + Sequestrene® 10 mg l⁻¹ + BA 0.1 mg l⁻¹. Los primeros cinco días se dejará a los meristemos en condiciones de oscuridad. El tiempo total en este medio será de tres semanas.
- 4) Para la optimización del crecimiento, los meristemos han de ser transferidos a tubos de cultivo con el mismo medio de recuperación pero sin BA. A los dos días se añade 1 ml de medio líquido consistente en sales Knop a la mitad de concentración, 50 g l⁻¹ de sacarosa y 3 g l⁻¹ de carbón activo. Este medio ha de ser suplementado dos semanas después.

3.5.2. Crioconservación de *Tamarix boveana*

- 1) Explantos de 0.5-1 cm han de ser precultivados en medio MS + glicerol 0.4 M + Plant agar 7 g l⁻¹ durante 1 día en oscuridad.
- 2) Tras la escisión de los meristemos (0.5-1 mm) se aplica SC durante 40 minutos a temperatura ambiente tras los que se sustituye por PVS2, solución en la que han de permanecer a 0°C durante 45 minutos. La descongelación tiene lugar a 40°C durante dos minutos y la solución de descarga (MS + sacarosa 1.2 M) se deja actuar durante diez minutos. Finalmente los meristemos son cultivados sobre un

papel de filtro estéril colocado sobre medio MS + sacarosa 0.3 M + Plant agar 6 g l⁻¹ + TDZ 0.01 mg l⁻¹ en el que permanecerán un día en oscuridad.

- 3) El medio de recuperación consiste en medio MS + sacarosa 0.09 M+ Plant agar 6 g l⁻¹ + TDZ 0.01 mg l⁻¹. Los primeros cinco días se dejarán los meristemas en condiciones de oscuridad. El tiempo total en este medio será de dos semanas. En intervalos de dos semanas se irá reduciendo la concentración de TDZ a la mitad.
- 4) A las seis semanas se transferirán los explantos a tubos con medio MS + sacarosa 0.09 M + Plant agar 6 g l⁻¹. A los dos días se añaden unas gotas de medio líquido consistente en sales Knop a la mitad de concentración, 30 g l⁻¹ de sacarosa y 3 g l⁻¹ de carbón activo. Este medio ha de ser suplementado en intervalos de dos semanas hasta que la elongación de los explantos resulte suficiente (unos 6 meses en cultivo) para ser aclimatados.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 4. Análisis de la estabilidad genética del material micropropagado y crioconservado



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4.1 Introducción

4.1.1. Variación somaclonal. Conceptos

El desarrollo de un protocolo de cultivo de tejidos es un procedimiento riguroso que implica la optimización de diferentes factores químicos, físicos y ambientales para garantizar el crecimiento de las plantas en unas condiciones que, no obstante, se alejan un tanto de las que imperan en su hábitat natural (Bairu & Kane, 2011). Además, la variación natural que existe en la fisiología y en los requerimientos para el crecimiento entre diferentes especies vegetales impone la necesidad de optimizar protocolos para cada especie individual. Pues bien, a pesar de esta meticulosidad y del diseño “a la carta” de un determinado protocolo, la aplicabilidad de esta técnica se ve con frecuencia afectada por problemas fisiológicos o de desarrollo surgidos durante el cultivo *in vitro*. Estos problemas pueden ir desde un crecimiento anormal hasta el aumento en la inestabilidad y/o variabilidad genética del material micropropagado (Bairu & Kane, 2011).

Efectivamente, el cultivo de tejidos puede inducir variación genética en el material vegetal sometido a este tipo de procedimientos. Han pasado más de tres décadas desde que Larkin & Scowcroft (1981) adoptaran el término “variación somaclonal” para referirse precisamente a esta variación que había venido siendo observada en plantas regeneradas por cultivo *in vitro* al menos desde 1969 (Jain, 2001). En realidad dicha variación se debe a un amplio abanico de alteraciones (mutaciones puntuales, reasociaciones y recombinaciones cromosómicas, metilación del ADN, presencia de un número alterado de copias de una secuencia y/o elementos transponibles) que pueden afectar tanto a los elementos genéticos nucleares como a los citoplasmáticos, que ocurren de forma impredecible y pueden ser heredables (variaciones genéticas) o no heredables (variaciones epigenéticas y fisiológicas) (Jain, 2001; Bairu et al., 2011).

Es necesario, por tanto, disponer de herramientas que nos permitan estimar la variación somaclonal en cultivo *in vitro* en todas las situaciones, pero sobre todo cuando el objetivo que perseguimos es la conservación de determinados genotipos. La experiencia ha demostrado que la aparición de variación somaclonal está condicionada, entre otros posibles factores, por el tipo de explanto, el estrés ambiental, la edad de la

planta madre, el método de propagación aplicado, el tipo y concentración de reguladores de crecimiento aplicados, así como por el número y duración de los subcultivos (Cassels & Curry, 2001; Jain, 2001; Castillo, 2006; Bairu et al., 2011). El genotipo es el factor principal a la hora de determinar el tipo y frecuencia de la variación somaclonal (Jain, 2001; Devarumath et al., 2002; Ray et al., 2006). Especies de la familia de las Solanáceas, así como otras especies de propagación vegetativa como la platanera o la caña de azúcar, experimentan una amplia gama de variaciones de este tipo. Es también importante controlar tanto la edad del cultivo como el número de subcultivos a los que se somete el explanto, ya que cuanto más se prolonguen en el tiempo mayor será la probabilidad de que aparezca variación somaclonal, si bien la influencia de estos factores está también condicionada por la especie vegetal de que se trate (Bairu et al., 2006). El tipo de explanto utilizado juega un papel importante a la hora de preservar la constitución genética del material micropropagado. En este sentido, la propagación a partir de meristemas es el método que menor riesgo de variación conlleva (Leva et al., 2012; Miguel et al., 2011), si bien algunos trabajos han puesto de manifiesto que este tipo de cultivos no siempre asegura la estabilidad del material micropropagado (Bindiya & Kanwar, 2003; Sahijram et al., 2003; Ray et al., 2006). Otro factor a tener en cuenta es el uso de reguladores del crecimiento, particularmente citoquininas y auxinas. Si la formación de brotes adventicios en cultivo es inducida por la presencia en el medio de estos reguladores del crecimiento, la probabilidad de que se produzcan mutaciones aumentará consecuentemente (Bairu et al., 2006). Los reguladores de naturaleza auxínica pueden promover la metilación del ADN, causando así cambios epigenéticos (Kaepler et al., 2000).

Finalmente, también hay que tener en cuenta que el cultivo *in vitro* puede poner de manifiesto más fácilmente la variabilidad genética natural existente en el material vegetal de partida. Así, por ejemplo, la activación de elementos transponibles (los retrotransposones), que son secuencias de ADN “móviles” en el genoma y que inducen mutaciones genéticas y reorganización del propio genoma, es un hecho frecuentemente observado en cultivo *in vitro* (Jain, 2001; Bairu et al., 2011; Sato et al., 2011).

4.1.2. Técnicas de detección

Los métodos aplicados para la detección de variación somaclonal pueden estar basados en la evaluación de determinados aspectos morfológicos (Castillo et al., 2010;

Wang et al., 2012), bioquímicos (Punja et al., 2004), citológicos (Hao et al., 2002) o moleculares (Leva & Petruccelli, 2012; Peredo et al., 2008) que manifiestan las plantas regeneradas. De todos estos los métodos moleculares son, sin duda, los más utilizados hoy día con el objetivo de detectar variación genética.

Hay numerosas técnicas moleculares disponibles actualmente para estos fines, pero además continuamente se están publicando nuevas herramientas o bien modificaciones de las ya existentes. A efectos prácticos es posible clasificar estas técnicas en función del principio tecnológico en el que se basan. De esta manera podemos hablar de (Karp, 2000):

- a) *Técnicas basadas en la hibridación del ADN con sondas específicas.* En términos generales en estas técnicas el ADN se digiere con enzimas de restricción, lo que da lugar a un conjunto de fragmentos de una longitud determinada por las características del enzima utilizado. Los fragmentos son posteriormente separados en electroforesis en gel e hibridados con sondas moleculares, que son pequeños fragmentos de ADN que pueden proceder de secuencias clonadas, ADN genómico desconocido, un gen o parte de él (Karp, 2000). La variación (polimorfismo) en este caso se detecta si la posible mutación afecta a los lugares de restricción o a la longitud del fragmento entre dichos lugares. A esta categoría de técnicas pertenece, por ejemplo, el RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción), que fue la primera técnica empleada en los años 80 para evaluar marcadores moleculares en plantas (Bairu et al., 2011).

- b) *Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. La PCR es una tecnología basada en el uso del enzima ADN polimerasa que es capaz de replicar en sucesivos ciclos una porción de ADN definida por *cebadores* específicos que han de ser incluidos en la mezcla de reacción. Lo que denominamos cebadores son pequeñas cadenas de ADN que se alinean con secuencias complementarias del ADN genómico en los flancos de la secuencia de interés e inician el proceso de amplificación (Figura 1). El desarrollo de esta tecnología a cargo del grupo

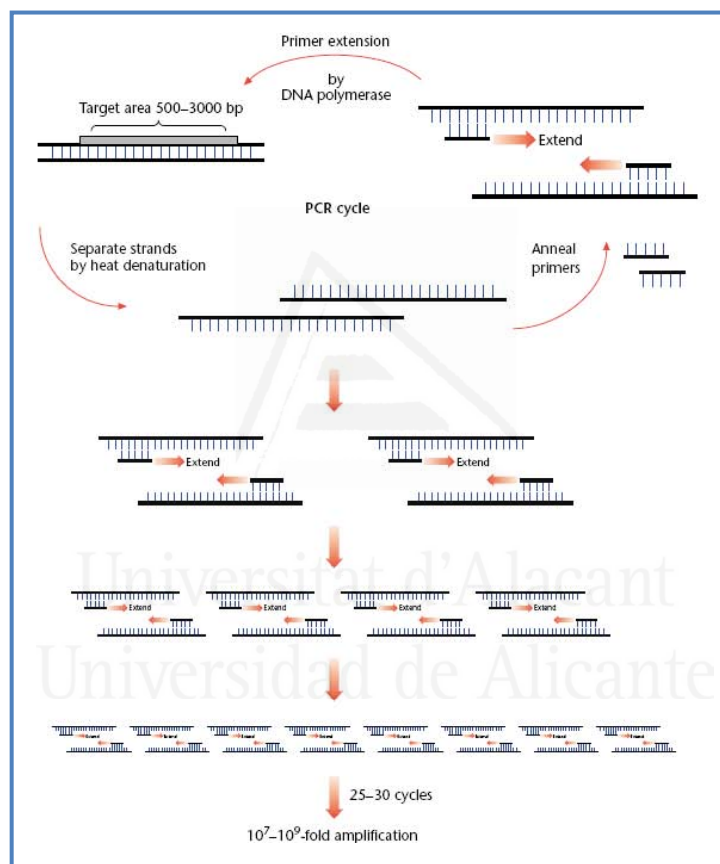


Figura 1. El ciclo de amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa. (Fuente: Metzker & Caskey, 2001).

de Mullis en 1983 supuso un enorme impulso a las técnicas moleculares de análisis ya que, entre otras ventajas, requiere mucha menos cantidad de ADN que las técnicas de hibridación (Bachmann, 1994). Las técnicas basadas en la PCR se pueden dividir, a su vez, en dos grandes categorías:

- **Técnicas que utilizan cebadores de secuencia arbitraria o genérica.** En este caso se utilizan cebadores de secuencia arbitraria

disponibles comercialmente. A esta categoría pertenece el RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*, ADN polimórfico amplificado aleatoriamente), técnica que hemos utilizado en la presente Memoria, y sus variantes AP-PCR (*Arbitrarily primed PCR*, PCR con cebadores arbitrarios) o DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*, huella de amplificación de ADN) (Bairu et al., 2011). Estos procedimientos resultan en general sencillos y asequibles, ya que no exigen disponer de información sobre la secuencia de ADN a amplificar y tampoco hay etapas de transferencia de los productos amplificados a membranas ni pasos de hibridación. Requieren, además, muy poca cantidad de ADN (en torno a 10 ng por reacción) y el proceso completo tiene buena capacidad de automatización (Karp, 2000). Otro procedimiento dentro de esta categoría es el AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) que son técnicamente algo más exigentes si bien ofrecen una mejor reproducibilidad. Teóricamente, esta modalidad supone la ingeniosa combinación del poder del RFLP y la flexibilidad de la tecnología basada en PCR (Bairu et al., 2011). En este caso la técnica implica la digestión del ADN con dos enzimas de restricción específicos que generan extremos cohesivos a los que se une un adaptador sintético de doble cadena. Las secuencias del adaptador y el sitio de restricción proporcionan sitios de unión para el cebador. Los productos de la amplificación son separados sobre un gel de poliacrilamida y pueden ser visualizados mediante autorradiografía o técnicas fluorescentes (Bairu et al., 2011). Esta técnica se ha utilizado con éxito para la detección de variación somaclonal en platanera (*Musa spp.*), un cultivo en el que es frecuente la aparición de variación en condiciones *in vitro* (Sahijram et al., 2003), *Arabidopsis thaliana* (Polanco y Ruiz, 2002), así como para detectar genes de resistencia a enfermedades en variantes somaclonales de papa (*Solanum tuberosum*) (Solomon-Blackburn y Barker, 2001).

- **Técnicas que utilizan cebadores de secuencia conocida.** Una alternativa a amplificar muchos lugares “anónimos” del genoma

consiste en utilizar la PCR para amplificar específicamente un lugar conocido del genoma, como puede ser un gen (o una familia de genes), un microsatélite único o un locus minisatélite (Karp, 2000). Esta tecnología se presenta bajo formatos ligeramente diferentes: SSR (*Sequence Single Repetitions*, repeticiones de secuencia sencilla), STR (*Short Tandem Repeats*, repeticiones cortas en tándem), STMS (*Sequence-Tagged Microsatellite Sites*, microsatélites con secuencia marcada) o SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphisms*, polimorfismos en la longitud de secuencias simples) (Bairu et al., 2011). En estos casos para obtener datos sobre diversidad genética es necesario primero conocer las secuencias que rodean la región que queremos que sea objeto de amplificación, de manera que se puedan diseñar cebadores apropiados para ser utilizados en la PCR. En plantas existen tres fuentes potenciales de secuencias genéticas para esta tecnología: el ADN nuclear, el mitocondrial y el cloroplástico, lo que la hace muy interesante para estudios a nivel poblacional (Karp, 2000). Lo que llamamos microsatélites son cortas secuencias (de 1 a 5 bases) del ADN que se repiten en tándem un número determinado de veces y que se hallan intercaladas en el genoma de todos los organismos eucariotas y muchos procariontes (Bairu et al., 2011). Los polimorfismos resultan de diferencias en el número de unidades que se repiten entre individuos en un locus particular. La popularidad de los microsatélites radica en la combinación única de diversas ventajas como son la herencia codominante, elevada abundancia, gran diversidad alélica y facilidad de detectar variación. Los microsatélites han sido utilizados para determinar variación somaclonal en *Populus tremuloides* (Rahman y Rajora, 2001) y en caña de azúcar (Singh et al., 2008; Pandey et al., 2012). Esta técnica requiere de mucho trabajo debido a que se puede analizar sólo un locus a la vez (Azofeifa-Delgado, 2006).

Dentro de las técnicas que detectan variaciones epigenéticas las más empleadas se centran en la metilación del ADN, siendo el MSAP (*Methylation-Sensitive*

Amplification Polymorphism, polimorfismo de amplificación sensible a la metilación) la más común.

4.1.3. RAPD y variación somaclonal

Como ya indicamos en el apartado anterior, RAPD representa un método basado en el uso de cebadores de secuencia arbitraria probablemente de los más utilizados hasta ahora. Además de lo comentado anteriormente, en esencia estas técnicas se basan en la probabilidad estadística de que las secuencias que van a unir a los cebadores aparezcan en sentido inverso separadas una determinada distancia (Figura 2), ya que sólo en esos casos se puede producir la amplificación (Bachmann, 1994). De ahí que el empleo de cebadores de 10 nucleótidos con un contenido en GC superior al 50% haya resultado lo más eficaz técnicamente para cada aplicación. Los productos de PCR se separan en geles de agarosa y se detectan mediante tinción con bromuro de etidio. Los polimorfismos generados con este método pueden deberse teóricamente a diferentes sucesos: 1) inserción de una gran pieza de ADN entre los sitios de unión del cebador, lo que resulta en la pérdida del fragmento en cuestión; 2) inserción o delección de una pequeña pieza de ADN que conducirá a cambios en el tamaño del fragmento amplificado; 3) delección de uno de los dos sitios de alineamiento del cebador que puede resultar tanto en la pérdida del fragmento como en un aumento de tamaño del mismo; 4) la sustitución de un nucleótido dentro de uno o en ambos sitios de unión del cebador puede afectar al proceso de alineamiento, lo que puede dar lugar tanto a la presencia o ausencia del fragmento como a un cambio de tamaño del mismo.

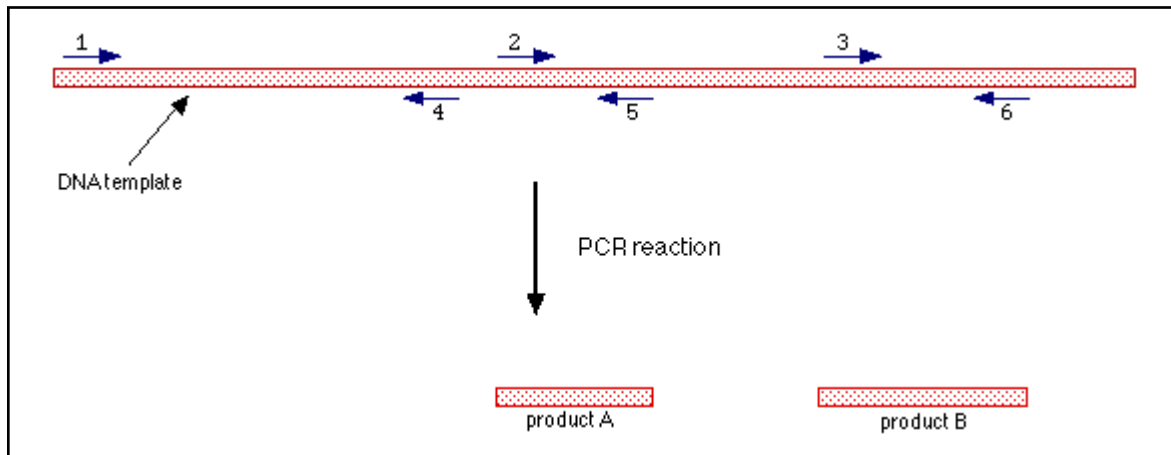


Figura 2: Esquema que muestra el funcionamiento de la técnica de RAPD utilizando múltiples copias de un solo cebador. El cebador encontrará numeras regiones del ADN donde alinearse, pero solo los fragmentos de ADN de una determinada longitud entre dos cebadores que se hayan alineado en orientación inversa (en el caso de la imagen los cebadores 2 y 5 y 3 y 6), serán objeto de amplificación por la ADN polimerasa.

La principal ventaja que caracteriza a este tipo de marcadores es la simplicidad de la técnica, además de que no es necesaria información previa de la secuencia a amplificar. Los RAPDs se han empleado, por ejemplo, en la valoración de la variación somaclonal de plantas de *Hypericum perforatum*, planta que produce compuestos con actividad anticancerígena y antiviral (hipericina y pseudohipericina), obtenidas de hojas y semillas en cultivo *in vitro* (Halušková y Košuth, 2003), *Cineraria marítima* (Srivastava et al., 2009), *Anethum graveolens* (Jana et al., 2012), caña de azúcar (Zucchi et al., 2002) o *Dioscorea bulbifera* (Zucchi et al., 2002), entre otros. En algunos casos, como en *Phoenix dactylifera*, un análisis comparativo de diferentes técnicas moleculares ha puesto de manifiesto que RAPD da mejores resultados que RFLP o AFLP para la detección de variación somaclonal (Kunert *et al.* 2003).

Es cierto que esta técnica presenta algunas desventajas. Una de ellas es su naturaleza dominante, lo que limita su uso en genética de poblaciones y estudios de mapeo. Estos marcadores tienden, además, a ser sensibles a pequeños cambios en las condiciones de reacción, lo que interfiere con la reproducibilidad de los patrones de bandas entre experimentos, instrumentación de PCR y laboratorios (Weising et al., 2005), pero esto no ha hecho que disminuya su presencia en el análisis de la diversidad genética en plantas.

4.2. Objetivos

El objetivo de este estudio es desarrollar una técnica de RAPD para la detección de variación genética en plántulas micropropagadas y crioconservadas de las especies *Tamarix boveana* y *Astragalus nitidiflorus*.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Extracción y cuantificación de ADN

Para la realización de los análisis de RAPDs utilizamos ADN procedente de material micropropagado (M), de lo que denominaremos material control de la crioconservación (C) consistente en explantos sometidos al proceso completo de crioconservación pero sin inmersión en NL, y de material que sí ha sido congelado (L) de ambas especies. Tanto las plántulas (C) como (L) fueron aclimatadas durante dos meses antes de proceder a la extracción.

El ADN genómico se extrajo mediante el DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. En general utilizamos material fresco tanto en el caso de *T. boveana* como de *A. nitidiflorus*, si bien realizamos previamente la comprobación de las consecuencias de liofilizar el material antes de su procesamiento. La concentración y calidad del ADN extraído se determinaron en todos los casos en un biofotómetro (Biophotometer plus, Eppendorf): para estimar la concentración se midió la absorbancia a 260 nm y el equipo realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Concentración de ADN} = \text{Abs}_{260} \times 50 \times \text{factor dilución},$$

ya que el ADN presenta un máximo de absorbancia a 260 nm (50 µg/ml de ADN tienen una Abs₂₆₀ de 1).

Se midió también la absorbancia a 280 nm y el equipo calculó el índice $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$, que nos aporta información sobre la pureza, o calidad, del ADN (Ahmed et al., 2009).

4.3.2. Condiciones de amplificación y de electroforesis

Las amplificaciones de las muestras de *T. boveana* se realizaron en un volumen final de 20 µl que contenía: 40 ng de ADN, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 100 ng de cebador, tampón de reacción al 1X y 0.5 U de Taq polimerasa (Ecotaq). El programa de amplificación seguido consistió en 2 min a 94°C seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 36°C y 2 minutos a 72°C, más una etapa final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

En el caso de *A. nitidiflorus*, las reacciones de amplificación se realizaron de igual forma en un volumen final de 20 µl que contenía: 70 ng de ADN, 2.5 mM de

MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 100 ng de cebador, tampón de reacción al 1X y 1 U de Taq polimerasa Netzyme (Need). El programa de amplificación comenzó con 2 min a 94°C seguidos de 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C y 2 minutos a 72°C, más una etapa final de extensión a 72°C durante 7 minutos.

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador Mastercycler® personal (Eppendorf).

A fin de seleccionar los cebadores que resultaban más informativos para el análisis de la estabilidad genética en ambas especies ensayamos en una primera fase 31 cebadores de 10 pb (Invitrogen) (tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de los 31 cebadores empleados en los análisis RAPD efectuados en *Tamarix boveana* y *Astragalus nitidiflorus*.

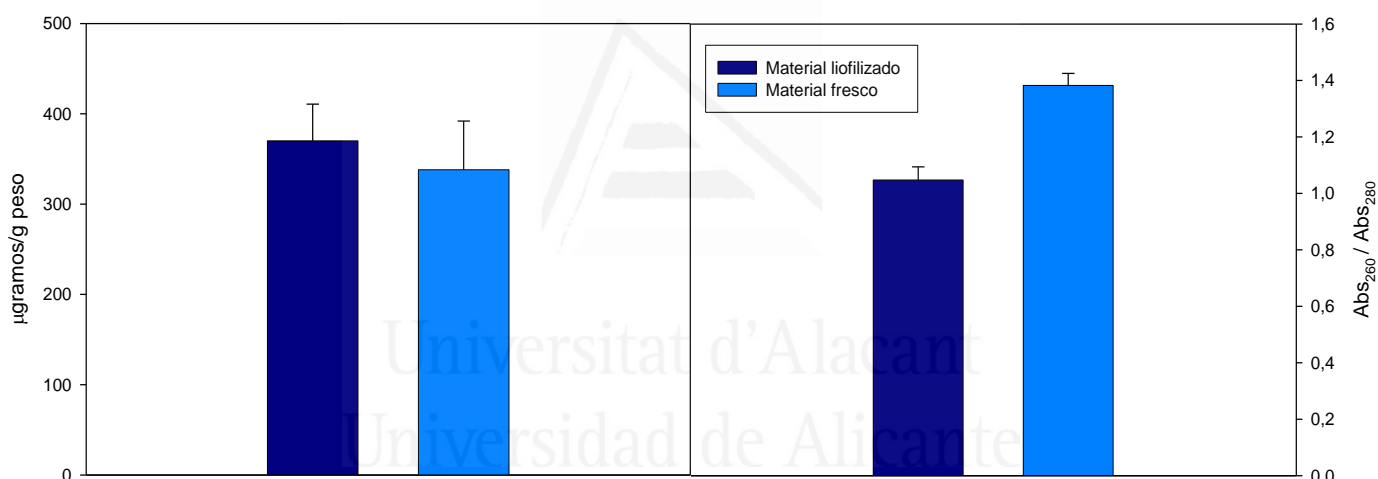
Cebador	Secuencia	Cebador	Secuencia
1	CGA CGA GTG A	17	TAC CCT CCC T
2	CTG GCT CGA A	18	ACC TAC CCA G
3	AAT CGG GGG A	19	CGA GTG AGG T
4	GTA TCC GCC T	20	GAA CAC GCT G
5	TCG GCC TCA A	21	GAG CAG CGA A
6	TCT GGT GGT G	22	GAT TGG CGT G
7	CAC GCC ATC A	23	CCA TCG TGT G
8	CGA AGA TGG G	24	ACC ACC CAC T
9	ATG CTG AGG G	25	CGT TGG TGA G
10	GAT GCC GTG A	26	CGG ACG CAT T
11	AGA TGC GGA C	27	ACG CTG GTA G
12	GTG TCC GAG T	28	CGC CAA GTC A
13	CGC ACT GCA A	29	CCA CGC AAC A
14	TGA TCG CCA C	30	TCG CAG TGT C
15	CAC GCG ACA A	31	ATG GGT ACG C
16	GCG ATT TGC C		

Las reacciones de amplificación se realizaron en todos los casos por duplicado. Los productos amplificados se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa (Pronadisa) al 2% en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X a una corriente constante de 90 V. Se utilizó un marcador de ADN de 100 pb (Generuler Ladder, Fermentas). Los geles fueron posteriormente teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg ml⁻¹) y luego fueron examinados y fotografiados bajo luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc2000 (BioRad). Las bandas polimórficas se registraron con los valores 0 y 1 (presencia o ausencia).

4.4. Resultados y Discusión

4.4.1. Análisis molecular de plantas micropropagadas y crioconservadas de *T. boveana* mediante RAPDs.

En primer lugar comprobamos el efecto que podía ejercer sobre la extracción de ADN el hecho de trabajar con material fresco o con material liofilizado. Para ello extrajimos el ADN de tejido foliar fresco y liofilizado de plantas de *Tamarix boveana* utilizando en ambos casos las mismas condiciones de extracción. Los resultados obtenidos en cuanto a concentración y calidad del ADN extraído (gráfica 1) mostraron que aunque con el material fresco se obtuvieron valores relativamente más bajos en la concentración, la calidad del ADN obtenido fue superior, por lo que optamos por utilizar material foliar fresco para la extracción de ADN.



Gráfica 1. Efecto del estado del material vegetal de partida sobre la cantidad (izquierda) y calidad (derecha) del ADN obtenida en la extracción.

El ADN de la planta madre se amplificó en un principio con un total de 31 cebadores (tabla 1) a fin de seleccionar aquellos que dieran un patrón de bandas más reproducible. Tras este análisis previo nos quedamos con diez de ellos (cebadores 1, 4, 7, 8, 9, 13, 18, 20, 21 y 23) ya que generaron un mayor número de bandas (figura 3) con una buena resolución y repetitividad, para su posterior uso.

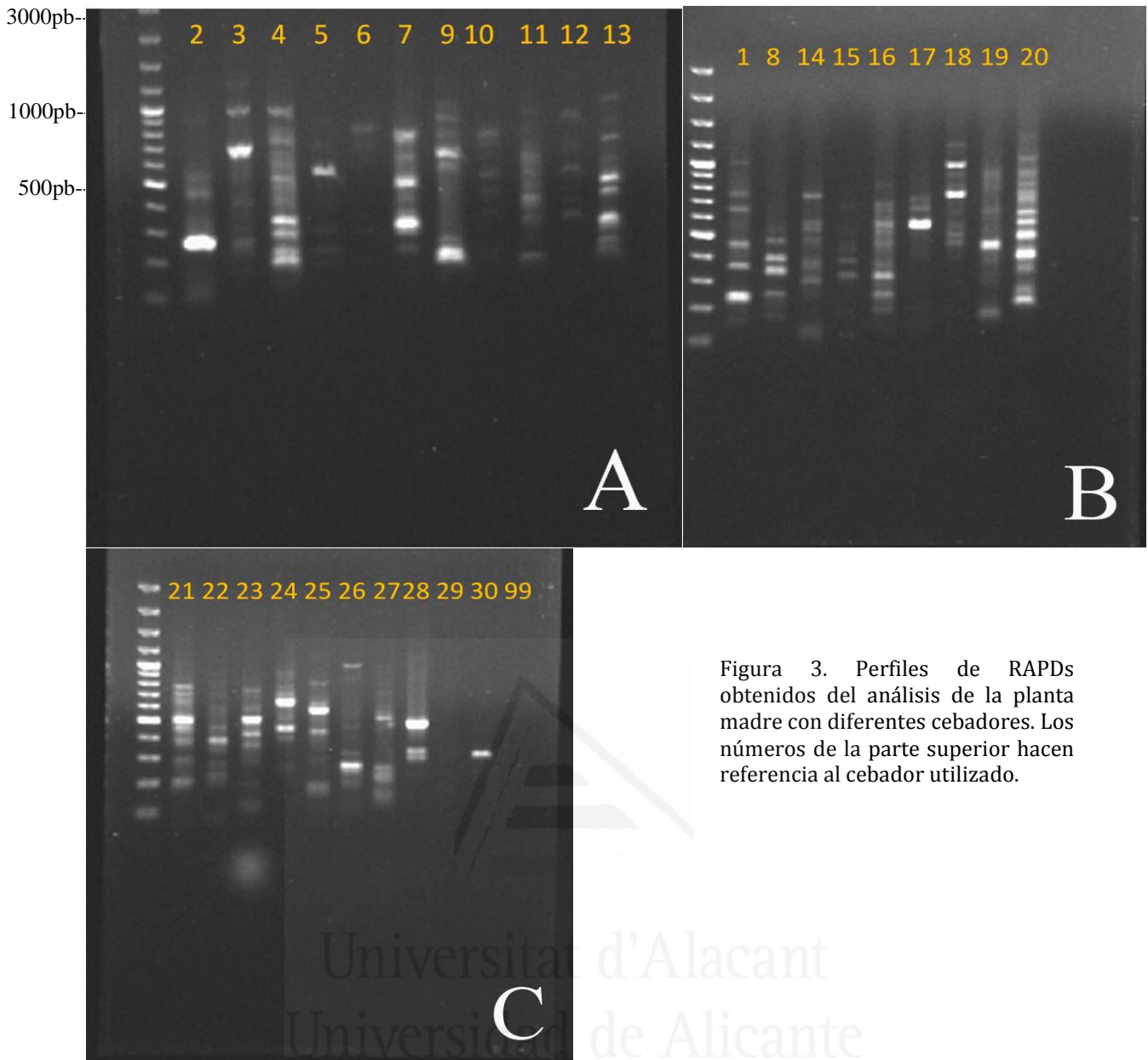


Figura 3. Perfiles de RAPDs obtenidos del análisis de la planta madre con diferentes cebadores. Los números de la parte superior hacen referencia al cebador utilizado.

En este primer caso analizamos separadamente dos individuos o genotipos de *T. boveana* (genotipo 2 y 3). En ambos casos utilizamos tres ejemplares de plántulas micropropagadas (M), otros tres de plántulas crioconservadas pero no congeladas (C) y otros tres de plantas crioconservadas (L), mientras que con el genotipo 3 incluimos además los productos de amplificación obtenidos a partir del ADN de la planta madre (F). Los resultados obtenidos permitieron detectar un total de 122 fragmentos con el genotipo 2 y 124 con el genotipo 3, lo que generó un total de 1098 y 1240 bandas respectivamente. El tamaño de bandas osciló entre los 100 y los 1750 pb en el genotipo 2 (tabla 2 y 3) y entre 150 y 2000 pb para el genotipo 3 (tablas 4 y 5). El número medio de fragmentos generados por cebador fue de 12.

Tabla 2. Resumen del análisis por RAPDs del material micropropagado del genotipo 2 de *Tamarix boveana*. Para el análisis se compararon las muestras M1-M3.

Cebador	Secuencia 5'...3'	Bandas monomórficas	Bandas Polimórficas	Rango pb
BAS 01	CGA CGA GTG A	14	0	900-100
BAS 04	GTA TCC GCC T	17	0	1350-200
BAS 07	CAC GCC ATC A	9	0	800-220
BAS 08	CGA AGA TGG G	12	0	900-170
BAS 09	ATG CTG AGG G	12	0	1200-190
BAS 13	CGC ACT GCA A	15	0	1500-150
BAS 18	ACC TAC CCA G	8	0	1500-420
BAS 20	GAA CAC GCT G	16	0	1750-220
BAS 21	GAG CAG CGA A	11	0	1000-125
BAS 23	CCA TCG TGT G	8	0	1200-200

Tabla 3. Resumen del análisis por RAPDs de material crioconservado del genotipo 2 de *T. boveana*. Para el análisis se compararon las muestras C1-C3 y L1-L3.

Cebador	Secuencia	Bandas monomórficas	Bandas Polimórficas	Rango Pb
BAS01	CGA CGA GTG A	14	0	900-100
BAS 04	GTA TCC GCC T	17	0	1350-200
BAS 07	CAC GCC ATC A	9	0	800-220
BAS 08	CGA AGA TGG G	12	0	900-170
BAS 09	ATG CTG AGG G	12	0	1200-190
BAS 13	CGC ACT GCA A	15	0	1500-150
BAS 18	ACC TAC CCA G	8	0	1500-420
BAS 20	GAA CAC GCT G	16	0	1750-220
BAS 21	GAG CAG CGA A	11	0	1000-125
BAS 23	CCA TCG TGT G	8	0	1200-200

Tabla 4. Resumen del análisis por RAPDs del material micropropagado del genotipo 3 de *T. boveana*. Para el análisis se compararon las muestras F y M1-M3.

Cebador	Secuencia 5'..3'	Bandas monomórficas	Bandas Polimórficas	Rango Pb
BAS 01	CGA CGA GTG A	13	0	2000 -150
BAS 04	GTA TCC GCC T	16	0	1350-200
BAS 07	CAC GCC ATC A	9	0	800-220
BAS 08	CGA AGA TGG G	12	0	900-170
BAS 09	ATG CTG AGG G	12	0	1200-190
BAS 13	CGC ACT GCA A	16	0	1400-150
BAS 18	ACC TAC CCA G	10	0	1500-390
BAS 20	GAA CAC GCT G	12	0	1200-220
BAS 21	GAG CAG CGA A	14	0	1200 -150
BAS 23	CCA TCG TGT G	10	0	1200-200

Tabla 5. Resumen del análisis por RAPDs del material crioconservado del genotipo 3 de *T. boveana*. Para el análisis se compararon las muestras C1-C3 y L1-L3.

Cebador	Secuencia 5'...3'	Bandas monomórficas	Bandas Polimórficas	Rango Pb
BAS01	CGA CGA GTG A	13	0	2000 -150
BAS 04	GTA TCC GCC T	16	0	1350-200
BAS 07	CAC GCC ATC A	9	0	800-220
BAS 08	CGA AGA TGG G	12	0	900-170
BAS 09	ATG CTG AGG G	12	0	1200-190
BAS 13	CGC ACT GCA A	16	0	1400-150
BAS 18	ACC TAC CCA G	10	0	1500-390
BAS 20	GAA CAC GCT G	12	0	1200-220
BAS 21	GAG CAG CGA A	14	0	1200 -150
BAS 23	CCA TCG TGT G	10	0	1200-200

En las figuras 4 y 5 se muestran como ejemplos algunas de las amplificaciones realizadas con los genotipos 3 y 2, respectivamente.

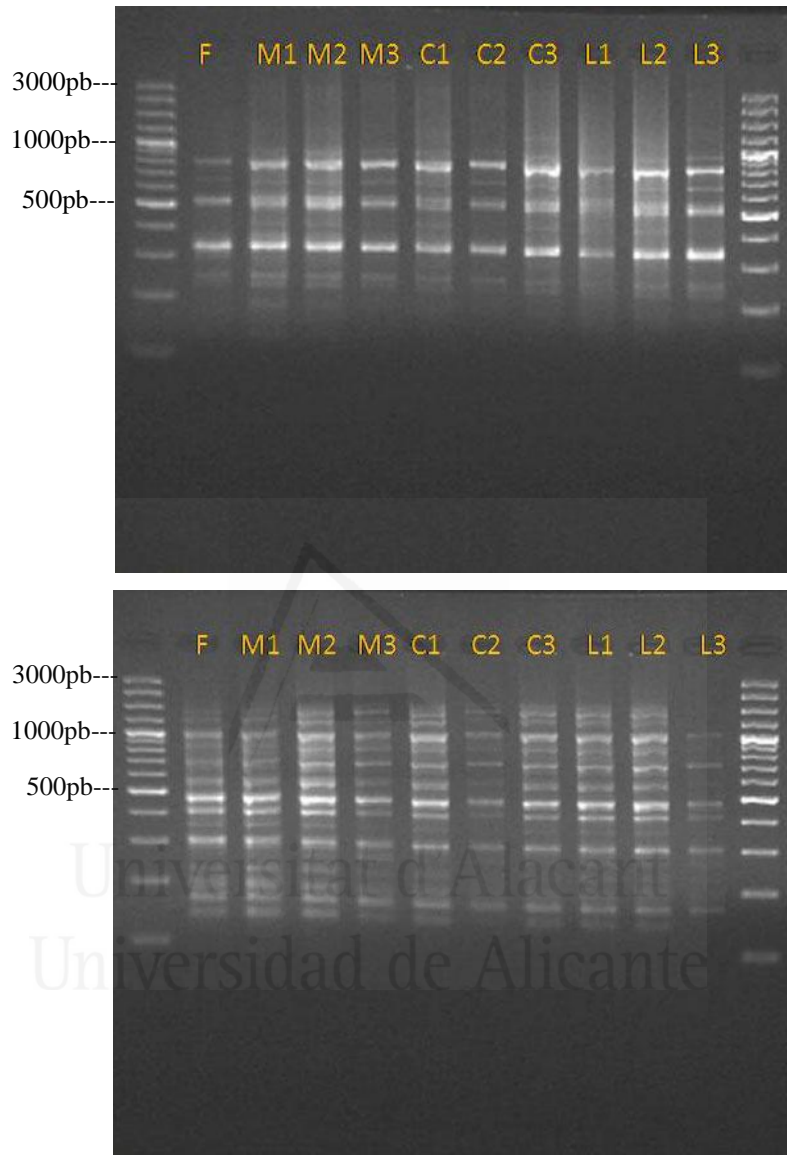


Figura 4. Perfiles de RAPDs detectados en el genotipo 3 con los cebadores 7 (arriba) y 13 (abajo). Las calles F, M, C y L corresponden a material procedente de la planta madre, plántulas micropropagadas, criopreservadas no congeladas y criopreservadas, respectivamente.

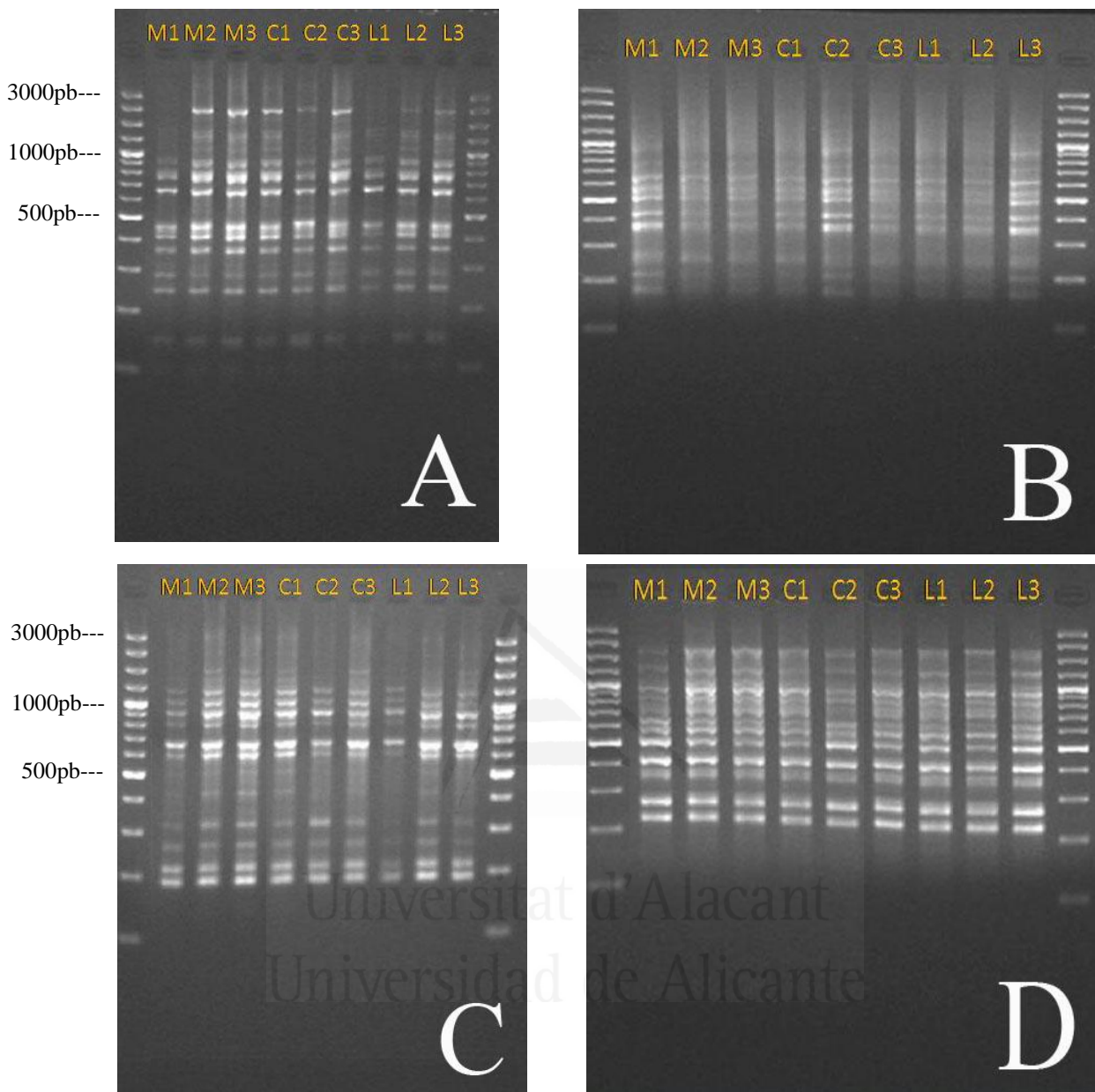


Figura 5. Perfiles de RAPDs obtenidos en el genotipo 2 con los cebadores 1 (A), 8 (B), 9 (C) y 20 (D). Las calles M, C y L corresponden a material procedente de la planta madre, plántulas micropropagadas, crioconservadas no congeladas y crioconservadas, respectivamente.

Como se puede comprobar, no detectamos variación repetible en ninguna de las muestras estudiadas. Similar falta de variación encontraron Leva & Petruccelli (2012) en plántulas micropropagadas de olivo y Xing et al. (2010) en plántulas regeneradas de *Solanum melongena*. Por el contrario, Salaj et al. (2011) detectaron variación somaclonal en tejidos embriogénicos de *Pinus nigra* pretratados con sorbitol y DMSO pero no congelados.

También quisimos comprobar si existía variación intraclonal detectable con esta técnica, para lo cual comparamos los productos de amplificación detectados en los dos genotipos anteriores. En este caso pudimos contabilizar una banda polimórfica con los cebadores 9, 21 y 23 y dos bandas polimórficas con el cebador 18 (figura 6), lo que conjuntamente supuso un 3.6% de variación.

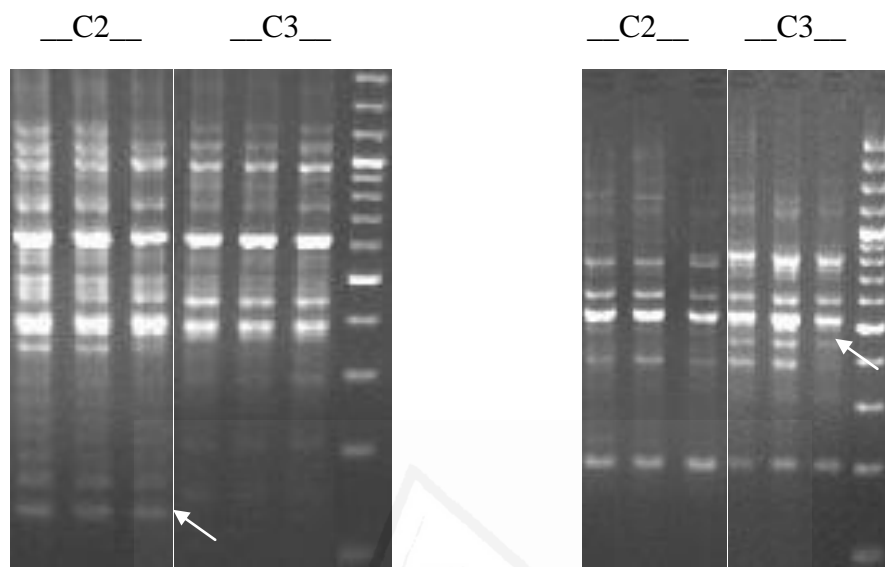


Figura 6. Análisis de RAPDs de los genotipos 2 y 3 de *T. boveana*. A la izquierda se representan las bandas detectadas con el cebador 21 y la derecha con el cebador 23. Las flechas blancas representan las bandas polimórficas.

4.4.2. Análisis molecular de plantas micropropagadas y crioconservadas de *Astragalus nitidiflorus* mediante RAPDs

En el caso de *A. nitidiflorus*, la extracción del ADN se llevó a cabo con material fresco. La aplicación del método de extracción descrito en el apartado 4.3 nos permitió obtener una solución de ADN con una concentración de $261 \pm 41.65 \mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco y una pureza ($\text{Abs}_{260} / \text{Abs}_{280}$) de 1.45 ± 0.03 .

Del total de 31 cebadores evaluados también con esta especie (tabla 1), diez de ellos (cebadores 1, 4, 13, 14, 18, 19, 23, 25, 27 y 29) mostraron una adecuada resolución y repetitividad (figura 7) y fueron utilizados en los siguientes experimentos.

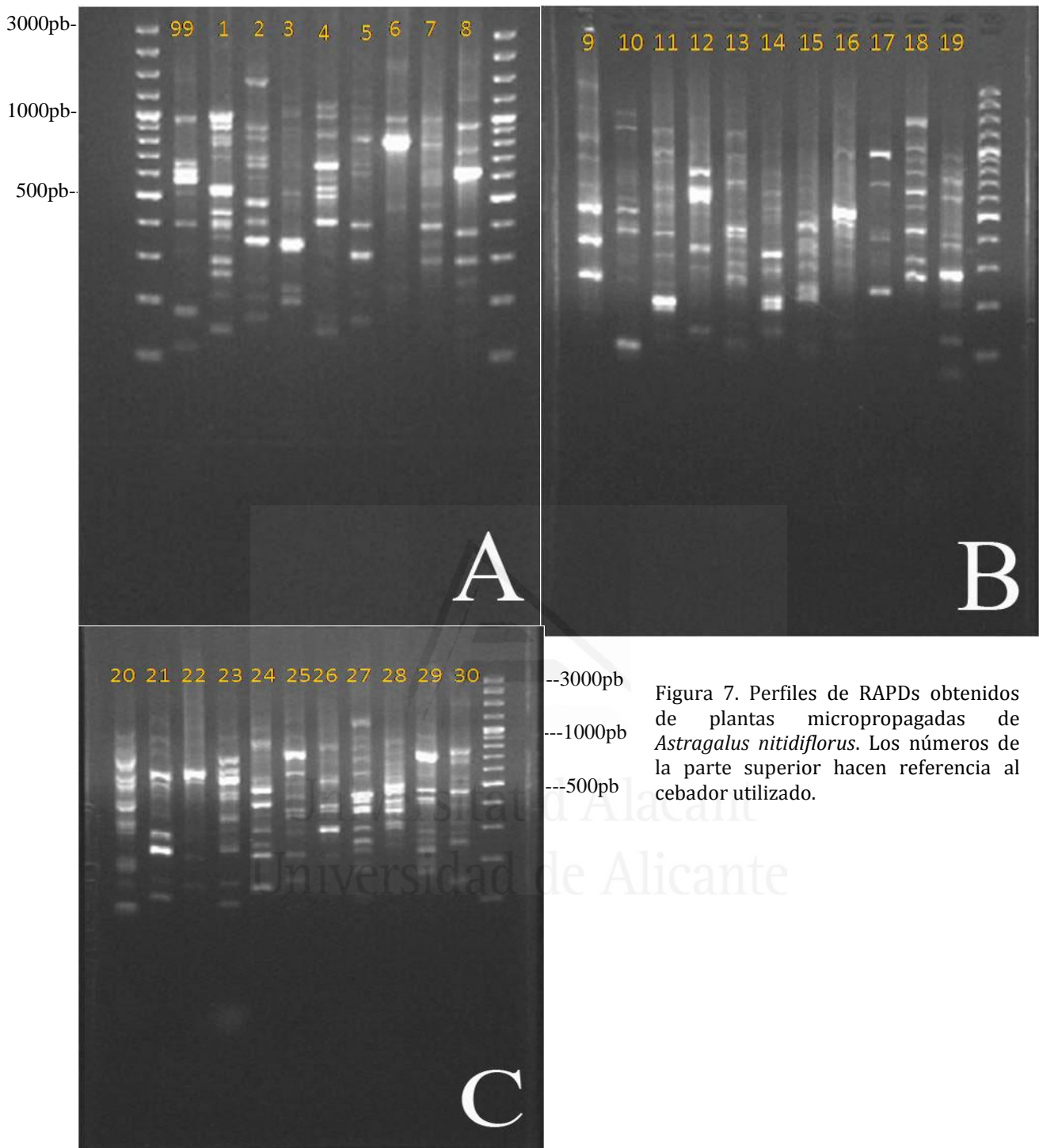


Figura 7. Perfiles de RAPDs obtenidos de plantas micropropagadas de *Astragalus nitidiflorus*. Los números de la parte superior hacen referencia al cebador utilizado.

En el caso de esta especie se analizaron tres ejemplares de plántulas micropropagadas, un ejemplar de plántulas criopropagadas no congeladas y un ejemplar criopropagado. Pudimos detectar un total de 128 fragmentos con los 10 cebadores evaluados (tablas 6 y 7), que generaron 640 bandas entre el material micropropagado y criopropagado. El número de bandas promedio por cebador fue de 12 y generaron tamaños de fragmentos que oscilaron entre los 120 y los 1800 pb.

Tabla 6. Resumen de los productos amplificados del material micropropagado de *Astragalus nitidiflorus*.

Cebador	Secuencia 5'...3'	Bandas monomórficas	Bandas Polimórficas	Rango Pb
BAS01	CGA CGA GTG A	13	0	1000 -150
BAS 04	GTA TCC GCC T	18	0	1800-160
BAS13	CGC ACT GCA A	16	0	1200-130
BAS14	CAC GCC ATC A	10	0	1100-150
BAS 18	ACC TAC CCA G	13	0	1500-120
BAS19	CGA AGA TGG G	10	0	1000-210
BAS23	CCA TCG TGT G	11	0	1750-250
BAS25	CGT TGG TGA G	10	0	1750-170
BAS27	ACG CTG GTA G	16	0	1200-190
BAS29	GAA CAC GCT G	11	0	1100-170

Tabla 7. Resumen de los productos amplificados del material crioconservado de *Astragalus nitidiflorus*.

Cebador	Secuencia 5'...3'	Bandas monomórficas	Bandas Polimórficas	Rango Pb
BAS01	CGA CGA GTG A	13	0	1000-150
BAS 04	GTA TCC GCC T	18	0	1800-160
BAS13	CGC ACT GCA A	16	0	1200-130
BAS14	CAC GCC ATC A	10	0	1100-150
BAS 18	ACC TAC CCA G	13	0	1500-120
BAS19	CGA AGA TGG G	10	0	1000-210
BAS23	CCA TCG TGT G	11	0	1750-250
BAS25	CGT TGG TGA G	10	0	1750-170
BAS27	ACG CTG GTA G	16	0	1200-190
BAS29	GAA CAC GCT G	11	0	1100-170

Estos resultados ponen de manifiesto que se mantuvo la estabilidad genética tanto en el material micropropagado como en el crioconservado en esta especie. En la figura 8 se muestran como ejemplo los perfiles de bandas detectados con los cebadores 13 y 18.

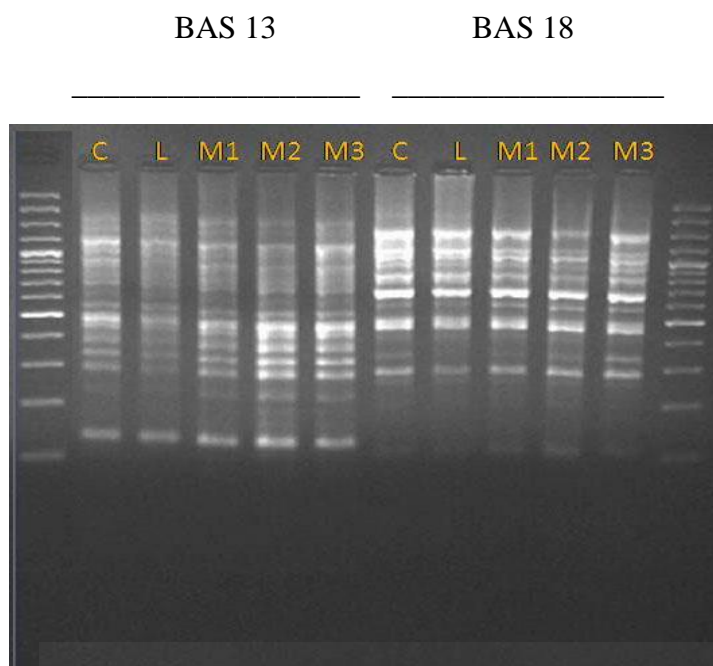


Figura 8. Perfiles de RAPDs obtenidos en *Astragalus nitidiflorus* con los cebadores 13 y 18. Las calles M, C y L corresponden a material procedente de plántulas micropropagadas, criopreservadas no congeladas y criopreservadas, respectivamente.

En nuestro estudio hemos seleccionado muestras procedentes de los estados más representativos de la conservación *in vitro* de ambas especies. A partir de los resultados obtenidos podemos asegurar que el material micropropagado por el procedimiento descrito en esta memoria es genéticamente estable. Un nivel de variación somaclonal esperado en el cultivo *in vitro* es del 1-3%, si bien esto depende de múltiples factores como la edad, la especie, el genotipo o el tipo de tejido (Skirvin et al., 1994). Además, es fundamental controlar el uso de los reguladores del crecimiento ya que estos influyen indirectamente en la tasa de variación somaclonal (Bairu et al., 2006). A pesar de haber utilizado yemas axilares como material de partida se ha comprobado en algunos casos que las plántulas procedentes del cultivo de meristemos pueden no ser siempre genéticamente idénticas a la planta madre (Damasco et al., 1996; Rival et al., 1998; Rani & Rania, 2000; Devarumath et al., 2002; Ray et al., 2006). Al igual que en éste existen otros trabajos en los que no se ha encontrado variación en plantas micropropagadas (Carvalho et al., 2004; Martins et al., 2004). Sin embargo, abundan los trabajos en los que se han detectado niveles sustanciales de variación somaclonal (Feuser et al., 2003; Modgil et al., 2005; Bairu et al., 2006; Ray et al., 2006).

El objetivo de la crioconservación no es solo el almacenamiento del material sino hacerlo de manera que se preserve la fidelidad genética del mismo (Liu et al., 2004; Scocchi et al., 2004). Al igual que lo que hemos descrito en este trabajo con *A. nitidiflorus* y *T. boveana*, en otras especies como *Betula pendula* (Ryynänen & Aronen, 2005), *Populus tremula* × *Populus tremuloides* (Jokipii et al., 2004) y manzana (Liu et al., 2004), tampoco se ha detectado variación genética sustancial tras la crioconservación cuando se analizaron mediante la técnica de RAPD.

Tampoco se ha detectado variación en los controles de crioconservación, a diferencia de lo encontrado, por ejemplo, en cultivos embriogénicos de *Abies cephalonica* (Aronen et al. 1999) o en *Pinus nigra* (Salaj et al. 2011). Estos autores constataron la aparición de polimorfismo ya en las muestras control del protocolo de crioconservación en el que se empleaba DMSO como crioprotector. Al no encontrar variación en los explantos recuperados tras la crioconservación se sugirió que la congelación en sí podría eliminar una alta proporción de células mutadas. El DMSO puede actuar modificando la función metabólica celular, además de que al interactuar con la cromatina y los ácidos nucleicos, puede causar daños al ADN (Aronen et al., 1999). Sin embargo, el uso de mezclas crioprotectoras, como la solución PVS2 utilizada en nuestro trabajo, podría haber minimizado los efectos que usualmente produce el DMSO y que elevan los niveles de variación en estos procesos.

4.5. Conclusiones

De los resultados obtenidos podemos extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Para la extracción de ADN se recomienda emplear material fresco dado que se obtiene una mayor calidad del ADN extraído
- 2) Los protocolos de RAPDs establecidos para *T. boveana* y *A. nitidiflorus* resultaron adecuados para la detección de productos amplificados con adecuada resolución y repetitividad. Estos protocolos pueden ser empleados con diferentes propósitos en estudios futuros que se realicen en estas especies.
- 3) No se detectó variación en los perfiles RAPDs con los diez cebadores empleados ni en las dos especies examinadas, ni entre los materiales micropropagados y

crioconservados evaluados. Esto sugiere que los procesos biotecnológicos involucrados en estos dos casos (micropropagación y criopreservación) presentaron una adecuada estabilidad genética.

- 4) Se apreció un 3.6% de polimorfismo genético entre los genotipos de *T. boveana* examinados.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Bibliografía



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

- Ahmed I, Islam M, Arshad W, Mannan A, Ahmad W & Mirza B. 2009. High quality DNA extraction for PCR: an easy approach. *Journal of Applied Genetics* 50 (2): 105-107.
- Ahuja S, Mandal BB, Dixit S & Srivastava PS. 2002. Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Dioscorea floribunda* plants derived from cryopreserved shoot tips. *Plant Science* 163: 971-977.
- Ai PF, Lu LP & Song JJ. 2012. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of *Rabdosia rubescens* by encapsulation-dehydration and evaluation of their genetic stability. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108: 381-387.
- Alcaraz F, Barreña JA, Clemente M, González Garnés JA, López Bernal J, Rivera D & Ríos S. 2008. *Manual de interpretación de los Hábitats Naturales y Seminaturales de la Región de Murcia*. Tomo 7: Grupo 9. Bosques. Dirección General del Medio Natural, Consejería de Desarrollo Sostenible y Ordenación del Territorio, Región de Murcia. Murcia. 91 pp.
- Alhonen-Hongisto L, Seppanen P & Janne J. 1980. Intracellular putrescine and spermidine deprivation induces increased uptake of the natural polyamines and methylglyoxal-bis(guanylhydrazone). *Biochemical Journal* 192: 941-945.
- Amo-Marco JB & Ibañez MR. 1998. Micropropagation of *Limonium cavallinesii* Erben, a threatened static, from inflorescence stems. *Plant Growth Regulation* 24: 49-54.
- Arena ME, Martínez-Pastur G, Benavides MP, Zappacosta D, Eliasco E & Curvetto N. 2003. Peroxidase and polyamine activity variation during the *in vitro* rooting of *Berberis buxifolia*. *New Zealand Journal of Botany* 41(3): 475-485.
- Arena M, Pastur G, Benavides M & Curvetto N. 2005. Polyamines and inhibitors used in successive culture media for in vitro rooting in *Berberis buxifolia*. *New Zealand Journal of Botany* 43: 373-380.
- Aribaud M, Kevers C, Martin-TanAribaud M, Kevers C, Martin-Tanguy J & Gaspar T. 1999. Low activity of amino-oxidases and accumulation of conjugated polyamines in disfavour of organogenic programs in *Chrysanthemum* leaf disc explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 55: 85-94.
- Aronen TS, Krajnakova J, Häggman HM & Rynnänen LA. 1999. Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. *Plant Science* 142: 163-172.
- Arrabal R, Amancio F, Carneiro LA, Neves LJ & Mansur E. 2002. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for in vitro preservation. *Biodiversity and Conservation* 11: 1081-1089.
- Arregui JM, Juarez J, Laguna E, & Navarro L. Micropropagación de *Cistus heterophyllus*. Un ejemplo de la aplicación del cultivo de tejidos a la conservación de especies amenazadas. *Vida Silvestre* 74: 24-29; 1993.
- Azofeifa-Delgado A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 221-246.
- Bachiri Y, Song GQ, Plessis P, Shoar-Ghaffari, Rekab T & Morisset C. 2001. Routine cryopreservation of kiwifruit (*Actinidia spp.*) germplasm by encapsulation-dehydration: importance of plant growth regulators. *Cryoletters* 22: 61-74.
- Bachmann K. 1994. Molecular markers in plant ecology. *New Phytologist* 126: 403-418.
- Badji S, Mairone Y, Ndiaye I, Merlin G, Danthu P, Neville P and Colonna J.P. 1993. In vitro propagation of the gum arabic tree (*Acacia senegal* (L.) Willd. 1. Developing a rapid method for producing plants. *Plant Cell Reports* 12: 629-633.

- Bairu MW, Aremu, AO & Van Staden J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63: 147-173.
- Bairu MW, Fennell CW & Van Staden J. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. "Zelig"). *Scientia Horticulturae* 108: 347-351.
- Bairu MW & Kane ME. 2011. Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants. *Plant Growth Regulation* 63: 101-103.
- Ballester A, San-Jose MC, Vidal N, Fernández-Lorenzo JL & Vieitez AM. 1999. Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Annals of Botany* 83: 619-629.
- Bañares A, Blanca G, Güemes J, Moreno JC & Ortiz S, eds. 2010. Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España. Adenda 2010. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino)-Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. Madrid, 170 pp.
- Baraldi R, Bertazza G, Bregoli AM, Fasolo F, Rotondi A, Predieri S, Serafini-Fracassini D, Slovin JP & Cohen JD. 1995. Auxins and polyamines in relation to differential *in vitro* root induction on microcuttings of two pear cultivars. *Journal of Plant Growth Regulation* 14: 49-59.
- Barceló-Muñoz A, Encina CL, Simón-Pérez E & Pliego-Alfaro F. 1999. Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 11-17.
- Baron K & Stasolla C. 2008. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 44: 384-395
- Benson EE 1999. An introduction to plant conservation biotechnology. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Erica E. Benson (Ed.) Taylor & Francis, Ltd. Pp: 3-10.
- Benson EE. 1999. Cryopreservation. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Erica E. Benson (Ed.) Taylor & Francis, Ltd. Pp: 83-95.
- Benson EE. 2000. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 36(3): 141-148.
- Bindiya K & Kanwar K. 2003. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Robinia pseudoacacia* L. *Euphytica* 132: 41-47.
- Biondi S, Diaz T, Iglesias M, Gamberini G & Bagni N. 1990. Polyamines and ethylene in relation to adventitious root formation in *Prunus avium* shoot cultures. *Physiologia Plantarum* 78:474-483.
- Bosela MJ & Michler CH. 2008. Media effects on black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot cultura growth *in vitro*: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 44: 316:329.
- Botstein D, White RL, Skolnick M & Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J. 1999. Polyamines and enviromental challenges: recent development. *Plant Science* 140: 103-125.
- Bouza L, Jacques M & Miginiac E. 1994. Requirements for *in vitro* rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vatry'. *Scientia Horticulturae* 58: 223-233.
- Burtin D, Martin-Tanguy J, Paynot M, Carre M & Rossin N. 1990. Polyamines, hydroxycinnamoylputrescines, and root formation in leaf explants of tobacco cultivated *in vitro*. *Plant Physiology* 93: 1398-1404.

- Carvalho LC, Goulão L, Oliveira C, Gonçalves JC & Amâncio S. 2004. RAPD assessment for identification of clonal identity and genetic stability of *in vitro* propagated chestnut hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 23-27.
- Carrión MA, Aznar L, Martínez JJ, Vicente MJ, Munuera M, Conesa E & Conesa F. 2007. Luces y sombras en la conservación de *Astragalus nitidiflorus*. *Conservación Vegetal*, 11: 35-37.
- Cassells AC & Curry RF. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability to plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145-157.
- Castillo NRF. 2006. Fingerprinting and genetic stability of *Rubus* using molecular markers. Master's thesis, Oregon State University, Corvallis.
- Castillo NRF, Bassil NV, Wada S & Reed BM. 2010. Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 46:246-256.
- Chaeroensub R, Hirai D & Sakai A. 2004. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cassava by encapsulation-vitrification method. *Cryoletters* 25: 51-58.
- Chandrika M, Ravishankar Rai V & Thoyajaksha. 2010. ISSR marker based analysis of micropropagated plantlets of *Nothapodytes foetida*. *Biologia Plantarum* 54(3): 561-565.
- Cho EG, Normah NM, Kim HH, Rao VR & Engelmann F. 2002. Cryopreservation of *Citrus aurantifolia* seeds and embryonic axes using a desiccation protocol. *Cryoletters* 23: 309-316.
- Christensen B, Sriskandarajah S, Serek M & Müller R. 2008. *In vitro* culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93: 151-161.
- Chand H, Pearson MN & Lovell PH. 1999. Rapid vegetative multiplication in *Colocasia esculenta* (L.) Schott (taro). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 223-226.
- Couée I, Hummel I, Sulmon C, Gouesbet G & El Amrani A. 2004. Involvement of polyamines in root development. *Plant Cell and Tissue Culture* 76: 1-10.
- Cyr DR. 2000. Cryopreservation: roles in clonal propagation and germplasm conservation of conifers. En: Engelmann F & Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Japanese International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japón, 261-268.
- Damasco OP, Graham GC, Henry RJ, Adkins SW & Godwin ID. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. *Plant Cell Reports* 16: 118-123.
- Debergh PC & Read PE. 1991. Micropropagation. En: *Micropropagation: Technology and Application*. Debergh P.C. y Zimmerman R.H. (Eds.) Dordrecht: Kluwer Academic. Pp. 31-44
- De Klerk GJ. 1996. Markers of adventitious root formation. *Agronomie* 16: 609-616.
- De Klerk GJ. 2002. Rooting of microcuttings: theory and practice. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*. 38: 415-422.
- De la Viña G, Barceló-Muñoz A & Pliego-Alfaro F. 2001. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 65: 229-237.
- De Riek J, Piqueras A & Debergh PC. 1997. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 47: 269-278.

- Devarumath RM, Nandy S, Rani V, Marimuthu S, Muraleedharan N & Raina SN. 2002. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tree clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* spp. *assamica* (Assam-Indian type). *Plant Cell Reports* 21: 166-173.
- Dias LLC, Santa-Catarina C, Ribeiro DM, Barros RS, Floh EIS & Otoni WC. 2009. Ethylene and polyamine production patterns during in vitro shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitors. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99: 199-208.
- Díaz-Sala C, Rey M & Rodríguez R. 1990. In vitro establishment of a cycloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 23: 151-157.
- Dixit S, Mandal B, Ahuja S & Srivastava P. 2003. Genetic stability assessment of plants regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* L. using RAPD, biochemical and morphological analysis. *CryoLetters* 24: 77-84.
- Dumet D, Engelmann F, Chabrilange N, Dussert S & Duval Y. 2000. Cryopreservation of oil-palm polyembryonic cultures. En: Engelmann F & Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Japanese International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japón, 172-177.
- Dumet D, Engelmann F, Chabrilange N, Dussert S & Duval Y. 2004. Effect of desiccation and storage temperature on the conservation of cultures of oil palm somatic embryos. *Cryoletters* 15: 85-90.
- Dussert S, Chabrilange N, Engelmann F, Anthony F, Louarn J & Hamon S. 1998. Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea Arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. *Seed Science Research* 8:9-15.
- Edson JL, Leege-Brusven AD, Everett RL & Wenny DL. 1996. Minimizing growth regulators in shoot cultures of an endangered plant, *Hackelia venusta* (Boraginaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 32:267-271.
- Engelmann F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En: Engelmann F & Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Japanese International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japón, 8-20.
- Engelmann F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 40(5): 427-433.
- Engelmann F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 47: 5-16.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA & Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21: 407-426.
- Faisal M, Alatar AA, Ahmad N, Anis M & Hegazy AK. 2012. Assessment of genetic fidelity in *Rauwolfia serpentina* plantlets grown from synthetic (encapsulated) seeds following in vitro storage at 4 °C. *Molecules* 17: 5050-5061.
- Faivre-Rampant O, Kevers C, Dommes J & Gaspar T. 2000. The recalcitrance to rooting of the micropropagated shoots of the *rac* tobacco mutant: implications of polyamines and of the polyamine metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* 38(6): 441-448.
- Fay M.F. 1994. In what situations is in vitro culture appropriate to plant conservation?. *Biodiversity and Conservation* 3: 176-183.

- Fang J-Y, Wetten A & Hadley P. 2004. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Science* 166: 669-675.
- Feuser S, Meler K, Daquinta M, Guerra MP & Nodari RO. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 221-227.
- Fridborg G, Pedersén M, Landström LE & Eriksson T. 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiologia Plantarum* 43: 104-106.
- Friedman R, Altman A & Bachrach U. 1982. Polyamines and root formation in mung bean hypocotyls cuttings. *Plant Physiology* 70: 844-848.
- Gamarnik A & Frydman RB. 1991. Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds. *Plant Physiology* 97: 778-785.
- Gamborg OL, Millar RA & Ojiva K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158
- Gaspar T, Kevers C & Hausman JF. 1997. Indissociable chief factors in the inductive phase of adventitious rooting. In: Altman A & Waisel Y (Eds.) *Biology of Root Formation and Development*. Plenum Press New York: 55-63.
- Geneve RL, Kester ST. 1991. Polyamines and adventitious root formation in the juvenile-and mature-phase of English ivy. *Journal of Experimental Botany* 42: 71-75.
- George EF. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1: The Technology*. 2^a ed. Exegetics Ltd., UK. pp. 574
- George EF, Hall MA & De Klerk GJ. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture. Vol. 1. The Background*. 3rd ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 508.
- George PS & Ravishankar GA. 1997. In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. *Plant Cell Reports* 16: 490-494.
- Gómez MP & Segura J. 1995. Axillary shoot proliferation in cultures of explants from mature *Juniperus oxycedrus* trees. *Tree Physiology* 15: 625-628.
- Gonçalves S, Correia PJ, Martins-Louçao MA & Romano A. 2005. A new medium formulation for in vitro rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentrations. *Biologia Plantarum* 49 (2): 277-280
- Gonzalez-Arno MT, Engelmann F, Urra C, Morenza M & Rios A. 1998. Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. *Cryoletters* 19: 177-182.
- González-Arno MT, Panta A, Roca WM, Escobar RH & Engelmann F. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 1-13.
- González-Benito ME, Clavero-Ramírez I & López-Aranda JM. 2004. Review. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2 (3): 341-351.
- González Benito ME, Martín C., Iriando JM & Pérez C. 1999. Conservation of the rare and endangered plants endemic to Spain. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Erica E. Benson (Ed.) Taylor & Francis, Ltd. Pp: 251-264.
- González-Benito ME, Mendoza-Condori VH & Molina-García AD. 2007. Cryopreservation of *in vitro* shoot apices of *Oxalis tuberosa* Mol. *Cryoletters* 28(1): 23-32.
- González-Benito ME & Pérez C. 1992. Cryopreservation of *Quercus faginea* embryonic axes. *Cryobiology* 29: 685-690.

- González-Benito ME, Viviani AB & Pérez C. 1997. Cryopreservation of nodal explants of an endangered plant species (*Centaureum rigualii* Esteve) using the encapsulation-dehydration method. *Biodiversity and Conservation* 6: 583-590.
- Gresshoff PM & Doy CH. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 17: 161-170
- Halmagyi A & Pinker I. 2006. Plant regeneration from *Rosa* shoot-tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84:145-153.
- Halušková J & Košuth J. 2003. RAPD analysis of somaclonal and natural DNA variation in *Hypericum perforatum* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 45/2: 101-104.
- Hao YJ, You CX & Deng XX. 2002. Effects of cryopreservation on developmental competency, cytological and molecular stability of citrus callus. *Cryoletters* 23: 27-35.
- Harding K. 1999. Stability Assessment of Conserved Plant Germplasm. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Erica E. Benson (Ed.) Taylor & Francis, Ltd. Pp: 97-105.
- Harding K. 1999. Stability assessments of conserved plant germplasm. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Erica E. Benson (Ed.) Taylor & Francis, Ltd. Pp: 97-105.
- Hausman JF, Evers D, Thiellement H & Jouve L. 2000. Compared responses of poplar cuttings and in vitro raised shoots to short-term chilling treatments. *Plant Cell Reports* 19: 954-960.
- Hausman JF, Kevers C & Gaspar T. 1994. Involvement of putrescine in the inductive rooting phase of poplar shoots raised in vitro. *Physiologia Plantarum* 92:201-206.
- Hausman JF, Kevers C & Gaspar T. 1995a. Putrescine control of peroxidase activity in the inductive phase of rooting in poplar shoots *in vitro*, and the adversary effect of spermidine. *Journal of Plant Physiology* 146: 681-685.
- Hausman JF, Kevers C & Gaspar T. 1995b. Auxin-polyamine interaction in the control of the rooting inductive phase of poplar shoots in vitro. *Plant Science* 110: 63-71.
- Helliot B, Madur D, Dirlewanger E & De Boucaud MT. 2002. Evaluation of genetic stability in cryopreserved *Prunus*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38: 493-500.
- Heloir MC, Kevers C, Hausman JF & Gaspar T. 1996. Changes in the concentration of auxins and polyamines during rooting of in vitro propagated walnut shoots. *Tree Physiology* 16: 515-519.
- Hiatt A & Malmberg RL. 1988. Utilization of putrescine in tobacco cell lines resistant to inhibitors of polyamine synthesis. *Plant Physiology* 86:441-446.
- Hirai D & Sakai A. 1999a. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Research* 42: 153-160.
- Hirai D & Sakai A. 1999b. Cryopreservation of in vitro-grown axillary shoot tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation-vitrification. *Plant Cell Reports* 19: 150-154.
- Hirai D & Sakai A. 2000. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. En: Engelmann F & Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Japanese International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japón, 205-211
- Huang WJ, Ning GG, Liu GF & Bao MZ. 2009. Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of *Platanus acerifolia* using ISSR markers. *Biologia Plantarum* 53(1): 159-163.

- Huetteman A & Preece EJ. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 105-119.
- Hummel I, Couée I, Amrani AE, Martin-Tanguy J & Hennion F. 2002. Involvement of polyamines in root development at low temperature in the subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica*. *Journal of Experimental Botany* 53: 1463-1473.
- Ikeda N, Bautista NS, Yamada T, Kamijima O & Ishii T. 2001. Ultra-simple DNA extraction method for marker-assisted selection using microsatellite markers in rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 27-32.
- Iriondo JM & Pérez C. 1996. Micropropagation and in vitro storage of *Centaurium rigualii* Esteve (Gentianaceae). *Israel Journal of Plant Science* 44: 115–123.
- Iriondo JM, Prieto C, Pérez-García F. 1995. *In vitro* regeneration of *Helianthemum polygonoides* Peinado *et al.*, an endangered salt meadow species. *Botanic Garden Micropropagation News*, Vol 2 Part 1.
- Ishikawa K, Harata K, Mii M, Sakai A, Yotshimasu A & Shimomura K. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Reports* 16: 754-757.
- Jain SM. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166.
- Jana S & Shekhawat GS. 2012. *In vitro* regeneration of *Anethum graveolens*, antioxidative enzymes during organogenesis and RAPD analysis for clonal fidelity. *Biologia Plantarum* 56(1): 9-14.
- Jekker Z, Kiss J, Gyulai G, Kiss E & Heszky LE. 2002. Cryopreservation of somatic embryos from *Aesculus hippocastanum* L. (Horse chestnut). En: *Cryopreservation of plant germplasm II*. Towill LE & Bajaj YPS (eds.). Springer-Verlag. 199-212.
- Jeon MG, Jo HI & Han TJ. 1998. Effect of polyamines on adventitious root formation from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf segments. *Journal of Plant Biology* 41(1): 31-36.
- Jitsuyama S, Suzuki T, Harada T & Fujikawa S. 1997. Ultrastructural study on mechanism of increased freezing tolerance due to extracellular glucose in cabbage leaf cells. *Cryoletters* 18: 33-34.
- Jokipii S, Ryyänen L, Kallio PT, Aronen T, Häggman H. 2004. A cryopreservation method maintaining the genetic fidelity of a model forest tree, *Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* Michx. *Plant Science* 166: 799-806.
- Joshi M & Dhar U. 2003. *In vitro* propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew.-an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya. *Plant Cell Reports* 21: 933-939.
- Kaczmarczyk A, Turner AR, Bunn E, Mancera RL & Dixon KW. 2011. Cryopreservation of threatened native Australian species - what have we learned and where to from here?. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 47: 17-25.
- Kadota M, Imizu K & Hiranu T. 2001. Double phase in vitro culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. *Scientia Horticulturae* 89: 207-215.
- Kaeppler SM, Kaeppler HF & Rhee Y. 2000. Epigenetics of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43:179-188.
- Kakkar RK & Sawhney VK. 2002. Polyamine research in plants—a changing perspective. *Physiologia Plantarum* 116: 281–292.
- Karp A. 2000. Molecular tools for detecting genetic diversity. *Acta Horticulturae* 530: 17-29.
- Keller JER. 2005. Improvement of cryopreservation results in garlic using low temperature preculture and high-quality *in vitro* plantlets. *Cryoletters* 26 (6): 357-366.

- Kim HH, Cha YS, Baek HJ, Cho EG, Chae YA, Engelmann F. 2002. Cryopreservation of tea (*Camellia sinensis* L.) seeds and embryonic axes. *CryoLetters* 23(4): 209–216.
- Knop W. 1865. Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen. Die Landwirtschaftlichen Versuch-Station 7: 93-107.
- Kozomara B, Vinterhalter B, Radojević Lj & Vinterhalter D. 2008. In vitro propagation of *Chimonanthus praecox* (L.), a winterflowering ornamental shrub. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 44: 142-147.
- Kunert KJ, Baaziz M & Cullis CA. 2003. Techniques for determination of true-to-type date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants: a literature review. *Emirates Journal of Agricultural Science* 15:1-16.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C & Takahashi Y. 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228: 367-381.
- Lambardi M, Fabbri A & Caccavale A. 2000. Cryopreservation of White poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *Plant Cell Reports* 19: 213-218.
- Lambert E, Goossens A, Panis B, Van Labeke MC & Geelen D. 2009. Cryopreservation of hairy root cultures of *Maesa lanceolata* and *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 96: 289-296.
- Landsmann J & Uhrig H. 1985. Somaclonal variation in *Solanum tuberosum* detected at the molecular level. *Theoretical and Applied Genetics* 71: 500-505.
- Larkin PJ & Scowcroft WR. 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60:197-214.
- Le Guen-Le Saos F & Hourmant A. 2001. Stimulation of putrescine biosynthesis via the ornithine decarboxylase pathway by gibberellic acid in the *in vitro* rooting of globe artichoke (*Cynara scolymus*). *Plant Growth Regulation* 35: 277-284.
- Leunufna S & Keller ERJ. 2005. Cryopreservation of yams using vitrification modified by including droplet method: effects of cold acclimation and sucrose. *Cryoletters* 26(2): 93-102.
- Leva AR & Petruccioli R. 2012. Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers. *Biologia Plantarum* 56(2): 373-376.
- Li SW, Xue L, Xu Shijian, Feng H & An L. 2009. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Botanical Review* 75: 230-247.
- Linsmaier EM & Skoog F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100–127.
- Liu Y, Wang X & Liu L. 2004. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification. *Plant Science* 166: 677-685.
- Liu ZH, Wang WC & Yen YS. 1998. Effect of hormone treatment on root formation and endogenous indole-3-acetic acid and polyamine levels of *Glycine max* cultivated in vitro. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39: 113-118.
- Lloyd DG & McCown BH. 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society* 421-427
- Lucchesini M, Mensuali-Sodi A & Vitagliano C. 1993. Micropropagation of *Tamarix gallica* from nodal explants of mature trees. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 35: 195-197.
- Lynch PT. 1999. Tissue culture techniques in *in vitro* plant conservation. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Erica E. Benson (Ed.) Taylor & Francis, Ltd. Pp: 41-60.

- Maene L & Debergh P. 1985. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 23-33.
- Malik SK & Chaudhury R. 2006. The cryopreservation of embryonic axes of two wild and endangered *Citrus* species. *Plant Genetic resources* 4(3): 204-209.
- Mallón R, Bunn E, Turner SR & González ML. 2008. Cryopreservation of *Centaurea ultriciae* (Compositae) a critically endangered species from Galicia (Spain). *CryoLetters* 29: 363–370.
- Manzanera J.A. & Pardos J.A. 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 1-8.
- Marco-Medina A, Casas JL, Swennen R & Panis B. 2010a. Cryopreservation of *Thymus moroderi* by droplet vitrification. *CryoLetters* 31: 14–23.
- Marco-Medina A, Gonzalez-Benito ME & Casas JL. 2010b. Cryopreservation of *Thymus moroderi* shoot tips by vitrification and encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 31: 301–309.
- Márquez-García B, Hidalgo PJ & Córdoba F. 2009. Effect of different media composition on the micropropagation of *Erica andevalensis*, a metal accumulator species growing in mining areas (SW Spain). *Acta Physiologia Plantarum* 31: 661–666.
- Martin C & González-Benito ME. 2005. Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration. *Cryobiology* 51: 281-289.
- Martin-Tanguy J. 1997. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiologia Plantarum* 11: 675-688.
- Martin-Tanguy J. 2001. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* 34, 135-148.
- Martin-Tanguy J & Carre M. 1993. Polyamines in grapevine microcuttings cultivated in vitro. Effects of amines and inhibitors of polyamine biosynthesis on polyamine levels and microcutting growth and development. *Plant Growth Regulation* 13: 269-280.
- Martinez MR. 2007. Propagación vegetativa de *Tamarix boveana* Bunge: ensayos de enraizamiento de esquejes. Proyecto Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Cartagena. 143 pp.
- Martinez Pastur G, Arena ME, Benavides MP, Eliasco E & Curvetto N. 2007. Role of polyamines during in vitro rhizogenesis of *Nothofagus nervosa* using successive culture media. *New Forests* 34: 83-93.
- Martins M, Sarmiento D & Oliveira MM. 2004. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports* 23: 492-496.
- Matsumoto T. 2002. Cryopreservation of In Vitro Grown Apical Shoot Tips of *Wasabia japonica* (Wasabi) by Different Procedures. En: Towill LE & Bajaj YPS, eds. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol. 50. Cryopreservation of Plant Germplasm II. Springer-Verlag, Berlín, 180-195.
- Matsumoto T, Sakai A, Takahashi C & Yamada K. 1995. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *Cryoletters* 16: 189-196.
- Matsumoto T, Sakai A, Takahashi C & Yamada K. 1996. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of lily (*Lillium* sp.) by encapsulation-vitrification method. *Plant Tissue Culture Letters* 13: 29-34.

- Matsumoto T, Takahashi C, Sakai A & Nako Y. 1998. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of hybrid statics by three different procedures. *Scientia Horticulturae* 76: 105-114.
- Metcalf B, Bey P, Dauzin C, Jung J, Casara P & Vevert J. 1987. Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (EC 4.1.1.17) by substrate and product analogues. *Journal of the American Chemical Society* 100: 2551-2553.
- Metzker ML & Caskey TC. 2001. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.
- Miguel C & Marum L. 2011. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany* 62(11): 3713-3725.
- Mirza JI & Bagni N. 1991. Effect of exogenous polyamines and difluoromethylornithine on seed germination and root growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 10: 163-168.
- Modgil M, Mahajan K, Chakrabarti SK, Sharma DR & Sobti RC. 2005. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. *Scientia Horticulturae* 104: 151-160.
- Mondal T, Bhattacharya A, Sood A & Ahuja PS. 1998. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) using thidiazuron. *Plant Growth Regulation* 26: 57-61.
- Moreno JC. (coord.). 2008. Lista Roja 2008 de la flora vascular española. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas), Madrid, 86 pp
- Morte MA & Honrubia M. 1992. In vitro propagation of *Helianthemum almeriense* Pau (Cistaceae). *Agronomie* 12: 807-809
- Morte MA & Honrubia M. 1996. Biotechnology in *Tetraclinis articulata* (Cartagena Cypress). En: YPS Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees IV*, Vol. 35. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 407-423.
- Moschou PN, Sanmartin M, Andriopoulou AH, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ & Roubelakis-Angelakis KA. 2008. Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 147: 1845-1857.
- Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Murthy BNS, Murch SJ & Saxena PK. 1998. Review. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 34: 267-275.
- Nag S, Saha K & Choudhuri MA. 2001. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 182-194.
- Naija S, Elloumi N, Ammar S, Kevers C & Dommes J. 2009. Involvement of polyamines in the adventitious rooting of micropropagated shoots of the apple rootstock MM106. *In Vitro Cell and Developmental Biology Plant* 45: 83-91.
- Neves C, Santos H, Vilas-Boas L & Amancio S. 2002. Involvement of free and conjugated polyamines and free amino acids in the adventitious rooting of micropropagated cork oak and grapevine shoots. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 1071-1080.
- Niino T, Sakai A, Yakuwz H & Nojiri K. 1992. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28: 261-266.

- Niino T, Tashiro K, Suzuki M, Ohuchi S, Magoshi J & Akihama T. 1997. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. *Scientia Horticulturae* 70:155-163.
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y & Matsuzawa T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis*) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* 91: 67-73.
- Nissen P. 1996. Difluoromethylornithine counteracts effect of auxins and inhibitors of polar auxin transport on plant development. *Biologia Plantarum* 38(3): 343-349.
- Nunome T, Ishiguro K, Yoshida T & Hirai M. 2001. Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. *Breeding Science* 51: 19-26.
- Ohe M, Scoccianti V, Bagni N, Tassoni A & Matsuzaki S. 2009. Putative occurrence of lysine descarboxylase isoforms in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Amino Acids* 36: 65-70.
- Orabi MAA, Taniguchi S & Hatano T. 2009. Monomeric and dimeric hydrolyzable tannins of *Tamarix nilotica*. *Phytochemistry* 70: 1286- 1293.
- Orabi MAA, Taniguchi S, Yoshimura M, Yoshida T, Hatano T. 2010a. New monomeric and dimeric hydrolyzable tannins from *Tamarix nilotica*. *Heterocycles* 80: 463-475.
- Orabi MAA, Taniguchi S, Yoshimura M, Yoshida T, Kishino K, Sakagami H & Hatano T. 2010b. Hydrolyzable tannins of tamaricaceous plants. III: Hellinoyl and macrocyclic type ellagitannins from *Tamarix nilotica*. *Journal of Natural Products* 73: 870-879.
- Orabi MAA, Taniguchi S, Terabayashi S & Hatano T. 2011. Hydrolyzable tannins of tamaricaceous plants. IV: Micropropagation and ellagitannin production in shoot cultures of *Tamarix tetrandra*. *Phytochemistry* 72: 1978-1989.
- Pal-Bais H & Raishankar GA. 2002. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 1-34.
- Palombi MA & Damiano C. 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). *Plant Cell Reports* 20: 1061-1066.
- Pan MJ & Van Staden J. 1998. The use of charcoal in in vitro culture-A review. *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
- Pandey RN, Singh SP, Rastogi J, Sharma ML & Singh RK. 2012. Early assessment of genetic fidelity in sugarcane (*Saccharum officinarum*) plantlets regenerated through direct organogenesis with RAPD and SSR markers. *Australian Journal of Crop Science* 6(4): 618-624.
- Panis B & Lambardi M. 2006. Status of cryopreservation technologies in plants (crop and forest trees). En: Ruane J & Sonnino A (eds.). *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Panis B, Piette B, Swennen R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems applicable to all *Musaceae*. *Plant Science* 168: 45-55.
- Panis B, Swennen R & Engelmann F. 2001. Cryopreservation of plant germplasm. *Acta Horticulturae (ISHS)* 560: 79-86.
- Panis B, Totté N, Van Nimmen K, Whitters LA & Swennen R. 1996. Cryopreservation of banana (*Musa* sp.) meristem cultures after preculture on sucrose. *Plant Science* 121: 95-106.

- Pau C. 1910. *Astragalus nitidiflorus* Jiménez et Pau n. sp. *Boletín de la Sociedad Aragonesa de Ciencias Naturales* 9: 130-131.
- Pence V. 1999. The application of biotechnology for the conservation of endangered plants. En: Plant Conservation Biotechnology. Benson E.E. (ed.). Taylor & Francis, London, pp. 227-250.
- Pennycooke JC & Towill LE. 2001. Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) shoot tips cryopreserved by vitrification and encapsulation-dehydration. *Cryoletters* 22: 381-389.
- Peredo EL, Arroyo-García R, Reed BM & Revilla MA. 2008. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology* 57:234-241.
- Pérez-García F & González-Benito ME. 2008. Seed cryopreservation of *Halimium* and *Helianthemum* species. *CryoLetters* 29: 271–276.
- Piqueras A, Han BH, Van Huylenbroeck JM & Debergh PC. 1998. Effect of different environmental conditions in vitro on sucrose metabolism and antioxidant enzymatic activities in cultured shoots of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Growth Regulation* 25: 5-10.
- Pitt RE, Parks JE, Huber SC & Sangree JA. 1997. Glycerol permeability of rye leaf protoplasts as affected by temperature and electroporation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50: 215-219.
- Podlech D. 1999. *Astragalus* L. En: Talavera S et al. (eds), *Flora Iberica*, VII (I) Leguminosae (partim), pp. 279-338. CSIC, Madrid.
- Podwyszynska M & Olszewski T. 1995. Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by in vitro culture of rose, cordyline and homalomena. *Scientia Horticulturae* 64: 77-84.
- Polanco C & Ruiz ML. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Science* 162: 817-824.
- Prathamlurarug S, Soonthorn Chaveonnon N, Chuakul W, Phaidee Y & Saralamp P. 2005. Rapid micropropagation of *Curcuma longa* using bud explants pre-cultured in thidiazuron – supplemented liquid medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 80: 347–351.
- Punja ZK, Feeney M, Schluter C & Tautorius T. 2004. Multiplication and germination of somatic embryos of American ginseng derived from suspension cultures and biochemical and molecular analyses of plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 40(3): 329-338.
- Quat, NG & Daniel IO. 2000. Storage of pollens for long-term conservation of yam genetic resources. En: Engelmann F & Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Japanese International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japón, 136-139.
- Rahman MH & Rajora OP. 2001. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Cell Reports* 20: 531-536.
- Ramage CM & Williams RR. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38: 116-124.
- Rani V & Raina SN. 2000. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 36: 319-330.

- Ray T, Dutta I, Saha P, Das S & Roy SC. 2006. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 11-21.
- Reed BM. 2008. Cryopreservation - Practical Considerations. En: Reed BM, ed. *Plant Cryopreservation. A Practical Guide*. Springer, New York, 3-14.
- Reed BM. 2011. Choosing and applying cryopreservation protocols to new plant species or tissues. *Acta Horticulturae (ISHS)* 908: 363-372.
- Reed BM, Schumacher L, Wang N, D'Achino J & Barker RE. 2006. Cryopreservation of bermudagrass germplasm by encapsulation-dehydration. *Crop Science* 46: 6-11.
- Rey M, Diaz-Sala C & Rodríguez R. 1994. Exogenous polyamines improve rooting of hazel microshoots. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36: 303-308.
- Rival A, Bertrand L, Beale T, Combes MC, Trouslot P & Leshermes P. 1998. Suitability of RAPD analysis for detection of somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Breeding* 117: 73-76.
- Rode A, Hartmann C, Dron M, Picard E & Ouetier F. 1985. Organelle genome stability in anther-derived doubled haploids of wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Moisson). *Theoretical and Applied Genetics* 71: 320-324.
- Rout GR, Samantaray S & Das P. 2000. In vitro rooting of *Psoralea corylifolia* Linn: Peroxidase as a marker. *Plant Growth Regulation* 30: 215-219.
- Rugini E, Di Francesco G, Muganu M, Astolfi S & Caricato G. 1997. The effect of polyamines and hydrogen peroxide on root formation in olive and the role of polyamines as an early marker for rooting ability. In: Altman A, Waisel Y (Eds.), *Biology of Root Formation and Development*. Plenum Press, New York, pp. 65-73.
- Ryynänen L & Aronen T. 2005a. Genome fidelity during short- and long-term tissue culture and differentially cryostored meristems of silver birch (*Betula pendula*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 21-32.
- Ryynänen L & Aronen T. 2005b. Vitrification, a complementary cryopreservation method for *Betula pendula* Roth. *Cryobiology* 51: 208-219.
- Ryynänen LA & Haggman HM. 2001. Recovery of cryopreserved silver birch shoot tips is affected by the pre-freezing age of the cultures and ammonium substitution. *Plant Cell Reports* 20(4): 354-360.
- Sahijram L, Soneji JR & Bollamma KT. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39: 551-556.
- Säidana D, Mahjoub MA, Boussaada O, Chriaa J, Chéraif I, Daami M, Mighri Z & Helal AN. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae). *Microbiological Research* 163: 445-455.
- Sakai A. 2000. Development of cryopreservation techniques. En: Engelmann F & Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Japanese International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japón, 1-8.
- Sakai A. 2004. Plant cryopreservation. En: *Life in the Frozen State*, Fuller B, Lane N & Benson EE, (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 329-346.
- Sakai A, Hirai D & Niino T. 2008. Development of PVS-Based Vitrification and Encapsulation-Vitrification Protocols. En: Reed BM, ed. *Plant Cryopreservation. A Practical Guide*. Springer, New York, 33-57.

- Sakai A, Kobayashi S & Oiyama I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9: 30-33.
- Salaj T, Matušíková I, Fráterová L, Piršelová B & Salaj J, 2011. Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 55-61.
- Sanchez MC, San-Jose MC, Ballester A & Vieitez M. 1996. Requirements for in vitro rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiology* 16: 673-680.
- Sánchez Gómez P, Carrión Vilches MÁ & Galicia Herbada D. 2006. *Astragalus nitidiflorus*. En: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>
- Sánchez-Gómez P, Guerra J, Carrión MA & Hernández A. 2002. Libro rojo de la flora silvestre protegida de la Región de Murcia. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, Murcia.
- Sánchez Gómez P, Guerra J, Carrión MÁ, Rodríguez García E, Jiménez JF, López Espinosa JA, Fernández Jiménez S, Hernández González A & Vera JB. 2005. *Lugares de Interés Botánico de la Región de Murcia*. Dirección General del Medio Natural, Región de Murcia.
- Sánchez Gómez P, Hernández González A, López Espinosa JA, Vera Pérez JB & Carrión Vilches MA. 2004. *Astragalus nitidiflorus* Jiménez et Pau. En: Bañares A, Blanca G, Güemes J, Moreno JC, Ortiz S (Eds.). *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España*. Táxones prioritarios, Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid. pp. 136-137
- Sandal I, Bhattacharya A & Ahuja PS. 2001. An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 75-80.
- Santana I, Luis JC, Ravelo M, Valdés F. 2004. *In vitro* propagation of *Helianthemum bystropogophyllum* Svent., a rare and endangered species from Gran Canaria (Canary Islands). *Botanica Macaronesica* 25:71-77.
- Santana I, Valdés F, Luis JC. 2006. Micropropagation of *Helianthemum inaguae*, a rare and endangered species from the Canary Islands. *Botanica Macaronesica* 26:55-64.
- Sarasan V, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G & Rowntree JK. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants - progress in the past decade. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42:206-214.
- Sato M, Hosokawa M & Doi M. 2011. Somaclonal variation is induced de novo via the tissue culture process: a study quantifying mutated cells in Saintpaulia. *Plos One* 6(8): e23541.
- Schayer RW, Smiley RS & Kennedy J. 1954. Diamine oxidase and cadaverine metabolism. *The Journal of Biotechnological Chemistry* 206(1): 461.
- Schenk RU & Hildebrandt AC. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199.
- Schoeb F, Yadav JS, Bajaj S & Rajam MV. 2001. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Science* 160:1229-1235.
- Schoenweiss K, Meier-Dinkel A, Grotha R. 2005. Comparison of cryopreservation techniques for long-term storage of ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Cryoletters* 26(3): 201-212.

- Scholz S, Martin Osorio VE, Wildpret de la Torre JA. 2008. Notas sobre el género *Tamarix* en Fuerteventura. *Botanica Macaronésica* 27: 127-132.
- Scocchi A, Faloci M, Medina R, Olmos S & Mroginski L. 2004. Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azederach* L. using encapsulation/dehydration and assessment of their genetic stability. *Euphytica* 135: 29-38.
- Sebastiani L & Tognetti R. 2004. Growing season and hydrogen peroxide effects on root induction and development in *Olea europaea* L. (cvs “Frantoio” and “Gentile di Larino”) cuttings. *Scientia Horticulturae* 100: 75-82.
- Sehrawat A & Sultana S. 2006. Evaluation of possible mechanisms of protective role of *Tamarix gallica* against DEN initiated and 2-AAF promoted hepatocarcinogenesis in male Wistar rats. *Life Sciences* 79: 1456-1465.
- Sharma P, Rajam MV. 1995. Spatial and temporal changes in endogenous polyamine levels associated with somatic embryogenesis from different regions of hypocotyl of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Plant Physiology* 146: 658-664
- Shibli RA, Haagenson DM, Cunningham SM, Berg WK & Volenec JJ. 2001. Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Reports* 20: 445-450.
- Shimonishi K, Ishikawa M, Suzuki S & Oosawa K. 2000. Cryopreservation of melon somatic embryos by dessication method. En: Engelmann F & Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Japanese International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japón, 157-171.
- Siddique I & Anis M. 2007. Rapid micropropagation of *Ocimum basilicum* using shoot tip explants pre-cultured in thidiazuron supplemented liquid medium. *Biologia Plantarum* 51: 787-790.
- Sing S & Syamal MA. Short pre-culture soak in thidiazuron or forchlorfenuron improves axillary shoot proliferation in rose micropropagation. *Scientia Horticulturae* 91: 169-177.
- Singh R, Srivastava S, Singh S, Sharma M, Mohopatra T & Sing N. 2008. Identification of new microsatellite DNA markers for sugar and related traits in sugarcane. *Sugar Technology* 10: 327-333.
- Skirvin RM, McPheeters KD & Norton M. 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. *Hortscience* 29: 1232-1237.
- Smith MAL & Spomer LA. 1995. Vessels, gels, liquid media and support systems. En: Aitken-Christie J, Kozai T & Smith MAL (eds.). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture* (pp.: 371-404). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (The Netherlands).
- Sofalian O, Chaparzadeh N & Dolati M. 2009. Genetic diversity in spring wheat landraces from Northwest Iran assessed by ISSR markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 37(2): 252-256.
- Solomon-Blackburn R & Barker H. 2001. A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. *Heredity* 86: 8-16.
- Srivastava V, Khan SA & Banerjee S. 2009. An evaluation of genetic fidelity of encapsulated microshoots of the medicinal plant: *Cineraria maritima* following six months of storage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 193-198.

- Su GX, Zhang WH & Liu YL. 2006. Involvement of hydrogen peroxide generated by polyamine oxidative degradation in the development of lateral roots in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology* 48: 426-432.
- Sujatha K & Hazra S. 2007. Micropropagation of mature *Pongamia pinnata* Pierre. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43: 608-613.
- Suranthran P, Gantait S, Sinniah UR, Subramaniam S, Alwee SSRS & Roowi SH. 2012. Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids. *Plant Growth Regulation* 66: 101-109.
- Takagi H, Tien Thinh N, Islam OM, Senboku T, Sakagi A. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigations of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Reports* 16: 594-599.
- Talavera, S. 1999. Sobre el tratamiento de la tribu Astragaleae Bercht. & J. Presl (Papilioideae, Leguminosae) en "Flora Iberica". *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 57(1): 218-220.
- Tang W & Newton RJ. 2005. Polyamines promote root elongation and growth by increasing root cell division in regenerated Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) plantlets. *Plant Cell Reports* 24: 581-589.
- Tassoni A, Buuren M, Francescheti M, Fornalè S & Bagni N. 2000. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiology and Biochemistry* 38(5): 383-393.
- Thinh NT, Takagi H & Yashima S. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of banana (*Musa* spp.) by vitrification method. *Cryoletters* 20:163-174.
- Thomas TD. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26: 618-631.
- Tiburcio AF, Gendy CA & Tran Thanh Van K. 1989. Morphogenesis in tobacco subepidermal cells: putrescine as marker of root differentiation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 19: 43-54.
- Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R & Galston AW. 1987. Effects of polyamine biosynthetic inhibitors on alkaloids and organogenesis in tobacco callus cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 9:111—120
- Tonon G, Kevers C & Gaspar T. 2001. Changes in polyamines, auxins and peroxidase activity during *in vitro* rooting of *Fraxinus angustifolia* shoots: an auxin-independent rooting model. *Tree Physiology* 21: 655-663.
- Torrigiani P, Altamura MM, Capitani F, Serafini-Fracassini D & Bagni N. 1989. De novo root formation in thin cell layers of tobacco: changes in free and bound polyamines. *Physiologia Plantarum* 77(3): 294-301.
- Touchell DH, Turner SR, Bunn E & Dixon KW. 2002a. Cryostorage of somatic tissue of endangered somatic species. En: Towill LE & Bajaj YPS, eds. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol. 50. Cryopreservation of plant germplasm II. Springer-Verlag, Berlín, 357-372.
- Touchell DH, Turner SR, Senaratna T, Bunn E & Dixon KW. 2002b. Cryopreservation of Australian species-The role of plant growth regulators. En: Towill LE & Bajaj YPS, eds. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol. 50. Cryopreservation of plant germplasm II. Springer-Verlag, Berlín, 373-390.
- Towill LE. 1983. Improved survival after cryogenic exposure of shoot tips derived from *in vitro* plantlet cultures of potato. *Cryobiology* 20:567-573.

- Towill LE. 2002. Cryopreservation of plant germplasm: Introduction and Some Observations. En: Towill LE & Bajaj YPS, eds. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol. 50. Cryopreservation of plant germplasm II. Springer-Verlag, Berlín, 3-21.
- Towill LE & Jarret RL. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam.) shoot tips by vitrification. *Plant Cell Reports* 11:175-178.
- Tsukazaki H, Mii M, Tohukara K, Ishikawa K. 2000. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. *Plant Cell Reports* 19: 1160-1164.
- Turgut-Kara N & Ari S. 2006. Micropropagation of *Astragalus maximus* Willd. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 20(1): 20-22.
- Turner SR, Senaratna T, Bunn E, Tan B, Dixon KW & Touchell DH. 2001a. Cryopreservation of shoot tips from six endangered Australian species using a modified vitrification protocol. *Annals of Botany* 87: 371-378.
- Turner SR, Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon KW & Tan B. 2001b. Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation. *Plant Science* 160: 489-497.
- Upreti J & Dhar U. 1996. Micropropagation of *Bauhinia vahlii* Wight & Arnott-a leguminous liana. *Plant Cell Reports* 16: 250-254.
- Uragami A, Sakai A & Nagai M. 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* grown in vitro. *Plant Cell Reports* 9: 328-331.
- Uribe ME, Materán ME, Cañal MJ & Rodríguez R. 2008. Specific polyamine ratios as indicators of *Pinus caribaea* microshoot rooting phases. *Plant Biosystems* 142(3): 446-453.
- Van Saambeek JW & Preece JE. 2007. In vitro propagation of *Fraxinus* species. En: *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Jain SM & Häggman H (Eds.) Springer. Pp: 179-192.
- Vandenbussche B, Weyens G & De Profit M. 2000. Cryopreservation of in vitro sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique. *Plant Cell Reports* 19: 1064-1068.
- Vázquez FM, Domínguez E, & Devesa JA. 1991. Nueva localidad de *Astragalus nitidiflorus* Jiménez y Pau en España. *Acta Botanica Malacitana* 16(2): 486-490.
- Vidal N, Sánchez C, Jorquera L, Ballester A & Vieitez AM. 2005. Cryopreservation of chesnut by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41(1): 63-68.
- Volk GM, Harris JL & Rotindo KE. 2006. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. *Cryobiology* 52: 305-308.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M & Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Wang Q, Batuman Ö, Li P, Bar-Joseph M & Gafny R. 2002a. A simple and efficient cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of “Troyer” citrange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 128: 135-142.
- Wang Q, Li P, Batuman Ö, Gafny R & Mawassi M. 2003. Effect of benzyladenine on recovery of cryopreserved shoot tips of grapevine and citrus cultured in vitro. *Cryoletters* 24: 293-302.

- Wang QM, Gao FZ, Gao X, Zou FY, Sui X, Wang M, Hui YJ & Wang L. 2012. Regeneration of *Clivia miniata* and assessment of clonal fidelity of plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109: 191-200.
- Wang ZC & Deng XX. 2004. Cryopreservation of shoot-tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. *Cryoletters* 25: 43-50.
- Wang ZC, Gafny R, Sahar N, Sela I, Mawassi M, Tanne E & Perl A. 2002b. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Science* 162: 551-558.
- Watson MB, Emory KK, Piatak RM & Malmberg RL. 1998. Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibit altered root growth. *The Plant Journal* 13(2):231-239.
- Weising K, Nybom H, Wolff K & Kahl GX. 2005. DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods, and Applications. CRC Press.
- Wilkinson T, Wetten A, Prychid C & Fay MF. 2003. Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Annals of Botany* 91: 65-74.
- Williams JKG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA & Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Williams-Ashman H & Schenone A. 1972. Methylglyoxal-bis-(guanylylhydrazone) as a potent inhibitor of mammalian and yeast S-adenosylmethionine decarboxylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 46: 288-295.
- Xing Y, Yu Y, Luo X, Zhang J-N, Zhao B & Guo Y-D. 2010. High efficiency organogenesis and analysis of genetic stability of the regenerants in *Solanum melongena*. *Biologia Plantarum* 54(2): 231-236.
- Yamada T, Sakai A, Matsumura T & Higuchi S. 1991. Cryopreservation of apical meristems of White clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. *Plant Science* 78:81-87.
- Yao Q, Wang LR, Xing QX, Chen JZ & Zhu HH. 2010. Exogenous polyamines influence root morphogenesis and arbuscular mycorrhizal development of *Citrus limonia* seedlings. *Plant Growth Regulation* 60: 27-33.
- Ye G, McNeil DL, Conner AJ & Hill GD. 2002. Multiple shoot formation in lentil (*Lens culinaris*) seeds. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 30: 1-8.
- Zaffari GP, Kerbauy GB, Kraus JE & Romano EC. 2000. Hormonal and histological studies related to in vitro banana bud formation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 63: 187-192.
- Zucchi MI, Arizono H, Morais VA & Fungaro MHP. 2002. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. *Genetics and Molecular Biology* 25(1): 91-96.