



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

**Universitat de València**  
Departamento de Biología Vegetal

**Propagación *in vitro* y estudio  
con marcadores moleculares y cromosómicos  
de *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló**

**Tesis Doctoral**

M.Remedios Ibáñez Alcocer  
Valencia, 2013





**Universitat de València**  
Departamento de Biología Vegetal

**Propagación *in vitro* y estudio  
con marcadores moleculares y cromosómicos  
de *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló**

**Tesis Doctoral**

M.Remedios Ibáñez Alcocer

**Directores:**

Dr. Juan Bautista del Amo Marco

Dr. Josep Antoni Rosselló Picornell



El doctor D. Juan Bautista del Amo Marco, profesor titular del Departamento de Biología Vegetal de la Universitat de València y el doctor D. Josep Antoni Rosselló Picornell, profesor titular del Departamento de Botánica de la Universitat de València,

## **CERTIFICAN:**

Que la presente memoria titulada “Propagación *in vitro* y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló”, que para optar al Grado de Doctor en Biología presenta la Licenciada D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Remedios Ibáñez Alcocer, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Laboratorio de Biología Vegetal de la Facultat de Biología y en el Laboratorio de Biología Molecular del Jardí Botànic de la Universitat de València y considerando que reúne los requisitos necesarios a tal efecto, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en

València, a 19 de Diciembre de 2012



Dr. Juan Bautista del Amo Marco



Dr. Josep Antoni Rosselló Picornell



## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento:

A los directores de este trabajo, Dr. Juan Bautista del Amo Marco del Departamento de Biología Vegetal y al Dr. Josep Antoni Roselló Picornell del Departamento de Botánica, por su ayuda y su confianza depositada en mí en todo momento.

La primera parte de la tesis la realicé en el Departamento de Biología Vegetal. Allí estaba Robert, la persona que me hizo adentrarme en la línea del cultivo *in vitro*. Has sido un gran apoyo en los puntos más críticos de la tesis. Andreu, me reflejé en ti en muchas ocasiones, tu coherencia y tus consejos los he llevado conmigo hasta el último momento. A todos mis compañeros del Departamento que han ido pasando por allí: Jose Luis, Nun, Toni, Sergi, Emili, Balans, Lorena y Raul. Este año que llega, como venimos repitiendo el primer sábado de febrero habrá más cosas que contar.

A las profesoras Amparo Sanz e Isabel Picazo por sus sabios y esperanzadores consejos a lo largo de estos años.

Durante unos años me separé de la investigación para optar a las oposiciones de enseñanza secundaria en Biología y Geología. Con estudio y esfuerzo conseguí una plaza como funcionaria de carrera. Actualmente trabajo como profesora de secundaria en el IES Abastos en Valencia. A partir de este momento, volví con el proyecto de tesis que había dejado a medias, con mayor fuerza e ilusión y siempre compaginándolo con la docencia.

La segunda parte del trabajo la realicé en el Laboratorio de Biología Molecular del Jardín Botánico de Valencia. Marcela y Arantxa habéis sido mis profesoras, consejeras y aliadas en estos últimos años. A José, si hablaran las paredes del despacho, cuantas conversaciones y reflexiones quedarán allí.

A la brigada de conservación del Servicio de Biodiversidad de Castellón, por ayudarme a conseguir el material vegetal necesario para llevar a cabo este trabajo, asimismo, a la técnica de conservación del Servicio de Biodiversidad Patricia Pérez Rovira, por facilitarme diversas informaciones relacionadas con la especie.

A la Consellería de Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana que me concedió dos subvenciones relacionadas con la conservación de la especie objeto de estudio.

## Agradecimientos

A Vicente Miñana, por transmitirme su fuerza, su ilusión y su entusiasmo.

A mi familia, una mención especial a mi madre, sus reflexiones me hicieron emprender y seguir nuevamente con este proyecto y otra mención a mi hermana por estar siempre.

A TODOS, GRACIAS.

**A mis padres**



**“ El final de cadascuna de les espècies és un pas  
més cap al final de l’espècie humana”**

**Les veus del desert. Marlo Morgan.**



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. El cultivo <i>in vitro</i> de vegetales	1
1.2. El cultivo <i>in vitro</i> como herramienta para la conservación de la flora amenazada.	2
1.3. Variación somaclonal en plantas	6
1.4. Importancia de la variación somaclonal en la conservación de las especies amenazadas	10
1.5. Métodos moleculares como herramientas de detección de variabilidad genética	11
1.6. Métodos moleculares aplicados al análisis de variación somaclonal	13
1.7. Análisis citogenético en la detección de la variación somaclonal	15
1.8. El género <i>Limonium</i>	17
1.9. <i>Limonium perplexum</i>	20
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de explantes de <i>Limonium perplexum</i>	24
3.1.1. Material de campo y esterilización	24
3.1.2. Establecimiento <i>in vitro</i> de los brotes y condiciones de cultivo	24
3.1.3. Multiplicación de brotes <i>in vitro</i>	27
3.1.4. Enraizamiento de brotes <i>in vitro</i>	27
3.1.5. Aclimatación <i>ex vitro</i> de plantas	28
3.1.6. Análisis estadístico	28
3.2. Detección de variación somaclonal en <i>Limonium perplexum</i> usando marcadores moleculares ISSR	29
3.2.1. Material de campo	29
3.2.2. Establecimiento <i>in vitro</i> de los brotes y condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	29
3.2.3. Diseño experimental seguido en el cultivo <i>in vitro</i> durante 12 meses	30
3.2.4. Selección del material vegetal para la extracción del ADN	32

3.2.5. Extracción del ADN .....	32
3.2.6 Selección de marcadores ISSR .....	33
3.2.7. Amplificación y condiciones de electroforesis.....	34
3.2.8. Análisis de datos .....	35
3.3. Análisis citogenético en la detección de variación somaclonal .....	35
3.3.1. Selección del material vegetal. Obtención de raíces.....	35
3.3.2. Técnica citogenética de fluorescencia .....	37
3.3.2.1. Preparaciones cromosómicas .....	37
3.3.2.2. Localización de secuencias de ADN mediante técnicas de hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH) .....	37
3.3.3. Visualización de las preparaciones y captura de las imágenes. ....	40
3.3.4. Análisis del cariotipo .....	40
4. RESULTADOS .....	41
4.1. Propagación <i>in vitro</i> de <i>Limonium perplexum</i> .....	41
4.1.1. Establecimiento <i>in vitro</i> del cultivo .....	41
4.1.2. Multiplicación <i>in vitro</i> de los brotes .....	42
4.1.3. Enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes .....	45
4.1.4. Aclimatación de plantas.....	47
4.2. Detección de variación somaclonal en <i>Limonium perplexum</i> usando marcadores moleculares inter-microsatélite (ISSR).....	48
4.2.1. Establecimiento de un sistema de cultivo <i>in vitro</i> para el mantenimiento de <i>Limonium perplexum</i> durante 12 meses .....	48
4.2.2. Efecto del cultivo <i>in vitro</i> en la variación genética en plantas generadas de <i>Limonium perplexum</i> . Análisis mediante marcadores ISSR .....	49
4.3. Análisis citogenético de detección de variación somaclonal.....	65
4.3.1. Análisis del cariotipo de <i>Limonium perplexum</i> en plantas de origen silvestre .....	65
4.3.2. Análisis del cariotipo de plantas obtenidas a partir de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Limonium perplexum</i> .....	69
4.3.3. Análisis comparativo del cariotipo de <i>Limonium perplexum</i> de plantas de campo y el obtenido a partir de cultivo <i>in vitro</i> .....	75

5. DISCUSIÓN	76
5.1. Propagación <i>in vitro</i> de <i>Limonium perplexum</i> .....	76
5.1.1. Establecimiento <i>in vitro</i> de brotes.....	76
5.1.2. Multiplicación de los brotes <i>in vitro</i> .....	78
5.1.3. Enraizamiento <i>in vitro</i> y aclimatación .....	79
5.2. La eficacia del cultivo <i>in vitro</i> en la conservación de las especies vegetales amenazadas.....	80
5.3. Magnitud de la variación somaclonal comparada con otras especies ..	83
6. CONCLUSIONES	87
7. REFERENCIAS	89
8. APÉNDICES	103
8.1. Bandas polimórficas .....	103



## ABREVIATURAS

ADN = Ácido desoxirribonucleico

ADNr = Ácido desoxirribonucleico ribosomal

AFLP = Polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados

ARN = Ácido ribonucleico

BAP = 6-Bencilaminopurina

BSA = Solución salina de albúmina bovina

CAP = Secuencia polimórfica amplificada y cortada

CTAB = Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

°C = Grados centígrados

DAPI = 4'-6-Diamino-2-fenilindol

DGGE = Geles de electroforesis en gradiente desnaturalizante/térmico

DMSO = Dimetil sulfóxido

dNTPs = Desoxi-nucleósidos-trifosfato

EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético

ETS = Sitios etiquetados por la expresión

FISH= Hibridación fluorescente *in situ*

g = gramos

h = Horas

2iP = 2-isopentenil adenina

IAA = Ácido 3-indolacético

IBA = Ácido 3-indolbutírico

IGS = Espaciador intergénico

ISSR = Secuencia entre repeticiones simples

ITS = Espaciador intergénico transcrito

Kin = Quinetina

MS = Medio salino de Murashige y Skoog (1962)

M = Moles/litro

mg = Miligramos

min = Minutos

ml = Mililitros

mM = Milimolar

ng = Nanogramos ( $10^{-9}$  g)

## Abreviaturas

pb = Pares de bases

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa

RAPD = Polimorfismos de ADN amplificado al azar

RFLP = Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción

rpm = Revoluciones por minuto

SAMPL = Amplificación selectiva de loci polimórficos de microsatélites

SCAR = Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas

SDS = Dodecilsulfato sódico

SNP = Polimorfismo de un solo nucleótido

SSC = Citrato sódico salino

SSCP = Polimorfismo de conformaciones monocatenarias

SSR = Repetición de secuencias discretas

STS = Sitios etiquetados por la secuencia

TAE = Tris-acético-EDTA

Taq = Polimerasa de ADN de *Thermus aquaticus*

Tris = Tris (hidroximetil) aminometano

Tween-80 = Monooleato de polioxietilensorbitano

U = Unidad

$\mu\text{g}$  = Microgramo ( $10^{-6}$  g)

$\mu\text{l}$  = Microlitro ( $10^{-6}$  l)

$\mu\text{M}$  = Micromolar

# 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.1. El cultivo *in vitro* de vegetales

El cultivo *in vitro* de vegetales se basa en el aislamiento de órganos, tejidos o células vegetales y en el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuestas fisiológicas o morfogénicas a partir de estos explantes (Höxtermann 1997). Las técnicas de cultivo *in vitro* incluyen diferentes diseños experimentales en función del tipo de explante con el que se trabaje y del fin que se quiera obtener en el estudio. Por una parte, algunos protocolos persiguen la formación *in vitro* de órganos como brotes caulinares, raíces y embriones, con vista a la regeneración de plantas completas. Por otra parte, resulta posible el establecimiento no organizado de células, tanto en suspensión como formando agregados (callos) para diversos estudios bioquímicos y fisiológicos. Por todo ello la diversidad de métodos posibles se amplía extraordinariamente.

El término de propagación *in vitro* o micropropagación se utiliza para referirse al establecimiento, multiplicación y posterior enraizamiento *in vitro* de brotes (Capuana y Giannini 1997; Bon *et al.* 1998). Los experimentos de micropropagación se basan en la selección de explantes que contienen yemas apicales o axilares y en el empleo de condiciones de cultivo que promueven la formación de brotes a partir de estas yemas. En estos experimentos, los brotes obtenidos *in vitro* (o segmentos nodales y ápices) pueden ser utilizados como explantes para sucesivos subcultivos. Hay autores que utilizan el término micropropagación para referirse a cualquier diseño experimental que multiplique *in vitro* una planta inicial, incluyendo la embriogénesis somática (Wesolowska *et al.* 1994) y la formación de yemas adventicias (Sudharsan y Aboel-Nil 1994).

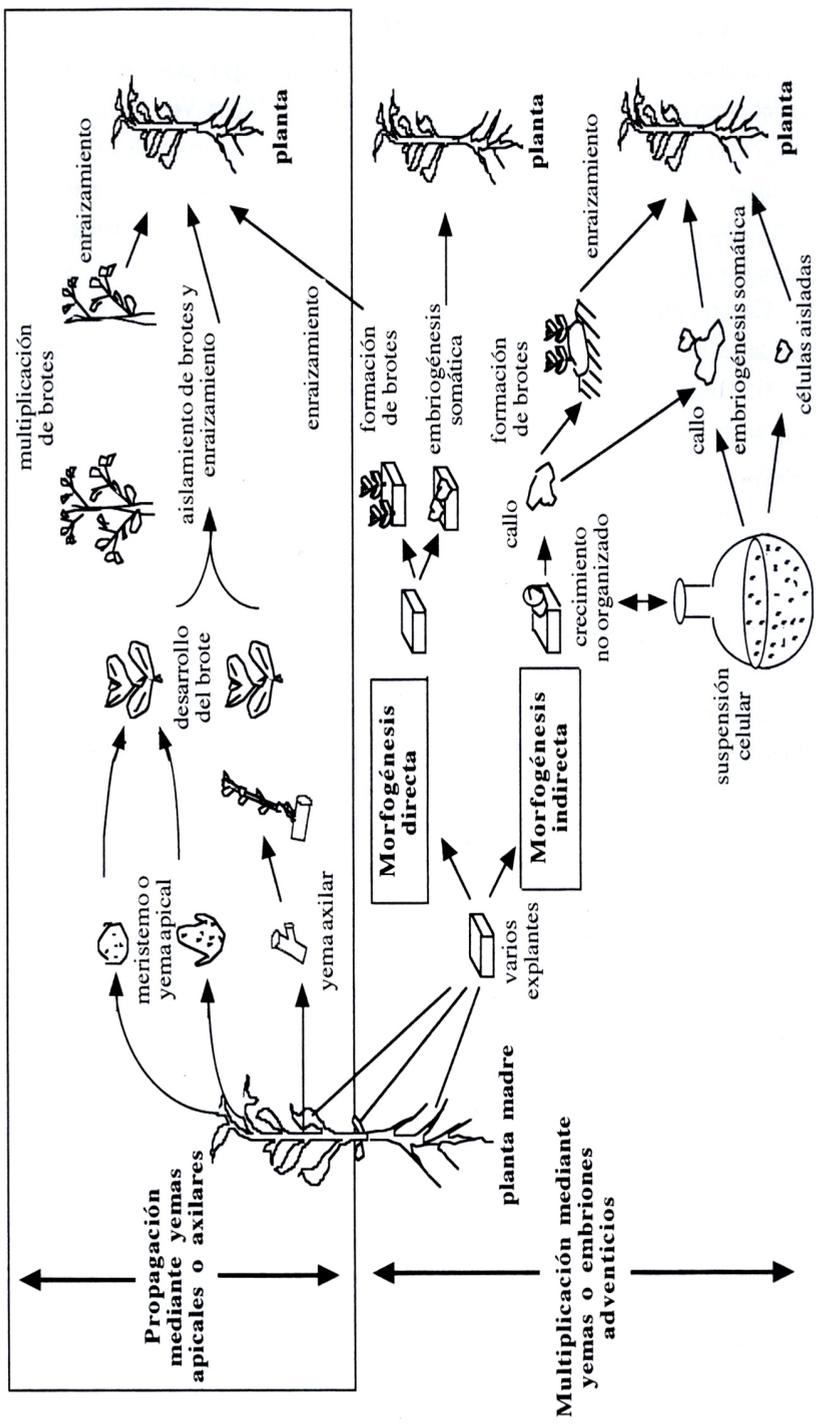
La formación *in vitro* de brotes o embriones adventicios es otra de las respuestas morfogénicas obtenidas en cultivo *in vitro* (Figura 1). La inducción de yemas adventicias puede dar lugar tanto a brotes vegetativos como florales (Cousson y Tran Thanh Van 1992). En los experimentos en que la respuesta organogénica consiste en la formación de brotes vegetativos, la regeneración de plantas se puede completar mediante la posterior formación de raíces, que típicamente se obtiene subcultivando los brotes en un medio de cultivo distinto.

Con respecto a la inducción de embriones adventicios *in vitro*, ésta puede tener lugar a partir de esporas o gametofitos (Simola y Santanen 1990; Touraev *et al.* 1997); aunque se emplean con mayor frecuencia explantes somáticos, con lo que tiene lugar un proceso denominado embriogénesis somática. Si la formación de brotes y/o embriones adventicios tiene lugar mediante el cultivo de órganos y tejidos en sistemas organizados se aplica el término de morfogénesis adventicia directa. Mientras que si la formación de brotes y/o embriones tiene lugar mediante el cultivo de masas desorganizadas de células en proceso activo de división celular (como son los callos y células en suspensión) se aplica el término de morfogénesis adventicia indirecta.

Las aplicaciones de las técnicas de cultivo de tejidos son muy amplias y están demostrando ser una herramienta indispensable en muchos campos. Desde un punto de vista básico, el establecimiento de vegetales *in vitro* resulta apropiado en estudios de diferenciación celular o morfogénesis (Fukuda *et al.* 1994). Desde un punto de vista aplicado, el establecimiento de vegetales *in vitro* permite la obtención de células y plantas bajo presiones de selección experimentales (Ganeshan *et al.* 1998), así como el crecimiento de cultivos con elevada producción de metabolitos secundarios (Verpoorte *et al.* 1998). Por otra parte, la capacidad de propagar y almacenar masivamente plantas *in vitro* se aplica a la conservación de la flora amenazada y la multiplicación aséptica de germoplasma.

### **1.2. El cultivo *in vitro* como herramienta para la conservación de la flora amenazada**

Las técnicas de cultivo *in vitro* han resultado muy útiles para la protección de la flora amenazada (Fay 1992; Fay 1994). De esta manera, se han llevado a cabo con éxito la propagación de varias especies en peligro de extinción y/o endémicas como *Coronopus navasii* (Iriondo y Perez 1990), *Artemisia granatensis* (Clemente *et al.* 1991), *Tetraclinis articulata* (Morte *et al.* 1992), *Minuartia valentina* (Ibáñez y Amo-Marco 1998), *Lavatera oblongifolia* (Iriondo y Pérez 1992), *Vella lucentina* (Lledó *et al.* 1995a), *Salix tarraconensis* (Amo-Marco y Lledó 1996), *Viburnum treleasei* (Moura *et al.* 2009), *Saussurea involucrata* (Guo *et al.* 2007), *Huernia hystrix* (Amoo *et al.* 2009), *Cadaba heterotricha* (Abbas y Qaiser 2010) y *Melaleuca alternifolia* (De Oliveira *et al.* 2010).



**Figura 1.** Resumen de algunos procedimientos estándar para la obtención de plantas *in vitro*. Referencia: Vieitez *et al.* 1987

## 1. Introducción

Cuando se trata de conservar la mayor diversidad genética posible de una población las semillas constituyen normalmente el material de propagación preferido. Si la germinación de las semillas es baja cuando se utilizan métodos convencionales, las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a mejorar los porcentajes de germinación (Fay *et al.* 1999). De esta manera, se ha llevado a cabo con éxito la germinación *in vitro* de varias especies de orquídeas tropicales amenazadas, como *Dendrobium spectatissimum*, *Cymbidium rectum*, *Clowesia rosea* y *Epidendrum ilense* utilizando diversos medios de cultivo (Fay *et al.* 1999). Cuando la disponibilidad de semillas es escasa y a ello se le suma la posibilidad que tienen algunas especies de hibridación con especies cercanas, situación común en muchas especies amenazadas, tras la germinación *in vitro* se emplean técnicas convencionales de micropropagación o propagación vegetativa.

Las técnicas de micropropagación se utilizan como método para incrementar el número de individuos en especies con problemas de reproducción y/o en poblaciones extremadamente reducidas (González y Martín 2011). Estas técnicas resultan atractivas debido a las altas tasas de multiplicación que se consiguen y al reducido material de partida requerido (Iriondo 2001) con lo cual no se ven afectadas las poblaciones con muy bajo número de individuos.

En la familia *Plumbaginaceae* una especial mención en la utilización de las técnicas de cultivo *in vitro* recibe el género *Limonium* Miller, el cual presenta un elevado número de especies endémicas en el Mediterráneo occidental. El material utilizado como explante, en la mayoría de casos, ha consistido en segmentos nodales de plántulas (Martín y Pérez 1992, 1995; Lledó *et al.* 1996); también se han utilizado yemas apicales y axilares de las rosetas basales en fase adulta y en algunos casos han sido las yemas presentes en las partes basales de los tallos de las inflorescencias el material escogido como partida (Lledó *et al.* 1993a, Amo-Marco y Ibáñez 1998).

Esta última técnica ha supuesto una gran ventaja para el establecimiento *in vitro* puesto que la inflorescencia es un material fácil de obtener y de esterilizar y además no conlleva la eliminación de la planta madre.

Se ha llevado a cabo con éxito la propagación de varias especies en peligro de extinción y endémicas del género *Limonium* (Tabla 1), tanto por su interés ornamental y como medida para su conservación *ex situ* (Harazy *et al.* 1985; Kunitake y Mii 1990).

**Tabla 1.** Especies del género *Limonium* micropropagadas.

Especies	Explant	IUCN	Referencias
<i>Limonium arborescens</i> (Brouss.) Kuntze	semillas	EN	Fay (1993)
<i>Limonium carthaginense</i> (Rouy) C.E. Hubb. y Sandwith	segmentos nodales obtenidos de semillas	VU	Martín y Pérez (1995)
<i>Limonium dufourii</i> (Girard) Kuntze	yemas axilares de la roseta basal	CR	Martín y Pérez (1995)
<i>Limonium estevei</i> Fdez. Casas	segmentos nodales obtenidos de semillas	CR	Martín y Pérez (1995)
<i>Limonium fruticans</i> (Webb) Kuntze	semillas	EN	Fay (1993)
<i>Limonium giberti</i> (Sennen.) Sennen	segmentos nodales obtenidos de semillas	UV	Martín y Pérez (1995)
<i>Limonium imbricatum</i> (Webb y Girard) Hubb.	semillas	EN	Fay (1993)
<i>Limonium parvibracteatum</i> Pignatti	yemas axilares/segmentos de tallos	VU	Lledó <i>et al.</i> (1993)
<i>Limonium perplexum</i> L. Sáez y Rosselló	segmentos de tallos con inflorescencias	CR	Amo-marco y Ibáñez (1998)
<i>Limonium redivivum</i> (Svent.) Kunkel y Sunding	semillas	EN	Fay (1993)
<i>Limonium rigualii</i> M.B. Crespo & Erben	yemas axilares de la roseta basal	VU	Lledó <i>et al.</i> (1993)
<i>Limonium preauxii</i> (Webb y Berthel.) Kunze	semillas	EN	Fay (1993)
<i>Limonium spectabile</i> (Svent.) Kunkel & Sunding	semillas	CR	Fay (1993)
<i>Limonium santapolense</i> Erben	yemas axilares de la roseta basal	VU	Lledó <i>et al.</i> (1993)
<i>Limonium thiniense</i> Erben	segmentos nodales obtenidos de semillas	CR	Lledó <i>et al.</i> (1996)

Categorías UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza): CR: en crítico peligro de extinción. EN: en peligro de extinción. VU: vulnerable

Referencia: UICN Lista Roja 2008

Sin embargo, las técnicas de cultivo *in vitro* no están exentas de problemas. En muchos casos, la micropropagación de una especie presenta enormes dificultades debidas a la contaminación del material de partida, la falta de respuesta de los explantes iniciales, la hiperhidratación de los tallos y la ausencia de enraizamiento (Lynch 1999).

Un problema adicional es la posible aparición de variación somaclonal, entendiéndose ésta como la variación genética en el material vegetal a consecuencia del cultivo *in vitro* (Larkin y Scowcroft 1981). Este último problema, cobra especial importancia en la conservación de las especies amenazadas, en donde lo que se pretende es conservar la diversidad genética original procedente de una población natural (Fay *et al.* 1999; Pence 1999; Touchell y Dixon 1999). El problema puede ser minimizado mediante una cuidadosa selección del material de partida y de los medios de cultivo, y la evaluación genética del material micropropagado (Iriondo y Pérez 1996; Lynch 1999). En la actualidad las técnicas moleculares son herramientas valiosas que se utilizan en el análisis de la estabilidad genética en la propagación *in vitro* (Martins *et al.* 2004).

### **1.3. Variación somaclonal en plantas**

La variabilidad genética inducida por las condiciones de cultivo *in vitro* no se limita a ningún grupo de plantas en particular. El proceso de la variación somaclonal se cree que requiere de múltiples eventos genéticos y/o epigenéticos que afectan a los patrones de expresión, o dan lugar a la alteración de genes. Varios mecanismos moleculares pueden ser responsables de la mutación del ADN y la inestabilidad genética que conduce al desarrollo de las variaciones (Leroy *et al.* 2000).

Tales mecanismos moleculares incluyen el daño del ADN y la mutación, la alteración de la capacidad celular para reparar el ADN dañado o mutado, la alteración de los genes de los mecanismos de control del ciclo celular y los cambios en el patrón de metilación del ADN (Merlo *et al.* 1995).

La variación somaclonal puede tener diferentes orígenes, por un hecho la heterocromatina de replicación tardía y el desequilibrio en el pool de nucleótidos son dos posibles orígenes de reordenamiento cromosómico en cultivo de tejidos (Bryant 1976). La primera causa posible engloba el ciclo celular mitótico de organismos superiores. El ciclo celular comprende cuatro

fases, G1 (gap), S (síntesis de ADN), G2 (gap), M (mitosis que consiste en una profase, metafase, anafase y telofase). Alguna perturbación que afecte a la sincronización entre replicación de cromosomas durante la fase S y la división celular daría lugar a una aberración en los cromosomas. Porque las regiones de la heterocromatina en la replicación tardía deben ser particularmente vulnerables a las fluctuaciones en el ciclo (Lee y Phillips 1988).

Los mecanismos de regulación del ciclo celular pueden jugar un papel directo en el crecimiento de la planta y en la morfogénesis. Los problemas en el control del ciclo celular pueden inducir errores durante el cultivo *in vitro*, que debe ser mayor que en condiciones naturales (Larkin y Scowcroft 1981). Las evidencias que apoyan la importancia de la recombinación mitótica en la generación de variación somaclonal son aún escasas. Sin embargo, existen algunas notables excepciones, puesto que recombinaciones mitóticas somáticas como el cruzamiento y el intercambio de cromátidas hermanas puede originar varios tipos de reordenamientos cromosómicos que han sido observados en cultivos de tejidos (Larkin y Scowcroft 1981). Ejemplos de la variación somaclonal como la morfología de las plantas regeneradas, los efectos de posición, la variación cualitativa y reordenamientos cromosómicos, los cambios en el número de copias de una secuencia y la amplificación del gen se implican con los reordenamientos cromosómicos.

Otro origen de la variación somaclonal es la activación de elementos transponibles. Se ha estudiado que la activación de elementos transponibles en maíz sugiere una posible relación entre la variación somaclonal y los elementos móviles. Las evidencias genéticas también sugieren que la aparición de mutaciones puede ser explicada por elementos transponibles y las condiciones establecidas en el cultivo *in vitro* que ofrece un entorno propicio para la transposición de estas secuencias (Larkin y Scowcroft 1981).

La variación somaclonal es de interés práctico, debido a sus usos potenciales en el cultivo de la planta, pero, por otro lado si el objetivo principal consiste en la propagación *in vitro* se convierte en un fenómeno indeseable (Polanco y Ruiz 2002).

El crecimiento celular en las plantas en cultivo *in vitro* y su regeneración en plantas completas es un proceso asexual, que incluye sólo la división

mitótica de la célula y, en teoría, no debería causar ninguna variación. De este modo y desde la óptica de la conservación de especies vegetales la aparición de la variación espontánea no controlada y al azar durante el proceso del cultivo *in vitro* se convierte en un fenómeno inesperado y no deseado en la mayoría de veces. Contrariamente a estos efectos, su utilidad en la mejora de los cultivos mediante la creación de nuevas variantes también ha sido bien documentada (Bouharmont 1994; Mehta y Agra 2000; Predieri 2001). La variación somaclonal inducida puede ser utilizada para la manipulación genética de los cultivos con rasgos poligénicos (Brar y Jain 1998; Jain 2001). También se ha convertido en una herramienta importante para el fitomejoramiento a través de la generación de nuevas variedades que podrían presentar resistencia a las enfermedades y la mejora de la calidad, así como un mejor rendimiento (Karp 1995; Unai *et al.* 2004).

Desde un punto de vista teórico y práctico es importante conocer la frecuencia, la distribución genómica, los mecanismos y los factores que influyen en la variación somaclonal. Durante el cultivo *in vitro*, la frecuencia de variación viene determinada por los siguientes factores: los métodos de propagación, naturaleza del tejido utilizado como material de partida, tipo y concentración de los reguladores, número y la duración de los subcultivos, así como el efecto del estrés y el genotipo (Pierik 1987).

### **(i) El método utilizado en la propagación *in vitro***

La organización celular es un importante factor para describir el origen y la causa de la variación somaclonal. El cultivo de tejidos implica crecimiento desorganizado a diferentes niveles, que van desde sistemas con organización celular elevada (como son los meristemas apicales) hasta los protoplastos y explantes no meristemáticos (Figura 1) donde la regeneración se lleva a cabo a través de la formación de brotes o embriones adventicios pasando por la fase de callo (Skirvin 1978; Scowcroft 1984). Sistemas ligados a la inestabilidad y crecimiento desorganizado demuestran que la organización celular es una característica relevante y que la variación somaclonal se relaciona en la mayoría de casos con crecimientos desorganizados (Sivanesan 2007).

**(ii) El material de partida con el que empieza el cultivo *in vitro***

Los tejidos altamente diferenciados como las raíces, hojas y tallos generalmente producen más variación que los explantes obtenidos a partir de yemas axilares y brotes apicales en los cuales existen pre-meristemos (Sharma *et al.* 2007). Sin embargo, existen excepciones donde tejidos como brotes apicales presentan más variación comparado con la embriogénesis somática como ha sido el caso en Bananas (Israeli *et al.* 1996), posiblemente debido a la disociación de quimeras.

**(iii) El número y la duración de los subcultivos**

Con respecto al número y la duración de los subcultivos también existe diversidad de opiniones e interpretaciones. Algunos autores defienden que la variación somaclonal es particularmente aparente y más elevada en plantas regeneradas tras un largo período de cultivo (Reuveni y Israeli 1990; Petolino *et al.* 2003). Otros autores, abogan que por ejemplo cultivos de brotes de hinojo mantenidos durante un largo periodo de tiempo (24 años) son genéticamente más estables que los genotipos originales (Smýal *et al.* 2007). En la micropropagación del hinojo se observó la ausencia de variación somaclonal a partir de los 17 meses de cultivo (Bennici *et al.* 2004), sugiriendo un posible efecto genotípico.

**(iv) El tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento utilizados**

Una concentración óptima en el rango de auxinas y citoquininas es esencial para una eficiente micropropagación (Skoog y Miller 1957; Letham y Gollnow 1985). La composición genética de una población celular puede por tanto ser influenciada por niveles relativos de auxinas y citoquininas (D'amato 1977). Niveles altos de la citoquinina BAP (30 mg/l) incrementan la variabilidad genética de los cultivos de callos en arroz comparados con cultivos suplementados con 2 mg/l de BAP (Oono 1985). Por el contrario, Reuveni *et al.* (1993) indica que medios que incluían altos niveles de citoquininas no afectaron directamente al rango de variación somaclonal en Bananas "Cavendish". En vista de estas contradicciones, el tipo y la concentración del regulador de crecimiento y en particular las citoquininas incide en la variación somaclonal dependiendo del tipo de plantas.

### **(v) Efecto del estrés y del genotipo**

El estrés durante el cultivo *in vitro* puede producir variación somaclonal. Diferentes genomas, sin embargo, responden de manera diferente a este estrés e indican que la variación somaclonal tiene componentes genotípicos (Bairu *et al.* 2011). Esto puede explicarse mejor por las secuencias repetitivas de ADN, que pueden variar en cantidad y calidad entre las especies de plantas (Lee y Phillips 1998). Mehta y Angra (2000) indicaron que hubo una variación en la resistencia a las enfermedades entre los somaclones de variedades de trigo debido a las condiciones inherentes de los explantes. En Musa el tipo y la tasa de variación fue específica del genotipo (Stover 1987; Israeli *et al.* 1991), la interacción entre el genotipo y las condiciones de cultivo (Martin *et al.* 2006) y la composición del genoma (Sahijram *et al.* 2003). Estos y otros fenómenos relacionados han servido para estimular el interés de estudiar los factores que regulan y/o influyen en la estabilidad genética en un entorno *in vitro*.

Los factores descritos demuestran que la variación somaclonal ocurre y es necesario evaluar la estabilidad/inestabilidad de los cultivos *in vitro* en las diferentes etapas del proceso, especialmente cuando la conservación genética es lo esencial en estas técnicas. El uso de marcadores moleculares facilitará la evaluación de la posible variación somaclonal.

### **1.4. Importancia de la variación somaclonal en la conservación de las especies amenazadas**

El conocimiento de la diversidad y estructuración genética de las especies es esencial para llevar a cabo su conservación (Hamrick 1983; Falk y Holsinger 1991; Ellstarnd y Elam 1993). La variación genética es un componente clave en la biología de la conservación y es la base fundamental de los altos niveles de biodiversidad. Sin variación genética, la población pierde la capacidad de adaptarse a los cambios medioambientales (Geffen *et al.* 2007).

La evaluación de la diversidad genética de una población es especialmente necesaria cuando la estrategia de conservación está centrada en una conservación *ex situ* del material de la planta, la cual debería representar a la población natural (Frankel y Soulé 1981). Las especies que han sido micropropagadas mediante técnicas de cultivo *in vitro* cuya finalidad es su conservación requieren también de un análisis y valoración de su

posible variación genética en el caso de que exista. Especies endémicas como *Centaurea rigualii* obtenidas a través de la micropropagación (Martín y Pérez 1994) muestran diferentes patrones de marcadores después de haber realizado análisis y valoración de variabilidad genética. En otras como es el caso de *Limonium estevei* no se detectó variación somaclonal tras dos años de cultivo *in vitro* (Martín y Pérez 1994).

Actualmente, el desarrollo y la proliferación de técnicas con marcadores moleculares facilita la combinación de estos estudios con las estrategias de conservación de la especie. La incidencia de la variación somaclonal debería ser analizada periódicamente. Esta variación, no sólo debería ser considerada como un hecho, sino que a partir de ella se podría realizar la selección de genotipos que permitiría un mejor ajuste en las condiciones de conservación. Para obtener mejores resultados en programas de conservación, todas las posibles técnicas deberían ser combinadas para cubrir los diferentes aspectos de las condiciones de conservación.

### **1.5. Métodos moleculares como herramientas de detección de variabilidad genética**

Una serie de técnicas moleculares de gran desarrollo en las últimas décadas permiten conocer la información genética de los organismos. Funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma y se les conoce de forma genérica como marcadores moleculares (Picca *et al.* 2004). Son ampliamente utilizados en genética humana, vegetal, animal y microbiana. Permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo.

Para que un carácter sea considerado un marcador genético debe mostrar una variación experimentalmente detectable entre los individuos de la población. Esta variación puede ser considerada a diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos heredables significativos hasta la variación de un solo nucleótido. Un marcador ideal debe ser: altamente polimórfico o variable dentro o entre especies, insensible a los efectos ambientales, codominante, de rápida identificación y simple análisis y de posible detección en los estadios tempranos del desarrollo de la planta (Ortiz *et al.* 2000).

## 1. Introducción

En la actualidad existe un gran número de técnicas moleculares disponibles para la detección de la variabilidad genética. Los marcadores moleculares se pueden dividir en dos grandes grupos:

- Los basados en el análisis de proteínas, como son el análisis isoenzimático o el polimorfismo posicional de péptidos revelados en geles bidimensionales de poliacrilamida.

- Los marcadores moleculares basados en el análisis del ADN. El uso de estos marcadores es muy prometedor para el mapeo detallado de cromosomas, la identificación y clonación de genes, y la obtención de nuevas variedades o genotipos de plantas. Dentro de esta categoría se encuentran dos grandes grupos de marcadores.

- i) Los marcadores revelados mediante hibridación, como los RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) y minisatélites.

- ii) Los marcadores obtenidos mediante amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*): RAPDs, AFLPs, microsatélites SSR, ISSR, STS, ESTs, CAPS, SCAR, SSCPs, DGGE, SAMPLs y SNP.

La introducción de los marcadores moleculares dentro de los estudios de biología ha ofrecido nuevas posibilidades para el estudio de la diversidad genética y permite estudiar las relaciones genéticas dentro o entre especies (Gostimsky *et al.* 2005). Son de utilidad en estudios evolutivos y de genética poblacional, manejo de bancos de germoplasma, identificación, protección legal de germoplasma, mapeo, selección asistida por marcadores, clonado de genes y en el control de la detección de la variación somaclonal.

Los criterios para seleccionar el marcador o los marcadores a utilizar en un determinado estudio estarán en función de la especie con la que se trabaje, de los objetivos que se quieran perseguir y de la infraestructura de la que se disponga. Los métodos moleculares se han utilizado tradicionalmente como herramientas de variabilidad genética en el contexto de la identificación de variedades de cultivo. Respecto al cultivo que se esté tratando de identificar, habrá que consultar la bibliografía, de modo que se obtenga información sobre trabajos previos de la misma especie, técnicas que se han empleado, complejidad desde el punto de vista genético y amplitud del panorama varietal.

Con referencia a los objetivos que se persiguen pueden ser múltiples, si se pretende resolver un problema de autenticidad varietal, si de lo que se trata es de establecer una base de datos de referencia para que dispongan de ella otros usuarios o bien si se realiza con vistas a patentar un nuevo genotipo. Una vez elegida la técnica a emplear será conveniente efectuar previamente ensayos para la puesta a punto y evaluación del método para el caso en concreto de que se trate.

Hay una amplia bibliografía en el campo citado que nos sirve y se aprovecha en los estudios y en la detección de la variación somaclonal.

### **1.6. Métodos moleculares aplicados al análisis de variación somaclonal**

Con objeto de evaluar la tasa de variación somaclonal en plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* se emplean marcadores moleculares que permiten llevar a cabo análisis rápidos y objetivos (Tabla 2). Las técnicas moleculares son una herramienta valiosa utilizada en el análisis de la estabilidad/inestabilidad genética de las plantas micropropagadas (Bairu *et al.* 2011). La existencia de polimorfismo genético está asociada a la elección y método utilizado para la regeneración de los plantales (Singh *et al.* 2011).

Entre las técnicas moleculares más utilizadas en la detección de variación somaclonal se encuentran los RADPs, que han sido empleados en especies regeneradas mediante cultivo *in vitro* como es el caso de *Secale cereale* (Linacero *et al.* 2000), *Phoenix dactylifera* (Saker *et al.* 2000), *Allium sativum* (Al-Zahim *et al.* 1999), *Pinus thunbergii* (Goto *et al.* 1998), *Gossypium hirsutum* (Jin *et al.* 2008), *Prunus dulcis* (Martins *et al.* 2004), *Pinus pinea* (Cuesta *et al.* 2010), *Aloe vera* (Singh *et al.* 2011), etc.

Mediante la utilización de AFLPs se han analizado especies como *Carya illinoensis* (Vendrame *et al.* 1999), *Hordeum brevisubulatum* (Li *et al.* 2007), *Arabidopsis thaliana* (Ruiz y Polanco 2002), *Pinus pinea* (Cuesta *et al.* 2010), etc.

Con respecto al uso de los marcadores ISSR, se han analizado *Pinus pinea* (Cuesta *et al.* 2010), *Prunus dulcis* (Martins *et al.* 2004), *Zingiber rubens* (Mohanty *et al.* 2011), *Aloe vera* (Singh *et al.* 2011), *Capsicum annum* (González *et al.* 2009), *Robinia ambigua* (Guo *et al.* 2006a), etc.

## 1. Introducción

**Tabla 2.** Ventajas e inconvenientes de marcadores moleculares

MARCADORES	VENTAJAS	INCONVENIENTES
<b>RFLPs</b>	número ilimitado de marcadores, polimorfismo medio/alto, repetitividad alta	Técnica de complejidad elevada
<b>AFLPs</b>	número ilimitado de marcadores, eficiencia elevada (número de marcadores/experiencia), polimorfismo muy alto, repetitividad alta.	No es codominante, técnica de complejidad elevada (incluyendo un laborioso análisis de los resultados), suele requerir trabajar con radioactividad (aunque existen técnicas alternativas), se trata de una marca registrada (™).
<b>RAPDs</b>	número ilimitado de marcadores, eficiencia elevada, polimorfismo muy alto	No es codominante, repetitividad baja, lo que hace difícil la comparación de resultados ente laboratorios.
<b>ISSR</b>	número prácticamente ilimitado de marcadores, polimorfismo alto/muy alto, técnica de complejidad media, repetitividad alta.	No es codominante

Referencia: Cervera MT y Simón L. 2000.

## 1.7. Análisis citogenético en la detección de la variación somaclonal

La citogenética fue definida como la disciplina que estudia la estructura, la morfología y el comportamiento de los cromosomas y su relación con la transmisión y recombinación de los genes (Schubert 2007). Los clásicos estudios citológicos han permitido mediante la tinción de la cromatina contribuir al actual entendimiento de la diversidad de cromosomas en diferentes especies. Estas aproximaciones metodológicas han permitido dilucidar alteraciones en el cariotipo tales como cambios en el número de cromosomas o en su morfología, y dar una visión sobre el conocimiento del comportamiento de los cromosomas en la mitosis y en la meiosis (Chester *et al.* 2010). El desarrollo de nuevas metodologías de estudio como las técnicas de hibridación *in situ* ha marcado la transición entre la era de la citogenética clásica y la era moderna de la citogenética molecular (Hans de Jong *et al.* 1999).

Los cromosomas son las unidades de la herencia del núcleo de todas las células eucariotas. Los cromosomas se caracterizan por su composición de ADN y su asociación con proteínas y por poseer características morfológicas distinguibles tales como su tamaño, posición de su centrómero y su número. Todas las anteriores características están sometidas a cambios evolutivos y por tanto podrán variar entre y dentro de los mismos organismos.

El conjunto de los cromosomas de un núcleo se define como el cariotipo de un organismo. El cariotipo es el resultado final de diferentes fuerzas que actúan sobre el genoma tanto a nivel estructural como funcional. El cariotipo es una característica fenotípica de la misma manera que lo es la morfología floral o un patrón isoenzimático, su diferencia respecto a otros aspectos del fenotipo reside en que es el propio material genético y permite dilucidar la organización global del genoma (Schubert 2007; Guerra 2008).

Mientras que los estudios de citogenética clásica utilizan técnicas de tinción convencionales (Giemsa, Feulgen, Carmín, etc.) y bandeos cromosómicos (C, CMA/DAPI, etc.) para la determinación de las características y la identificación cromosómica, las técnicas de citogenética molecular (hibridación *in situ*) combinan información citológica clásica con el análisis de la secuencia de ADN; se realizan estudios de mapeo y de distribución física de secuencias, análisis de relaciones evolutivas entre especies y estudio la organización del genoma y la arquitectura nuclear.

### Hibridación Fluorescente *in Situ* (FISH)

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es una técnica que se basa en la utilización de una sonda de ADN para detectar un gen o una secuencia de nucleótidos específicos en cromosomas mitóticos, meióticos o en núcleos. La secuencia del ADN que se utiliza como sonda es marcada preferentemente con métodos de modificación del ADN incorporando nucleótidos marcados con una molécula de biotina o digoxigenina (hapteno) o una molécula fluorescente como por ejemplo puede ser la rodamina o la fluoresceína. La visualización de la hibridación de la sonda en el ADN receptor de los cromosomas o núcleos es analizada en un microscopio de epifluorescencia.

Las diferentes secuencias de ADN utilizadas como sondas en estudios que utilizan la técnica FISH pueden ser secuencias de ADN altamente repetidas, familias multigénicas de ADN ribosomales, secuencias de centromeros, secuencias teloméricas, genes de bajo número de copia o retrotransposones, entre otras. Esta técnica ha significado una ventaja en resolución, contraste, rapidez y seguridad respecto a otras técnicas de tinción.

### El ADN ribosómico

Los ADNs ribosómicos se encuentran constituyendo dos familias multigénicas distintas, la familia 45S y la familia 5S. La familia 45S está compuesta por los genes de ADN ribosomal 18S, 5.8S y 26/28S, dos espaciadores internos que se transcriben (ITS-1 e ITS.2), y un espaciador intergénico (IGS) que incluye en ambos extremos dos espaciadores externos (ETS-1 y ETS-2). Esta sería la unidad básica de 45S que junto con el otro gen nuclear ribosomal 5S producen los ARN maduros que forma parte de las subunidades que dan lugar a los ribosomas citoplasmáticos en la mayoría de eucariotas (Figura 8; Figura 9). Los loci ribosomales (el lugar físico de la secuencia de ADN en el cromosoma) están formados por cientos o miles de estas unidades repetidas en tándem, loci para los cuales se ha constatado una amplia diversidad en cuanto a número y colocación dentro de los genomas de las plantas. Por tanto, el elevado número de copias y la organización en tándem de estos genes los convierte en útiles marcadores para la identificación de cromosomas y el cariotipo en diversas plantas (Ansari *et al.* 1999, Badaeva *et al.* 1996).

Los genes ribosomales son considerados como buenos marcadores para la hibridación *in situ* ya que han conservado secuencias de ADN que se encuentran en un número alto de copias (Datson y Murray 2003). Estos marcadores a menudo se utilizan como características adicionales del cariotipo para la identificación y el seguimiento de los cambios en su estructura durante la evolución (Mukai *et al.* 1991; Shi *et al.* 1996; Zoldos *et al.* 1999). Se han estudiado patrones y procesos de la evolución de cromosomas en diversos géneros de plantas como *Aloe* (Adams *et al.* 2000), *Nicotiana* (Kovarik *et al.* 2008), *Zamia* y *Ceratozamia* (Tagashira y Kondo 2001).

Los genes ribosomales se han utilizado también en la detección de variación somaclonal, y por tanto la variación en el número y estructura del cromosoma también ha sido observada entre somaclones de cultivo *in vitro* de diferentes especies (Al-Zahim *et al.* 1999, Mujib *et al.* 2007).

## 1. 8. El género *Limonium*

El género *Limonium* de la familia *Plumbaginaceae* es uno de los géneros de plantas con mayor número de endemismos del Mediterráneo occidental. El género comprende aproximadamente 400 especies, distribuidas por todo el mundo, estando su número más alto de especies localizado en el área del Mediterráneo occidental (Erben 1993). Se trata de un género de gran complejidad taxonómica y que plantea grandes problemas de identificación. A la complejidad del género hay que añadir el fenómeno de la elevada tasa de hibridación que en ocasiones se produce entre los propios híbridos y sus progenitores (Palacios *et al.* 2000).

### Aspectos generales

La mayor parte de las especies de este género son plantas perennes que forman rosetas basales cortamente diferenciadas (hemicriptófitos ro-sulados). Más raramente presentan tallos robustos portadores de hojas helicoidalmente esparcidas, que a veces se elevan unos decímetros (caméfitos), o incluso llegan a alcanzar casi tres metros (fanerófitos). También, pueden encontrarse plantas anuales de ciclo estacional como es el caso de *L. echioides* y *L. lobatum*. La forma de las hojas varía entre las lobuladas y las enteras.

En cuanto al indumento en general son plantas totalmente glabras, es decir, carentes de indumento en todas sus partes. No obstante, algunas

especies presentan un cierta pilosidad como por ejemplo *Limonium furfuraceum* y *Limonium dufourii* (Lledó 1996).

Un aspecto significativo del género es la forma de la inflorescencia, aunque en pocas ocasiones es determinante para identificar la especie. Las flores están reunidas en espiguillas formadas por la reunión de 2 o más flores. Estas espiguillas están rodeadas de tres brácteas: externa, media e interna. Las flores son muy parecidas de unas especies a otras y el color de los pétalos no suele ser un factor significativo ya que la mayoría son violáceas y en pocos casos son blancas o rosadas. Este género se caracteriza por su elevado valor ornamental.

### **Números cromosómicos**

El género *Limonium* comprende principalmente plantas perennes con un amplio rango de poliploidia (generalmente di-, tri, y tetraploide) y sistemas reproductivos (sexual y asexual a través de apomixis) (Palop *et al.* 2000). Los estudios en citogenética como son el conocimiento del número de cromosomas, el nivel de poliploidia, y la descripción del cariotipo en la mayoría de las especies del género *Limonium* han sido muy importantes a la hora de evaluar los patrones de microevolución y la diversificación de las especies en la cuenca mediterránea (Erben 1979). De este modo se ha llegado a entender, con mayor profusión, el origen filogenético de especies poliploides.

En el género *Limonium* se han descrito números cromosómicos que varían entre  $2n=12$  y  $2n=54$ , muchos de los cuales sólo pueden aceptarse considerando la existencia de procesos de apomixis agamospérmicos. En el campo de la citogenética y de acuerdo con la morfología de los cariotipos, el análisis de taxones poliploides se puede dividir en dos grupos. El primer grupo incluye especies que muestran cromosomas homólogos en grupos de tres, cuatro o seis. Esto probablemente sugiera un origen autopoliploide. El segundo grupo incluye las restantes poliploidías por la presencia de dos juegos de cromosomas diferentes ( $x=8$  y  $x=9$ ) en el genoma. Estas especies se sugiere que tienen un origen alopoliploide. Existe alguna excepción al respecto. La situación en *Limonium* es excepcional, normalmente el nivel de poliploidia y el número singular de cromosomas caracteriza cada especie. El nivel de triploída ha sido documentado en el 84.6% de los estudios citológicos en especies de las Islas Baleares, mientras que la presencia de especies diploides es de 7.7% y tetraploides 7.7% (Castro y Rosselló 2007).

Estos resultados apoyan a estudios previos (Erben 1993) indicando que los triploides predominan sobre el resto de cariotipos en la Península Ibérica y en las Islas Baleares.

## **Ecología**

La mayoría de las especies del género *Limonium* se han considerado tradicionalmente como halófitos estrictos y colonizan ambientes altamente salinos y frecuentemente húmedos. No obstante, dado que crecen con igual vitalidad en suelos ricos en nutrientes no estrictamente salinos, puede decirse que han desarrollado la habilidad de combinar la resistencia a ambientes secos con la halotolerancia (Llorens *et al.* 1992). También habitan en terrenos yesosos y margosos de áreas semiáridas o muy secas, con alto contenido en sales en superficie (generalmente sulfatos) debido a fuertes procesos de evaporación. Ello ha llevado a Dolcher y Pignatti (1971) a proponer un esquema donde se relaciona las apetencias ecológicas de los taxones con el nivel de poliploidía de su cariotipo.

## **Sistemática del género *Limonium***

La sistemática tradicional del género, basada en ciertos rasgos morfológicos, se complementa adecuadamente mediante un enfoque molecular y citogenético.

Se han llevado a cabo estudios filogenéticos en las *Plumbaginaceae* basados en secuencias de ADN plastidial (Lledó *et al.* 2001). Estos estudios confirman la clasificación de las *Plumbaginaceae* en dos subfamilias *Plumbaginoideae* y *Staticoideae*, bien diferenciadas por caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares. La subfamilia *Plumbaginoidae* comprende cuatro géneros, de los cuales *Plumbago* es el más extenso con 20 especies. Los géneros que comprende la otra subfamilia *Staticoideae* son morfológicamente más diversos. Más del 85% de las especies se reparten en tres géneros, *Limonium*, *Armeria* y *Acantholimon*.

## **Problemática del género *Limonium***

El excesivo impacto humano en la costa mediterránea de la Península Ibérica ha tenido una alta incidencia en la flora endémica de esta región provocando en diversos casos la extinción de algunas especies (Gómez-

Campo 1987; Laguna *et al.* 1994). En la Comunidad Valenciana se han identificado 25 especies del género *Limonium*, de las cuales 9 son exclusivas de Alicante, Valencia o Castellón (Crespo 1992), presentan áreas de distribución casi puntuales y muchas de las poblaciones de estos presentan microendemismos están desapareciendo.

La presión antropogénica, la existencia de procesos de hibridación entre plantas endémicas y otras cercanas filogenéticamente y las confusiones o datos erróneos en los tratamientos taxonómicos, áreas de distribución, censos, recolecciones, etc, han llevado a estimar incorrectamente el tamaño poblacional en algunas ocasiones. Por estas razones, las precauciones que normalmente se tienen en cuenta para la iniciación de un trabajo de conservación deben extremarse en el caso que nos ocupa. Es necesario poseer un amplio conocimiento de los aspectos tanto corológicos y ecológicos como taxonómicos y sistemáticos de estas plantas antes de iniciar cualquier trabajo encaminado a su conservación.

Las políticas de la conservación deben estar basadas en el entendimiento de la biología de las especies en particular y de los factores que actúan en contra de su supervivencia. El conocimiento de la cantidad y distribución de la variabilidad genética puede ayudar a diseñar estrategias de conservación y al control de sus efectos. Consecuentemente el estudio de las poblaciones genéticas ha sido identificado como una de los papeles prioritarios para la conservación (Holsinger y Gottlieb 1991).

### **1.9. *Limonium perplexum***

*Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló (limonio, ensopeguera) se ha catalogado como un especie endémica y amenazada “en peligro crítico” atendiendo a la Lista Roja de la Flora Vascular y Amenazada y siguiendo los criterios de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). Es endémica porque se conoce una única población situada en la Sierra de Irta, en la zona norte de la provincia de Castellón y es amenazada porque el número de individuos decrece de modo alarmante en un determinado intervalo de tiempo (Laguna *et al.* 2004).

Hasta 1999, *Limonium perplexum* había sido confundida con *Limonium cavanillesii* Erben, de la que se conocen únicamente escasos ejemplares de herbario. En realidad, *L. cavanillesii* es una planta extinta y la población que se encuentra en la Sierra de Irta corresponde a *L. perplexum* (Saéz y

Rosselló 1999). La morfología, el número cromosómico y la combinación polínico-estigmática de *L. perplexum* permitieron relacionarla con el complejo de *L. duriusculum*. Sobre la base del estudio morfológico se estableció la hipótesis de que *L. cavanillesii* Erben podría haber sido originado por una hibridación entre *L. perplexum* y *L. dufourii*.

*Limonium perplexum* es un hemcriptófito rosulado. Planta generalmente perenne de tallos poco escamosos y más o menos glabra. Sus hojas están dispuestas en pequeñas rosetas basales, espatuladas, obtusas y uninervias. Presenta escapos florales paniculados de 3 a 12 cm de longitud y produce numerosas espiguillas con 2-3 flores. Los pétalos tienen una coloración violácea y florecen de julio a septiembre. Los frutos son monospermos y una vez maduros quedan en el cáliz que participa en la diáspora. Atendiendo a sus mecanismos reproductivos, *Limonium perplexum* es una especie triploide ( $2n=27$ ), la presencia muy alta de granos de polen estériles y mal formados, y la presencia de una combinación auto-incompatible polen-estigma (Erben 1979) han llevado a los investigadores a considerar a *L. perplexum* una especie esencialmente apomítica (Rosselló *et al.* 1998).

Crece en repisas de roquedos calcáreos, en áreas cálidas y muy soleadas, donde forma parte de diversos matorrales halófilos. Con respecto a su corología es un endemismo valenciano-tarraconense de los saladares costeros termomediterráneos situados entre Benicarló y Alcocebre, al norte de la provincia de Castellón. Las circunstancias de deterioro y el peligro de desaparición de *Limonium perplexum* se deben en gran medida a la influencia ocasionada por una serie de factores, tales como la actividad urbanística y la transformación agraria. Con el propósito de conseguir la protección y la conservación de esta especie se establecen estrategias globales que obligan al desarrollo de planes de conservación *in situ* y *ex situ*.

Por lo que respecta a los planes de conservación *in situ* se encuentran como elementos activos las “microrreservas” (Laguna 1996). La única población conocida se encuentra en una “microrreserva de flora” de la Consellería de Medio Ambiente (Generalitat Valenciana), que se sitúa en el LIC (Lugar de Importancia Comunitaria) “Serra d'Irta”. En cuanto a los planes de conservación *ex situ* son las técnicas de cultivo *in vitro* las que se han utilizado en este trabajo.

## 2. OBJETIVOS

En un primer bloque de este trabajo se estudian las posibilidades que en el campo de la propagación *in vitro* ofrece la especie *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló. Para esta especie amenazada se consideran las técnicas de cultivo *in vitro* como una alternativa para la conservación de germoplasma, por lo que los objetivos de este bloque son:

1. Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* de *L. perplexum* a partir de segmentos de tallos con inflorescencias y yemas inmaduras.
2. Diseñar un protocolo eficaz para la multiplicación *in vitro* y enraizamiento *in vitro* de brotes de *Limonium perplexum*.
3. Aclimatar la planta a unas condiciones de cámara de crecimiento e invernadero después del cultivo *in vitro*.

El segundo bloque del trabajo está dedicado a la determinación, análisis e interpretación de los niveles de variación somaclonal que pueda presentar el ADN genómico de *Limonium perplexum* originada por el efecto del cultivo *in vitro*. En este bloque se realiza un diseño experimental de mantenimiento de *L. perplexum* en cultivo *in vitro* durante 12 meses. El bloque a su vez se divide en dos amplios apartados, atendiendo a las técnicas de análisis y evaluación empleadas en el estudio de la variabilidad genética:

Primer apartado: Se evalúan 148 ejemplares obtenidos del cultivo *in vitro* de 4 plantas madre seleccionadas de la única población de *Limonium perplexum* conocida. Los objetivos de este apartado son los siguientes:

4. Determinar la variación somaclonal de *Limonium perplexum* a lo largo de 1 año mediante marcadores moleculares inter-microsatélites (ISSR).
5. Evaluar la idoneidad de la selección de los marcadores moleculares inter-microsatélites ISSR como técnica válida de detección de la variación somaclonal en la especie objeto de estudio.

Segundo apartado: Se realiza un análisis citogenético comparativo entre los cariotipos consenso de plantas madre de la población original y los cariotipos consenso de ejemplares obtenidos de cultivo *in vitro*. Los objetivos de este apartado son los siguientes:

**6.** Analizar e interpretar el cariotipo de *Limonium perplexum* mediante la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en ejemplares de la población natural.

**7.** Analizar e interpretar el cariotipo de *Limonium perplexum* mediante la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en ejemplares tras 12 meses de cultivo *in vitro*.

**8.** Analizar comparativamente los cariotipos de *Limonium perplexum* antes y después del cultivo *in vitro*.

**9.** Determinar y conocer mediante FISH si durante el cultivo *in vitro* se genera o no variación somaclonal asociada a cambios cromosómicos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Cultivo *in vitro* de explantes de *Limonium perplexum*

##### 3.1.1. Material de campo y esterilización

Los explantes de *Limonium perplexum* se esterilizaron a partir de material recogido de la única población silvestre conocida en la Sierra de Irta, al noreste de la provincia de Castellón. A partir de una planta madre se seleccionaron tallos que presentaban inflorescencias y yemas en varios estados de diferenciación (Figuras 2 y 3). Los tallos se cortaron en segmentos de 40-50 mm de longitud y se lavaron en el laboratorio con jabón y agua durante 10 minutos. Posteriormente se esterilizaron con etanol al 70% durante 2 minutos y con lejía comercial al 40% durante 20 min. Se hicieron 4 lavados sucesivos con agua destilada estéril durante 5 min cada uno. Una vez terminado el protocolo de esterilización los explantes se cortaron en secciones de 20 mm de longitud con una o dos yemas y se sembraron en los medios de cultivo.

##### 3.1.2. Establecimiento *in vitro* de los brotes y condiciones de cultivo

Los explantes esterilizados se sembraron en un medio que contenía agua destilada, 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar (Probus). Después de 7-10 días los explantes contaminados o necróticos fueron descartados y los que se encontraban en aparentes buenas condiciones fueron transferidos a un medio de establecimiento *in vitro*. Este medio contenía una formulación mineral de macro y micronutrientes de Murashige y Skoog (MS 1962) (Tabla 3) y fue suplementado con 30 g/l sacarosa, 10 mg/l tiamina, 2 mg/l glicina, 1.0 mg/l piridoxina, 1.0 mg/l ácido nicotínico y 100 mg/l de myo-inositol. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 con KOH y posteriormente se añadieron 8 g/l de agar. Todos los medios fueron esterilizados en un autoclave a 121 °C durante 20 min.

Los explantes se sembraron en frascos de vidrio cilíndricos de 55 mm de diámetro y 70 mm de altura, cuya abertura se cubrió con 2 capas de papel de aluminio. Cada frasco contenía 30 ml de medio de cultivo y se sembraron 20 explantes, cuatro por cada frasco.

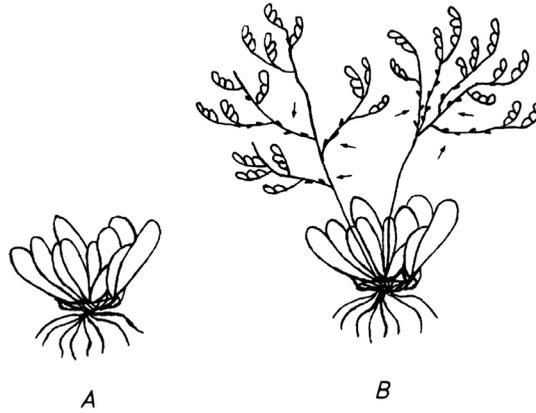
Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 14 horas de luz (60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) y 10 horas de oscuridad, a una

temperatura que alternó entre  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (luz) y  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  (oscuridad). La iluminación se obtuvo mediante tubos Osram L36W/77.

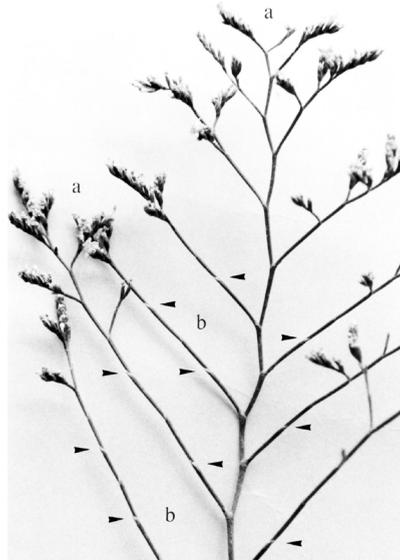
Cuando los brotes desarrollados a partir de yemas inmaduras de las inflorescencias adquirieron 1 cm de longitud y tuvieron 4-6 hojas, se cortaron y se subcultivaron dos veces seguidas en un medio MS con 2 mg/l de Kinetina. Este procedimiento se realizó con el fin de obtener buenos y suficientes explantes con los que empezar la fase de multiplicación en base a unos resultados previos obtenidos con otras especies del género *Limonium* (Lledó 1996).

**Tabla 3.** Sales minerales de Murashige y Skoog (MS 1962) para la preparación de un medio de cultivo basal.

MACRONUTRIENTES	mg/l	mM
$\text{KNO}_3$	1900.00	18.79
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650.00	20.61
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00	2.99
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00	1.50
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170.00	1.25
MICRONUTRIENTES	mg/l	$\mu\text{M}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.25	100
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	100
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30	100
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60	30
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.20	100
KI	0.83	5
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.1
$\text{CoCl}_2$	0.07	0.1



**Figura 2.** Diagrama mostrando la especie *Limonium perplexum*. **(A)** Una planta en estado vegetativo de desarrollo, con la forma de roseta característica. **(B)** Una planta en fase de floración, con tallos y flores de la inflorescencia. Las flechas indican la posición de las yemas no diferenciadas en partes del tallo utilizadas como explantes. Referencia: Amo Marco y Ibañez 1998.



**Figura 3.** Detalle de una inflorescencia de *L. perplexum*, con flores **(a)** y la sección de tallo utilizado como explantes **(b)** con las yemas indiferenciadas. Referencia: Amo Marco y Ibañez 1998.

### 3.1.3. Multiplicación de brotes *in vitro*

Para llevar a cabo los experimentos de multiplicación *in vitro* se partió de brotes con 4-6 hojitas procedentes de clusters (conjunto de brotes surgido de un mismo explante) previamente mantenidos en medio de establecimiento suplementado con 2 mg/l de Kinetina. Los medios de cultivo utilizados en la fase de multiplicación se basaron en el propio medio de establecimiento en combinación con las citoquininas BAP, Kin o 2iP a diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 y 5 mg/l). En los tres experimentos se estudió el efecto de cada hormona a diferentes concentraciones sobre la multiplicación de los segmentos nodales. El tratamiento control no incluyó citoquininas. Para cada uno de los tratamientos se utilizaron 20 explantes (4 por frasco de cultivo).

La multiplicación de los brotes se evaluó a las 4 semanas de la siembra midiendo los siguientes parámetros en cada explante:

- viabilidad de los explantes (%),
- número de nuevos explantes obtenidos por cluster,
- número de explantes con hojas más largas de 15 mm.

### 3.1.4. Enraizamiento de brotes *in vitro*

La fase de enraizamiento *in vitro* se llevó a cabo con brotes de 15-20 mm de longitud que procedían del medio de cultivo MS con 2 mg/l de Kinetina de la fase de multiplicación. Los brotes se transfirieron a un medio de establecimiento en combinación con las auxinas IBA y IAA por separado a diferentes concentraciones (0.1 y 0.5 mg/l). El tratamiento control no incluyó regulador de crecimiento. Después de un mes en medio de enraizamiento se calcularon los siguientes parámetros:

- porcentaje de explantes enraizados,
- número de raíces formadas por cada explante,
- número de nuevos brotes formados y longitud de los vástagos más largos.

Por otra parte, durante el primer mes de cultivo se llevó a cabo un seguimiento del tiempo requerido para la formación de las raíces. Para ello, a intervalos de 2 ó 3 días se anotó el número de brotes enraizados. A partir de estos datos se construyeron tablas de la progresión del enraizamiento.

### **3.1.5. Aclimatación *ex vitro* de plantas**

Los brotes enraizados *in vitro* se extrajeron del medio de cultivo y sus raíces se limpiaron de restos de agar con agua destilada. Seguidamente, las plantas se transfirieron a macetas con vermiculita y se regaron con agua destilada semanalmente. Las macetas se llevaron a una cámara de crecimiento con un régimen de fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad de intensidad luminosa  $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , a una temperatura que alternó entre  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  (luz) y  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (oscuridad). Para evitar la desecación del material sembrado, las macetas se cubrieron con una capa de plástico transparente y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de luz y temperatura que las empleadas en la fase de enraizamiento. El plástico se agujereó progresivamente durante un mes para ir adaptando los brotes a una menor humedad ambiental, al término del cual se retiró por completo.

Una vez eliminada la protección de plástico, las plantas se sacaron de la vermiculita (sin separar las partículas de ésta que quedaron adheridas a las raíces) y se transfirieron a macetas con una mezcla de perlita y turba en proporción 1:1. Estas macetas se mantuvieron en cámara de crecimiento varias semanas y después se llevaron a invernadero.

### **3.1.6. Análisis estadístico**

Se utilizaron 20 explantes por tratamiento tanto para la fase de multiplicación como para la de enraizamiento. Los resultados se analizaron por análisis de varianza y las comparaciones entre medias muestrales se realizaron según el test múltiple de Duncan al nivel de significación de  $p < 0.05$ .

## 3.2. Detección de variación somaclonal en *Limonium perplexum* usando marcadores moleculares ISSR

### 3.2.1. Material de campo

Se recogió material vegetal de cuatro plantas de *Limonium perplexum* cuya única población conocida se encuentra en la Sierra de Irta (norte de Castellón próximo a la costa). Durante todo el estudio a estas cuatro plantas se les denomina plantas madre. De cada una de ellas se seleccionaron dos tipos de material vegetal: uno hojas y el otro, tallos que presentaban inflorescencias y yemas en varios estados de diferenciación (Figura 4).

Las hojas se guardaron por separado en el congelador a  $-85^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso mientras que con los escapos florales se procedió al protocolo de esterilización (ver apartado 3.1.1) y al establecimiento *in vitro*.



**Figura 4.** *Limonium perplexum* en campo (A). Selección de las inflorescencias de la planta en campo (B).

### 3.2.2. Establecimiento *in vitro* de los brotes y condiciones de cultivo *in vitro*

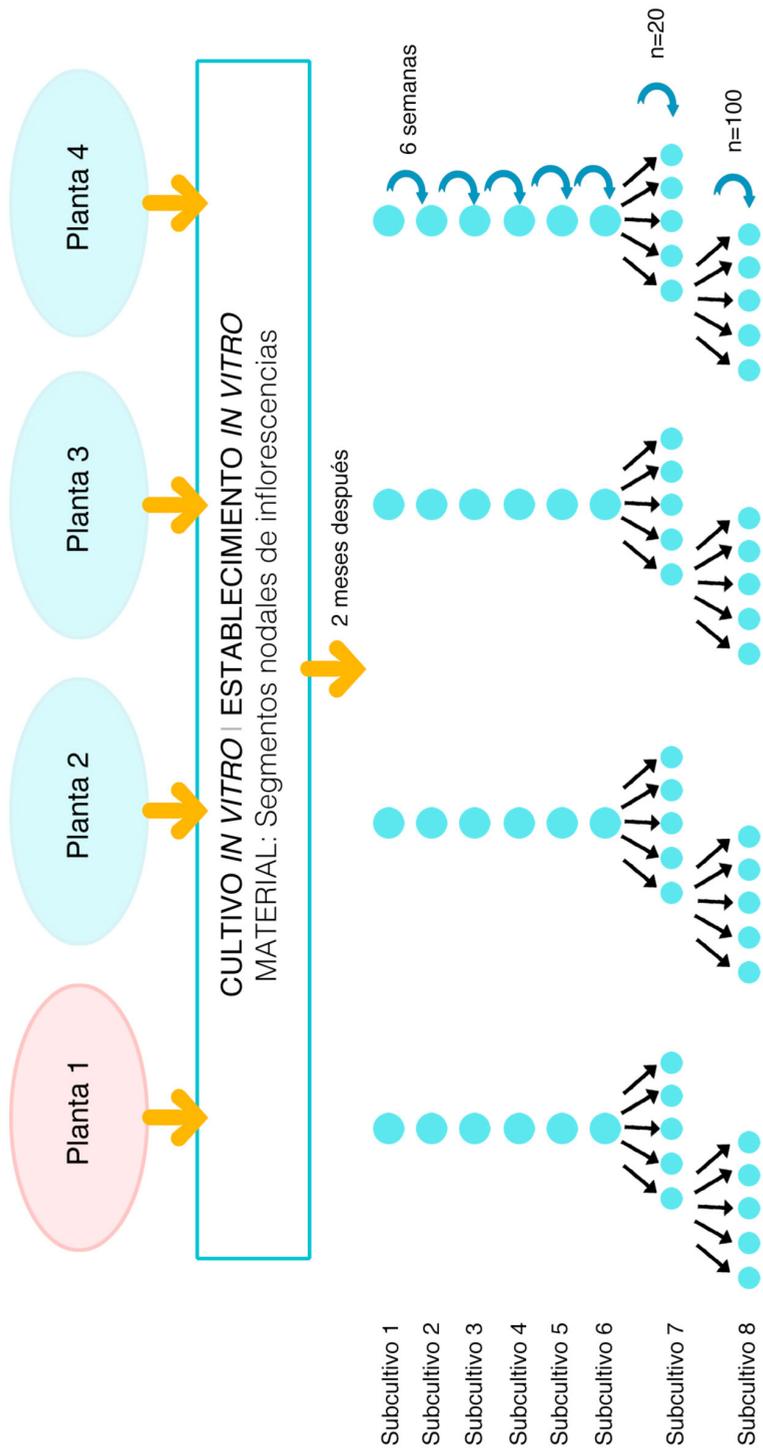
El establecimiento *in vitro* de los brotes se hizo de la manera ya descrita en el punto 3.1.1 y en el punto 3.1.2., sólo con la diferencia de que se utilizaron en este caso 4 plantas madre (Figura 5).

### **3.2.3. Diseño experimental seguido en el cultivo *in vitro* durante 12 meses**

A lo largo de 12 meses y para cada una de las cuatro plantas madre y por separado se realizaron 8 subcultivos con un intervalo de tiempo de 6 semanas cada uno. En cada uno de los seis primeros subcultivos se analizó una muestra para cada una de las 4 plantas.

A partir del subcultivo 6 (Figura 5) la obtención de ejemplares se amplió y de cada uno de los 4 ejemplares obtenidos en el subcultivo 6 se obtuvieron 5 en el subcultivo 7 resultando un total de 20 ejemplares para dicho subcultivo. A partir del subcultivo 7 y siguiendo con el mismo diseño de trabajo, de los 20 ejemplares obtenidos en el subcultivo 7 se obtuvieron 5 de cada uno de ellos, resultando 100 ejemplares en el subcultivo 8.

A lo largo de todo el trabajo, se obtuvieron 36 ejemplares para cada una de las 4 plantas madre y con ello un total de 144 ejemplares. Como muestras para la extracción de ADN se cogieron hojas de las cuatro plantas madre y de los 144 ejemplares obtenidos en el cultivo *in vitro*.



**Figura 5.** Diseño experimental seguido en el mantenimiento de *Limonium perplexum* en cultivo *in vitro* durante 12 meses. Cada círculo azul representa un ejemplar. Los 100 ejemplares obtenidos en el subcultivo 8 proceden de los 20 ejemplares del subcultivo 7, siguiendo el esquema indicado al inicio de cada ejemplar. n = número de ejemplares en cada subcultivo.

### 3.2.4. Selección del material vegetal para la extracción del ADN

Para llevar a cabo la extracción de ADN se utilizaron hojas verdes procedentes de diferente material de partida:

(i) Plantas de campo

Se utilizaron hojas verdes de las cuatro plantas madre almacenadas por separado a -85°C desde el momento de su recolección.

(ii) Plantas cultivadas *in vitro*.

En el caso en que la extracción de ADN se inició a partir del cultivo *in vitro*, las hojas se recogieron el día en que se hacía un nuevo subcultivo. Los días de transferencia de los cultivos así como el tiempo del establecimiento de la plantas *in vitro* se presentan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Frecuencias de los subcultivos realizados a lo largo de 12 meses.

MATERIAL DE CAMPO <i>Material de cultivo in vitro</i>	Establecimiento <i>in vitro</i> (7-4-09/14-7-09) <i>Día de la transferencia de los cultivos</i>
<i>Subcultivo 1</i>	<i>14 Julio de 2009</i>
<i>Subcultivo 2</i>	<i>28 agosto de 2009</i>
<i>Subcultivo 3</i>	<i>19 Octubre de 2009</i>
<i>Subcultivo 4</i>	<i>4 Diciembre de 2009</i>
<i>Subcultivo 5</i>	<i>21 Febrero de 2010</i>
<i>Subcultivo 6</i>	<i>16 Abril de 2010</i>
<i>Subcultivo 7</i>	<i>20 Junio de 2010</i>
<i>Subcultivo 8</i>	<i>23 Julio de 2010</i>

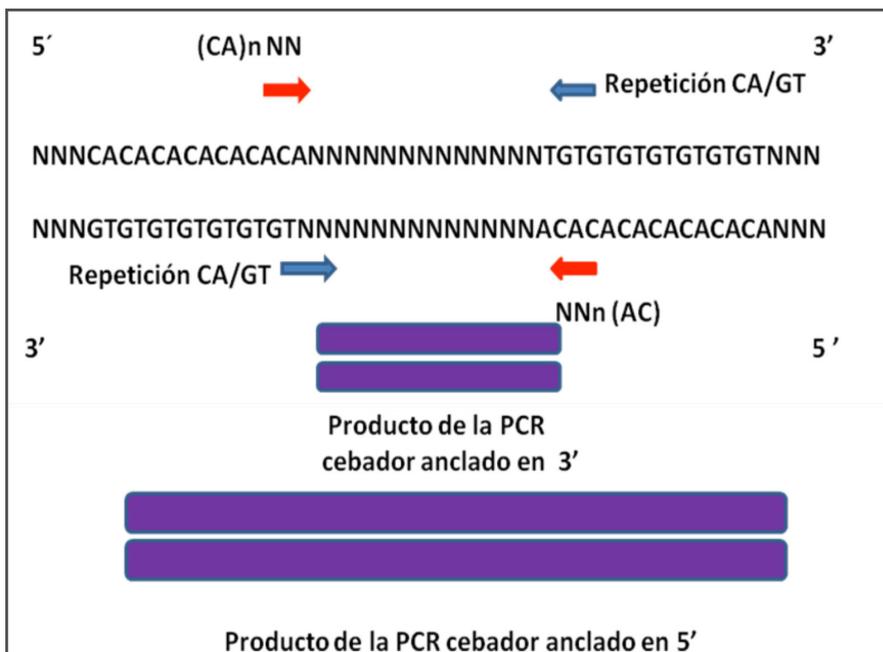
### 3.2.5. Extracción del ADN

El ADN se extrajo a partir de hojas verdes de 148 ejemplares, de los cuales 144 procedían del cultivo *in vitro* y 4 de ellos de material de campo (plantas madre). Se utilizó el protocolo de extracción por CTAB de Doyle y Doyle (1990), ligeramente modificado. Para cada una de las muestras, el ADN se obtuvo a partir de 50 mg de tejido que se trituró con 500 µl de tampón de extracción (CTAB al 2%, 100 mM Tris pH 8, 1.4 M NaCl, 20

mM EDTA y se añadió 0.2%  $\beta$ -mercaptoetanol en el momento de su uso). Los tubos se incubaron 45 min a 60°C. El contenido de los tubos se homogeneizó durante la incubación con agitación. A cada tubo se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo:indolacético 24:1 (v:v) en el proceso de purificación y las fases se separaron por centrifugación a 13000 rpm durante 10 min. A continuación, la fase acuosa se transfirió a un eppendorf limpio y se le añadieron 800  $\mu$ l de etanol al 96% permaneciendo durante 20 min a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min y el precipitado se volvió a lavar con etanol al 70%. Nuevamente, se volvió a centrifugar durante 10 min y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Las muestras se resuspendieron con 30  $\mu$ l de agua desionizada.

### 3.2.6 Selección de marcadores ISSR

En este trabajo se utilizó la técnica de los ISSR o Inter Simple Sequence Repeats (Zietkiewicz *et al.* 1994) lo cual permite obtener los niveles de variación genética en regiones internas de los microsátelites (SSR). El fundamento de la técnica es que se emplea un cebador constituido por una secuencia simple repetida, que normalmente lleva un anclaje de uno o dos nucleótidos aleatorios en el extremo 3' o en el 5' (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema de la amplificación mediante ISSR (adaptado de Zietkiewicz *et al.* 1994).

### 3. Materiales y métodos

En primer lugar se realizó un estudio piloto con 16 cebadores (ISSR) y con el ADN de las plantas madre. Se utilizaron aquellos marcadores del conjunto capaces de amplificar en la especie de estudio y que mostraron un patrón variable de bandas más nítido y de fácil escrutinio en los geles. Con este criterio, se seleccionaron los 5 cebadores ISSR descritos en la tabla 5.

**Tabla 5.** Secuencia de los marcadores ISSR y temperatura de anillamiento utilizada en las reacciones PCR. Tm: temperatura de anillamiento.

CEBADOR	SECUENCIA	Tm
IS01	5'-CAC ACA CAC ACA CAC AT-3'	50.4°C
IS02	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CT-3'	50.4°C
IS09	5'-CAC ACA CAC ACA CAC AG-3'	52.8°C
IS10	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CG-3'	52.8°C
IS12	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GC-3'	52.8°C

#### 3.2.7. Amplificación y condiciones de electroforesis

La amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en 20 µl de mezcla de reacción que contenía 1 µl de ADN, 0.6 µM de cebadores, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de Taq polimerasa (Bio-tools), 200 µM de dNTP (mezcla de 4 di-deoxinucleótidos a 10 mM Fermentas), y agua desionizada (llevada a un volumen final de 20 µl de muestra). Se optimizaron las condiciones de las PCR atendiendo a la temperatura de anillamiento de cada uno de los ISSRs utilizados (Tabla 5). Las amplificaciones de las muestras consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a la temperatura de anillamiento, 1 min a 72°C, y un ciclo de 72°C durante 20 minutos.

Una vez amplificados los productos de PCRs se separaron mediante electroforesis, utilizando TAE 1x como buffer de corrida para geles de agarosa al 2%, los cuales se tiñeron con bromuro de etidio a 1.0 mg/ml para poder visualizarlos en una lámpara de luz ultravioleta.

Para determinar el tamaño aproximado de las bandas se empleó un marcador molecular de un peso molecular de 100 pares de bases (Takara biotechnology) de 250  $\mu\text{g}$  (1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) que corría junto con las muestras.

Cada gel fue fotografiado con una cámara digital Canon 90 IXUS y las imágenes fueron digitalizadas en el programa informático de tratamiento de imágenes Adobe Photoshop V.7.0.

### **3.2.8. Análisis de datos**

La lectura de los geles se realizó de forma manual, identificando los patrones de los diferentes loci amplificados. Se seleccionaron sólo las bandas reproducibles y dentro de un rango comprendido entre 200 y 1150 pb. La captación de imágenes se realizó después de anotar la presencia o ausencia de bandas en el gel. El tiempo transcurrido entre la anotación de bandas y la captación de las imágenes, siendo mínimo, suele derivar en la pérdida de alguna de las bandas. Las bandas se codificaron con caracteres binarios, 1 para su presencia y 0 para la ausencia de bandas. Los datos se ordenaron y trasladaron a una matriz de resultados (*Apendice 1*).

También se realizaron, a través del programa informático TCS vs. 121 (Clement *et al.* 2000) los diagramas de mínima parsimonia que conectan los haplotipos ISSR encontrados (Figura 23, 24, 25 y 26).

## **3.3. Análisis citogenético en la detección de variación somaclonal**

### **3.3.1. Selección del material vegetal. Obtención de raíces**

En la realización de los estudios de citogenética el material vegetal empleado son las raíces, concretamente los ápices radiculares, tejido con un alto índice de división celular. Las raíces que se han utilizado provienen de dos materiales de partida.

La primera clase de material corresponde a raíces obtenidas a partir de semillas procedentes de las 4 plantas madre de *Limonium perplexum* de la población de la Sierra de Irta utilizadas también en el punto 3.2. Las semillas procedentes de las plantas madre se recogieron durante el verano del 2009. A continuación se sembraron en un medio con agar al 1% en cápsulas petri y separadamente. La germinación de las mismas tuvo lugar en una cámara de crecimiento a 20°C de temperatura constante y con 12 h de luz blanca diaria. Las semillas de una de las 4 plantas no llegaron a germinar.

### 3. Materiales y métodos

En la segunda clase de material de partida las raíces fueron obtenidas a partir de los 12 meses de ser subcultivadas las cuatro plantas madre en cultivo *in vitro* durante sucesivos subcultivos cada 6 semanas.

La obtención y extracción de estos ápices radiculares resultó dificultosa, puesto que las raíces se encontraban inmersas en el agar utilizado en el medio de cultivo. Para su selección se utilizó una lupa binocular. Una vez obtenidas las raíces se enjuagaron en varias ocasiones con agua con el fin de desprender el agar, y poder iniciar el tratamiento previo a las preparaciones cromosómicas (Figura 7).



**Figura 7.** Raíces de *Limonium perplexum* obtenidas tras doce meses de cultivo *in vitro*

### 3.3.2. Técnica citogenética de fluorescencia

#### 3.3.2.1. Preparaciones cromosómicas

Tanto para las raíces obtenidas del material de campo como para las raíces obtenidas a partir del material en cultivo *in vitro*, se siguió el mismo protocolo de pretratamiento de meristemas apicales. Esta fase se consigue utilizando anti-mitóticos, que detienen las células en división celular en los estadios de metafase y/o profase por inhibir la formación del huso acromático. Una vez las raíces llegaron a 1-2 cm de longitud se cortaron los ápices y se sumergieron en una solución de 2  $\mu$ M de 8-hidroxiquinoleína como anti-mitótico durante 2 h a 4°C y 2 h a temperatura ambiente (20-25°C). Transcurrido este tiempo, los ápices se lavaron con agua destilada y se fijaron en una solución de etanol absoluto y ácido acético glacial en una proporción 3:1 (v:v). Posteriormente se conservaron a 4°C hasta el momento de su procesado.

En el momento de la utilización de los ápices se hicieron dos lavados con agua destilada y un lavado con tampón citrato (1x), y se procedió a la digestión enzimática incubando en una solución conjunta de celulasa al 2% y peptinasa al 4% durante 1h a 37°C. Al cabo de 1 h se sacaron y se volvieron a lavar con tampón citrato (1x), seguido de un lavado con agua destilada y se guardaron en la nevera a 4°C hasta la realización de las preparaciones.

Las preparaciones se realizaron por aplastamiento con una gota de ácido acético al 45% y se congelaron a -85°C o con hielo seco. Después de 1 h se quitaron los cubreobjetos con un bisturí e inmediatamente se fijaron con una solución fría de etanol absoluto: ácido acético glacial 3:1 (v:v), posteriormente se deshidrataron con etanol absoluto al 100% y se guardaron a 37°C hasta el momento de su observación.

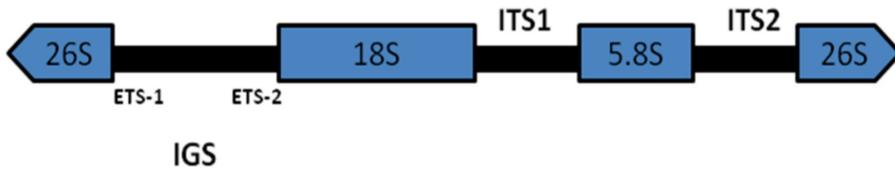
#### 3.3.2.2. Localización de secuencias de ADN mediante técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

##### a) Regiones utilizadas

Las dos familias multigénicas de ADN ribosomal nuclear (ADNr) se localizaron con 2 sondas diferentes de ADN. La familia multigénica de ADN ribosomal nuclear 45S se localizó mediante el clon pTa71 que es un fragmento EcoRI de 9 Kb que contiene los genes 18S-5.8S-26S de ADNr, dos

### 3. Materiales y métodos

espaciadores internos que se transcriben (ITS-1) e (ITS-2), y un espaciador intergénico (IGS) que incluye en ambos extremos dos espaciadores externos transcritos (ETS-1 y ETS-2) de *Triticum aestivum* (Gerlach y Bedbrook 1979) (Figura 8). El ADNr 5S se localizó usando el clon pTa794, que contiene un fragmento BamHI de 410 pb, correspondiente al gen 5S y al IGS de *T. aestivum* (Gerlach y Dyer 1980) (Figura 9).



**Figura 8.** Representación esquemática de la organización de la unidad ribosómica 45S completa de plantas.



**Figura 9.** Representación esquemática de la organización de la unidad ribosómica 5S completa de plantas.

#### b) Marcaje de las regiones

Las sondas se marcaron por el método de traslado de mella (nick translation). Para ello, se prepararon dos tipos distintos de mezclas de marcaje, cada una de ellas con nucleótidos modificados y sin modificar.

Los nucleótidos modificados fueron: digoxigenina-11-dUTP (Roche) y biotina-16-dUTP (Roche), ambos análogos de dTTP. La reacción de marcaje se llevó a cabo con 6 µl de ADN, 0.1 mM de dNTPs (conteniendo el nucleótido modificado con digoxigenina o biotina) y 4 µl de Nick Translation Mix (Roche). Se incubó en un termociclador a 15°C durante 90 min y la reacción se detuvo a 60 °C. Finalmente, las sondas marcadas se conservaron a -20°C.

El clon pTa71 se marcó con digoxigenina-11-dUTP y el clon pTa794 se marcó con biotina-16-dUTP.

c) Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Los protocolos se llevaron a cabo de acuerdo con Rosato *et al.* (2008) con pequeñas modificaciones. Las preparaciones de cromosomas fueron pretratadas con RNAasa durante 1 h a 37°C, seguido de 2 lavados en 2xSSC durante 5 min cada uno. Se incubó con pepsina durante 20 min y una posterior fijación en una solución acuosa de paraformaldehído al 4%. Se realizaron 2 lavados con 2xSSC, tres veces durante 5 min y posteriormente se pasó a una deshidratación en una serie de alcoholes (70%, 90% y 100%) de tres minutos cada uno a temperatura ambiente. Las preparaciones se dejaron secar durante 1 h. La desnaturalización de las preparaciones se llevó a cabo en formamida al 70% durante 2 min a 68°C. Se pasó a una deshidratación en alcoholes fríos en la secuencia 70%, 90% y 100% durante 5 min cada uno. Luego se dejaron secar las preparaciones durante 1 h.

La mezcla de hibridación consistió en 50% de formamida, 10% de sulfato dextrano, 2xSSC, 0.10% SDS, 1.5 µl de sonda pTa71 (digoxigenina) y sonda pTa794 (biotina). La mezcla de hibridación se desnaturalizó durante 10 min a 100°C e inmediatamente después se enfrió en hielo durante 7 min. A cada una de las preparaciones se le añadió 15 µl de la mezcla de hibridación y luego se dejaron en una cámara húmeda a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se quitaron los cubreobjetos y se procedió a los lavados poshibridatorios.

Primero se lavaron las preparaciones 3 veces con 2xSSC durante 30 min y una vez con 1xSSC durante 5 min. A continuación se realizó un lavado de astringencia en 1xSSC durante 30 min a 37°C (50% de astringencia).

Para la detección de las sondas marcadas, primero se incubaron en tampón 4B (4xSSC, 0.5% w/v BSA) durante 40 min a 37°C y a continuación se prepararon las mezclas de los anticuerpos conjugados con los respectivos fluorocromos. La sonda pTa71 marcada con digoxigenina-11-dUTP, se detectó con el anticuerpo primario anti-digoxigenina conjugado con el fluorocromo fluoresceína (15 ng/µl) (Roche). La sonda pTa794, marcada con biotina-11-dUTP, se detectó con strepavidina conjugada con *Texas*

*Red* (15 ng/μl) (Vector). Las preparaciones se incubaron con la mezcla de anticuerpos durante 1 h a 37°C en cámara húmeda y en oscuridad.

Las preparaciones se lavaron en tampón de detección (4xSSC, 0.2% Tween-20) 1 vez durante 5 min a temperatura ambiente y 2 veces durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se deshidrataron en una serie de etanoles (70%, 90% y 100%) durante tres minutos cada una a temperatura ambiente y en oscuridad.

Finalmente, todas las preparaciones se contra-tiñeron con el fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) durante 5 min en oscuridad, las preparaciones se lavaron en agua destilada y se prepararon utilizando un medio de montaje que evita el decaimiento de la fluorescencia (Vectashield H-1000, Vector) y se guardaron en oscuridad a 4°C.

#### **3.3.3. Visualización de las preparaciones y captura de las imágenes**

Las señales de hibridación se analizaron usando un microscopio Olympus epifluorescente, con un filtro de separación, equipado con una cámara digital Olympus Camedia C-2000-Z. Las imágenes fueron optimizadas para mejorar su brillo y contraste utilizando el programa informático de tratamiento de imágenes Adobe Photoshop V.7.0.

#### **3.3.4. Análisis del cariotipo**

El recuento de cromosomas se hizo a partir de raíces obtenidas de la germinación de las semillas en agar de las plantas madre y a partir de raíces de plantas regeneradas *in vitro* durante 12 meses. En la mayoría de los casos de cada individuo analizado se obtuvieron entre 1-5 metafases. Las fotomicrografías se llevaron a cabo con una cámara digital Olympus Camedia C-2000-Z y se procesaron usando el programa Adobe Photoshop v.7.0. Las medidas de los cromosomas se realizaron en imágenes digitales usando el procesador de imágenes software IMAGETOOL v.5.0.

Para determinar la posición del centrómero se utilizó la nomenclatura de Levan *et al.* (1964). Primeramente, se midió el brazo corto del cromosoma, seguido del brazo largo y posteriormente el cromosoma completo. Se utilizó el índice centromérico  $i=(S/L+S) \times 100$  donde S es el brazo corto del cromosoma y L es el brazo largo. El idiograma se ha construido ordenando los cromosomas según su tamaño en orden decreciente y posición del centrómero.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Propagación *in vitro* de *Limonium perplexum*

#### 4.1.1. Establecimiento *in vitro* del cultivo

La obtención de cultivos *in vitro* estériles utilizando el procedimiento estándar en plantas en roseta resulta muy dificultosa y han de ser muchas las plantas que se utilizan para la obtención de explantes estériles. Sin embargo, con el procedimiento descrito en este trabajo y con el tipo de material que se utilizó (tallos con inflorescencias), sólo el 10% de explantes resultó contaminado y para este protocolo de trabajo sólo se utilizó una planta madre para el establecimiento *in vitro* de los cultivos. Todo lo cual es de suma importancia para la obtención de material de especies o poblaciones con muy pocos individuos (especies raras, endémicas o amenazadas).

El estado de desarrollo de los tallos de la inflorescencia fue muy importante para la obtención de yemas vegetativas. Dos semanas después de permanecer los explantes en el medio de establecimiento *in vitro*, algunos de ellos mostraron yemas muertas mientras que un 80% presentaron pequeños brotes con un aspecto y desarrollo normal (Figura 10).



**Figura 10.** Estados de regeneración de plantas de *Limonium perplexum* a partir de tallos con inflorescencias. Brotes adventicios desarrollados *in vitro* a partir de yemas indiferenciadas, después de cuatro semanas de cultivo.

Estos resultados demuestran que las yemas presentes en las partes basales de los tallos de las inflorescencias son un buen material a partir del cual se obtienen cultivos estériles para la micropropagación. Es el caso también de otras especies de plantas como *Panicum miliaceum* (George y Eapen 1990), *Cortaderia selloana* (Robacker y Corley 1992) y *Beta vulgaris* (Zhong *et al.* 1993).

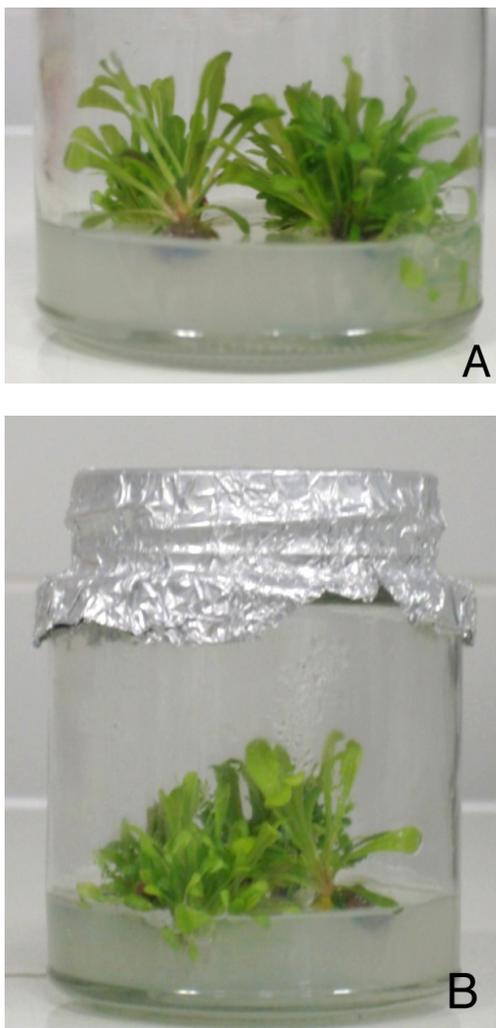
Los brotes desarrollados a partir de estas yemas y nuevamente subcultivados 2 veces seguidas en medio de establecimiento con 2 mg/l de Kinetina mostraron un alta tasa de multiplicación (con unos 7-10 brotes por explante), suficiente para proporcionar una buena cantidad de explantes para empezar la fase de multiplicación.

#### **4.1.2. Multiplicación *in vitro* de los brotes**

Durante esta fase de propagación se estudió el efecto de tres citoquininas (BAP, Kinetina y 2iP) sobre los brotes sembrados en medio salino MS. Un pequeño callo se formó en la base del explante en todos los cultivos, pero éste no llegó a afectar al proceso de proliferación. La viabilidad de brotes resultó muy alta en la mayoría de tratamientos, superando en general el 70% y llegando en algunos casos al 100% (Tabla 6).

Como se muestra en la Tabla 6, en el medio sin regulador de crecimiento los explantes produjeron algunos brotes (3.9). El rango de multiplicación (número total de brotes formados) fue significativamente más alto en los cultivos suplementados con altas concentraciones de Kinetina (2 y 5 mg/l) alcanzando valores de 9.4 y 10.2 brotes por cluster respectivamente. Con la hormona 2iP (5 mg/l) se alcanzaron también valores de 9.4 brotes por cluster. Respecto a la hormona BAP los mejores resultados se obtuvieron a bajas concentraciones (0.1 mg/l) con 9.3 brotes por cluster. No se obtuvieron diferencias significativas en los resultados obtenidos en estos tres tratamientos con citoquininas.

Estos resultados están en la línea de los obtenidos con otros tratamientos en otras especies como *L. rigualii* (Lledó *et al.* 1993b), *L. dufourii*, *L. santapolense*, *L. furfuraceum* (Lledó *et al.* 1993a) y *L. thiniense* (Lledó *et al.* 1996). Sin embargo, la mayoría de brotes que se formaron durante las 6 semanas de cultivo fueron de pequeño tamaño (longitud de las hojas de la roseta basal) y solamente en cultivos suplementados con Kinetina a 5 mg/l se obtuvo el mayor nº de brotes (4.4) que superaban los 15 mm de longitud. (Tabla 6, Figura 11).



**Figura 11. (A)** Multiplicación de brotes a partir de tallos con inflorescencias de *L. perplexum* tras 6 semanas en medio salino MS, con Kinetina a 2 mg/l. **(B)** Multiplicación de brotes a partir de tallos con inflorescencias de *L. perplexum* tras 6 semanas en medio salino MS, con BAP a 2 mg/l.

Se obtuvo un bajo número de brotes (3.1-3.0) en los medios con una baja concentración de kinetina o 2iP (0.1 mg/l). Sin embargo, los peores resultados (respecto a la viabilidad, aspecto de los brotes y nº de brotes mayores de 15 mm de longitud) se obtuvieron con BAP a altas concentraciones (2 y 5 mg/l). Se produjeron ciertas anomalías en brotes con tratamientos con BAP conforme la concentración de éste iba aumentando (Figura 11B).

**Tabla 6.** Efecto de la Kinetina (Kin), 6-benzylaminopurina (BAP) y 2 isopentil-adenina (2iP) en la propagación *in vitro* de *Limonium perplexum* en medio salino Murashige y Skoog (MS). Brotes originados a partir de yemas inmaduras de inflorescencias utilizados en la fase de multiplicación. Los datos (medias  $\pm$  Error estándar) se analizaron a las 4 semanas de cultivo.

Citoquininas mg l <sup>-1</sup>	% Viabilidad de brotes	Brotes totales por cluster	Nº de brotes >15 mm por cluster
0	95	3.9 $\pm$ 0.2 e	2.5 $\pm$ 0.2 cde
Kin	0.1	3.1 $\pm$ 0.3 e	1.5 $\pm$ 0.2 cde
	0.2	3.9 $\pm$ 0.4 e	1.6 $\pm$ 0.3 cde
	1.0	7.3 $\pm$ 0.6 bc	1.8 $\pm$ 0.3 cd
	2.0	9.4 $\pm$ 0.9 ab	2.5 $\pm$ 0.4 bc
	5.0	10.2 $\pm$ 1.0 a	4.4 $\pm$ 0.5 a
BAP	0.1	9.3 $\pm$ 1.3 ab	1.9 $\pm$ 0.5 c
	0.2	8.0 $\pm$ 1.1 bc	1.4 $\pm$ 0.3 cde
	1.0	6.4 $\pm$ 0.9 cd	0.6 $\pm$ 0.1 e
	2.0	4.8 $\pm$ 0.6 de	0.7 $\pm$ 0.2 de
	5.0	4.7 $\pm$ 0.7 de	0.6 $\pm$ 0.1 e
2iP	0.1	3.0 $\pm$ 0.3 e	1.5 $\pm$ 0.3 cde
	0.2	4.4 $\pm$ 0.3 de	1.4 $\pm$ 0.2 cde
	1.0	3.9 $\pm$ 0.3 e	1.8 $\pm$ 0.2 cd
	2.0	4.9 $\pm$ 0.4 de	2.3 $\pm$ 0.2 bc
	5.0	9.4 $\pm$ 0.6 ab	3.0 $\pm$ 0.4 b

En cada columna, las diferentes letras indican que los valores son significativamente diferentes (Test de rango múltiple Duncan, P<0.05)

### 4.1.3. Enraizamiento *in vitro* de brotes

Los resultados obtenidos en diferentes medios de enraizamiento con los reguladores de crecimiento IBA o IAA (Tabla 7) fueron muy similares, sin diferencias significativas entre ambos. Un alto porcentaje de brotes (80-85%) enraizaron en un mes en la mayoría de los medios analizados. Además, simultáneamente al enraizamiento, se observó la elongación de los brotes después de cuatro semanas en esta fase de cultivo.

Los brotes cultivados en medio básico MS sin reguladores de crecimiento o con IBA o IAA produjeron raíces normales (Figura 12). En estos medios de enraizamiento *in vitro* el cultivo de brotes también mostró una cierta tasa de multiplicación, si bien no superando el valor de 2.6 brotes por explante.

La Tabla 7 muestra también el porcentaje de enraizamiento alcanzando después de diferentes intervalos de tiempo. Las raíces emergieron en la base del brote 10 o 12 días después del cultivo en el medio. El enraizamiento en medios con IBA, IAA o sin regulador de crecimiento fue generalmente del 25% en este tiempo. Durante el periodo de 3 semanas se llegó al 75-80% de enraizamiento y después de 6 semanas (datos no mostrados) se alcanzó el 90-95% de brotes enraizados en todos los medios analizados.



**Figura 12.** Enraizamiento *in vitro* de brotes de *L. perplexum*, en medios de cultivo MS con la adición de 0.1 mg/l de IAA.

**Tabla 7.** Efecto del ácido 3-indolbutírico (IBA) y ácido 3-indolacético (IAA) en el enraizamiento *in vitro*, número de raíces por explante, número de nuevos brotes y elongación de *Limonium perplexum* en un medio salino de Murashige y Skoog (MS). Los datos (medias  $\pm$  Error standard) se analizaron a las 4 semanas de cultivo.

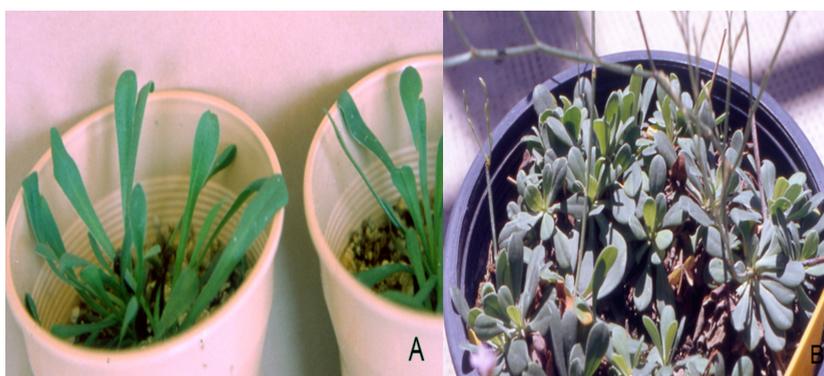
Auxina mg l <sup>-1</sup>	% enraizamiento a				N° de raíces	Longitud brote (mm)	N° nuevos brotes
	10 d	14 d	21 d	28d			
IBA	0	55	75	85	4.6 $\pm$ 0.7	26.6 $\pm$ 2.2	2.6 $\pm$ 0.2
	0.1	25	35	75	4.4 $\pm$ 0.7	23.1 $\pm$ 2.7	2.6 $\pm$ 0.2
IAA	0.5	5	35	70	3.4 $\pm$ 0.2	25.1 $\pm$ 2.5	2.4 $\pm$ 0.1
	0.1	20	35	80	5.7 $\pm$ 0.9	25.4 $\pm$ 2.7	2.4 $\pm$ 0.1
	0.5	35	60	85	4.8 $\pm$ 0.9	19.9 $\pm$ 2.1	2.2 $\pm$ 0.2

Para todos los tratamientos, los valores de significación de las raíces, longitud de los brotes y número de nuevos brotes, no son significativamente diferentes (Test de rango múltiple Duncan,  $P < 0.05$ ).

(d): días de cultivo.

#### 4.1.4. Aclimatación de plantas

Las plantas enraizadas se transfirieron desde los frascos de cultivo *in vitro* a vasos con vermiculita en cámara de crecimiento y tapados con bolsas de plástico observándose un crecimiento vigoroso de las plantas (Figura 13). El porcentaje de supervivencia de las plantas durante su aclimatación a condiciones *ex vitro* fue de un 90%. El número o tamaño de las raíces formadas en los brotes no afectaron la aclimatación de los plantales en la cámara de crecimiento o posteriormente en invernadero.



**Figura 13.** Aclimatación de plantas de *L. perplexum* a condiciones *ex vitro* tras la fase de enraizamiento **(A)** en sustrato de vermiculita, tras la retirada de las bolsas de plástico que cubrían los brotes. **(B)** en maceta en invernadero tras varios meses de cultivo.

Nuestro procedimiento para la propagación *in vitro* de *Limonium perplexum* utilizando tallos con inflorescencias como material de partida proporciona un adecuado y práctico método para su micropropagación. Este método es altamente reproducible y ventajoso para la conservación de la especie, porque con este procedimiento existe una elevada regeneración de las plantas que pueden ser obtenidas, conservando además sin daño las plantas madre.

## 4.2. Detección de variación somaclonal en *Limonium perplexum* usando marcadores moleculares inter-microsatélite (ISSR)

### 4.2.1. Establecimiento de un sistema de cultivo *in vitro* para el mantenimiento de *Limonium perplexum* durante 12 meses

Un total de 144 ejemplares de *Limonium perplexum* se han obtenido por micropropagación en un medio MS que contenía 2 mg/l de Kinetina a partir de segmentos nodales con yemas sin diferenciar de 4 plantas madre (36 ejemplares por cada una de ellas). Las plantas obtenidas del cultivo *in vitro* se han mantenido durante 12 meses mediante 8 subcultivos con intervalos de 6 semanas cada uno siendo su viabilidad del 99% (Figura 14; Figura 5). El 1% corresponde a material vegetal contaminado. La elección del tipo de explante y el medio de cultivo utilizado han permitido un eficiente mantenimiento de la planta en buenas condiciones a lo largo de los 12 meses del experimento, haciendo posible la obtención de material idóneo para llevar a cabo la extracción del ADN y con ello su análisis.



**Figura 14.** Mantenimiento de los cultivos de *Limonium perplexum* a los 6 meses de su establecimiento *in vitro*, en la cámara de crecimiento.

#### **4.2.2. Efecto del cultivo *in vitro* en la variación genética en plantas generadas de *Limonium perplexum*. Análisis mediante marcadores ISSR**

Todas las muestras incluyendo las muestras de las plantas madre fueron amplificadas con los 5 cebadores ISSR seleccionados. De las bandas generadas por estos, resultaron 17 de las cuales 8 eran polimórficas y 9 monomórficas. El número de bandas amplificadas por cada cebador osciló entre 2 y 5, con una media de 3.6 bandas por cebador. El rango de la longitud de las bandas estuvo comprendido entre 400 y 1150 pb. Todos los cebadores ISSR excepto el IS10 mostraron polimorfismo (Tabla 8).

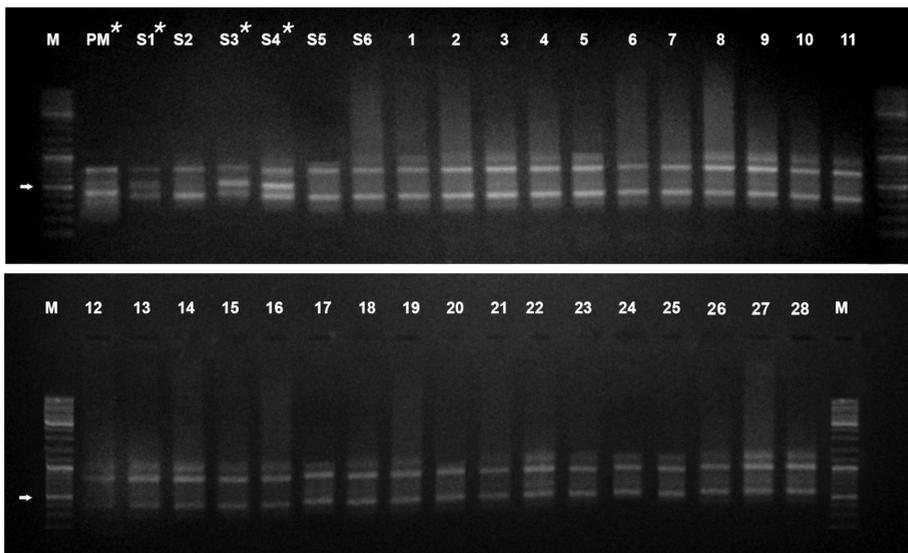
En términos generales se detectó polimorfismo en los 8 subcultivos, aunque desde el primer al sexto subcultivo el grado fue mayor, estabilizándose en el séptimo y octavo subcultivo. Las bandas polimórficas en plantas regeneradas en cultivo *in vitro* incluyeron tanto la ausencia de banda(s) originales presentes en la planta madre (PM) como la presencia de bandas nuevas, siendo el primero de los casos el más frecuente.

Algunos ejemplos de los fenotipos moleculares se presentan en las figuras 15, 16 y 17.

4. Resultados

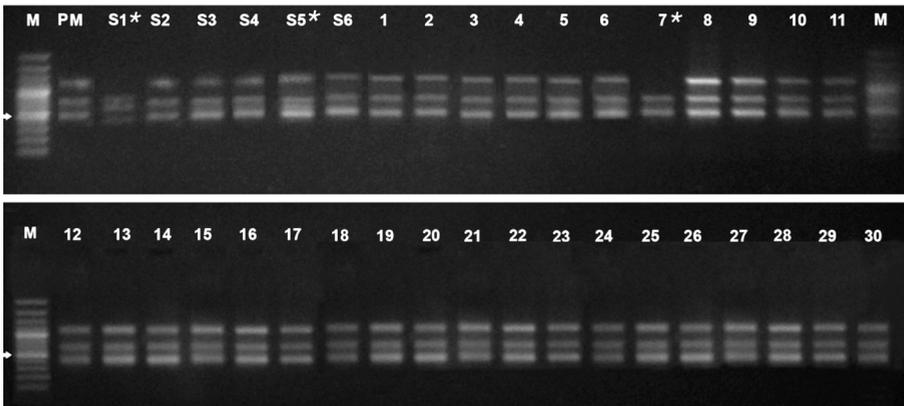
**Tabla 8.** Los 5 cebadores ISSR utilizados se presentan en la primera columna. La designación de las bandas obtenidas y su tamaño se detalla en la columna 2. La tercera columna muestra si la banda es polimórfica (P) o monomórfica (M). De las bandas generadas por estos, resultaron 17 de las cuales 8 eran polimórficas y 9 monomórficas.

Cebador	Banda (Tamaño en pb)	P/M
IS01	A (800)	M
	B (600)	P
	C (400)	M
IS02	D (1150)	P
	E (1100)	P
	F (900)	P
	G (800)	M
	H (650)	M
IS09	I (1100)	P
	J (700)	M
	K (500)	P
	L (400)	M
IS10	M (600)	M
	N (500)	M
IS12	O (900)	P
	P (500)	P
	Q (200)	M
TOTAL	17	(8/9)

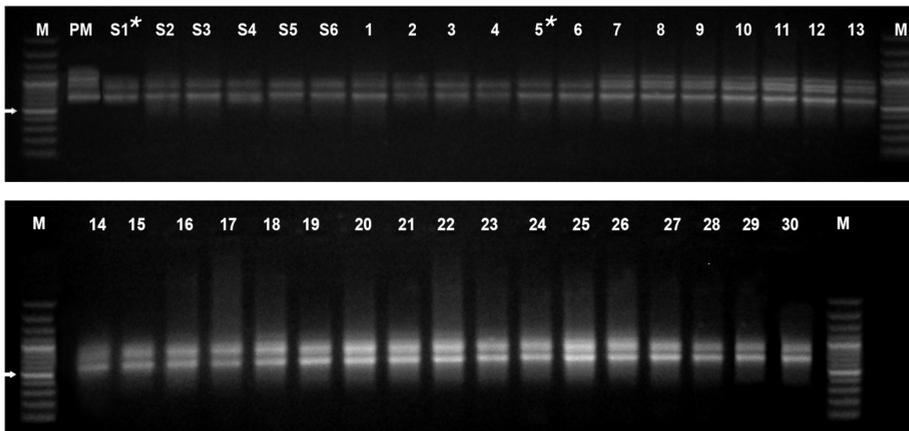


**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa de amplificados de PCR con el cebador ISSR IS01 obtenidos a partir de explantes procedentes de cultivo *in vitro* durante un año. **M:** corresponde a un marcador de ADN de un tamaño molecular de 100 pb. La flecha indica la banda de 500 pb. **PM:** planta madre. **S1-28:** muestras obtenidas de cada uno de los 8 subcultivos. Se observan dos bandas a 400 pb y 800 pb presentes en todos los ejemplares y una banda polimórfica de 600 pb. (\*) Ejemplares que muestran la banda de 600 pb.

#### 4. Resultados



**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa de amplificados de PCR con el cebador ISSR IS09 obtenidos a partir de explantes procedentes de cultivo *in vitro* durante un año. **M:** corresponde a un marcador de ADN de un tamaño molecular de 100 pb. La flecha indica la banda de 500 pb. **PM:** planta madre. **S1-30:** muestras obtenidas de cada uno de los 8 subcultivos. Se observan dos bandas de 400 pb y de 800 pb presentes en todos los ejemplares. Se observan dos bandas polimórficas. En el ejemplar S1 y 7 la banda de tamaño molecular 1100 pb no aparece, siendo muy evidente su ausencia. La banda de 500 pb aparece en el ejemplar S1 y S5, más tarde esta banda ya no vuelve a aparecer. (\*) Ejemplares que muestran bandas polimórficas.



**Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa de amplificados de PCR con el cebador ISSR IS02 obtenidos a partir de explantes procedentes de cultivo *in vitro* durante un año. **M:** corresponde a un marcador de ADN de un tamaño molecular de 100 pb. La flecha indica la banda de 500 pb. **PM:** planta madre. **S1-30:** muestras obtenidas de cada uno de los 8 subcultivos. Se observan la ausencia de bandas polimórficas de 1100 y 1150 pb de tamaño molecular desde el S1 hasta el ejemplar 5 del subcultivo 7. (\*) Bandas polimórficas en ejemplares comprendidos entre S1 y S5.

#### 4. Resultados

A partir de la matriz con bandas polimórficas se identificaron 23 haplotipos en los 148 ejemplares analizados (Tabla 10). En la tabla quedan representados en las columnas de la derecha, la frecuencia de cada haplotipo, así como el momento de aparición a lo largo de los ocho subcultivos. Estos datos se obtienen para las 4 plantas estudiadas. Las frecuencias más altas se observan en el subcultivo 8, la mayor variación somaclonal se observa desde el subcultivo 1 al 6, a partir de este hay menos variación.

Se realizaron 4 representaciones esquemáticas que corresponden a plantas estudiadas (Figuras 18, 19, 20 y 21) y su representación conjunta (Figura 22). El número de haplotipos presentes en cada línea de subcultivo se presenta en la tabla 9.

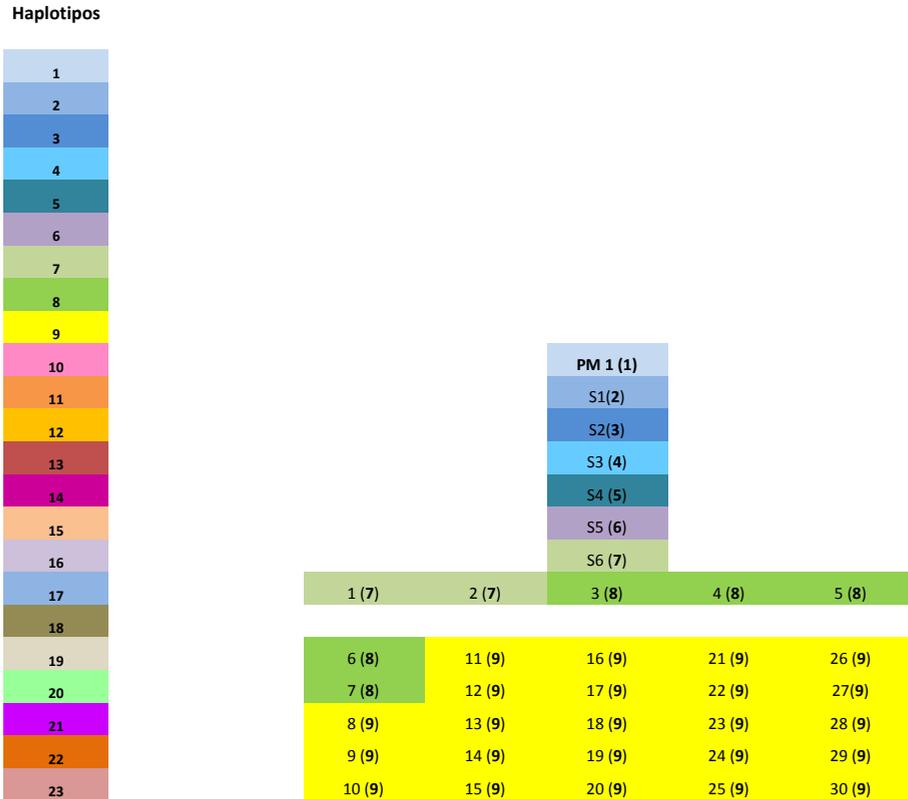
**Tabla 9.** Número de haplotipos presentes en cada línea de subcultivo.

Línea de subcultivos	haplotipos
PM	1
S1	2, 10, 16, 23
S2	3, 11, 17, 23
S3	4, 11, 14, 23
S4	5, 12, 14, 23
S5	6, 13, 18, 23
S6	7, 13, 14, 23
S7	7, 8, 10, 14, 16, 17, 19, 20
S8	7, 8, 9, 14, 15, 16, 17, 21, 22

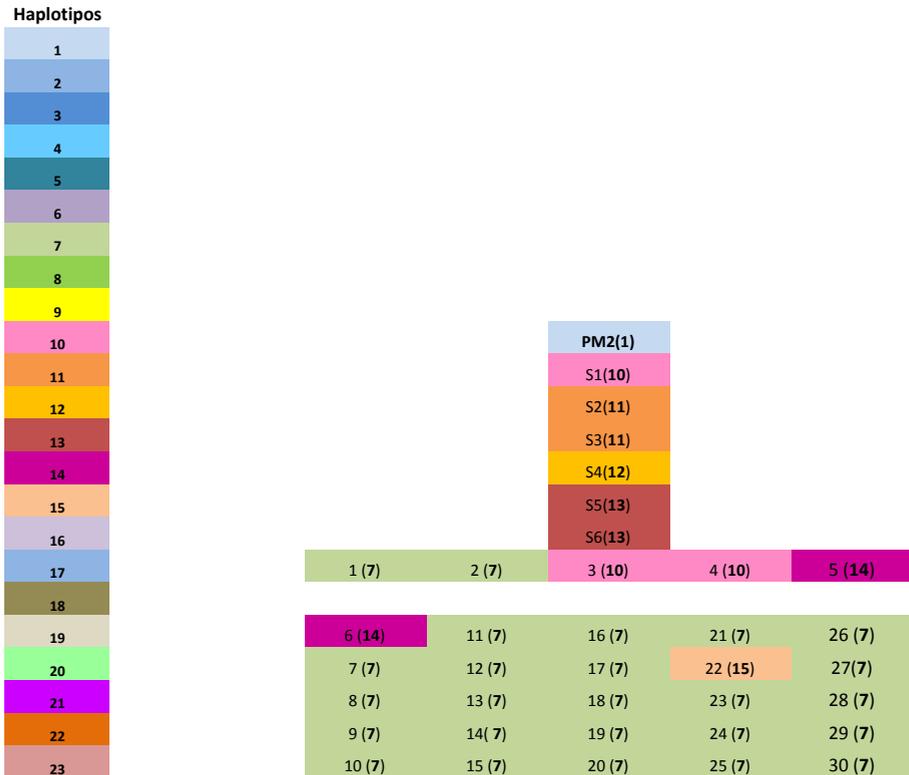
**Tabla 10.** Haplotipos encontrados en *Limonium perplexum* en plantas madre y en plantas regeneradas del cultivo *in vitro* a lo largo de 12 meses

Haplótipo	BANDAS POLIMÓRFICAS												Frecuencia	Subclivos	
	M	B	D	E	F	I	K	O	P						
	01/600	02/1150	02/1100	02/900	09/1100	09/500	012/900	012/500							
1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	4	PM1, PM2, PM3, PM4
2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	3
5	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	4
6	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	5
7	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	28	6,7,8
8	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	5	7,8
9	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	58	8
10	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	3	1,7
11	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	2	2,3
12	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	4
13	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	5,6
14	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	6	3,4,7,8
15	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	8
16	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	8	1,7,8
17	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	13	2,7,8
18	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	5
19	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	2	7
20	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7
21	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8
22	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	8
23	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	6	1,2,3,4,5,6

#### 4. Resultados

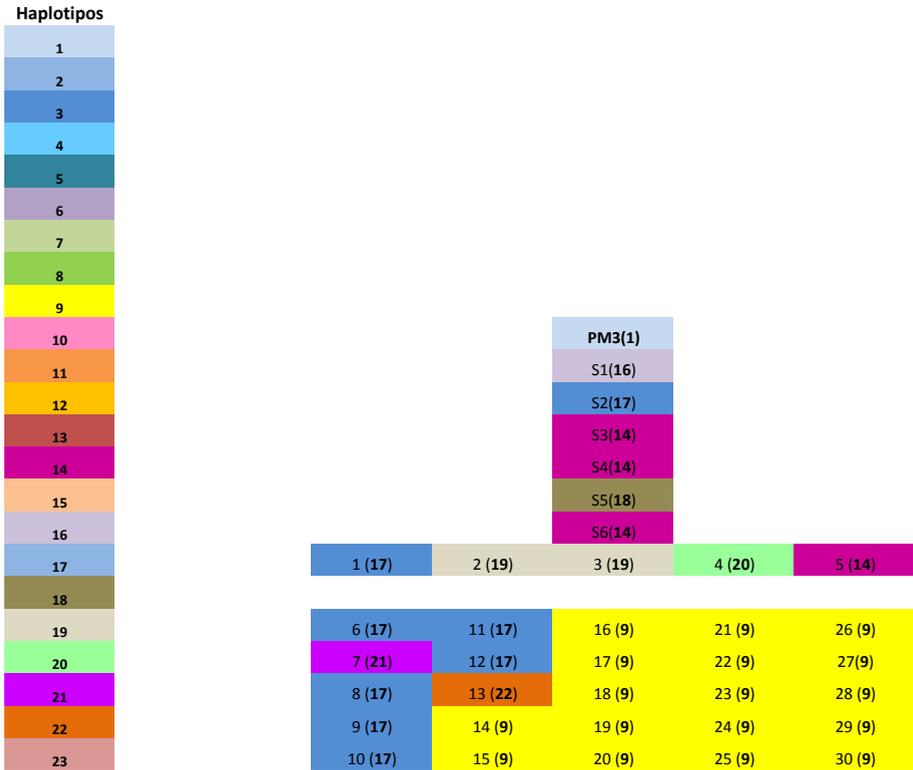


**Figura 18.** Esquema representativo del orden de aparición de los haplotipos a lo largo de los 8 subcultivos realizados en la Planta Madre 1 (PM1) de *Limonium perplexum*. S: corresponde a subcultivos. A partir del subcultivo 7 los ejemplares se identifican del número 1 al 30. El número entre paréntesis es el número de haplotipos, el color está relacionado con la columna de la izquierda.

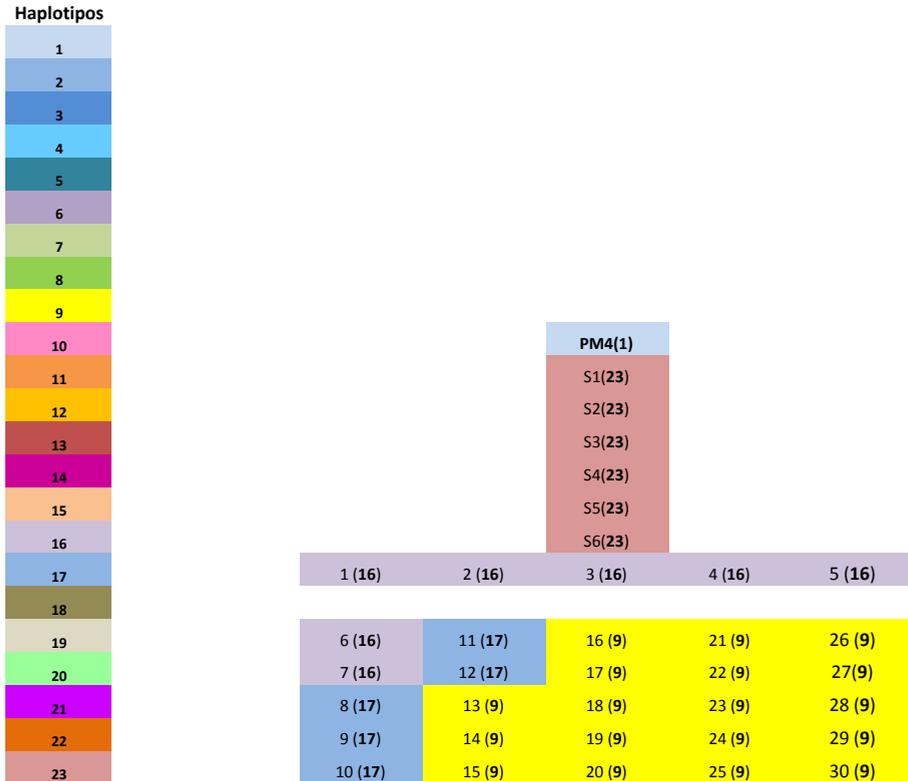


**Figura 19.** Esquema representativo del orden de aparición de los haplotipos a lo largo de los 8 subcultivos realizados en la Planta Madre 2 (PM2) de *Limonium perplexum*. S: corresponde a subcultivos. A partir del subcultivo 7 los ejemplares se identifican del número 1 al 30. El número entre paréntesis es el número de haplotipos, el color está relacionado con la columna de la izquierda.

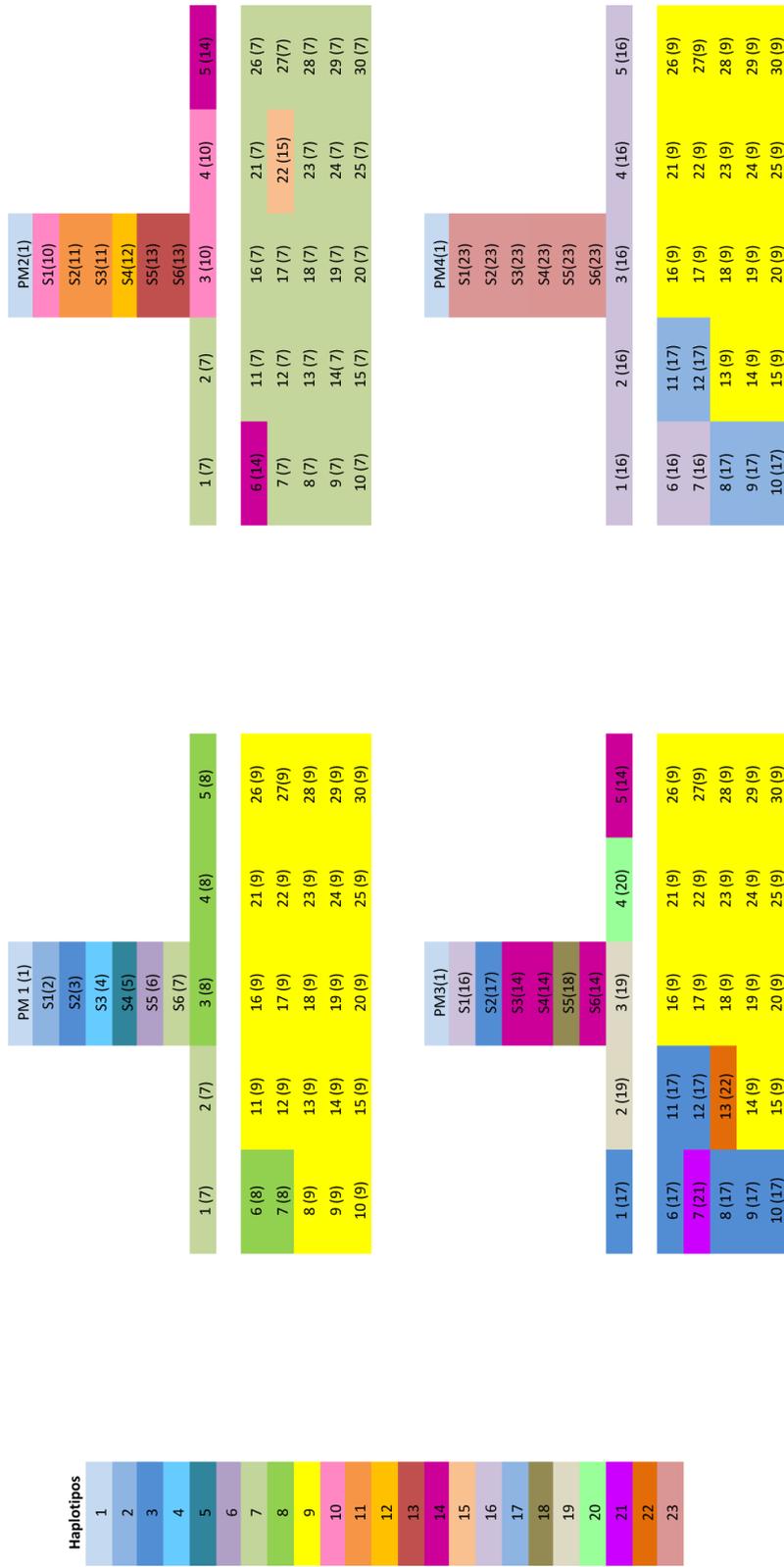
4. Resultados



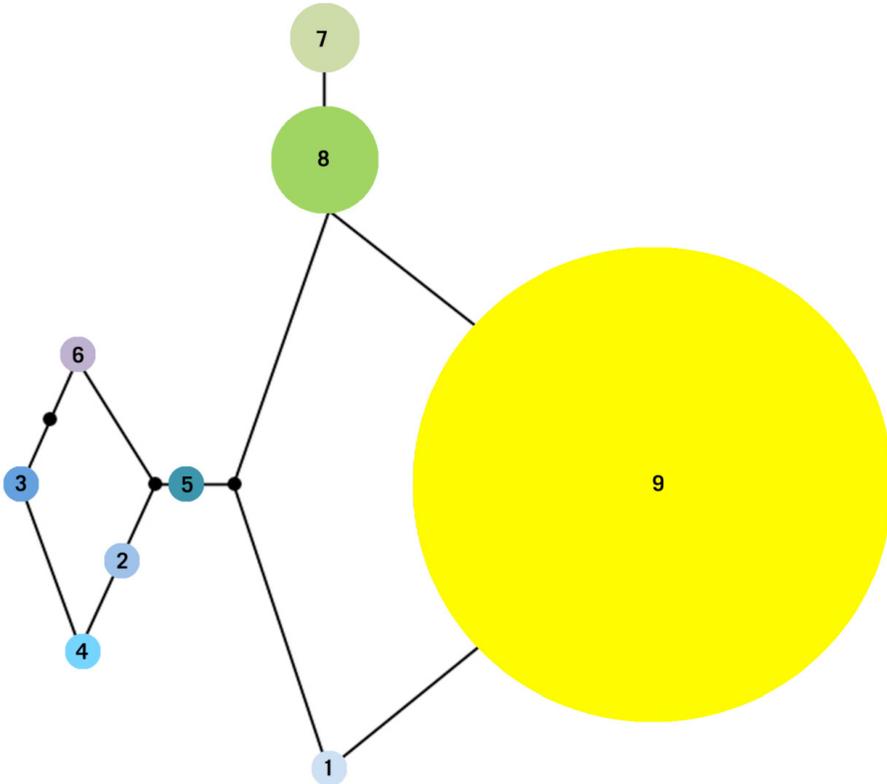
**Figura 20.** Esquema representativo del orden de aparición de los haplotipos a lo largo de los 8 subcultivos realizados en la Planta Madre 3 (PM3) de *Limonium perplexum*. S: corresponde a subcultivos. A partir del subcultivo 7 los ejemplares se identifican del número 1 al 30. El número entre paréntesis es el número de haplotipos, el color está relacionado con la columna de la izquierda.



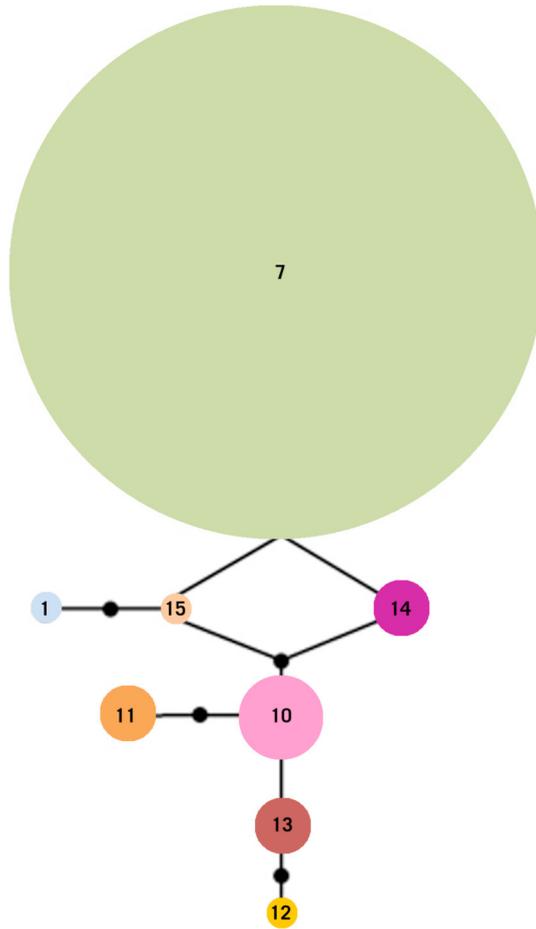
**Figura 21.** Esquema representativo del orden de aparición de los haplotipos a lo largo de los 8 subcultivos realizados en la Planta Madre 4 (PM4) de *Limonium perplexum*. S: corresponde a subcultivos. A partir del subcultivo 7 los ejemplares se identifican del número 1 al 30. El número entre paréntesis es el número de haplotipos, el color está relacionado con la columna de la izquierda.



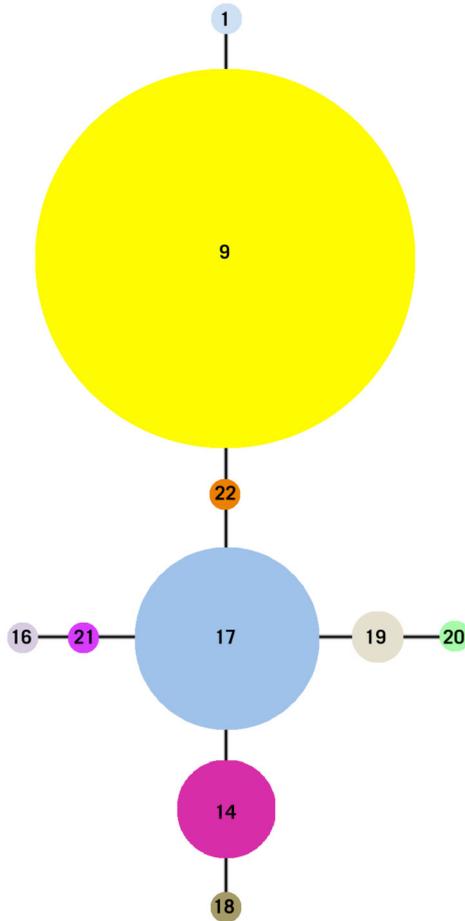
**Figura 22.** Esquema representativo del orden de aparición de los haplotipos a lo largo de los 8 subcultivos realizados en 4 plantas de *Limonium plexum*. PM: Planta Madre. S: corresponde a subcultivos. A partir del 7 subcultivo los ejemplares se identifican con número del 1 al 30. El número entre parentesis es el número de haplotipos, el color esta relacionado con la columna de la izquierda.



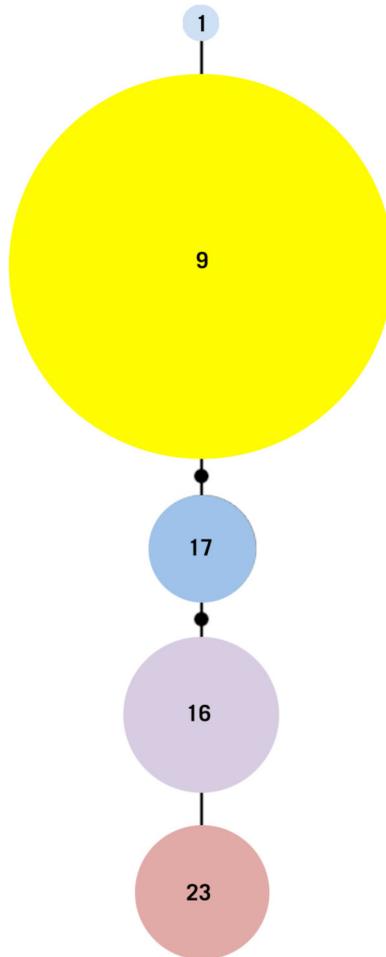
**Figura 23.** Esquema representativo de las relaciones entre los haplotipos detectados en *Limonium perplexum* correspondientes a la planta 1 y sus descendientes. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. Los colores coinciden con los de la figura 18.



**Figura 24.** Esquema representativo de las relaciones los haplotipos detectados en *Limonium perplexum* correspondientes a la planta 2 y sus descendientes. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. Los colores coinciden con los de la figura 19.



**Figura 25.** Esquema representativo de las relaciones entre haplotipos detectados en *Limonium perplexum* que corresponden a la planta 3 y sus descendientes. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. Los colores coinciden con los de la figura 20.



**Figura 26.** Esquema representativo de las relaciones entre los haplotipos detectados en *Limonium perplexum* que corresponden a la planta 4 y sus descendientes. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. Los colores coinciden con los de la figura 21.

### 4.3. Análisis citogenético de detección de variación somaclonal

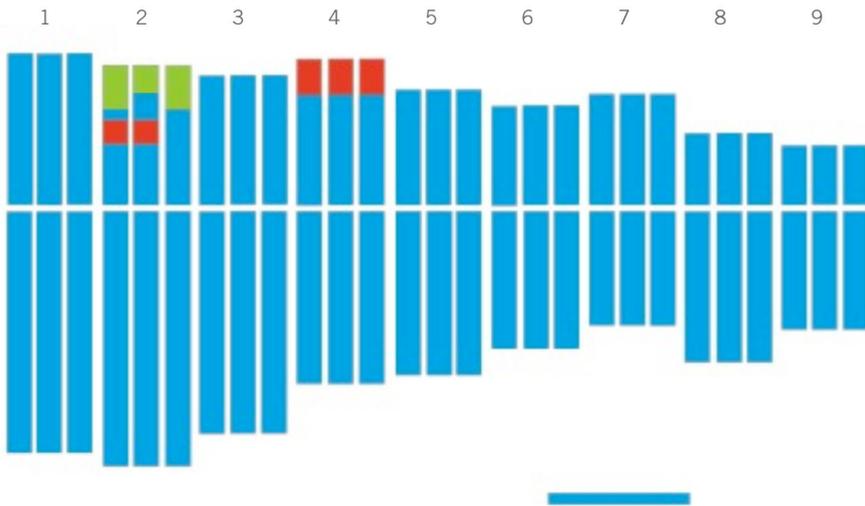
#### 4.3.1. Análisis del cariotipo de *Limonium perplexum* en plantas de origen silvestre

De acuerdo con el número de cromosomas *Limonium perplexum* es una especie triploide ( $2n=3x=27$ ; Figura 27) presentando su cariotipo 4 tripletes de cromosomas metacéntricos (4, 5, 6 y 7) y 5 tripletes de cromosomas submetacéntricos (1, 2, 3, 8 y 9). Estos resultados están en línea con los obtenidos previamente en especies triploides del género *Limonium* con número básico  $x=9$ , en cuyos cariotipos se observan los cromosomas homólogos en grupos de 3 (Castro y Rosselló 2007).

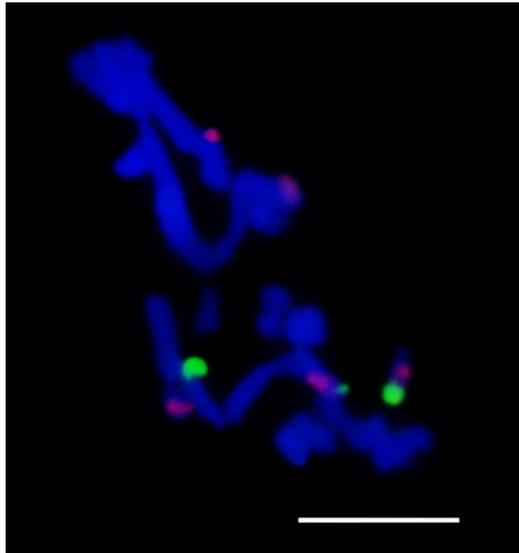
*Limonium perplexum* presenta cromosomas de pequeño tamaño que varían entre 3.1-7.3  $\mu\text{m}$  y cuyo valor medio es de 5.5  $\mu\text{m}$ . No se observaron constricciones secundarias ni satélites con la técnica de tinción empleada (DAPI).

Los análisis FISH revelaron que la familia multigénica de ADN ribosómico 45S se presenta en tres sitios de hibridación en los tres cromosomas submetacéntricos que componen el segundo triplete, en los brazos cortos y en posición terminal (Figura 27). Se aprecia una diferencia de tamaño de los sitios 45S, siendo uno de ellos de menor tamaño respecto a los otros dos. Estas observaciones se detectaron en metafases y en núcleos interfásicos (Figuras 28 y 29). Respecto a la familia multigénica de ADN ribosómico 5S se observaron cinco sitios de hibridación, de los cuales dos sitios se encuentran en dos de los cromosomas que componen el segundo triplete, siendo colineales con las señales de la familia 45S. Los restantes tres sitios de hibridación del ADN ribosómico se localizaron en el cuarto triplete de cromosomas metacéntrico.

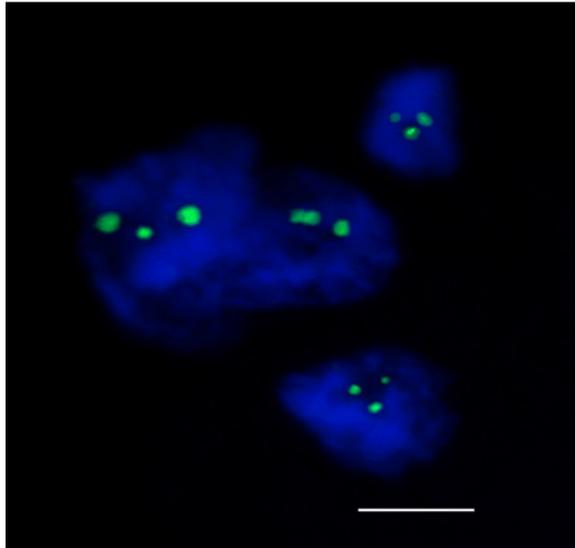
#### 4. Resultados



**Figura 27.** Idiograma de plantas silvestres de *Limonium perplexum* ( $2n = 3x = 27$ ). La hibridación *in situ* de las sondas heterólogas de ADN ribosomales (pTa71 y pTa794) revela la localización de las dos familias ribosomales multigénicas (45S rDNA y 5S rDNA, respectivamente), observándose tres sitios del cistron 45S (verde) en posición terminal del segundo triplete de cromosomas y 5 sitios de la familia 5S (rojo), dos de ellos en el segundo triplete de cromosomas y los tres restantes en el cuarto triplete. La escala representa 2.5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 28.** Hibridación fluorescente *in situ* en cromosomas en metafase de meristemas radiculares de *Limonium perplexum*. La hibridación *in situ* de las sondas heterólogas de ADN ribosomales (pTa71 y pTa794) revela la localización de las dos familias ribosomales multigénicas (45S rDNA y 5S rDNA, respectivamente), observándose tres sitios del cistrón 45S (fluorescencia verde) y 5 sitios de hibridación de la familia 5S (fluorescencia roja). La escala representa 10  $\mu$ m.



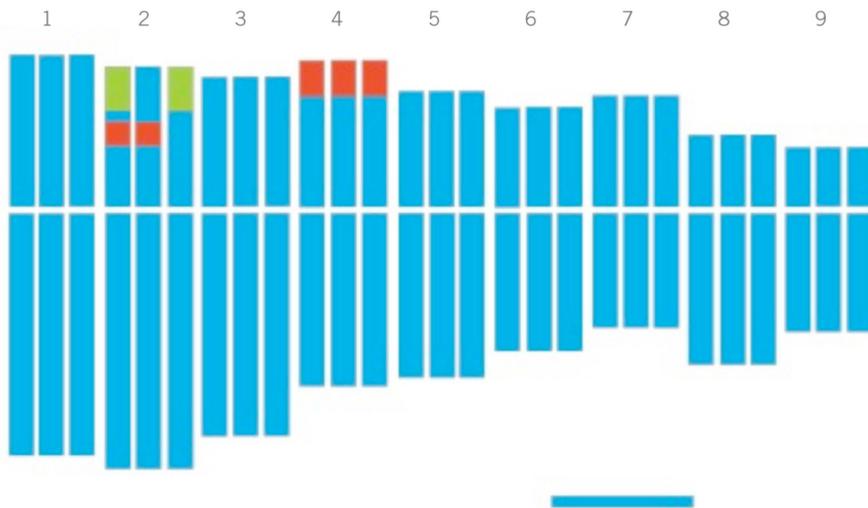
**Figura 29.** Hibridación fluorescente *in situ* en núcleos interfásicos de meristemas radiculares de la planta madre 2 de *Limonium perplexum*. La hibridación *in situ* de la sonda de ADN ribosomales (pTa71) revela la localización de tres sitios del cistrón 45S (fluorescencia verde). La escala representa 10  $\mu$ m.

### **4.3.2. Análisis del cariotipo de plantas obtenidas a partir de cultivo *in vitro* de *Limonium perplexum***

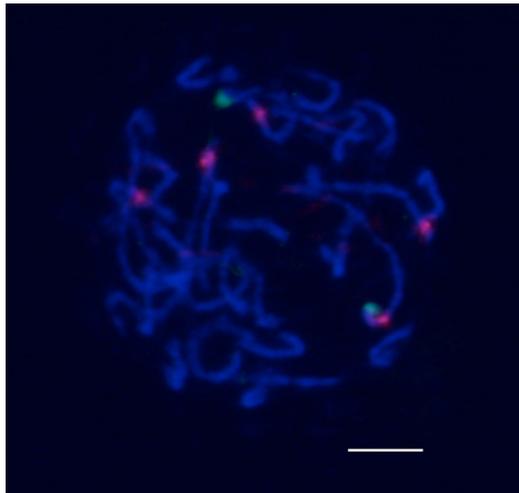
El número de cromosomas y la morfología del cariotipo de las plantas procedentes de cultivo *in vitro* (Figura 30) no presentó variación respecto al descrito en el apartado anterior (Figura 27).

Por el contrario, el análisis de FISH con las familias multigénicas ribosomales reveló un patrón diferente. La familia multigénica 5S reveló un número constante en el número de sitios y sus posiciones cromosómicas. En cambio, en la familia multigénica 45S se ha observado una variación en el número de sitios respecto a la población natural analizada en el apartado anterior, observándose dos sitios de hibridación de la familia multigénica 45S en lugar de tres en los cromosomas que componen el segundo triplete. En el idiograma se representa la pérdida de la familia multigénica 45S que corresponde al cromosoma portador de la familia multigénica 5S. Estas observaciones se detectaron en profases (Figura 31), en núcleos interfásicos y en metafases (Figuras 32, 33 y 34).

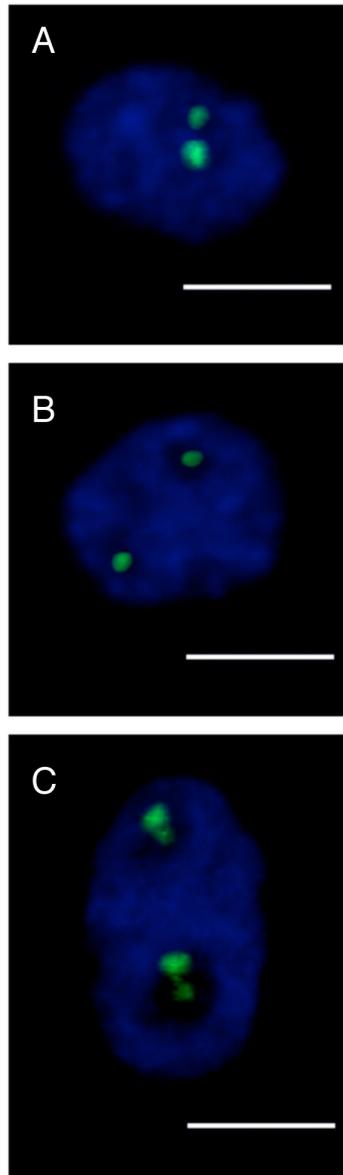
#### 4. Resultados



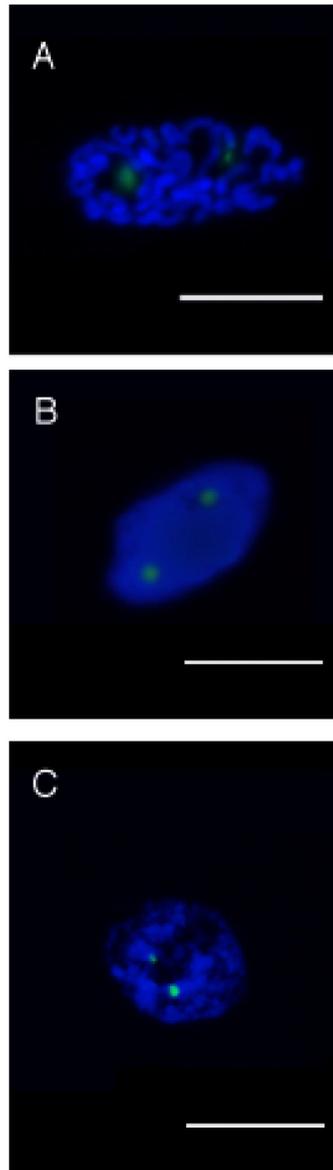
**Figura 30.** Idiograma de plantas obtenidas del cultivo *in vitro* de *Limonium perplexum*. La hibridación *in situ* de las sondas heterólogas de ADN ribosomales (pTa71 y pTa794) revela la localización de las dos familias ribosomales multigénicas (45S rDNA y 5S rDNA, respectivamente), observándose solo dos sitios del citrón 45S (verde) en posición terminal del segundo triplete de cromosomas y 5 sitios de la familia 5S (rojo), dos de ellos en el segundo triplete de cromosomas y los tres restantes en el cuarto triplete. La escala representa 2.5  $\mu\text{m}$ .



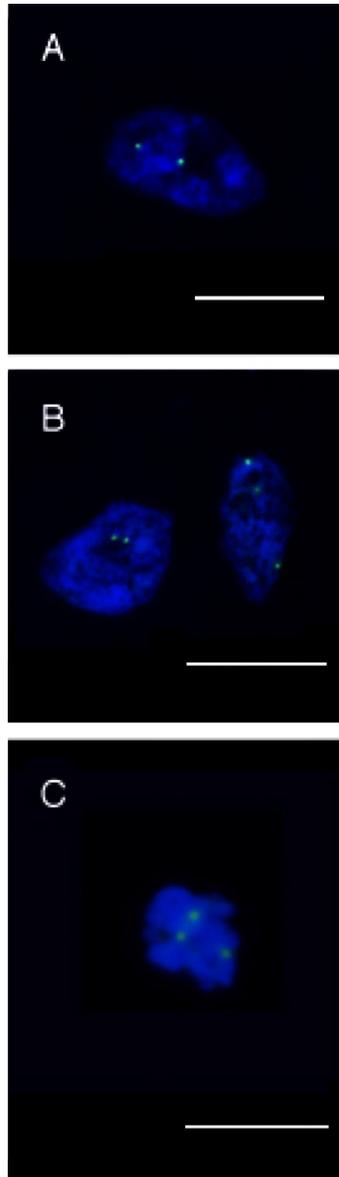
**Figura 31.** Hibridación fluorescente *in situ* en cromosomas en profase de meristemos radiculares de *Limonium perplexum* procedente de cultivo *in vitro* durante 12 meses. La hibridación *in situ* de las sondas heterólogas de ADN ribosomales (pTa71 y pTa 794) revela la localización de las dos familias ribosomales multigénicas (45S rDNA y 5S rDNA, respectivamente), observándose dos sitios del cistrón 45S (verde) y 5 sitios del gen 5S (fluorescencia roja). La escala representa 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 32.** (A), (B) y (C) Hibridación fluorescente *in situ* en núcleos interfásicos de meristemos radiculares de *Limonium perplexum* de cultivo *in vitro* durante 12 meses. La hibridación *in situ* de la sonda heteróloga de ADN ribosomales (pTa71) revela la localización de dos sitios del cistrón 45S (fluorescencia verde). La escala representa 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 33.** (A) Hibridación fluorescente *in situ* en cromosomas en metafase de meristemas radiculares de *L. perplexum* en cultivo *in vitro* durante 12 meses. La sonda heteróloga de ADN ribosomales (pTa71) revela la localización de dos sitios de hibridación del cistrón 45S (fluorescencia verde). (B) y (C) Hibridación fluorescente *in situ* en núcleos interfásicos de meristemas radiculares de *L. perplexum* en cultivo *in vitro* durante 12 meses. La escala representa 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 34.** (A), (B) y (C) Hibridación fluorescente *in situ* en núcleos interfásicos de meristemos radiculares de *Limonium perplexum* de cultivo *in vitro* durante 12 meses. La sonda heteróloga de ADN ribosomales (pTa71) revela la localización de dos sitios de hibridación del cistrón 45S (fluorescencia verde). La escala representa 10  $\mu$ m.

### 4.3.3. Análisis comparativo del cariotipo de *Limonium perplexum* de plantas de campo y el obtenido a partir de cultivo *in vitro*

**Tabla 11.** Resumen de datos del análisis del cariotipo de los individuos analizados mediante FISH. El color rojo representa las plantas madre y el color rosa las plantas de subcultivos *in vitro*. 2n= número de cromosomas.

Accesiones	2n	Nivel de ploidía (x)				Nº total de sitios 45S rDNA	Nº total de sitios 5S rDNA
<b>Planta Madre 2</b>	27	3x	2	1	3	3	5
Planta subcultivo 2.1	27	3x	1	1	3	2	5
<b>Planta Madre 3</b>	27	3x	2	1	3	3	5
Planta subcultivo 3.1	27	3x	1	1	3	2	5
Planta subcultivo 3.2	27	3x	1	1	3	2	5
<b>Planta Madre 4</b>	27	3x	2	1	3	3	5
Planta subcultivo 4.1	27	3x	1	1	3	2	5
Planta subcultivo 4.2	27	3x	1	1	3	2	5
Planta subcultivo 4.3	27	3x	1	1	3	2	5
Planta subcultivo 4.4	27	3x	2	1	3	3	5

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Propagación *in vitro* de *Limonium perplexum*

#### 5.1.1. Establecimiento *in vitro* de brotes

Una parte del éxito en los protocolos de propagación *in vitro* reside en el tipo de explante escogido para su establecimiento *in vitro* y el posterior estudio de multiplicación y enraizamiento.

El material vegetal seleccionado como explante debe ser un tejido donde el riesgo de contaminación sea mínimo, puesto que la contaminación inicial representa un serio problema para su establecimiento *in vitro*. Si a esto se le suma el hecho de que en ocasiones se trabaja con especies en peligro de extinción, como es la especie objeto de estudio en este trabajo, la contaminación inicial del material de partida cobra aún mayor importancia.

Por otra parte, cuanto menor sea el grado de destrozo de los individuos seleccionados menor será el impacto sufrido en la población original. Se debe tener en cuenta que todas las especies no sufren ni están expuestas al mismo riesgo de extinción, y por tanto este hecho conlleva a una máxima precaución en los protocolos de propagación de la especie atendiendo como uno de los puntos esenciales el material vegetal escogido para empezar con el protocolo.

En este trabajo, los cultivos se iniciaron a partir de segmentos nodales con yemas indiferenciadas localizadas en las partes basales de los escapos florales, las cuales llegaron a formar brotes *in vitro*. La ventaja que presentan los explantes de inflorescencia para el establecimiento *in vitro* es la fácil esterilización del material vegetal y la conservación de las plantas originales utilizadas para el estudio (Singh y Sehgal 1999). Por este motivo, los segmentos nodales se han descrito como el explante más adecuado para el establecimiento *in vitro* de algunas especies del género *Limonium*, como es el caso de *L. parvibracteatum* (Lledó *et al.* 1996a). La selección de este tipo de explante como material de partida se convierte en un material idóneo para llevar a cabo los estudios de propagación *in vitro* también en la especie aquí estudiada, *L. perplexum*.

Como hemos podido comprobar en este trabajo, las yemas en las partes basales de los escapos florales pueden producir brotes. Este hecho se ha observado en diferentes especies, incluso *in vivo* como por ejemplo

en *L. insigne*, *L. parvibracteam*, *L. santapolense* o *L. virgatum* (Lledó *et al.* 1995b).

En diferentes especies de *Limonium* se han hecho estudios de propagación a partir de diferente material de partida, por ejemplo es el caso de *L. estevei* (Martín y Pérez 1992) endemismo localizado en la franja costera noreste de la provincia de Almería (Gómez-Campo 1987), o de *L. dufourii*, *L. carthaginense*, *L. catalaunicum*, *L. dichotomum* o *L. gibertii* (Martín y Pérez 1995), en estos casos los estudios se iniciaron a partir de semilla.

Otro ejemplo de conservación de un *Limonium* endémico a partir de semillas es *L. thiniense* (Lledó *et al.* 1996). En este caso la propagación *in vitro* se inició a partir de unas pocas semillas obtenidas de algunos ejemplares conservados en el herbario la Universidad de Alicante.

Aparte de la utilización de semillas y segmentos nodales de inflorescencias se han establecido cultivos a partir de material adulto como son las yemas axilares de las rosetas adultas (Fay 1993), en unos casos a causa de la ausencia de semillas viables (*L. dendroides*), o en otros por tratarse de endemismos de muy reducida área de distribución (*L. arborescens*, *L. imbricatum* o *L. spectabile*). Su crecimiento en roseta adherida al suelo favorece el contacto con microorganismos del suelo en forma directa e indirecta (salpicaduras). Muchos hongos y bacterias, presentes generalmente sobre la superficie del vegetal en forma saprofítica, son depositados en el medio de cultivo junto con el material de propagación. Por este motivo en este caso el riesgo de contaminación es mayor y se tienen que extremar las condiciones de esterilización.

La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* para la conservación de especies amenazadas tiene como objetivo prioritario la obtención de cultivos con una buena tasa de multiplicación y alta tasa de viabilidad con protocolos de puesta a punto que puedan ser utilizados en el momento en que las especie pueda llegar a desaparecer. No se persigue la producción a gran escala, sino preservar la biodiversidad poblacional.

### 5.1.2. Multiplicación de los brotes *in vitro*

La elección de un medio de cultivo adecuado para mantener *stocks* de plantas en una fase de multiplicación representa un éxito en el protocolo de conservación.

Las citoquininas se utilizan frecuentemente para inducir la multiplicación de brotes *in vitro*, dado su efecto opuesto a la dominancia apical favorecida por auxinas (Cline 1994). La tasa de multiplicación de brotes se puede optimizar sustancialmente con la adición en el medio nutritivo de concentraciones apropiadas de citoquininas con o sin auxina (Bhojwani y Razdan 1996).

Las citoquininas generalmente se utilizan en bajas concentraciones para estimular la proliferación de tejidos y en concentraciones más elevadas para desencadenar la neoformación de yemas sobre callos (Margara 1988). En particular, se emplean usualmente citoquininas con ciertos sustituyentes en posición N<sup>6</sup> (Kin, BAP y 2iP) de forma que la molécula, aún siendo susceptible de conjugación y degradación en los tejidos vegetales, es especialmente resistente a la actividad citoquinina oxidasa (Strnad 1997).

En nuestro caso se utilizaron tres compuestos con actividad citoquinina: el regulador de crecimiento Kin y las hormonas BAP y 2iP. En cuanto a la viabilidad de los brotes con Kin y 2iP se alcanzaron valores comprendidos entre 70% y el 100%. Ese porcentaje disminuyó al 60% al utilizar BAP en concentraciones comprendidas entre 2.0 mg/l y 5 mg/l. Además, se produjeron ciertas anomalías en brotes con tratamientos con BAP conforme la concentración iba aumentando; casos similares ocurrieron con *L. sinuatum* (Harazy *et al.* 1985), *L. estevei* (Martín y Pérez 1992) y *L. thiniense* (Lledó 1996).

Los valores más elevados de la tasa de multiplicación o número de nuevos brotes por cluster se obtuvieron al utilizar Kin (2 ó 5 mg/l) o bien 2iP (5 mg/l) ó BAP (0.1 mg/l) sin diferencias significativas entre ellos. Se observó una estimable relación entre la multiplicación de los brotes y el nº de brotes con hojas mayores de 15 mm de longitud, aumentando ligeramente al ir aumentando la concentración de Kin o la de 2iP, y en cambio disminuyendo al ir aumentando la concentración de BAP. Por otra parte, el mantenimiento de cultivos en multiplicación con elevadas dosis de citoquininas puede inducir problemas de hiperhidratación en los cultivos (Böttcher *et*

al. 1988; Debergh *et al.* 1992; Phan 1991), problemas que se han observado en *L. dufourii* o *L. furfuraceum* (Lledó 1996).

Con estos resultados se consideró que el medio de cultivo más adecuado para la propagación de *L. perplexum* (combinando número de brotes totales y número de brotes mayores de 15 mm de longitud) es el medio MS suplementado con Kin a 2 mg/l. Se obtienen resultados de mayor nº de brotes que superan los 15 mm con Kin a 5 mg/l, pero el hecho de introducir concentraciones más altas de reguladores de crecimiento también puede conducir a otros tipos de problemas asociados. Por lo que el medio en el cual se almacenaron los cultivos de *L. perplexum* fue el seleccionado de Kin a 2 mg/l.

### 5.1.3. Enraizamiento *in vitro* y aclimatación

Otra parte del éxito en un plan de conservación *ex situ* y no menos importante reside en la fase de enraizamiento y la posterior aclimatación de la planta a las condiciones de invernadero y a más largo plazo en campo.

La especie estudiada en este trabajo, *L. perplexum*, enraizó sin problemas en un medio de cultivo MS carente de hormonas. Respecto a la adición exógena de las auxinas IBA y IAA utilizadas en estudio con el fin de promover el enraizamiento, se observaron porcentajes de enraizamiento del 80%-85%. En otras especies de este género *Limonium* se alcanzaron resultados similares con respecto al efecto causado por IBA y IAA en la inducción de las raíces *in vitro* (Lledó 1996). En nuestro caso, no se observaron diferencias significativas en los resultados de enraizamiento obtenidos (% de brotes enraizados, nº de raíces formadas y longitud de los brotes), en ninguno de los medios donde se utilizaron las citadas auxinas.

Aunque en este estudio el porcentaje de brotes enraizados se ha considerado como el parámetro más relevante, el proceso de enraizamiento se caracterizó también mediante el número de raíces y su longitud.

Se realizó también un control de frecuencia de aparición de las raíces a lo largo de un mes y se observó que a los 10, 14 y 21 días el incremento fue progresivo y a partir del día 21 el % de explantes enraizados se mantiene o aumenta sólo ligeramente.

Otro factor a tener en cuenta se debe a la atmósfera saturada de humedad que se origina dentro de los frascos de cultivo. Las plantas micropropagadas se caracterizan por tener una epidermis modificada y ausencia de ceras epicuticulares (Nashar 1989), por tanto, las plantas deben aclimatarsen gradualmente a las condiciones externas. Además esta fase es una de las más críticas y en muchos casos a la que menos atención se le presta. Una vez escogidas aquellas plántulas con las raíces lo suficientemente largas y sin callo basal se transfirieron a macetas que contenían vermiculita. Tras mantenerlas durante un período de un par de semanas en una atmósfera saturada de humedad (encerradas en bolsas de plástico), se fueron endureciendo las condiciones de humedad progresivamente, abriendo orificios en las bolsas, hasta que las plántulas pudieron sobrevivir fuera de ellas, aunque en condiciones controladas en la cámara de crecimiento. Así mismo, en el inicio de la fase de aclimatación las plantas de *L. perplexum* se mantuvieron bajo las mismas condiciones de fotoperiodo e intensidad de luz de la fase de enraizamiento, pues Van Huylbroeck y Debergh (1996) citan que un incremento brusco de la irradiancia puede inducir estrés añadido en la fase de aclimatación. Se consideró que las plántulas que iniciaban un crecimiento *ex vitro* (aparición de nuevas hojillas) habían superado la fase de aclimatación.

Un porcentaje muy elevado de plantas sobrevivieron, en torno al 90%. No se advirtieron cambios fenotípicos en ninguna de ellas, aunque en próximos estudios se podrían abordar controles para detectar la posible aparición de variación somaclonal en plantas de campo ya aclimatadas, procedentes de una antigua micropropagación.

### **5.2. La eficacia del cultivo *in vitro* en la conservación de las especies vegetales amenazadas**

El uso de las técnicas de cultivo *in vitro* en algunos casos es controvertido, particularmente en lo que se refiere a los posibles cambios genéticos (variación somaclonal) producidos a través de estos procesos (González y Martín 2011). Mientras algunos autores no recomiendan el uso de somaclones como propuestas de conservación y los consideran solo como ejemplos de posibles fuentes de componentes medicinales (Sarasan *et al.* 2006), otros autores han considerado que la inducción de una alta mutación puede contribuir en la recuperación de la diversidad genética (Bramwell 1990). En estos casos el

control de plantas regeneradas (a través de técnicas de detección de la inestabilidad genética) se ha convertido en un tema de gran interés.

Durante las últimas décadas, se han desarrollado protocolos de micropropagación en más de 60 especies endémicas y en peligro de extinción en todo el territorio español (González y Martín 2011). Por lo que acontece al género *Limonium*, se han desarrollado protocolos en las especies *L. estevei* (Martín y Pérez 1992), *L. giberti* (Martín y Pérez 1995), *L. rigualii* (Lledó *et al.* 1993b), *L. dufourii*, *L. parvibracteatum*, *L. rigualii* y *L. santapolense* (Lledó *et al.* 1993a), *L. fruticans*, *L. redivivum*, *L. rumicifolium*, y *L. spectabile* (Fay 1993).

La evaluación de la diversidad genética de una población es especialmente necesaria cuando la estrategia que se quiere llevar a cabo está centrada en la conservación *ex situ* del material de la planta, el cual debería ser el material representativo de la población natural de la misma planta (Frankel y Soulé 1981; Simberloff 1988). La mayoría de las investigaciones están de acuerdo en que la diversidad genética y su estructuración poblacional necesitan ser investigadas cuando las estrategias de conservación se estén desarrollando.

Se ha evaluado la diversidad genética en algunas especies endémicas y en peligro de extinción y han sido publicados en las últimas décadas estudios sobre las siguientes especies: *Betula pendula* subsp. *fontqueri* (Martín *et al.* 2008), *Senecio boissieri* (Peredo *et al.* 2009), *Silene sennenii* (López-Pujol *et al.* 2007), *Chlorophytum arundinaceum* (Lattoo *et al.* 2006), *Erodium paularense* (Martín *et al.* 1996), *Limonium dufourii* (Palacios y González-Candelas 1997a) y *Limonium perplexum* (Palacios y González-Candelas 1997b).

En el caso de que sean las técnicas de cultivo *in vitro* las que se utilicen como estrategia de conservación, la valoración de la diversidad genética del material de partida no solo garantiza la representación de la diversidad poblacional, sino que también puede ser un control de referencia. La incidencia de variación somaclonal debido a las condiciones de cultivo *in vitro* debe ser periódicamente revisada. No solo deberían ser consideradas las variaciones genéticas que aparecen durante los procesos de conservación del cultivo *in vitro*, sino también actuar en base a la selección de genotipos y en un mejor ajuste en las condiciones de conservación en el campo de la

propia especie. Cada método de conservación tiene sus propias ventajas y sus desventajas, por tanto es importante crear estrategias que integren diferentes medidas de conservación (Gonçalves *et al.* 2010). Si se habla en términos de conservación de las especies amenazadas, las semillas se convierten bajo condiciones estándar en la medida y método más eficiente (González y Martín 2011).

Sin embargo, la utilización de esta metodología no es siempre aplicable en muchos casos. Semillas de muchas especies de *Limonium* germinan pobremente y tienen su vida limitada (Hartmann *et al.* 1997). Este inconveniente y el hecho de que poblaciones de determinadas especies como es el caso que acontece a *Limonium perplexum* estén en peligro de extinción son los motivos por los que se recurre en la mayoría de casos a las técnicas de cultivo *in vitro*.

Mediante la utilización de marcadores genéticos RAPD ha sido evaluada la posible variación somaclonal en *L. estevei* y en *C. rigualii* en plantas regeneradas a través de la micropropagación (Martín y Pérez 1994; Martín *et al.* 1996). En el primer caso, no hubo variación somaclonal después de 2 años de realizar subcultivos mensuales. Sin embargo, después de 6 años en cultivo, brotes de *C. rigualii* derivados a partir de una línea de clon original mostraron marcadores diferentes de los paternos (Martín *et al.* 1996). Estos ejemplos muestran que la variación somaclonal puede ocurrir y todavía es necesario evaluar la estabilidad de las plantas obtenidas del cultivo *in vitro* en las diferentes fases del proceso, especialmente cuando la conservación genética es el objetivo de estas técnicas. Sólo algunos protocolos llevan incluidos estudios de estabilidad o inestabilidad genética mediante marcadores genéticos.

En la mayoría de estos estudios, la importancia de diversos análisis para establecer estrategias de conservación de la diversidad genética ya es un hecho. En algunas de las especies citadas anteriormente, como *Betula pendula* y *Narcissus longispathus*, se están llevando a cabo análisis genéticos de conservación (Martín *et al.* 2008; Barret *et al.* 2004). Para estos casos particulares, los procedimientos de micropropagación son llevados a cabo previamente a los análisis genéticos. Se espera que la proliferación en el uso de técnicas con marcadores moleculares facilite la combinación en el empleo de estos estudios con las estrategias de conservación. El uso

de marcadores moleculares no es solo importante para cuantificar grados de diversidad en y entre poblaciones, es también una medida para determinar la correcta identificación de especies que deberían ser consideradas para planes particulares de conservación

### **5.3. Magnitud de la variación somaclonal comparada con otras especies**

Hay diferentes técnicas moleculares que se han utilizado para detectar la variabilidad genética de *Limonium perplexum*. Entre ellas los RADP que han sido empleadas para estudiar los polimorfismos entre los individuos de una población y asimismo realizar estudios de variabilidad genética (Palacios y González-Candelas 1997b). Más tarde, los mismos autores trabajaron con marcadores moleculares AFLP y justificaron la baja variabilidad genética obtenida debido al sistema reproductivo que presenta esta especie (Palacios y González 1999). Ambos resultados fueron comparados y los marcadores AFLP resultaron representar índices de variabilidad más significativa que los marcadores RADP.

Posteriormente, el uso de marcadores microsátélites ISSR en diferentes especies del género *Limonium* proporcionó una buena técnica para investigar cuestiones de variabilidad genética, debido a su codominancia, multiallelismo y su alta naturaleza polimórfica (Palop *et al.* 2000). Los marcadores ISSR han sido aplicados en diferentes estudios a plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* y se ha podido detectar con eficiencia la ausencia o presencia de variación somaclonal. La estabilidad genética mediante esta técnica ha sido descrita en diferentes casos, por ejemplo, en plantas regeneradas de *Picea mariana* a partir de embriogénesis somática (Isabel *et al.* 1993), en micropropagación de brotes de *Zinziber rubens* (Mohanty *et al.* 2011) y *Prunus dulcis* (Martins *et al.* 2004). Sin embargo, la variación somaclonal también ha sido detectada mediante esta técnica en un número de especies, como por ejemplo en *Pinus pinea* (Cuesta *et al.* 2010), *Codonopsis lanceolata* (Guo *et al.* 2006b), *Musa spp* (Sahijram *et al.* 2003), *Humulus lupulus* (Patzak 2003), *Aloe vera* (Singh *et al.* 2011), *Linum usitatissimum* (Uysal *et al.* 2010).

En este trabajo, se han utilizado los marcadores ISSR, porque en comparación con otros marcadores como puede ser las AFLP y RFLP, tienen un menor coste y requiere menores cantidades de ADN (Zietkiewicz *et al.*

1994). Además, estos marcadores son altamente reproducibles y pueden llegar a ser más populares debido a su herencia dominante, alta abundancia en organismos, enorme diversidad alélica, así como por la facilidad de evaluación de la variación del tamaño de microsatélites mediante PCR (Li *et al.* 2002; Weising *et al.* 2005; Agarwal *et al.* 2008).

El presente estudio proporciona una primera información en las bases moleculares del polimorfismo detectado mediante marcadores moleculares ISSR en plantas micropropagadas de *L. perplexum*. Hemos utilizado los marcadores ISSR para evaluar la incidencia y la dimensión de los cambios genómicos en 144 ejemplares regenerados a partir de 4 plantas madre de *L. perplexum*. En las 4 plantas madre seleccionadas a partir de la única población existente se detecta el mismo haplotipo, pero a partir del primer subcultivo empieza a aparecer polimorfismo en sus descendientes. La amplificación mediante ISSR aparece como un método seguro en la determinación de la inestabilidad genética en etapas tempranas en el cultivo *in vitro* (Leroy *et al.* 2000). Los análisis ISSR produjeron un porcentaje de polimorfismo del 15.5% con 148 ejemplares. Análisis ISSR en estudios similares detectaron bajos porcentajes con 3.92% de polimorfismo en 21 individuos de plantas regeneradas *in vitro* de *Dictyospermum ovalifolium* (Chandrika *et al.* 2008) y 10.62% de polimorfismo en 42 individuos de *Robinia ambigua* (Guo *et al.* 2006a). Aparecen polimorfismo más altos de 15.72% en 64 individuos de plantas medicinales de *Codonopsis lanceolata* (Guo *et al.* 2006b) y 21.42% de polimorfismos en tres cultivares de banana (Ray *et al.* 2006).

Por lo que concierne a las secuencias envueltas en la observación de la variación, la presencia o ausencia de estos fragmentos específicos de ADN podrían deberse a la variación en secuencias cercanas que podrían verse modificadas de tal manera que desapareciera o apareciera una nueva banda.

En algunos casos (por ejemplo la banda de 1000 pb en el cebador IS09, Fig. 16), la variación se manifiesta como la pérdida de una banda en algunos ejemplares pero la adquisición de la misma banda en otros. Esto podría significar que el mismo locus está siendo sometido a un suceso mutacional y que los nuevos alelos originados ya estaban presentes en otras plantas del cultivo. Por consiguiente, algunos ejemplares presentaban

la banda y la mutación fue la causa de su ausencia y en otros casos, la mutación fue el origen de la nueva banda.

Paralelamente, el análisis citogénético realizado en nuestro trabajo mediante la aplicación de las técnicas FISH en plantas madre y plantas de cultivo *in vitro*, ha revelado una diferenciación en el patrón de distribución cromosómico de ambos tipos de ADN ribosomal nuclear. Respecto al gen 5S, hemos detectado aparentemente un número de copias y una localización similar en los ejemplares obtenidos del cultivo *in vitro* en *L. perplexum* indicando una conservación en la estructura del cariotipo respecto al gen 5S durante el proceso del cultivo *in vitro*. En contraste, el número de locus 18S-5.8S-26S es variable y se ha identificado la pérdida de uno de los tres locus del cistrón ribosomal mediante FISH durante el periodo de cultivo *in vitro*.

De esta manera hemos observado que la reorganización genómica durante la regeneración en cultivo *in vitro* ha sido más dinámica para el cistrón 45S que para la familia 5S. De este modo, la variación en el número de locus 45S no se encuentra asociada a la constancia observada en los locus 5S sugiriendo que podrían poseer tendencias o respuestas independientes a la presión originada en proceso del cultivo *in vitro*.

La variación en el número y la estructura de los cromosomas ha sido observada entre somaclones obtenidos del cultivo *in vitro* (Al-Zahim *et al.* 1999; Hao y Deng 2002; Mujib *et al.* 2007). Diferentes autores han considerado que las reestructuraciones cromosómicas observadas durante el cultivo *in vitro* podrían deberse a efectos durante la replicación del ADN. Alguna perturbación que afecte a la sincronización entre la replicación del cromosoma durante la fase S (síntesis de ADN) y la división celular probablemente resultaría en una irregularidad en el cromosoma. Porque las regiones de heterocromatina replican más tarde que los segmentos de eucromatina y su integridad debe ser particularmente vulnerable a las fluctuaciones en el ciclo (Lee y Phillips 1988).

En diferentes géneros de plantas, la variabilidad en el número y la localización de los genes ribosomales está ampliamente observada. Además, en estos estudios diferentes mecanismos han sido propuestos que pueden estar implicados: reordenamientos en la estructura del cromosoma (inver-

sión y/o translocación), movilidad del ADNr (transposición, o un desigual entrecruzamiento entre homólogos).

Más allá, diferentes datos en relación a una o más de las hipótesis sobre los mecanismos parecen estar implicados en la evolución patrón de ADNr asociado a la reestructuración del genoma de grupos diferentes de plantas (Schubert y Wobus 1985; Dubcovsky y Dvořák 1995; Raskina *et al.* 2004; Datson y Murray 2006; Lysak *et al.* 2006; Pedrosa-Harand *et al.* 2006; Weiss-Schneeweiss *et al.* 2007; Raskina *et al.* 2008; Weiss-Schneeweiss *et al.* 2008).

Son escasos los estudios que analizan la distribución cromosómica de las familias multigénicas durante el cultivo in vitro de tejidos, indicando que en condiciones de cultivo ocurren variación o reorganización en el genoma del ADN ribosomal.

## 6. CONCLUSIONES

### Primera

En este trabajo se describe un protocolo para la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de brotes de *Limonium perplexum*, una especie ibérica muy localizada y en peligro de extinción. En la fase de multiplicación, el porcentaje de viabilidad del material vegetal utilizado resultó en general elevado, situándose en la mayoría de los medios de cultivo usados entre el 70% y el 95%. Las tasas de multiplicación de brotes más elevadas (entre 9.3 y 10.2 brotes por cluster) se obtuvieron en el medio salino MS a concentraciones de BAP (0.1 mg/l) o de 2iP (5 mg/l) o bien de Kinetina a 2 mg/l ó 5 mg/l, sin diferencias significativas en ningún caso.

### Segunda

En la fase de enraizamiento, el porcentaje de brotes enraizados a los 21 días alcanzó el 85% en medio MS con IAA (0.5 mg/l). En la cuarta semana, el mismo porcentaje de enraizamiento se obtuvo en los brotes cultivados en medio MS sin auxinas. Independientemente del medio de cultivo utilizado (MS solo o suplementado con IBA o con IAA a 0.1 ó 0.5 mg/l) no hubo diferencias significativas en los parámetros de enraizamiento utilizados (porcentaje de brotes enraizados, nº de raíces formadas ni en la longitud que los brotes alcanzaron en el medio de enraizamiento). Las plantas enraizadas y transferidas a condiciones *ex vitro* sobrevivieron en un porcentaje del 90%.

### Tercera

Los análisis con marcadores moleculares ISSR se han revelado como un método eficiente para la identificación de la variación somaclonal en plantas regeneradas en *L. perplexum*. Las mutaciones detectadas sugieren diferencias en el genoma rápidamente identificables por este tipo de marcadores. De acuerdo con los resultados obtenidos, se ha obtenido un grado de polimorfismo del 15.5% en los ejemplares regenerados mediante la técnica del cultivo *in vitro* y se detecta variación somaclonal en la etapas tempranas de los subcultivos.

### **Cuarta**

Hemos obtenido que el número de loci del gen 5S de ADN ribosomal nuclear se conserva a lo largo de un año mediante las técnicas de cultivo *in vitro* en los ejemplares de *L. perplexum*. Por el contrario un locus del cistrón 18S-5.8S-26S de ADN ribosomal nuclear se ha perdido durante el mismo período. Este hecho se ha revelado como una respuesta a las condiciones del empleo de las técnicas del cultivo *in vitro*.

### **Quinta**

La gran mayoría de las estrategias y planes de conservación que se llevan a cabo en plantas que se encuentran en peligro de extinción y que impliquen la puesta en marcha de un protocolo de cultivo *in vitro* deberían ir asociadas a análisis de variación somaclonal integrados mediante marcadores moleculares y citogenéticos. El conocimiento genómico de la especie y su comportamiento como respuesta al establecimiento de estas condiciones puede aportar la información necesaria para saber qué estrategia es la más adecuada para ser aplicada. Estos hechos quedan confirmados para el caso particular de *L. perplexum*.

## 7. REFERENCIAS

- Abbas H y Qaiser M (2010) *In vitro* conservation of *Cadaba heterotricha* stocks, an endangered species in Pakistan. *Pak. J. Bot.* **42**: 1553-1559.
- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW y Leitch AR (2000) Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (*Asphodelaceae*). *American J. Bot.* **87**: 1578-1583.
- Agarwal M, Shrivastava N y Padh H (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* **27**: 617-631.
- Al-Zahim MA, Ford-Lloyd BV y Newbury HJ (1999) Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Rep.* **18**: 473-477.
- Amoo SO, Finnie JF y Van-Staden J (2009) *In vitro* propagation of *Huernia hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **96**: 273-278.
- Amo-Marco JB y Lledó MD (1996) *In vitro* propagation of *Salix tarraconensis* Pau ex Font Quer, an endemic and threatened plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **32**: 42-46.
- Amo-Marco JB y Ibáñez MR (1998) Micropropagation of *Limonium cavanillesii* Erben, a threatened statice, from inflorescence stems. *Plant Growth Regul.* **24**: 49-54.
- Ansari HA, Ellison NW, Reader SM, Badaeva ED, Friebe B, Miller TE y William WM (1999) Molecular cytogenetic organization of 5S and 18S rDNA loci in white clover (*Trifolium repens* L.) and related species. *Ann. Bot.* **83**: 199-206.
- Badaeva ED, Friebe B y Gill BS (1996) Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species. *Genome* **39**: 293-306.
- Bairu MW, Aremu AO y Staden JV (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* **63**: 147-173.
- Barret SCH, Cole WW y Herrera CM (2004) Matting patterns and genetic diversity in the wild Daffodil *Narcissus longispathus* (*Amaryllidaceae*). *Heredity* **92**: 459-465.
- Bennici A, Anzidei M y Vendramin GG (2004) Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Sci.* **166**: 221-227.
- Berjano R, Roa F, Talavera S y Guerra M (2009) Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristo lochia* (*Aristolochiaceae*) species based on distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. *Plant Syst. Evol.* **280**: 219-227.
- Bon MC, Bonal D, Goh DK y Monteuis O (1998) Influence of different macronutrient solutions and growth regulators on micropropagation of juvenile *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **53**: 171-177.
- Böttcher I, Zoglauer K y Göring H (1988) Induction and revision of vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* **72**: 560-564.
- Bouharmont J (1994) Application of somaclonal variation and *in vitro* selection to plant improvement. *Acta Hort.* **355**: 213-331.

## 7. Referencias

- Bouman H y De Klerk GJ (2001) Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. *Theor. Appl. Genet.* **102**: 111-117.
- Bhojwani S y Razdan M (1996) Plant tissue culture: Theory and practice, a revised edition. *Elsevier Science*. Netherlands.
- Bramwell D (1990) The role of *in vitro* cultivation in the conservation of endangered species. In Hernández-Bermejo JE, Clemente M y Heywood V (Ed.) *Conservation Techniques in Botanic Gardens*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books **52**: 3-15.
- Brar DS y Jain SM (1998) Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (eds) Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*. 15-37.
- Bryant JA (1976) The cell cycle. In: Bryant JA (ed) Molecular aspect of gene expression in plants. Academic Press, New York. 117-216.
- Capuana M y Giannini R (1997) Micropropagation of young and adult plants of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *J. Hortic. Sci.* **72**: 453-460.
- Castro M y Rosselló JA (2007) Karyology of *Limonium* (*Plumbaginaceae*) species from the Balearic Islands and the western Iberian Peninsula. *Bot. J. Linnean Society* **155**: 257-272.
- Cervera MT y Simón L (2000) Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Departamento de Genética Molecular de Plantas. Centro Nacional de Biotecnología, CSIC. Campus de la Universidad Autónoma de Madrid.
- Chandrika M, Thoyajaksha, Ravishankar Rai V y Ramachandra Kini K (2008) Assessment of genetic stability of *in vitro* grown *Dictyospermum ovalifolium*. *Biol. Plant.* **52**: 735-739.
- Chester M, Leitch AR, Soltis PS y Soltis DE (2010) Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). *Genes* **1**: 166-192.
- Clement M, Posada D y Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**: 1657-1659.
- Clemente M, Contreras P, Susín J y Pliego-Alfaro F (1991) Micropropagation of *Artemisia granatensis*. *Hort Science* **26**: 420-423.
- Cline MG (1994) The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiol. Plant.* **92**: 601-607.
- Cousson A y Tran Thanh Van K (1992) Influence of ionic composition of the culture medium on *de novo* flower formation in tobacco thin cell layers. *Can. J. Bot.* **71**: 506-511.
- Crespo MB (1992) Las especies valencianas del género *Limonium* Miller (*Plumbaginaceae*). Memoria final del convenio de investigación nº 002/91. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana.
- Crespo MB y Lledó MD (1998) A new species of *Limonium* Mill. (*Limoniaceae*) from

- Spain. Bot. J. Linn. Soc.
- Cuenca S, Amo-Marco JB y Parra R (1999) Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk. (*Compositae*). *Plant Cell Rep.* **18**: 674-679.
- Cuenca S y Amo-Marco JB (2000) *In vitro* propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems. *Plant Growth Regul.* **30**: 99-103.
- Cuesta C, Ordás RJ, Rodríguez A y Fernández B (2010) PCR-based molecular markers for assessment of somaclonal variation in *Pinus pinea* clones micropropagated *in vitro*. *Biol. Plant.* **54**: 435-442.
- D'Amato F (1977) Cytogenetics of differentiation in tissue and cell culture. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds) Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. *Springer, New York*. 333-348.
- Datson PM y Murray BG (2003) The use of *in situ* hybridization to investigate plant chromosome diversity. *Plant Genome: Biodiversity and Evolution* **1**: 298-318.
- Datson PM y Murray BG (2006) Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research* **14**: 845-857.
- De Oliveira Y, Pinto F, Lopes da Silva AL, Guedes I, Biasi LA y Quoirin M (2010) An efficient protocol for micropropagation of *Melaleuca alternifolia* Cheel. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **46**: 192-197.
- Debergh P, Aitken-Christie J y Cohen D (1992) Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **30**: 135-140.
- Dolcher T y Pignatti S (1971) Un'ipotesi sull'evoluzione dei *Limonium* del Bacino del Mediterraneo. *Giornale Botanico Italiano* **105**: 95-107.
- Doyle JJ y Doyle JS (1990) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phy. Bull.* **19**: 11-15.
- Dubcovsky J y Dvorák J (1995) Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the *Triticeae* genomes. *Genetics* **140**: 1367-1377.
- Ellstrand NC y Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size. Implications for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **24**: 217-242.
- Erben M (1979) Karyotype differentiation and its consequences in mediterranean *Limonium*. *Webbia* **34**: 409-417.
- Erben M (1993) *Limonium* Miller. In: Castroviejo S et al (Eds). *Flora Ibérica*. **4**. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- Falistocco E, Torricelli R y Falcinelli M (2002) Genomic relationships between *Medicago murex* Willd. and *Medicago lesinsii* E. Small. investigated by *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* **105**: 829-833.
- Falk DA y Holsinger K (1991) Genetics and conservation of rare plants. *Oxford University Press, New York*.
- Fay MF (1992) Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In*

## 7. Referencias

- Vitro Cell. Dev. Biol.* **3**: 1-4.
- Fay MF (1993) Micropropagation of plants from the Canary Islands. *Bol. Mus. Mun. Funchal.* **2**: 85-86.
- Fay MF (1994) In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiv. Conserv.* **3**: 176-183.
- Fay MF, Bunn E y Ramsay MM (1999) *In vitro* propagation. *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Bowes BG: 97-107.
- Ferrer P, Albert F, Arregui JM, Escribá MC, Ferrando I, García X, Juárez JA, Martínez F, Martínez V, Navarro A, Navarro L, Piera M y Laguna E (2011) *Frangula alnus* subsp. *baetica*, conservación en la Comunidad Valenciana. *Boletín de la Sociedad Española de Biología de la Conservación* 15: 14-15.
- Figuerola DM y Bass HW (2010) A historical and modern perspective on plant cytogenetics. *Briefings in Functional Genomics* **2**: 95-102.
- Frankel OH y Solulé ME (1981) Conservation and evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frello S y Heslop-Harrison JS (2000) Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (*Iridaceae*) investigated by *in situ* hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. *Ann. Bot.* **86**: 317-322.
- Fukuda H, Ito M, Sugiyama M y Komamine A (1994) Mechanisms of the proliferation and differentiation of plant cells in cell culture systems. *Int. J. Dev. Biol.* **38**: 287-299.
- Ganeshan D, Fautrier AG y Conner AJ (1998) A cell culture system for somatic cell selection in *Asparagus*. *Plant Tissue Culture Biotechnol.* **4**: 104-112.
- Geffen E, Luikart G y Waples S (2007) Impacts of modern molecular genetic techniques on conservation biology. In; MacDonald D y Service K (eds) Key topics in conservation biology. Blackwell, Oxford.
- George I y Eapen S (1990) High frequency plant-regeneration through direct shoot development and somatic embryogenesis from immature inflorescence cultures of finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn). *Euphytica* **48**: 269-274.
- Gerlach WL y Bedbrook JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1869-1885.
- Gerlach WL y Dyer TA (1980) Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **8**: 4851-4855.
- Gómez-Campo C (1987) Libro rojo de especies vegetales amenazadas de España peninsular e Islas Baleares. ICONA. M de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Gonçalves S, Fernandes L y Romano A (2010) High-frequency *in vitro* propagation of the endangered species *Tuberaria major*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **101**: 359-363.
- González-Benito ME y Martín C (2011) *In vitro* preservation of Spanish Biodiversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **47**: 46-54.
- González M, Medina MA, Medina M y Palomares G (2009) Identificación y selección

- de marcadores moleculares Inter-microsatélite (ISSR) para la diferenciación varietal en *Capsicum annuum* L. Universidad Politécnica de Valencia.
- Gostimsky SA, Kokaeva ZG y Konovalov FA (2005) Studying plant genome variation using molecular markers. *Russian Journal of Genetics* **41**: 378-388.
- Goto S, Thakur RC y Ishii K (1998) Determination of genetic stability in long-term micropropagation shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. *Plant Cell Rep.* **18**: 193-197.
- Guerra M (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet. Genome Res.* **120**: 339-350.
- Guo B, Gao M y Liu C-Z (2007) *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucreta* Kar. et Kir. *Plant Cell Rep.* **26**: 261-265.
- Guo W, Yidan L, Gong L, Fengxia L, Yingsham D y Bao L (2006a) Efficient micropropagation of *Robinia ambigua* var. *idahoensis* (Idaho Locust) and detection of genomic variation by ISSR markers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **84**: 343-351.
- Guo W, Yidan L, Gong L, Fengxia L, Yingsham D y Bao L (2006b) Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook.f., as revealed by ISSR and RAPD markers. *Plant Cell Rep.* **25**: 896-906.
- Hamrick JL (1983) The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: Schonewald-Cox CM, Chambers SM, MacBryde B y Thomas WL (eds). Benjamin-Cummings, Menlo Park. *Genetics and conservation*. 335-348.
- Hannweg K, Watt MP y Berjak P (1996) A simple method for the micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **37**: 213-218.
- Hans de Jong J, Fransz P y Zabel P (1999) High resolution FISH in plants –techniques and applications. *Trends in Plant Science* **4**: 258-263.
- Hao YJ y Deng XX (2002) Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured *Citrus* callus. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **38**: 472-476.
- Harazy A, Leshem B y Cohen A (1985) *In vitro* propagation of statice as an aid to breeding. *Hort Science* **20**: 361-362.
- Hartmann TH, Kester DE, Davies FT y Geneve RL (1997) Plant Propagation: Principles and Practices. *Prentice-Hall International*, London.
- Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M, Kowalczyk M, Kulak-Ksiazczyk S, Heneen WK y Maluszynska J (2006) Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of *Brassicaceae*. *Ann. Bot.* **97**: 205-216.
- Hasterok R, Jenkins G, Langdon T y Jones RN (2001) Ribosomal DNA is an effective marker of *Brassica* chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 486-490.
- Heslop-Harrison JS (Pat) (2000) RNA, genes, genomes and chromosomes: repetitive DNA sequences in plants. *Chromosomes Today* **13**: 45-53.
- Holsinger KE y Gottlieb L (1991) Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. *Genetics and Conservation of Rare Plants* **13**: 198-199.

## 7. Referencias

- Howell EC, Kearsey MJ, Jones GH, King GJ y Armstrong SJ (2008) A and B genome identification in *Brassica napus* by sequential fluorescence in hybridization and genomic *in situ* hybridization. *Genetics Society of America* **180**: 1849-1857.
- Höxtermann E (1997) Cellular “elementary organisms” *in vitro*. The early vision of Gottlieb Haberlandt and its realization. *Physiol. Plant.* **100**: 716-728.
- Hüseyin U, Yong-Bi F, Orhan K, Gregory WP, Diederichsen A y Peter K (2010) Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) and its wild progenitor pale flax (*Linum bienne* Mill.) as revealed by ISSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* **57**: 1109-1119.
- Ibáñez MR y Amo-Marco JB (1998) Promotion by phloroglucinol of micropropagation of *Minuartia valentina*, an endangered and endemic Spanish plant. *Plant Growth Regul.* **26**: 49-56.
- Iriondo JM y Pérez C (1990) Application of *in vitro* culture techniques to the conservation of Iberian endemic endangered plant species. *Bot. Gard. Micropropag. News* **1**: 4-6
- Iriondo JM y Pérez C (1992) *In vitro* plant regeneration of *Lavatera oblongifolia* (Malvaceae), an endangered species. *Bot. Gard. Micropropag. News* **1**: 54- 57.
- Iriondo JM y Pérez C (1996) Micropropagation and *in vitro* storage of *Centaureum rigualii* Esteve (Gentianaceae). *Israel J. Plant Sci.* **44**: 115-123.
- Iriondo JM (2001) Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* **16**: 100-110.
- Isabel N, Tremblay L, Michaud M, Tremblay FM y Bousquet J (1993) RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Theor. Appl. Genet.* **86**: 81-87.
- Israeli Y, Ben-Bassat D y Reuveni O (1991) Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. *Sci. Hortic.* **48**: 71-88.
- Israeli Y, Ben-Bassat D y Reuveni O (1996) Selection of stable banana clones which do not produce dwarf somaclonal variants during *in vitro* culture. *Sci. Hortic.* **67**: 197-205.
- Jain SM (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* **118**: 153-166.
- Jin S, Mushke R, Zhu H, Tu L, Lin Z, Zhang Y y Zhang X (2008) Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Rep.* **27**: 1303-1316.
- Karp A (1995) Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* **85**: 295-302.
- Kovarik A, Dadejova M, Yoong L, Chase MW, Clarkson JJ, Knapp S y Leitch AR (2008) Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: A potential link between rDNA homogenization and epigenetics. *Ann. Bot.* **101**: 815-823.
- Kulak S, Hasterok R y Maluszynska J (2002) Karyotyping of *Brassica amphidiploids* using 5S and 25S rDNA as chromosome markers. *Hereditas* **136**: 144-150

- Kunitake H y Mii M (1990) Plant regeneration from cell cultured-derived protoplasts of statice (*Limonium perezii* Hubbard). *Plant Sci.* **70**: 115-119.
- Laguna E (1994) Introducción. pp. 13-27 in Aguilera A *et al.* Flora vascular rara, endémica o amenazada de la Comunidad Valenciana. *Consellería de Medio Ambiente, Generalitat Valenciana*.València.
- Laguna E (1996) Conservación *in situ* de la flora mediante microrreservas en la Comunidad Valenciana. *Real Soc. Esp. His. Nat.* Tomo Extraordinario 125 aniversario: 385-387.
- Laguna E, Deltoro V, Pèrez-Botella J, Pèrez-Rovira P, Serra L, Olivares A y Fabregat C (2004) The role of small reserves in plant conservation in a region of high diversity in eastern Spain. *Conselleria de Territori i Habitatge, València, Spain*.
- Larkin P y Scowcroft W (1981) Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**: 197-214.
- Latto SK, Bamotra S, Sapru Dhar R, Khan S y Dhar AK (2006) Rapid plant regeneration and analysis of genetic fidelity of *in vitro* derived plants of *Chlorophytum arundinaceum* Baker-an endangered medicinal herb. *Plant Cell Rep.* **6**: 499-506.
- Lee M y Phillips RL (1988) The Chromosomal basis of somaclonal variation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**: 413-437.
- Leroy X, León K y Branchard M (2000) Plant genomic instability detected by microsatelliteprimers. *E.J. of Biotechnology* **3**: 0717-3458.
- Letham D y Gollnow B (1985) Regulators of cell division in plant tissues. Cytokinin metabolism in relation to radish cotyledon expansion and senescence. *Plant Growth Regul.* **4**: 129-145.
- Levan A, Fredga K y Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**: 201-220.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A y Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* **11**: 2453-2465.
- Li X, Yu X, Wang N, Feng Q, Dong Z, Liu L, Shen J y Liu B (2007) Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link) *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **90**: 153-168.
- Linacero R, Freitas E y Vázquez AM (2000) Hot spots of DNA instability revealed the study of somaclonal variation in rye. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 506-511.
- Lledó MD, Crespo MB y Amo-Marco JB (1993a) Preliminary remarks on micropropagation of threatened *Limonium* species (*Plumbaginaceae*). *Bot. Gard. Micropropag. News* **10**: 72-74.
- Lledó MD, Martínez-Cortina C y Amo-Marco JB (1993b) Comparación entre distintas técnicas para medir el crecimiento *in vitro* de una planta rosulada (*Limonium rigualii* MB Crespo y Erben). Ed. Ministerio de Agricultura y pesca. Madrid. *II Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas* **2**: 960-965.
- Lledó MD, Crespo MB y Amo-Marco JB (1994) Effect of cytokinins on *in vitro* mul-

## 7. Referencias

- tiplication of three threatened species of *Limonium* (*Plumbaginaceae*) from the Valencian Community (Spain). VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, S2-68. Firenze, Italy.
- Lledó MD, Crespo MB y Amo-Marco JB (1995a) *In vitro* multiplication of *Vella lucentina* MB Crespo (*Brassicaceae*), a threatened Spanish endemic species. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **31**: 199-201.
- Lledó MD, Crespo MB y Amo-Marco JB (1995b) *Ex situ* conservation of threatened *Limonium* species (*Plumbaginaceae*) by using *in vitro* culture. Congreso Planta-Europa. Hyères. Francia.
- Lledó MD (1996) Sistemática molecular de la familia *Plumbaginaceae*. Conservación de especies endémicas de *Limonium* en la Comunidad Valenciana. Tesis Doctoral (inéd.). Universidad de Alicante.
- Lledó MD, Crespo MB y Amo-Marco JB (1996) Micropropagation of *Limonium thiniense* Erben (*Plumbaginaceae*) using herbarium material. *Bot. Gard. Micropropag. News* **2**: 18-21.
- Lledó MD, Crespo MB, Fay MF y Chase MW (2001) Phylogenetic position and taxonomic status of the genus *Aegialitis* and subfamilies *Staticoideae* and *Plumbaginoideae* (*Plumbaginaceae*): evidence from plastid DNA sequences and morphology. *Plant Syst. Evol.* **229**: 107-124.
- Lledó MD, Crespo MB, Fay MF y Chase MW (2005) Molecular phylogenetics of *Limonium* and related genera (*Plumbaginaceae*). *American J. Bot.* **92**: 1189-1198.
- Llorens L, Tébar FJ y Gil L (1992) Sobre la corología del género *Limonium* Miller en las Islas Baleares. *Itinera Geobot.* **6**: 237-245.
- López-Pujol J, Font J, Simon J y Blanche C (2007) Can the preservation of historical relicts permit the conservation of endangered plant species? The case of *Silene sennenii* (*Cariophyllaceae*). *Conserv. Genet.* **8**: 903-912.
- Lynch PT (1999) Tissue culture techniques *in vitro* plant conservation. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Benson: 41-62.
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K y Schubert I (2006) Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related *Brassicaceae* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 5224-5229.
- Margara J (1988) Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Ed. Mundi-Prensa.
- Martín C y Pérez C (1992) Multiplicación *in vitro* of *Limonium estevei* Fdez. Casas. *Ann. Bot.* **70**: 165-167.
- Martín C y Pérez C (1994) The use of RAPD to determine the genetic variability of micropropagated plants from endangered species. Application to the Spanish endemism *Limonium estevei*. *Phyton* **56**: 65-72.
- Martín C y Pérez C (1995) Micropropagation of five endemic species of *Limonium* from the Iberian Peninsula. *J. Hortic. Sci.* **70**: 97-103.
- Martín C, Torres E, Iriondo JM y Pérez C (1996) Utilización de marcadores molecu-

- lares para la detección de variación somaclonal. *Proceedings of the IV Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas*, Santa Clara, Cuba, pp 84-86.
- Martin K, Pachathundikandi S, Zhang C, Slater A y Madassery J (2006) RAPD analysis of variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande naine and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **42**: 188-192.
- Martín C, Parra T, Clemente-Muñoz M y Hernández-Bermejo JE (2008) Genetic diversity and structure of the endangered *Betula pendula* subsp. fontqueri populations in the South of Spain. *Silva Fenica.* **42**: 487-498.
- Martins M, Sarmento D y Oliveira MM (2004) Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep.* **23**: 492-496.
- Mehta YR y Angra DC (2000) Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids. *Genet. Mol. Biol.* **23**: 617-622.
- Mohanthy S, Panda MK, Sahoo S y Nayak S (2011) Micropropagation of *Zingiber rubens* and assessment of genetic stability through RADP and ISSR markers. *Biol. Plant.* **55**: 16-20.
- Molnár I, Cifuentes M, Schneider A, Benavente E y Molnár-Láng M (2011) Association between simple sequence repeat-rich chromosome regions and intergenomic translocation breakpoints in natural populations of allopolyploid wild wheats. *Ann. Bot.* **107**: 65-76.
- Moreno JC, coord (2008) Lista Roja 2008 de flora vascular española. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino-Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas, Madrid.
- Morte MA, Honrubia M y Piqueras A (1992) Micropropagation of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (*Cupressaceae*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **28**: 231-233.
- Moura M, Candeias MN y Silva L (2009) *In vitro* propagation of *Viburnum treleasei* Gand., an azorean endemic with high ornamental interest. *Hort Science* **44**: 1668-1671.
- Mujib A, Banerjee S y Dev Ghosh P (2007) Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture-raised hippeastrum (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations). *Propag. Ornam. Plants* **7**: 169-174.
- Mukai Y, Endo TR y Gill BS (1991) Physical mapping of the 18.26S ribosomal RNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. *Chromosoma* **100**: 71-78.
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 474-478.
- Nashar L (1989) Micropropagation. *Australian J. Biotech.* **3**: 288-289.
- Oono K (1985) Putative homozygous mutations in regenerated plants of rice. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 377-384.
- Ortega C y González C (1985) Contribución a la conservación *ex situ* de especies cana-

## 7. Referencias

- rias en peligro: propagación *in vitro* de *Senecio hermosae* Pitard. *Bot. Macarones.* **14**: 59-72.
- Ortiz JM, Aguinagalde I y Martín JP (2000) Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia.
- Palacios C y González-Candelas F (1997a) Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (*Plumbaginaceae*). *Mol. Ecol.* **6**: 1107-1121.
- Palacios C y González-Candelas F (1997b) Lack of genetic variability in the rare and endangered *Limonium cavanillesii* (*Plumbaginaceae*) using RAPD markers. *Mol. Ecol.* **6**: 671-675.
- Palacios C y González-Candelas F (1999) AFLP analysis of the critically endangered *Limonium cavanillesii* (*Plumbaginaceae*). *The Journal of Heredity* **4**: 485-489.
- Palacios C, Rosselló JA y González-Candelas F (2000) Study of the evolutionary relationships among *Limonium* species (*Plumbaginaceae*) using nuclear and cytoplasmic molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **14**: 234-249.
- Palop M, Palacios C y González-Candelas F (2000) Development and across-species transferability of microsatellite markers in the genus *Limonium* (*Plumbaginaceae*). *Conservation Genetics* **1**: 177-179.
- Patzak J (2003) Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) *in vitro* meristem cultures and clones by molecular methods. *Euphytica* **131**: 343-350.
- Pedrosa-Harand A, Souza de Almeida CC, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D y Guerra M (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor. Appl. Genet.* **112**: 924-933.
- Pence V (1999) The Application of biotechnology for the conservation of endangered plants. *Plant Conservation Biotechnology*. Benson 227-250.
- Peredo EL, Revilla MA, Jiménez-Alfaro B, Bueno A y Priero JA (2009) Historical biogeography of a disjunctly distributed, Spanish alpine plant, *Senecio boissieri* (*Asteraceae*). *Taxon* **58**: 883-892.
- Petolino JF, Roberts JL y Jayakumar P (2003) Plant cell culture: a critical tool for agricultural biotechnology. In Vinci VA, Parekh SR (eds) Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial and plant cells. *Humana Press, New Jersey*: 248-258.
- Phan CT (1991) Vitreous state in *in vitro* culture: ethylene versus cytokinin. *Plant Cell Rep.* **9**: 517-519.
- Phillips RL, Kaeppler SM y Olhoft P (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: Break-down of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 5222-5226.
- Picca A, Helguera M, Salomón N y Carrera A (2004) Biotecnología y mejoramiento vegetal. Volumen **4**: 61-68.
- Pierik RLM (1987) *In vitro* culture of higher plants. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*.

- Polanco C y Ruiz ML (2002) AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Sci.* **162**: 817-824.
- Predieri S (2001) Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **64**: 185-210.
- Raskina O, Belyayev A y Nevo E (2004) Activity of the *En/Spm*-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. *Chromosome Res.* **12**: 153-161.
- Raskina O, Barber JC, Nevo E y Belyayer A (2008) Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research* **120**: 351-357.
- Ray T, Dutta I, Saha P, Das S y Roy SC (2006) Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* sp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RADP and ISSR markers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **85**: 11-21.
- Reuveni O, Israeli Y y Golubowicz S (1993) Factors influencing the occurrence of somaclonal variations in micropropagated bananas. *Acta Hort.* **336**: 357-364.
- Reuveni O y Israeli Y (1990) Measures to reduce somaclonal variation *in vitro* propagated bananas. *Acta Hort.* **275**: 307-313.
- Robacker CD y Corley WL (1992) Plant regeneration of Pampas grass from immature inflorescences cultured *in vitro*. *Hort Science* **27**: 841-843.
- Rosato M, Castro M y Rosselló JA (2008) Relationships of the woody *Medicago* species (section *Dendrotelis*) assessed by molecular cytogenetic analyses. *Ann. Bot.* **102**: 15-22.
- Rosselló JA y Sáez L (1998) Is *Limonium cavanillesii* Erben (Plumbagineaceae) really an extant species? *Anales Jardín Botánico de Madrid* **57**: 47-55.
- Rusche ML, Mogensen HL, Shi L, Keim P, Rougier M, Chaboud A y Dumas C (1997) B Chromosome behavior in maize pollen as determined by a molecular probe. *Genetics Society of America* **147**: 1915-1921.
- Ruta C y Morone-Fortunato I (2010) *In vitro* propagation of *Cistus clusii* Dunal, an endangered plant in Italy. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **46**: 172-179.
- Sahijram L, Soneji J y Bollamma KT (2003) Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **39**: 551-556.
- Saker MM, Bekheet SA, Taha HS, Fahmay AS y Moursy HA (2000) Detection of somaclonal variations in tissue culture-derived date palm plants using isoenzyme analysis and RAPD fingerprints. *Biol. Plant.* **43**: 347-351.
- Sarasan V, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G y Rowntree Jk (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the pass decade. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **42**: 206-214.
- Scowcroft WR (1984) Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization. International board for plant genetic resources (IBPGR) technical report AGPGIBPGR/84/152.

## 7. Referencias

- Schubert I y Wobus U (1985) *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosome* **92**: 143-148.
- Schubert I (2007) Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology*. **10**: 109-115.
- Sharma S, Bryan G, Winfield M y Millan S (2007) Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta* **226**: 1449-1458.
- Shi L, Zhu T, Morgante M, Rafalski JA y Keim P (1996) Soybean chromosome painting: a strategy for somatic cytogenetics. *J. Hered.* **87**: 308-318.
- Simola LK y Santanen A (1990) Improvement of nutrient medium for growth and embryogenesis of megagametophyte and embryo callus lines of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* **80**: 27-35.
- Simberloff D (1988) The contribution of population and community biology to conservation science. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **19**: 473-512.
- Singh NK y Sehgal CB (1999) Micropropagation of "Holy Basil" (*Ocimum sanctum* Linn.) from young inflorescences of mature plants. *Plant Growth Regul.* **29**: 161-166.
- Singh Rathore M, Chikara J, Mastan SG, Rahman H, Anand KGV y Shekhawat NS (2011) Assessment of genetic stability and instability of tissue culture-propagated plantlets of *Aloe Vera* L. by RADP and ISSR markers. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **165**: 1356-1365.
- Sivanesan I (2007) Shoot regeneration and somaclonal variation from leaf callus cultures of *Plumbago zeylanica* Linn. *Asian J. Plant Sci.* **6**: 83-86.
- Skirvin RM (1978) Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica* **27**: 241-266.
- Skoog F y Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **54**: 118-130.
- Smýkal P, Valledor L, Rodríguez R y Griga M (2007) Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep.* **26**: 1985-1998.
- Stover RH (1987) Somaclonal variation in Grande Naine and Saba bananas in the nursery and in the field. In: Persley GJ, De Langhe E (eds) ACIAR proceeding n. 21, Canberra.
- Strnad M (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.* **101**: 674-688.
- Sudharsan C y Aboel-Neil MM (1994) Micropropagation of *Phoenix dactylifera* L. through direct bud regeneration from various tissue explants. In: *Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, p 10. International Association for Plant Tissue Culture, Firenze.
- Tagashira N y Kondo K (2001) Chromosome phylogeny of *Zamia* and *Ceratozamia* by means of Robertsonian changes detected by fluorescence *in situ* hybridization

- (FISH) technique of rDNA. *Plant Syst. Evol.* **227**: 145-155.
- Tokuhara K y Mii M (1993) Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Rep.* **13**: 7-11.
- Touchell DH y Dixon KW (1999) *In vitro* preservation. *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Bowes BG: 108-118.
- Touraev A, Vicente O y Heberle-Bors E (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci.* **2**: 297-302.
- Unai E, Iselen T y De Garcia E (2004) Comparison of characteristics of bananas (*Musa* sp) from the somaclone CIEN BTA-03 and its parental clone Williams. *Fruits* **59**: 257-263.
- Uysal H, Fu YB, Kurt O, Peterson GW, Diederichsen A y Kusters P (2010) Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) and its wild progenitor pale flax (*Linum bienne* Mill.) as revealed by ISSR markers. *Genet Resour Crop Evol.* **57**: 1109-1119.
- Van Huylbroeck JM y Debergh PC (1996) Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. *Plant Tissue Culture Biotechnol.* **2**: 136-141.
- Vendrame WA, Kochert G y Wetzstein HY (1999) AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Rep.* **18**: 853-857.
- Verpoorte R, Van der Heijden R, Ten Hoopen HJG y Memelink J (1998) Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. *Plant Tissue Culture Biotechnol.* **4**: 3-20.
- Vieitez AM, Ballester A, Vieitez ML, San José MC, Vieitez FJ y Vieitez E (1987) Propagación de plantas leñosas por cultivo *in vitro*. Diputación Provincial. Pontevedra.
- Weising K, Nybom H, Wolff K y Kahl G (2005) DNA fingerprinting in plants: principles, methods and applications. *CRC Press, New York*.
- Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss GM, Stuessy TF, Mabuchi T, Jeong-Mi P, Jang CG y Sun BY (2007) Chromosomal stasis in diploids contrasts with genome restructuring in auto- and allopolyploid taxa of Hepatica (*Ranunculaceae*). *New Phytologist* **174**: 669-682.
- Weiss-Schneeweiss H, Tremetsberger K, Schneeweiss GM, Parker JS y Stuessy TF (2008) Karyotype diversification and evolution in diploid and polyploidy South American *Hypochaeris* (*Asteraceae*) inferred from rDNA localization and genetic fingerprint data. *Ann. Bot.* **101**: 909-918.
- Wesolowska M, Kapusta J y Skrzypczak L (1994) Micropropagation via somatic embryogenesis of *Gentiana cruciata* L. En: *Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, p 176. International Association for Plant Tissue Culture, Firenze.
- Wochok ZS (1981) The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. *Biol. Conserv.* **20**: 83-89.
- Zhong Z, Smith HG y Thomas TH (1993) Micropropagation of wild beet (*Beta maritima*) from inflorescence pieces. *Plant Growth Regul.* **12**: 53-57.

## 7. Referencias

- Zietkiewicz E, Rafalski A y Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176-183.
- Zoldos V, Papes D, Cerbah M, Panaud O, Besendorfer V y Siljak-Yakovlev S (1999) Molecular cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theor. Appl. Genet.* **99**: 969-977.

## 8.APÉNDICES

### 8.1. Bandas Polimórficas

	B	D	E	F	I	K	O	P
	01/600	02/1150	02/1100	02/900	09/1100	09/500	012/900	012/500
PM1	1	0	1	1	1	0	1	1
S1	1	0	0	1	0	1	1	1
S2	0	0	0	0	0	1	1	1
S3	1	0	0	0	0	1	1	1
S4	1	0	1	1	0	0	1	1
S5	0	0	1	1	0	1	1	1
S6	0	0	0	1	1	0	1	1
1	0	0	0	1	1	0	1	1
2	0	0	0	1	1	0	1	1
3	0	0	1	1	1	0	1	1
4	0	0	1	1	1	0	1	1
5	0	0	1	1	1	0	1	1
6	0	0	1	1	1	0	1	1
7	0	0	1	1	1	0	1	1
8	0	1	1	1	1	0	1	1
9	0	1	1	1	1	0	1	1
10	0	1	1	1	1	0	1	1
11	0	1	1	1	1	0	1	1
12	0	1	1	1	1	0	1	1
13	0	1	1	1	1	0	1	1
14	0	1	1	1	1	0	1	1
15	0	1	1	1	1	0	1	1
16	0	1	1	1	1	0	1	1
17	0	1	1	1	1	0	1	1
18	0	1	1	1	1	0	1	1
19	0	1	1	1	1	0	1	1
20	0	1	1	1	1	0	1	1
21	0	1	1	1	1	0	1	1
22	0	1	1	1	1	0	1	1
23	0	1	1	1	1	0	1	1
24	0	1	1	1	1	0	1	1
25	0	1	1	1	1	0	1	1
26	0	1	1	1	1	0	1	1
27	0	1	1	1	1	0	1	1
28	0	1	1	1	1	0	1	1
29	0	1	1	1	1	0	1	1
30	0	1	1	1	1	0	1	1

8. Apéndices

	B	D	E	F	I	K	O	P
	01/600	02/1150	02/1100	02/900	09/1100	09/500	012/900	012/500
PM2	1	0	1	1	1	0	1	1
S1	1	0	0	1	1	1	0	1
S2	1	0	0	0	1	1	0	0
S3	1	0	0	0	1	1	0	0
S4	1	0	0	1	0	0	0	0
S5	1	0	0	1	0	1	0	1
S6	1	0	0	1	0	1	0	1
1	0	0	0	1	1	0	1	1
2	0	0	0	1	1	0	1	1
3	1	0	0	1	1	1	0	1
4	1	0	0	1	1	1	0	1
5	0	0	0	1	1	0	0	1
6	0	0	0	1	1	0	0	1
7	0	0	0	1	1	0	1	1
8	0	0	0	1	1	0	1	1
9	0	0	0	1	1	0	1	1
10	0	0	0	1	1	0	1	1
11	0	0	0	1	1	0	1	1
12	0	0	0	1	1	0	1	1
13	0	0	0	1	1	0	1	1
14	0	0	0	1	1	0	1	1
15	0	0	0	1	1	0	1	1
16	0	0	0	1	1	0	1	1
17	0	0	0	1	1	0	1	1
18	0	0	0	1	1	0	1	1
19	0	0	0	1	1	0	1	1
20	0	0	0	1	1	0	1	1
21	0	0	0	1	1	0	1	1
22	1	0	0	1	1	0	1	1
23	0	0	0	1	1	0	1	1
24	0	0	0	1	1	0	1	1
25	0	0	0	1	1	0	1	1
26	0	0	0	1	1	0	1	1
27	0	0	0	1	1	0	1	1
28	0	0	0	1	1	0	1	1
29	0	0	0	1	1	0	1	1
30	0	0	0	1	1	0	1	1

	B	D	E	F	I	K	O	P
	01/600	02/1150	02/1100	02/900	09/1100	09/500	012/900	012/500
PM3	1	0	1	1	1	0	1	1
S1	0	0	1	1	0	1	0	1
S2	0	0	1	1	1	0	0	1
S3	0	0	0	1	1	0	0	1
S4	0	0	0	1	1	0	0	1
S5	0	0	0	1	1	1	0	1
S6	0	0	0	1	1	0	0	1
1	0	0	1	1	1	0	0	1
2	0	0	1	0	1	0	0	1
3	0	0	1	0	1	0	0	1
4	0	0	1	0	1	0	0	0
5	0	0	0	1	1	0	0	1
6	0	0	1	1	1	0	0	1
7	0	0	1	1	0	0	0	1
8	0	0	1	1	1	0	0	1
9	0	0	1	1	1	0	0	1
10	0	0	1	1	1	0	0	1
11	0	0	1	1	1	0	0	1
12	0	0	1	1	1	0	0	1
13	0	1	1	1	1	0	0	1
14	0	1	1	1	1	0	1	1
15	0	1	1	1	1	0	1	1
16	0	1	1	1	1	0	1	1
17	0	1	1	1	1	0	1	1
18	0	1	1	1	1	0	1	1
19	0	1	1	1	1	0	1	1
20	0	1	1	1	1	0	1	1
21	0	1	1	1	1	0	1	1
22	0	1	1	1	1	0	1	1
23	0	1	1	1	1	0	1	1
24	0	1	1	1	1	0	1	1
25	0	1	1	1	1	0	1	1
26	0	1	1	1	1	0	1	1
27	0	1	1	1	1	0	1	1
28	0	1	1	1	1	0	1	1
29	0	1	1	1	1	0	1	1
30	0	1	1	1	1	0	1	1

## 8. Apéndices

	B	D	E	F	I	K	O	P
	01/600	02/1150	02/1100	02/900	09/1100	09/500	012/900	012/500
<b>PM4</b>	1	0	1	1	1	0	1	1
<b>S1</b>	0	0	0	1	0	1	0	1
<b>S2</b>	0	0	0	1	0	1	0	1
<b>S3</b>	0	0	0	1	0	1	0	1
<b>S4</b>	0	0	0	1	0	1	0	1
<b>S5</b>	0	0	0	1	0	1	0	1
<b>S6</b>	0	0	0	1	0	1	0	1
<b>1</b>	0	0	1	1	0	1	0	1
<b>2</b>	0	0	1	1	0	1	0	1
<b>3</b>	0	0	1	1	0	1	0	1
<b>4</b>	0	0	1	1	0	1	0	1
<b>5</b>	0	0	1	1	0	1	0	1
<b>6</b>	0	0	1	1	0	1	0	1
<b>7</b>	0	0	1	1	0	1	0	1
<b>8</b>	0	0	1	1	1	0	0	1
<b>9</b>	0	0	1	1	1	0	0	1
<b>10</b>	0	0	1	1	1	0	0	1
<b>11</b>	0	0	1	1	1	0	0	1
<b>12</b>	0	0	1	1	1	0	0	1
<b>13</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>14</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>15</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>16</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>17</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>18</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>19</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>20</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>21</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>22</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>23</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>24</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>25</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>26</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>27</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>28</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>29</b>	0	1	1	1	1	0	1	1
<b>30</b>	0	1	1	1	1	0	1	1

