

**Micropropagación de *Leontopodium
alpinum* Cass. (Edelweiss) e inducción de
la floración en condiciones de invernadero**

ROBERTO JAVIER MONDÉJAR CANET

**EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Micropropagación de *Leontopodium alpinum* Cass.
(Edelweiss) e inducción de la floración en condiciones de
invernadero**

Memoria presentada por
ROBERTO JAVIER MONDÉJAR CANET
para optar al grado de
DOCTOR por la Universidad Politécnica de Valencia

Directores

Dr. LUIS ANTONIO CAÑAS CLEMENTE

Dr. JOSÉ PÍO BELTRÁN PORTER

Valencia, 2014

Colección Tesis Doctorales

© Roberto Javier Mondéjar Canet

© 2014, de la presente edición: Editorial Universitat Politècnica de València
Telf.: 963 877 012 / www.lalibreria.upv.es

ISBN: 978-84-9048-216-2 (versión CD)

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

D. Luis Cañas Clemente, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador Científico del CSIC y D. José Pío Beltrán Porter, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor de Investigación del CSIC, ambos del Instituto de Biología Molecular de Plantas (Universidad Politécnica - Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia,

CERTIFICAN que,

Don Roberto Javier Mondéjar Canet, Ingeniero Agrónomo, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que con el título “Micropropagación de *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss) e inducción de la floración en condiciones de invernadero”, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 4 de febrero de 2014.

Fdo: Dr. Luis Antonio Cañas Clemente

Fdo: Dr. José Pío Beltrán Porter

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una manera u otra han contribuido a que se llevara a cabo esta Tesis.

A mis directores, Dr. José Pío Beltrán y Dr. Luis Cañas, por haber confiado en mí, dándome la oportunidad de trabajar y aprender en su laboratorio y por ofrecerme la posibilidad de realizar esta Tesis Doctoral. Gracias también al Dr. Manuel Ibarra porque en definitiva todo este trabajo surgió de él.

A mi tutor, el Dr. Vicente Moreno, por su disponibilidad y asesoramiento.

A todos los integrantes del IBMCP de Valencia (Investigadores, Administración y Servicios) por ayudarme de distintas formas en la realización de este trabajo.

A Rafa Martínez por sus ímprobos esfuerzos por cuidar de mis plantas y rescatarlas cuando fue necesario. Me quedo especialmente con su ejemplo de profesionalidad.

A Miguel por su ayuda, sus consejos y las conversaciones ante una cerveza.

A Paco y Cristina, por su preocupación y su estímulo insistente para acabar esta tesis.

Al “girl power” del laboratorio y la hora del café, a lo largo de tantos años. Rosa, Amparo, Liz, Reyes, Noelia, Marina, Begoña, Teresa, Auri, Mari Cruz, Concha, Edelín, MD, Ana, Majo, Mónica, Joanna, Marisol, Pilar, Sandra, Marjan y Rim. Gracias por aceptarme en ese universo femenino vuestro, como tal inabarcable, nunca plenamente comprensible y definitivamente maravilloso. Espero que sepas apreciarlo, Abdallah.

A tantos compañeros de estos años en el IBMCP, Aurora, Pako, Antonio, Vicente, Cristina, M^ªÁngeles, Lina, Juan Carlos, Mónica, Pedro y muchos otros a los que pido perdón por no nombrar.

Gracias también a las personas que me acompañaron en este período de mi vida.

A los amigos que me encontré, a los que siempre estuvieron y a aquellos que pude descuidar (con mis disculpas).

A Jose Manuel y Susana. No os tengo que decir nada pero espero teneros siempre cerca para no perder la oportunidad de hacerlo.

Dziękuję “mojej polskiej rodzinie” z Warszawy i Krakowa. Za przyjęcie mnie i sprawienie abym się czuł członkiem Waszego grona.

A Elżbieta y Ryszard. Por acogerme en sus vidas, en su casa y en su familia, haciéndome sentir su afecto. Zawsze będziecie w moim sercu.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional ahora y siempre, cerca o lejos en la distancia.

A Ricardo, Rysio o Richu, según quién se acerque a dejarse robar una sonrisa. Gracias por tus abrazos, tus juegos y tus besos, y perdón por los momentos robados para acabar la Tesis.

A Joanna, por la suerte de tenerte a mi lado. Gracias por tu generosidad y por convencerme de que podía lograrlo.

A Joanna

A Ricardo

RESÚMENES

Micropropagación de *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss) e inducción de la floración en condiciones de invernadero.

Leontopodium alpinum (Edelweiss, Flor de las nieves, Estrella alpina) es una planta herbácea perenne de la familia de las Asteráceas. Se trata de una especie protegida que en España se localiza en áreas del sistema pirenaico de Aragón y Cataluña, en altitudes entre 1.500 y 2.800 m. La planta de edelweiss tiene un gran atractivo ornamental gracias a su característica flor en forma de estrella. Su carácter emblemático hace que sea una flor muy apreciada, por lo que sus poblaciones se han visto amenazadas por recolecciones indiscriminadas. En la tradición alpina, además se ha venido utilizando como planta medicinal como remedio frente a diversas enfermedades. Los extractos de la planta son, de hecho, una importante fuente de principios activos tales como antioxidantes y otras sustancias con propiedades anti-inflamatorias y citoprotectoras que confieren a edelweiss un gran interés farmacológico y biotecnológico.

La comercialización de las plantas de edelweiss con propósito ornamental se ve restringida principalmente por la necesidad de altitudes elevadas para asegurar la calidad de las flores y por la estacionalidad de la producción de las mismas. Asimismo, su condición de planta protegida limita la disponibilidad de materiales para la extracción de compuestos fitoquímicos de interés.

En el presente trabajo se han desarrollado dos protocolos de micropropagación de plantas de *L. alpinum* pertenecientes a la población española de esta especie. En el primero de ellos, se partió de flores maduras aisladas de plantas silvestres recolectadas en campo. Estas flores se implantaron en cultivo *in vitro* y se indujo, mediante regeneración organogénica indirecta, la formación de brotes adventicios que se incorporaron posteriormente a un proceso de multiplicación y enraizamiento de gran eficiencia. Mediante este protocolo se garantiza la producción de un gran número de plantas clonales que pueden utilizarse con un fin comercial o como material de partida para la extracción y purificación de metabolitos de interés, sin amenazar a las poblaciones naturales. Asimismo, puede plantearse como herramienta complementaria para los proyectos de conservación de esta especie. En el segundo de los protocolos establecidos, se utilizó como material de partida hojas de plantas micropropagadas cultivadas *in vitro*. Este tipo de explante, cuya utilización no ha sido descrita con anterioridad en edelweiss, mostró una elevada capacidad organogénica en medios de cultivo con tidiázurón (TDZ). A la vista de los resultados, este protocolo proporciona un método de regeneración de plantas *in vitro* eficaz y reproducible que puede suponer un primer paso para el abordaje de la transformación genética de plantas de *L. alpinum*

Por otro lado, se ha estudiado la floración de las plantas micropropagadas y cultivadas en condiciones de invernadero a nivel del mar, mediante la aplicación de distintas condiciones de inducción basadas en la temperatura de cultivo, el fotoperíodo y la aplicación exógena de giberelinas. Como resultado de estos estudios se plantea un sistema alternativo de obtención de flores de edelweiss basado en el tratamiento de plantas micropropagadas con giberelinas, que permite la obtención de inflorescencias en invernadero de manera sincronizada y sin restricciones estacionales.

Micropropagation of *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss) and flowering induction under greenhouse conditions

Leontopodium alpinum (Edelweiss, Lion's foot, Glacier Queen) is an herbaceous perennial plant belonging to the *Asteraceae* family. It is a protected plant species which can be found in the Spanish Pyrenees in the regions of Aragon and Catalonia, at altitudes ranging from 1,500 to 2,800 m. Edelweiss plants have a great ornamental value because of their characteristically star-shaped flowers. Besides, its emblematic character converts its populations in target of indiscriminate collections. In the alpine folk, it has been used as a medicinal plant to treat different diseases. In fact, edelweiss extracts are an important source of active principles like antioxidants and other substances with anti-inflammatory and cytoprotective properties which confer this plant a great pharmacological and biotechnological interest.

The commercialization of edelweiss plants for ornamental purposes is restricted by the need of high altitudes to ensure the flower quality and the seasonality of the floral production. Moreover, its protected status limits the availability of plant material for the extraction of phytochemical compounds of interest.

In this work we developed two protocols for the micropropagation of *L. alpinum* plants belonging to the Spanish population of this species. The first one, started from mature flowers isolated from wild plants collected in the field, which were implanted in *in vitro* culture. The formation of adventitious shoots was induced by indirect organogenic regeneration. Subsequently, these shoots were incorporated into a greatly efficient process of multiplication and rooting. This protocol guarantees the production of high numbers of clonal plants that might be used to commercialize these plants and/or as starting material for metabolites extraction and purification, without disturbing the natural populations. Furthermore, it can be used as a complementary tool in edelweiss conservation projects. The second protocol uses leaves from *in vitro* micropropagated plants. This kind of explants, whose use has not been previously described to multiply edelweiss, show high organogenic response when cultivated on culture media supplemented with thidiazuron (TDZ). This protocol provides an efficient and reproducible *in vitro* plant regeneration method that might be the first step towards the genetic transformation of *L. alpinum* plants.

On the other hand, we studied the floral production in micropropagated plants grown under greenhouse conditions at sea level, assaying different inductive conditions of temperature, photoperiod or exogenous application of gibberellins. The results lead to an alternative system of flower production based on the treatment of micropropagated plants with gibberellins. The inflorescences are obtained synchronously and without seasonal restrictions in the greenhouse.

Micropropagació de *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss) i inducció de la floració en condicions d'hivernacle.

Leontopodium alpinum (Edelweiss, Flor de neu, Estrela alpina) és una planta herbàcia perenne de la família de les Asteràcies. Es tracta d'una espècie protegida que a Espanya es localitza en àrees del sistema pirinenc d'Aragó i Catalunya, en altituds entre 1.500 i 2.800 m. La planta de flor de neu té un gran atractiu ornamental gràcies a la seua característica flor en forma d'estrela. El seu caràcter emblemàtic fa que siga una flor molt apreciada, per la qual cosa les seues poblacions s'han vist amenaçades per recol·leccions indiscriminades. En la tradició alpina, a més s'ha utilitzat com a planta medicinal com a remei enfront de diverses malalties. Els extractes de la planta són, de fet, una important font de principis actius com ara antioxidants i altres substàncies amb propietats antiinflamatòries i citoprotectores que confereixen a l'edelweiss un gran interès farmacològic i biotecnològic.

La comercialització de les plantes d'edelweiss amb propòsit ornamental es veu restringida principalment per la necessitat d'altituds elevades per a assegurar la qualitat de les flors i per l'estacionalitat de la producció de les mateixes. Així mateix, la seua condició de planta protegida limita la disponibilitat de materials per a l'extracció de compostos fitoquímics d'interés.

En el present treball s'han desenvolupat dos protocols de micropropagació de plantes de *L. alpinum* pertanyents a la població espanyola d'aquesta espècie. En el primer d'ells, es va partir de flors madures aïllades de plantes silvestres recol·lectades en camp. Estes flors es van implantar en cultiu *in vitro* i es va induir, per mitjà de regeneració organogènica indirecta, la formació de brots adventicis que es van incorporar posteriorment a un procés de multiplicació i arrelament de gran eficiència. Per mitjà d'aquest protocol es garanteix la producció d'un gran nombre de plantes clonals que poden utilitzar-se amb un fi comercial o com a material de partida per a l'extracció i purificació de metabòlits d'interés, sense amenaçar les poblacions naturals. Així mateix, pot plantejar-se com a ferramenta complementària per als projectes de conservació d'esta espècie. En el segon dels protocols establits, es va utilitzar com a material de partida fulles de plantes micropropagades cultivades *in vitro*. Aquest tipus d'explant, la utilització del qual no ha sigut descrita amb anterioritat en edelweiss, va mostrar una elevada capacitat organogènica en medis de cultiu amb thidiazuron (TDZ). A la vista dels resultats, aquest protocol proporciona un mètode de regeneració de plantes *in vitro* eficaç i reproduïble que pot suposar un primer pas per a l'abordatge de la transformació genètica de plantes de *L. alpinum*.

D'altra banda, s'ha estudiat la floració de les plantes micropropagades i cultivades en condicions d'hivernacle a nivell del mar, per mitjà de l'aplicació de distintes condicions d'inducció basades en la temperatura de cultiu, el fotoperíode i l'aplicació exògena de giberelines. Com a resultat d'aquests estudis es planteja un sistema alternatiu d'obtenció de flors d'edelweiss basat en el tractament de plantes micropropagades amb giberelines, que permet l'obtenció d'inflorescències en hivernacle de manera sincronitzada i sense restriccions estacionals.

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS.....	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. <i>Leontopodium alpinum</i> Cass.	3
1.1 Descripción morfológica	4
1.2 Ecología	6
1.3 Protección y conservación	7
1.4 Usos y utilidades	8
1.4.1 <i>Leontopodium alpinum</i> como planta medicinal y de interés farmacológico.....	8
1.4.2 <i>Leontopodium alpinum</i> como planta cosmética.....	11
1.4.3 <i>Leontopodium alpinum</i> como especie ornamental	11
1.5 Aspectos de interés para la mejora vegetal de <i>Leontopodium alpinum</i>	12
2. Cultivo de tejidos y regeneración de plantas	13
2.1 Introducción	13
2.2 Ventajas y limitaciones	14
2.3 Sistemas de propagación vegetativa <i>in vitro</i>	15
2.4 Factores implicados en la micropropagación	16
2.5 Estructura de un protocolo de micropropagación	19
2.6 El cultivo <i>in vitro</i> de <i>Leontopodium alpinum</i>	22
3. Control de la floración en plantas	24
II. OBJETIVOS	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. Material vegetal	35
1.1. Recolección de material vegetal silvestre.....	35
1.1.1. Localización	35
1.1.2. Recolección de material vegetal	36
1.2. Condiciones de cultivo de plantas de semilla	36

1.2.1.	Cultivo de plantas en alvéolos	36
1.2.2.	Cultivo de plantas <i>in vitro</i>	37
1.3.	Caracterización del material vegetal	38
1.3.1.	Caracterización morfológica	38
1.3.1.1.	Caracteres de la planta	38
1.3.1.2.	Caracteres de la biología floral	39
1.3.2.	Análisis de la germinación y la viabilidad de los granos de polen	39
1.3.2.1.	Ensayo de germinación de polen <i>in vitro</i>	39
1.3.2.2.	Ensayo de viabilidad de los granos de polen	39
1.3.3.	Otros métodos asociados al análisis fenotípico de plantas	40
1.3.3.1.	Criomicroscopía electrónica de barrido	40
1.3.3.2.	Análisis del nivel de ploidía mediante citometría de flujo	40
1.4.	Polinización cruzada	41
2.	Micropropagación de <i>Leontopodium alpinum</i>	41
2.1.	Obtención y cultivo de explantes	41
2.1.1.	Cultivo de segmentos nodales de tallo floral	41
2.1.2.	Cultivo de hojas	42
2.1.3.	Cultivo de flores	42
2.2.	Multiplicación de brotes en cultivo axénico	42
2.3.	Enraizamiento y aclimatación	43
2.3.1.	Efecto de la adición de distintas concentraciones de ácido indolacético (AIA) al medio de enraizamiento	43
2.3.2.	Evaluación de distintos sustratos para el cultivo de las plantas	43
2.4.	Micropropagación a partir de hojas	44
2.4.1.	Ensayo de medios de inducción de organogénesis	44
2.4.2.	Efecto de la presencia de yema axilar	45
2.5.	Preparación de los medios de cultivo	45
2.6.	Soluciones minerales	46
2.7.	Soluciones vitamínicas	47
2.8.	Medios de cultivo	47
3.	Ensayos de inducción de la floración en plantas cultivadas en invernadero	49
3.1.	Ensayo de la temperatura de cultivo	49

3.2.	Ensayo de las condiciones de fotoperíodo	49
3.3.	Ensayo de vernalización de plantas aclimatadas.....	50
3.4.	Ensayos de aplicación de reguladores del crecimiento	50
3.4.1.	Tratamientos	50
3.4.2.	Ensayo de la aplicación de giberelinas.....	51
3.4.3.	Ensayo de dosis de regulador del crecimiento	51
3.4.4.	Ensayo del número de aplicaciones del tratamiento.....	52
3.4.5.	Ensayo de la edad de la planta en el momento del tratamiento.....	52
3.4.6.	Ensayo de la formulación de GA ₃	52
4.	Análisis estadístico	52
IV.	RESULTADOS	53
1.	Caracterización del material de partida	55
1.1.	Plantas silvestres.....	55
1.1.1.	Estudio de los caracteres morfológicos de las plantas silvestres	55
1.1.2.	Análisis de la viabilidad y de la capacidad de germinación del polen de las plantas silvestres.....	58
1.1.3.	Estudio de la capacidad de germinación de las semillas silvestres	59
1.2.	Plantas de semilla silvestre cultivadas en invernadero	59
1.2.1.	Estudio de los caracteres morfológicos de la plantas procedentes de semilla silvestre	60
1.2.2.	Análisis de la viabilidad y de la capacidad de germinación del polen de las plantas procedentes de semilla silvestre.....	62
1.2.3.	Estudio de la capacidad de germinación de las semillas de las plantas procedentes de semilla silvestre	63
1.3.	Análisis del nivel de ploidía	63
2.	Micropropagación de <i>Leontopodium alpinum</i>	64
2.1.	Implantación del material vegetal e inducción de la organogénesis	64
2.1.1.	Cultivo de segmentos nodales	64
2.1.2.	Cultivo de explantes de hoja	65
2.1.3.	Cultivo de flores	65
2.2.	Multiplicación de brotes regenerados.....	67

2.3.	Enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes multiplicados.....	68
2.4.	Aclimatación en invernadero de brotes enraizados.....	69
2.5.	Características del material micropropagado.....	70
2.6.	Micropropagación a partir de hojas de plantas multiplicadas <i>in vitro</i>	72
3.	Ensayos de inducción de la floración en plantas micropropagadas de <i>Leontopodium alpinum</i>	76
3.1.	Ensayo de distintas condiciones de termoperíodo.....	77
3.2.	Ensayo de distintas condiciones de fotoperíodo.....	78
3.3.	Ensayo de vernalización de plantas micropropagadas.....	80
3.4.	Aplicación exógena de giberelinas sobre plantas micropropagadas.....	81
3.4.1.	Efecto de la aplicación de giberelinas sobre la formación de inflorescencias en plantas micropropagadas.....	82
3.4.2.	Efecto de la dosis de giberelina aplicada sobre la formación de inflorescencias en plantas micropropagadas.....	85
3.4.3.	Efecto del número de aplicaciones del tratamiento con giberelinas sobre la formación de inflorescencias en plantas micropropagadas .	88
3.4.4.	Efecto de la edad de la planta sobre la formación de inflorescencias en plantas micropropagadas tratadas con GA ₃	94
3.4.5.	Efecto de la formulación de GA ₃ sobre la formación de inflorescencias en plantas micropropagadas.....	96
3.5.	Caracterización de las inflorescencias de plantas micropropagadas	98
V.	DISCUSIÓN.....	103
1.	Desarrollo de un protocolo de micropropagación a partir de plantas silvestres de <i>Leontopodium alpinum</i>	107
2.	Desarrollo de un protocolo de micropropagación a partir de brotes cultivados <i>in vitro</i> de <i>Leontopodium alpinum</i>	111
3.	Las plantas micropropagadas de <i>Leontopodium alpinum</i> divergen de las de semilla silvestre en la respuesta de floración	113
4.	El ajuste del termoperiodismo no induce la floración de las plantas micropropagadas de <i>Leontopodium alpinum</i>	115

5. La vernalización de las plantas micropropagadas de <i>Leontopodium alpinum</i> promueve su floración.....	116
6. Las plantas micropropagadas de <i>Leontopodium alpinum</i> responden al fotoperíodo como plantas de día corto-largo	117
7. La aplicación exógena de giberelinas induce la floración en planta micropropagadas de <i>Leontopodium alpinum</i>	117
8. La aplicación de giberelinas exógenas como estrategia para el uso ornamental de plantas micropropagadas de <i>Leontopodium alpinum</i>	120
9. Otras perspectivas de aplicación de la micropropagación de plantas de <i>Leontopodium alpinum</i>	123
VI. CONCLUSIONES	125
VII. BIBLIOGRAFÍA	129

ABREVIATURAS

%	porcentaje
°C	grado Celsius
µg	microgramo
µL	microlitro
µM	micromolar
ADN	ácido desoxirribonucleico
AIA	ácido indolacético
AIB	ácido indolbutírico
ARN	ácido ribonucleico
cm	centímetro
cv.	cultivar
DAPI	2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamidina
DC	día corto
DKW	Driver y Kuniyuki
DL	día largo
Dr.	Doctor
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EE	error estándar
g	gramo
h	hora
L	litro
LP	Quoirin y Lepoivre
m	metro
M	molar
MES	tampón ácido 2-(N-morfolino) propano sulfónico
mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar

MS	Murashige y Skoog
N	normal
N	norte
nm	nanómetro
p/v	peso / volumen
pH	potencial de hidrógeno
PM	peso molecular
s	segundo
ssp	subespecie
TDZ	tidiazurón
UV	ultravioleta
V	voltio
v/v	volumen / volumen
W	oeste
W	vatio

INTRODUCCIÓN

1. *Leontopodium alpinum* Cass.

Leontopodium alpinum Cass. (Edelweiss, Flor de Nieve, Pie de León, Estrella alpina) es una planta herbácea perenne de la familia de las Asteráceas, una familia botánica que contiene cerca de 25.000 especies distribuidas entre 1.500 géneros (Heywood, 1985). El género *Leontopodium* R.Br. ex Cassini comprende entre 30 y 40 especies originarias de Eurasia (Handel-Mazzetti, 1928; Safer *et al.*, 2011) que crecen en áreas montañosas de Japón, Asia y Europa (Hook, 1993). Una forma ancestral de *Leontopodium* alcanzó los Alpes después de las glaciaciones del periodo Cuaternario y se diferenció en dos especies muy distintas del resto de especies del género (Blöch *et al.*, 2010) que quedaron confinadas en las montañas del centro y oeste de Europa (Figura 1). Por un lado, *Leontopodium alpinum* Cass., localizada en las cadenas montañosas de Pirineos, Jura, Alpes, Apeninos ligures, norte de los Balcanes y Cárpatos, caracterizada por un indumento blanco ralo y por otro lado, *Leontopodium nivale* (Ten.) Huet ex Hand.-Mazz., localizada en la zona de Abruzzo de los Apeninos, en los Alpes Dináricos y en las montañas Pirin del sudeste de los Balcanes, con indumento grisáceo denso y tallos florales más cortos (Safer *et al.*, 2011).



Figura 1. Distribución de *Leontopodium alpinum* (azul) y *Leontopodium nivale* (amarillo). Tomado de Meusel y Jäger (1992) Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora.

Algunos botánicos han clasificado como dos subespecies a *Leontopodium alpinum* ssp. *alpinum* y a *Leontopodium alpinum* ssp. *nivale*. Sin embargo, investigaciones morfológicas y moleculares apuntan a que deben considerarse como dos especies distintas (Greuter, 2003; Blöch *et al.*, 2010).

En España, *Leontopodium alpinum* se localiza en Pirineos (Figura 2), en puntos de las provincias de Barcelona, Lérida y Huesca. En los Pirineos aragoneses salpica los montes calizos alto-pirenaicos, desde Pomero (Benasque) hasta el Bisaurín, en Aragües del Puerto; hacia el Prepirineo va quedando más aislada, por ejemplo en el Turbón o la Peña Montañesa, y sus últimos reductos meridionales se hallan en Oroel y Guara. En los Pirineos catalanes la distribución se hace en áreas bastante separadas; por un lado existe en el Valle de Aran, en la Ribagorza y en el Pallars Jussá y, por otro lado se encuentra en el Capcir y la sierra de Catllaràs (Font Quer, 1948; Bolòs, 1953; Rivas-Martínez *et al.*, 1991; Bolòs *et al.*, 1993; Carreras *et al.*, 1996; Bolòs, 1998; Font Quer, 1999; Villar-Pérez *et al.*, 2001; Benito-Alonso, 2005; Aymerich, 2006 y Vigo, 2008).

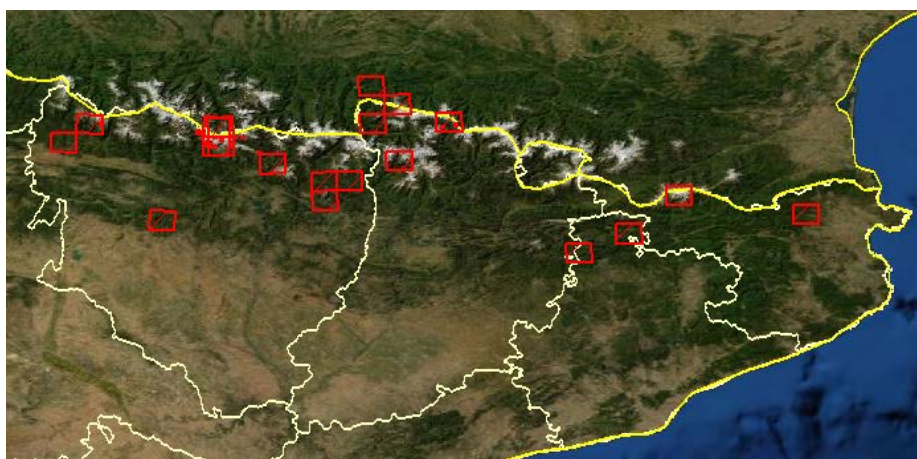


Figura 2. Localización de *Leontopodium alpinum* en España. Los cuadros rojos indican localizaciones referenciadas bibliográficamente. Tomado de "Anthos- Sistema de Información sobre las plantas en España". www.anthos.es

1.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Se trata de una planta vivaz, de rizoma leñoso, del que salen varias rosetas de hojas, y con un sistema radicular en cabellera con raíces fibrosas. Florece durante los meses de julio y agosto. La flor, en forma de estrella, es en realidad una inflorescencia cuyos tallos se yerguen de 5 a 30 cm y son más o menos foliosos, erectos, simples y albotomentosos (Handel-Mazzetti, 1928). Las hojas inferiores son enteras, estrechamente oblanceoladas y miden 1,5-5 cm de alto por 0,3-0,8 cm de ancho. Son verdes por el haz y grises por el envés. Las hojas del tallo floral son más pequeñas, alternas, linear oblongas, patentes y densamente lanuginosas. La inflorescencia cuenta con 1 a 12 capítulos

pequeños, agrupados en un glomérulo umbeliforme terminal y cubierto por un involucre de 5 a 15 brácteas (Bolòs *et al.*, 1993). Estas brácteas son lanceoladas, lanuginosas, blancas, patentes y sobrepasan considerablemente los capítulos. Aparecen dispuestas en forma de estrella de 2,5 a 3,5 cm de diámetro (Tzvelov y Fedorov, 2002) y son, de hecho, expansiones de un receptáculo muy modificado. Los capítulos son subglobosos y miden de 5 a 7 mm de diámetro. Presentan las brácteas involucrales oblanceoladas, agudas, lanuginosas, blancas, oscuras en el margen y el ápice y distribuidas en diferentes filas (Figura 3).

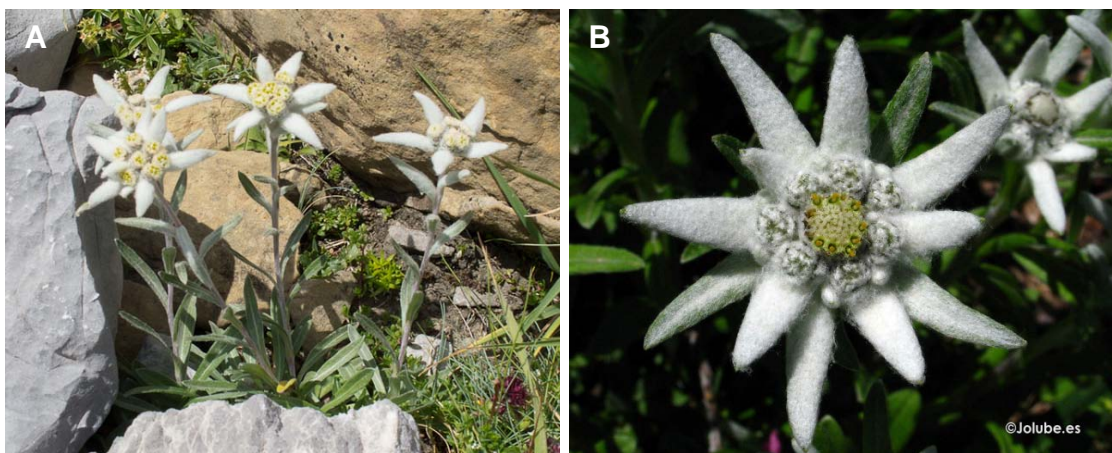


Figura 3. Flores silvestres de *Leontopodium alpinum*. A. Roseta de hojas de una planta de edelweiss de la que emergen varios tallos inflorescentes. Imagen tomada de “Atlas de la Flora de Aragón” <http://proyectos.ipe.csic.es/floragon/>. B. Inflorescencia de *Leontopodium alpinum* en forma de estrella. Imagen tomada de www.jolube.es

Las flores son actinomorfas, pentámeras y tubulosas y se disponen sobre el receptáculo convexo del capítulo (Handel-Mazzetti, 1928; Tutin *et al.*, 1976). Las flores exteriores son femeninas mientras que las interiores son hermafroditas pero funcionalmente masculinas (Figura 4). En ocasiones pueden aparecer capítulos unisexuales e incluso inflorescencias con flores de un único sexo (Carron *et al.*, 2007). El cáliz está transformado en un papus uniseriado, con las setas denticuladas y connadas en la base (Tutin *et al.*, 1976). Las flores femeninas tienen la corola tetralobulada y un estilo bifido. El gineceo es ínfero, sincárpico, bicarpelar y unilocular. En su interior hay un único primordio seminal, anátropo, erecto y de placentación basal. Las flores masculinas tienen la corola pentalobulada, el androceo formado por cinco estambres, con las anteras introrsas y soldadas formando un tubo. El estilo tiene forma de porra que

empuja el polen al atravesar el cuello de anteras situándolo al alcance de los insectos polinizadores (Müller, 1998). Los principales agentes polinizadores son las moscas y, ocasionalmente, abejas, sírfidos y lepidópteros (Erhardt, 1993).



Figura 4. Detalle de un capítulo de flores de *Leontopodium alpinum*. Las flores femeninas, con el estigma bífido, se disponen en el exterior de capítulo. Las flores hermafroditas, con el cono de anteras amarillo por la presencia de polen, se encuentran en el interior.

Los frutos son aquenios de 0'5 a 1 mm, con el papus persistente. El desarrollo de la inflorescencia es centrípeto y protoginio, de modo que las flores femeninas florecen entre cuatro y cinco días antes que las flores hermafroditas (Rey y Slacanin, 1999) y comienza en el capítulo central continuando en los periféricos (Carron *et al.*, 2007). La fecundación se considera alógama aunque la existencia de apomixis fue descrita por Sokołowska-Kluczycka (1959).

1.2 ECOLOGÍA

Leontopodium alpinum Cass. se encuentra generalmente en los pisos alpinos y subalpinos montañosos en altitudes entre 1.200 y 3.000 m. En términos de distribución global la altitud más elevada en que se encuentra es de 3.140 m en Suiza y la más baja conocida a 220 m en Eslovenia. Su hábitat natural en los Pirineos son pastos muy *innivados* del piso alpino y subalpino, entre los 1.500 y los 2.800 m. Excepcionalmente se exceden estos límites altitudinales, llegando hasta los 1.100 m en su cota inferior y hasta los 3.030 m en la superior. Es una planta netamente calcícola que crece en pastos pedregosos supraforestales y en menor medida se encuentra en fisuras y rellanos de roquedo. Suele encontrarse asociada a especies como *Seslerietalia coeruleae*, *Saxifragion mediae* o especies del género *Elynion* (Villar-Pérez *et al.*, 2001). Las poblaciones son vistosas, pero en general no muy nutridas y bastante aisladas entre sí.

Las elevadas altitudes en las que crece hacen que tenga que enfrentarse a altos niveles de radiación ultravioleta, bajas presiones atmosféricas y grandes variaciones de

humedad y de temperatura (Dweck, 2004), con temperaturas nocturnas en plena estación estival que pueden descender por debajo de los 0 °C (Prevedello *et al.*, 2004). Como mecanismo de protección ante estas condiciones extremas, la planta ha desarrollado una cubierta tomentosa que la aísla de los cambios climáticos, evita pérdidas excesivas de humedad y la protege de los rayos ultravioleta del sol (Vigneron *et al.*, 2005).

1.3 PROTECCIÓN Y CONSERVACIÓN

A partir de la segunda mitad del siglo XIX, la flor de edelweiss adquirió gran popularidad coincidiendo con el interés creciente por el montañismo alpino. Los numerosos mitos y leyendas, creados en torno a las dificultades de su recolección en lugares casi inaccesibles, le confirieron un carácter fuertemente simbólico (Berry, 2009). A finales de dicho siglo se popularizó el turismo en los Alpes, y las nuevas vías férreas facilitaron el acceso a su hábitat natural. La flor de edelweiss se convirtió en el souvenir ideal ya que su forma y color no se alteran al secarse. Lamentablemente este interés amenazó pronto a la supervivencia de la especie ante las recolecciones indiscriminadas de aficionados. La recolección de edelweiss comenzó a controlarse en todo el arco alpino, empezando en el cantón suizo de Odwalden en 1878, seguida de Austria, el primer país en protegerla en todo su territorio en 1886 (Scheidegger, 2011). Aparte de las recolecciones indiscriminadas, otros riesgos, comunes a otras plantas silvestres, son la competencia con otras especies vegetales y la reducción, fragmentación y degradación de los hábitats naturales (García Casanova *et al.*, 2001). Con el paso del tiempo el estatus de planta protegida en mayor o menor grado se ha extendido por todo el área de distribución de la especie. En España está catalogada, según la clasificación establecida en la LEY 4/1989, como planta de “Interés Especial” en Aragón (DECRETO 49/1995, modificado por la ORDEN de 4 de marzo de 2004), en las poblaciones que se encuentran dentro de los Espacios Naturales Protegidos y Lugares de Importancia Económica (Catálogo de Especies Amenazadas de Aragón, 2008). En Cataluña tiene la categoría de “Vulnerable” en todo el territorio, con la excepción de poder mantener la planta muerta en domicilios particulares (DECRETO 172/2008).

1.4 USOS Y UTILIDADES

1.4.1 *Leontopodium alpinum* como planta medicinal y de interés farmacológico

Pese a que, según Font Quer (1980), en Pirineos no se le ha atribuido habitualmente ninguna aplicación medicinal a esta especie, no ha sido así en el caso de los Alpes. En la tradición alpina se han utilizado extractos de la planta para atenuar la inflamación y el dolor en las vías respiratorias (amigdalitis, bronquitis y neumonitis), en el sistema digestivo (gastritis y colitis) (Grabley y Thiericke, 1999), en articulaciones (artritis reumatoide) (Chiej, 1988) y en tejidos afectados por tumores (piel y tejidos conectivos en el cáncer de mama) (Dweck, 2004). Confirmando estas aplicaciones, diversos estudios farmacológicos de los extractos de la parte aérea y de las raíces ponen de manifiesto sus propiedades anti-inflamatorias (Dobner *et al.*, 2004) y antimicrobianas (Dobner *et al.*, 2003 b). Los extractos también muestran efectos antioxidantes, de protección del ADN y analgésicos probados en diferentes modelos *in vivo* (Speroni *et al.*, 2006).

La gran mayoría de las propiedades farmacológicas de *L. alpinum* se han atribuido a la presencia y al espectro de metabolitos secundarios polifenólicos (Lulli *et al.*, 2012). *L. alpinum* contiene una amplia variedad de polifenoles (Tabla 1) pertenecientes a las clases de fenilpropanoides (ácidos fenólicos, glucósidos, flavonoides, cumarinas, y lignanos), terpenos (sesquiterpenos y diterpenos), así como derivados del pirano y el benzofurano (Tira *et al.*, 1970; Hennessy *et al.*, 1989; Hook *et al.*, 1994; Comey *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 1999; Stuppner *et al.*, 2002; Dobner *et al.*, 2003a; Schwaiger *et al.*, 2004; Schwaiger *et al.*, 2005). Algunos de los compuestos identificados de la raíz de la planta, de sus partes aéreas, o a partir de cultivos de raíces, resultan potentes inhibidores *in vitro* y *ex vitro* de la biosíntesis de leucotrieno, limitando la movilización de leucocitos y reduciendo así la inflamación (Speroni *et al.*, 2006).

La evaluación analítica de los extractos de las partes aéreas de *L. alpinum* reveló la presencia de glucósidos y agliconas de flavonoides (luteolina, quercetina, apigenina). Compuestos como la luteolina-4-*O*-glucósido, la apigenina-7-glucósido y la luteolina, actúan sobre la permeabilidad capilar y mejoran la circulación sanguínea periférica aportando así más oxígeno a los tejidos. Así mismo tienen actividad anti-inflamatoria por inhibición de la interleukina-5 (Prevedello *et al.*, 2004).

Tabla 1. Relación de los principales metabolitos secundarios aislados de *L. alpinum*

Ácidos fenólicos	Ácido clorogénico	Hennessy <i>et al.</i> 1989
	Ácido 3,4-di cafeolquínico	Hennessy <i>et al.</i> 1989
	Ácido 3,5-dicafeolquínico	Schwaiger <i>et al.</i> 2006
	Ácido 4,5-dicafeolquínico	Hennessy <i>et al.</i> 1989
	Ácido leontopódico A	Schwaiger <i>et al.</i> 2005
	Ácido leontopódico B	Schwaiger <i>et al.</i> 2006
Flavonoides	Luteolina	Tira <i>et al.</i> 1970
	Luteolina-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucósido	Tira <i>et al.</i> 1970
	Luteolina-4'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucósido	Tira <i>et al.</i> 1970
	Luteolina-7,4'-di- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucósido	Schwaiger <i>et al.</i> 2006
	Luteolina-3'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucósido	Schwaiger <i>et al.</i> 2006
	6-Hidroxi-luteolina-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucósido	Schwaiger <i>et al.</i> 2006
	Apigenina	Schwaiger <i>et al.</i> 2006
	Apigenina-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucósido	Schwaiger <i>et al.</i> 2006
	Crisoeriol-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucósido	Schwaiger <i>et al.</i> 2006
Quercetina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucósido (Isoquercitrina)	Schwaiger <i>et al.</i> 2006	
Cumarinas	Obliquina	Dobner <i>et al.</i> 2003 a
	Metoxiobliquina	Dobner <i>et al.</i> 2003 a
Lignanós	Leoligina	Dobner <i>et al.</i> 2003a
Diterpenos	Ácido kaurenico	Schwaiger <i>et al.</i> 2004
	ent-7 α ,9 α -dihidroxi-15 β -[(2 <i>Z</i>)-2-metil-but-2-enoiloxi]kaur-16-en-19-oato	Schwaiger <i>et al.</i> 2004
Sesquiterpenos	Isocomeno	Gray <i>et al.</i> 2000
	β -isocomeno	Dobner <i>et al.</i> 2003b
	14-Acetoxiisocomeno	Gray <i>et al.</i> 2000
	Metilisocomen-14-oato	Gray <i>et al.</i> 2000
	Modéfeno	Hook y Sheridan 2001
	15-Acetoximodéfeno	Gray <i>et al.</i> 2000
	Silfineno	Dobner <i>et al.</i> 2003b
	T-cadinol	Schwaiger <i>et al.</i> 2004
	(1 <i>R</i> *,2 <i>S</i> *,4 <i>R</i> *,5 <i>S</i> *)-4-(acetiloxi)-2-[3-(acetiloxi)-1,5-dimetilhex-4-enil]-5-metilciclohexil(2 <i>Z</i>)-2-metilbut-2-enoato	Stuppner <i>et al.</i> 2002
	(1 <i>R</i> *,4 <i>S</i> *,6 <i>R</i> *)-4-(acetiloxi)-6-[3-(acetiloxi)-1,5-dimetilhex-4-enil]-3-metilciclohex-2-en-1-il(2 <i>Z</i>)-2-metilbut-2-enoato	Stuppner <i>et al.</i> 2002
	3-metil-1-{2-[(1 <i>R</i> *,2 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *,6 <i>S</i> *)-2,5,6-tris(acetiloxi)-4-metilcyclohex-3-en-1-il]propil}but-2-enil(2 <i>Z</i>)-2-metilbut-2-enoato	Stuppner <i>et al.</i> 2002
6-acetoxi(15),7(14)-cariofiladieno	Gray <i>et al.</i> 2000	
[(1 <i>S</i> ,2 <i>Z</i> ,3 <i>aS</i> ,5 <i>aS</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-1,3 <i>a</i> ,4,5,5 <i>a</i> ,6,7,8-octahidro-1,3 <i>a</i> ,6-trimetilciclopenta[c]pentalen-2-il]metil acetato	Dobner <i>et al.</i> 2003 a	
Derivados de Benzopirano	(<i>S</i>)-(-)-2,3-Dihidro-2,6-dimetil-4 <i>H</i> -benzopirano-4-ona	Comey <i>et al.</i> 1997
Derivados de Benzofurano	1-[(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *)-3-(β - <i>D</i> -glucopiranosiloxi)-2,3-dihidro-2-[1-(hidroximetil)vinil]-1-benzofuran-5-il]etanona	Dobner <i>et al.</i> 2003 a
Poliacetilenos	1-acetoxi-3-angeloiloxi-(4 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-tetradeca-4,6-dieno-8,10,12-trieno	Schwaiger <i>et al.</i> 2004
	1-acetoxi-3-angeloiloxi-(4 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-tetradeca-4,6-dieno-8,10,12-trieno (6 <i>Z</i>)-isómero	Schwaiger <i>et al.</i> 2004
Esteroles	β -sitosterol	Hennessy <i>et al.</i> 1989

En estos extractos de la parte aérea también se encontró un alto contenido de ácidos clorogénico, 3,5-dicafeoilquínico y leontopódico (Schwaiger *et al.*, 2006), compuestos que presentan una importante actividad antioxidante.

Los ácidos leontopódicos (isómeros A y B; Figura 5) descubiertos en esta especie (Schwaiger *et al.*, 2005, 2006) son de especial interés ya que poseen una actividad antioxidante que duplica la del ácido clorogénico y es tres veces superior al trolox en el análisis por el método TEAC (“Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”, Rice-Evans y Miller, 1994). En publicaciones posteriores, se apunta a que los isómeros del ácido leontopódico son responsables, en gran medida, de los efectos biológicos beneficiosos de los extractos de edelweiss (Costa *et al.*, 2009).

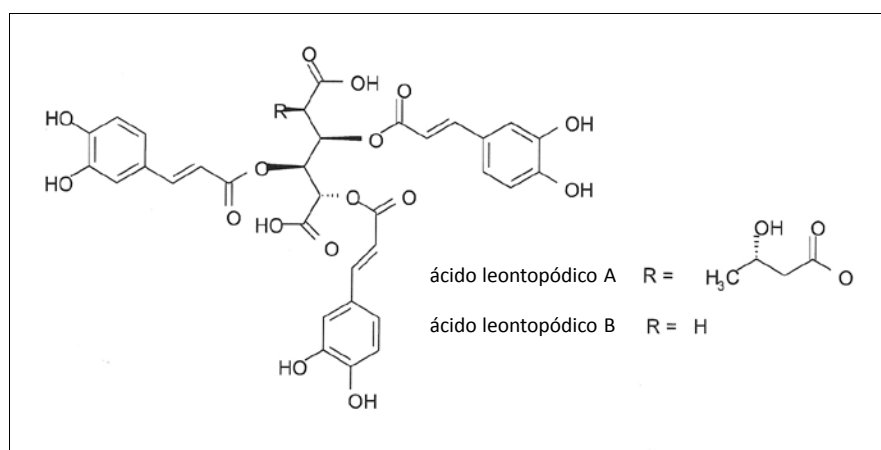


Figura 5. Estructura química de los ácidos leontopódico A y B. Schwaiger *et al.*, 2005 y 2006.

Entre los compuestos aislados a partir de las raíces, se ha comprobado (Hornick *et al.*, 2008) que algunos sesquiterpenos como el isocomeno son capaces de potenciar la transmisión colinérgica, señalándolos como posibles agentes anti-demenia en enfermedades asociadas a déficits colinérgicos. Otra sustancia como la leoginina, el principal lignano de *L. alpinum*, aislada de las raíces (Schwaiger *et al.*, 2004), se ha visto que inhibe la hiperplasia interna de tejidos en cultivo de órganos (Reisinger *et al.*, 2009) siendo por ello candidata a utilizarse en los tratamientos de enfermedades de injerto venoso (“bypass”). Duwensee *et al.* (2011), por su parte, han comprobado que la leoginina también es capaz de activar la proteína colesterol ester transferasa (CETP), reduciendo los niveles de colesterol lo que le confiere una aplicación potencial en pacientes con hipercolesterolemia.

1.4.2 *Leontopodium alpinum* como planta cosmética

Los extractos de *L. alpinum* también presentan gran capacidad antioxidante y de captación de radicales libres, fundamentalmente por la presencia en ellos de flavonoides y ácidos fenólicos como el ácido leontopódico. Los efectos de los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico, como el ácido clorogénico, están potenciados por los taninos y se asocian con la inhibición de la formación de la peroxidación lipídica, la inhibición de la formación del ión superóxido (una de las especies radicales más dañinas) y la protección del colágeno de tipo III (Okuda *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1999). Además, los compuestos de *L. alpinum* tienen propiedades de inhibición de enzimas como la hialuronidasa, la 5-lipoxigenasa y la elastasa aumentando la elasticidad de la piel (Kuppusamy y Das, 1991; Scalbert, 1991). La presencia de β -sitosterol, luteolin-4'-glucosidasa y derivados del bisabolano en *L. alpinum* explican su efecto calmante. Estas propiedades hacen que los extractos de la planta se utilicen como componentes para el tratamiento de piel estresada y sensible incorporándose a cremas anti-envejecimiento y a filtros solares. En los últimos años grandes empresas cosméticas como Weleda o Pentapharm han desarrollado líneas de productos que incorporan estos extractos de la planta en su formulación.

1.4.3 *Leontopodium alpinum* como especie ornamental

La flor de edelweiss (*L. alpinum*) tiene un gran atractivo ornamental siendo probablemente una de las flores silvestres más famosas del mundo. Como planta ornamental se ha cultivado habitualmente en jardines rocosos. En la actualidad ha surgido también cierto interés por su utilización para flor cortada para lo que se necesitan formas de tallo más largo. Contrariamente a la creencia popular, puede cultivarse con cierta facilidad en rocallas, requiriendo suelos húmedos pero bien drenados, ricos en humus (Wagenitz, 1979). Las semillas germinan fácilmente sin necesidad de vernalización para romper la latencia como ocurre con otras especies alpinas y las flores aparecen habitualmente en el segundo año de cultivo. En el cultivo a partir de semilla muestra gran variación en términos de tamaño y apariencia (Carron *et al.*, 2007), lo que refleja la biodiversidad inicial de la planta silvestre en la naturaleza.

Cuando la planta se cultiva en altitudes más bajas de las de su hábitat natural disminuye la cobertura de pelos que le ayuda a protegerse del frío, el tallo floral tiende a alargarse y la inflorescencia pierde parte de su aspecto característico. En estas condiciones los pulgones (*Aphis* spp.) colonizan fácilmente las plantas, sobre todo si el cultivo se realiza bajo cubierta. Cuando el número de pulgones se dispara, el crecimiento y la calidad de las plantas disminuye. En invernadero, otras plagas provocan pérdidas como la mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), la araña roja (*Tetranychus urticae*) o los trips (*Frankliniella occidentalis*). Entre las enfermedades que pueden afectar al cultivo está la podredumbre blanca (*Sclerotinia minor*), lo que aconseja limitar el riego y asegurar el buen aireamiento del cultivo (Sigg, 2008).

1.5 ASPECTOS DE INTERÉS PARA LA MEJORA VEGETAL DE *Leontopodium alpinum*

Aunque *L. alpinum* puede en algunos casos propagarse vegetativamente mediante subdivisión de plantas cultivadas senescentes (Hook, 1993), normalmente se multiplica por semilla. En ese caso la variabilidad de las plantas, tanto morfológica como fitoquímica, es manifiesta y dificulta su aprovechamiento comercial. Además, se trata de una planta con limitaciones de cultivo en cuanto a su localización. Como se ha indicado, la planta pierde su aspecto característico al cultivarse en altitudes más bajas. Asimismo, existen diferencias en el contenido de metabolitos secundarios de interés según la altitud en que se desarrollan las plantas (Marcon *et al.*, 2006).

Entre los objetivos que se plantean para el mejor aprovechamiento de esta planta está la consecución de material más homogéneo tanto desde un punto de vista morfológico como fitoquímico y capaz de obtenerse de forma masiva en localizaciones no tan específicas. En el caso del aprovechamiento como planta ornamental también resultaría interesante desarrollar procedimientos de control de la floración para reducir la dependencia de la estacionalidad. Hasta el momento, el único abordaje de un programa de mejora para convertir *L. alpinum* en una planta comercial es el llevado a cabo en el Centro de Investigación Conthey de Agroscope Changins-Wädenswil (ACW) auspiciado por las empresas Weleda y Ricola. Fruto de este trabajo se seleccionó un híbrido (variedad Helvetia) obtenido mediante cruzamientos (Carron *et al.*, 2007) adaptado al cultivo en los valles suizos (1.100m de altitud).

2. CULTIVO DE TEJIDOS Y REGENERACIÓN DE PLANTAS

2.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de células y tejidos vegetales se fundamenta en el principio de totipotencia celular, que establece que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl y Paul, 2000).

La potencialidad de una célula diferenciada para generar tejidos nuevos y eventualmente un organismo completo, disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por esa célula, pero puede revertirse parcial o totalmente según las condiciones de cultivo a las que se someta. La división y la des-diferenciación de las células vegetales pueden inducirse si se colocan porciones de tejido (explantes) en un medio de cultivo adecuado que contenga los nutrientes y los aditivos necesarios. Muchos aspectos de la diferenciación celular y la morfogénesis en cultivo de tejidos están controlados por la acción de reguladores del crecimiento, fundamentalmente citoquininas y auxinas. La diferenciación de brotes y raíces directamente en los explantes o partir de callo está estrechamente relacionada por los niveles relativos de estos dos reguladores (Ammirato, 1986).

Entre las principales aplicaciones de la técnica de cultivo *in vitro* se encuentran la propagación masiva de plantas, la preservación de germoplasma, la obtención de plantas libres de patógenos, la mejora genética, la biosíntesis de metabolitos y la investigación básica en áreas como la genética, la fisiología y la bioquímica (Fowler, 1987, Carpita y McCann, 2000).

La propagación de plantas mediante el cultivo *in vitro* de tejidos, conocida como micropropagación, se caracteriza entre otros aspectos por ser una propagación vegetativa, sin que medie ningún tipo de fusión de las células sexuales, masiva y substancialmente clonal e implica el cultivo de explantes en condiciones asépticas en recipientes que permiten controlar las condiciones ambientales y la composición y concentración de nutrientes.

2.2 VENTAJAS Y LIMITACIONES

La micropropagación presenta una serie de aspectos positivos para la producción de plantas tal y como han descrito autores como Lindsey y Jones (1989) y George (2008a). Las plantas cultivadas *in vitro* tienen un tamaño reducido de modo que pueden cultivarse con una gran densidad, lo que supone un ahorro de espacio, de superficie de invernadero, de costes de mantenimiento y de labores. La propagación, además, se lleva a cabo en condiciones asépticas, por lo que no se producen pérdidas por plagas o enfermedades y, en último término, deberían estar libres de bacterias, hongos y otros microorganismos. La obtención de plantas libres de patógenos permite la producción de planta certificada y la miniaturización y el control de las condiciones sanitarias facilitan el intercambio a través de fronteras.

Las plantas se pueden producir durante todo el año ya que el proceso es independiente de los efectos ambientales, y el material producido puede ser almacenado durante largos periodos de tiempo. De este modo resulta muy útil cuando se requiere la producción de un gran número de plantas y permite, por ejemplo, tener disponibles nuevas variedades en el mercado en un menor tiempo y en gran cantidad.

La micropropagación permite también obtener clones de algunas plantas cuya propagación vegetativa *in vivo* sería lenta y dificultosa, cuando no imposible. Por otra parte, las plantas pueden adquirir temporalmente nuevas características gracias a la micropropagación que hacen que las plantas sean más apreciadas por los cultivadores como, por ejemplo, un hábito arbustivo en plantas ornamentales. Asimismo, las tasas de propagación pueden aumentarse mediante el control estricto de los factores que afectan la regeneración vegetativa, como los niveles nutricionales o de los reguladores del crecimiento, la luz o la temperatura.

Sin embargo, la aplicación de los métodos *in vitro* tiene limitaciones como es la necesidad de disponer de instalaciones altamente especializadas y de trabajadores con un nivel alto de capacitación. Las plantas producidas inicialmente son pequeñas y en caso de producirse contaminaciones en las fases tempranas del cultivo pueden perderse propágulos potenciales. Además, es frecuente la necesidad de desarrollar métodos específicos para cada especie y variedad para conseguir una micropropagación eficaz, incluyendo las condiciones de enraizamiento y aclimatación de las plantas. Todo esto

hace que se incrementen los costes de producción y el precio final de la planta pueda resultar relativamente elevado.

Por otra parte, durante el cultivo *in vitro* pueden producirse variaciones indeseadas y que no son fácilmente detectables en los primeros estadios, lo que aumenta la posibilidad transmitir las variaciones a gran escala.

2.3 SISTEMAS DE PROPAGACIÓN VEGETATIVA *in vitro*

En cultivo *in vitro* se pueden distinguir dos tipos de crecimiento; un crecimiento organizado dirigido a la creación o mantenimiento de estructuras definidas, y un crecimiento desorganizado, en el que no existe una estructura reconocible. En el cultivo de estructuras organizadas se enmarca el cultivo de meristemos, de ápices de tallo, de nudos, de yemas laterales, de raíces y el cultivo de embriones. En el cultivo de tejidos desorganizados, por su parte, se puede incluir el cultivo de callos (masas de células mayoritariamente no organizadas que surgen a partir de un crecimiento no coordinado y no organizado de pequeñas secciones de tejido), los cultivos en suspensión, el cultivo de protoplastos y el cultivo de anteras, entre otros.

La micropropagación es un término general que describe una variedad de rutas para la propagación de germoplasma seleccionado utilizando técnicas *in vitro* (Lynch, 1999). Tal y como describe George (2008b), en general, se pueden obtener nuevas plantas completas a partir de cultivo de tejidos por tres de estas rutas: (a) a partir de yemas o meristemos preexistentes que son estimulados a crecer y proliferar; (b) a partir de nuevos brotes inducidos en cultivos no organizados (organogénesis indirecta) o directamente sobre tejidos separados de la planta madre (organogénesis directa); o (c) mediante la formación de embriones somáticos a partir de tejidos organizados (embriogénesis somática directa) o no organizados (embriogénesis somática indirecta). Estos embriones se asemejan a los zigóticos y pueden convertirse en plántulas de la misma manera que ellos.

La ruta que normalmente provoca la más rápida multiplicación de los propágulos es la callogénesis adventicia. Sin embargo, la formación de callo puede provocar una mayor proporción de plantas alteradas genéticamente comparadas con las rutas

morfogenéticas que no implican formación de callo. La elección de una u otra estrategia dependerá del objetivo final buscado.

2.4 FACTORES IMPLICADOS EN LA MICROPROPAGACIÓN

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por el material vegetal y por las condiciones físicas y químicas utilizadas *in vitro* (Pierik, 1990).

Del material vegetal influyen factores como su composición genética, la edad de la planta y del explante a utilizar, el estado fisiológico, el estado sanitario así como el tamaño del explante y su posición relativa en la planta

Los cultivos de tejidos vegetales deben mantenerse en condiciones ambientales apropiadas para su mantenimiento, tratando de reproducir las condiciones naturales más favorables. La luz, la temperatura, la humedad relativa y los niveles de O₂ y CO₂ son los factores físicos ambientales más importantes. Las condiciones de luz y temperatura que se seleccionan para el cultivo *in vitro* suelen ser semejantes a las que optimizan el crecimiento y el desarrollo del material experimental *in vivo*. De la luz interesan distintos aspectos como la intensidad, el fotoperiodo y la calidad espectral. La luz es necesaria no tanto para la fotosíntesis de los tejidos, que suele ser limitada, sino para que la fotomorfogénesis tenga lugar y se produzcan brotes de aspecto normal. La temperatura de cultivo suele situarse entre 20 y 30 °C. El mantenimiento de cierto periodo térmico o la aplicación de pre-tratamientos a temperaturas bajas afectan a la morfogénesis (Constabel y Shyluk, 1994). Además se ha observado que para un mismo tejido existe una temperatura óptima diferente para la formación de brotes frente a la de raíces (Rumary y Thorpe, 1984). En el interior de los recipientes de cultivo se mantiene una humedad relativa elevada, cercana a la saturación debido a las condiciones de estanqueidad necesarias para la asepsia, y que sólo permiten cierto intercambio gaseoso. Los gradientes de O₂ y CO₂ de dentro a fuera de las estructuras organizadas influyen sobre la diferenciación. Este hecho hace que las plantas deban sufrir modificaciones para poder ser trasplantadas al exterior.

Los tejidos vegetales solo crecerán *in vitro* si se les suministra un medio específico que cubra sus necesidades. Los medios usados en el cultivo de tejidos están compuestos por diferentes componentes: sales, vitaminas, aminoácidos, reguladores del

crecimiento, azúcares, agentes gelificantes (en medios semi-sólidos) y agua. Todos estos compuestos cumplen una o más funciones en el crecimiento *in vitro* de plantas.

El agua utilizada deber ser desionizada y preferiblemente estéril. En el cultivo de protoplastos, células o meristemas el agua debe ser bidestilada. Muy pocos cultivos son autótrofos y por lo tanto, es necesario agregar azúcares al medio como fuente de carbono. La sacarosa es el azúcar que más se utiliza y, en menor medida, glucosa, manosa o fructosa, entre otros.

Los minerales presentes en los medios de cultivo de plantas pueden ser usados por las células vegetales como elementos para la síntesis de moléculas orgánicas. Los iones de las sales disueltas juegan un papel importante en el transporte de moléculas ionizadas en la planta, en la regulación osmótica, y en el mantenimiento del potencial electroquímico de la planta.

El nitrógeno, el azufre, y el fósforo son componentes de las proteínas y de los ácidos nucleicos. El magnesio y muchos microelementos forman parte esencial de los enzimas y de los orgánulos celulares. El calcio y el ácido bórico se encuentran principalmente en la pared celular, y el calcio en particular resulta primordial en la estabilización de biomembranas. El potasio y el cloro, por otro lado, son importantes en la regulación osmótica, para el mantenimiento del potencial electroquímico, y para la activación de un gran número de enzimas.

Las sales de los medios de cultivo se dividen en macro y micro elementos. Esta división se basa principalmente en las necesidades de la planta de estos elementos. La mayoría de microelementos están presentes en cantidades micromolares. La necesidad de macroelementos es mucho mayor y por tanto se encuentran en concentraciones macromolares. Dentro del grupo de macroelementos, las sales que contienen nitrógeno, principalmente en forma de nitrato potásico, nitrato amónico o nitrato cálcico son las más utilizadas. Existen diversas formulaciones de nutrición mineral entre las cuales la más utilizada es la formulación MS (Murashige y Skoog, 1962) de uso universal. Otras formulaciones son WH (White, 1963), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969) utilizado en el cultivo de anteras, LP (Quoirin y Lepoivre, 1977) para *Prunus* spp. y en la que la concentración del ion amonio es mucho menor que en MS y se reduce drásticamente el cloro, AE (von Arnold y Eriksson, 1981), LM (Litvay, 1982), WPM (Lloyd y McCown, 1980) para el cultivo de plantas leñosas o DKW (Driver and Kuniyuki, 1984).

La formulación MS es la primera opción elegida cuando se trabaja con especies que no han sido propagadas *in vitro* previamente. Sin embargo, ésta se caracteriza por una alta concentración de sales, comparada con otras formulaciones por lo que se desaconseja su uso sin diluir en especies sensibles a la sal. La elección de una de las distintas soluciones nutritivas depende de la planta con la que se trabaja y de la etapa del proceso de micropropagación.

Los reguladores del crecimiento de plantas o fitohormonas, se encargan de regular el crecimiento, el desarrollo y la respuesta a estímulos. Cada una de estas pequeñas moléculas orgánicas puede causar efectos pleiotrópicos. El equilibrio entre ellas se desplaza constantemente y los cambios en los niveles de fitohormonas dan como resultado cambios en la expresión génica. En cultivo de tejidos, los reguladores del crecimiento se utilizan principalmente para estimular la regeneración adventicia de raíces, brotes y embriones, el desarrollo de yemas axilares y la formación de callo. Las citoquininas y las auxinas normalmente se necesitan para lograr un crecimiento cuantitativo (incrementando el número de células y su volumen). En cultivo de tejidos, frecuentemente solo se añaden auxinas y citoquininas. Una gran parte de la experimentación en cultivo *in vitro* tiene que ver con la modificación de las concentraciones y los tipos de reguladores.

El efecto de los reguladores también depende de su estabilidad en el medio de cultivo y en el tejido, y en la sensibilidad del tejido diana: las células de cierto tejido o en cierto estado de desarrollo pueden no reconocer la señal hormonal, o puede ser incapaz de llevar a cabo la respuesta deseada.

Las cinco fitohormonas consideradas clásicamente son: auxinas, citoquininas, etileno, giberelinas y ácido abscísico. En las últimas décadas se ha comprobado la acción reguladora de otras hormonas como el ácido jasmónico, los brasinosteroides o las oligosacarinas (George, 2008e). Las principales auxinas utilizadas en cultivo *in vitro* son el ácido indolacético (AIA), el ácido indolbutírico (AIB), y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Las auxinas promueven la formación de raíces adventicias, inducen la embriogénesis somática (particularmente el 2,4-D), la división celular, la formación y crecimiento de callo e inhiben el desarrollo de yemas axilares y el crecimiento de la raíz. Las citoquininas más comunes son la N⁶bencilaminopurina (BAP), la kinetina, la zeatina y el tidiazurón (TDZ). Las citoquininas promueven la formación de brotes, la división

celular y la formación y crecimiento de callo, estimulan el crecimiento de las yemas axilares e inhiben la formación de raíces adventicias, la elongación de brotes y la senescencia de hojas. El ácido giberélico (GA₃) es la giberelina más utilizada. Las giberelinas promueven la elongación de entrenudos, rompen la dormición en semillas e inhiben la formación de raíces adventicias. Por su parte, el etileno promueve la senescencia de hojas y provoca la maduración de frutos y el ácido abscísico se utiliza para la maduración de embriones somáticos, y también facilita la aclimatación y favorece la formación de bulbos y tubérculos.

Las vitaminas se añaden a las plantas en diversas formas y concentraciones, principalmente algunas del grupo B. Se han desarrollado diversas formulaciones de vitaminas que pueden incluir tiamina, mioinositol, piridoxina, ácido nicotínico, biotina, riboflavina, ácido fólico y otras. Sin embargo, no existe un consenso sobre qué vitaminas de las que suelen incluirse en los medios de cultivo son realmente esenciales (George, 2008b).

Existen otros compuestos utilizados en cultivo *in vitro* como las poliaminas, fenilurea y sus derivados, aminoácidos como la glicina, la L-glutamina, o la adenina, mezclas de origen vegetal como la leche de coco, mezclas de compuestos como fuente de nitrógeno y vitaminas como el hidrolizado de caseína y compuestos de prevención antioxidante como el carbón activo (Pierik, 1990).

En los medios de cultivo semi-sólidos se utilizan además agentes gelificantes, de los cuales el agar es el más utilizado, que forman una matriz de soporte.

2.5 ESTRUCTURA DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN

Murashige (1974) definió tres etapas o estadios en la propagación *in vitro* (Figura 6) de plantas, correspondientes a la iniciación del cultivo en condiciones asépticas (estadio I), multiplicación (estadio II) y elongación y enraizamiento (estadio III). Estos estadios responden a tres fases morfológicas fundamentales de cualquier proceso de regeneración *in vitro* y además suponen transiciones en las que frecuentemente es necesario cambiar alguna de las condiciones de cultivo utilizadas en la etapa anterior. Posteriormente se introdujeron otros dos estadios desarrollados *ex vitro*. Un estadio 0 previo a los anteriores consistente en la preparación y tratamiento de la planta madre

(Debergh y Maene, 1981) y un estadio IV o de aclimatación de las plantas cultivadas *in vitro* a condiciones naturales de cultivo (Maene y Debergh, 1986). A continuación se comentan los principales elementos de cada uno de estos estadios.



Figura 6. Esquema de las fases de la propagación *in vitro* de plantas. 0: preparación de los explantes; 1: inicio del cultivo; 2: multiplicación; 3: elongación y enraizamiento; 4: aclimatación.

Estadio 0: Preparación de los explantes.

El objetivo de esta fase es seleccionar adecuadamente el material vegetal de partida. Por un lado debe ser una representación adecuada del material de interés y por otro presentar el mejor estado sanitario posible para prevenir contaminaciones durante el cultivo *in vitro*. Si es viable, se aconseja cultivar las plantas madre bajo condiciones controladas. Estas resultan más higiénicas y permiten manipular el estado fisiológico de las plantas, de la fuente de los explantes o de los mismos explantes modificando factores como la luz o la temperatura, entre otros.

Esta etapa busca mejorar la respuesta y la adaptación de los explantes a las condiciones que se les aplicarán a continuación.

Estadio 1: Inicio del cultivo.

El objetivo de esta fase es establecer cultivos axénicos y viables. El éxito del procedimiento depende del tamaño de los explantes y su estado de desarrollo, así como la edad de la planta madre y el estado fisiológico.

Una vez seleccionada la fuente de explantes, el siguiente paso es el inicio o establecimiento de cultivos axénicos, para lo cual es necesaria la aplicación de métodos apropiados de esterilización. Conviene tener en cuenta que tanto la concentración del compuesto o los compuestos esterilizantes utilizados como el tiempo de exposición deben estar perfectamente dimensionados y controlados para no afectar a la viabilidad de los explantes. El cultivo se considera establecido cuando se ha determinado que está aparentemente libre de patógenos y de microorganismos contaminantes.

Estadio II: Multiplicación.

En esta etapa se pretende aplicar las condiciones necesarias para aumentar el número de estructuras capaces de dar lugar a plantas completas. Estas nuevas estructuras o propágulos podrán a su vez ser utilizados para continuar el ciclo de multiplicación o bien ser dirigidos a la siguiente etapa de regeneración.

La multiplicación de los explantes suele ser dependiente de la adición al medio de cultivo de reguladores del crecimiento vegetal. Así, las concentraciones relativas de auxinas y citoquininas son las encargadas de regular en la mayoría de los casos este proceso. En general, las citoquininas son muy eficaces a la hora de promover la iniciación de brotes, ya que reducen la dominancia natural de las yemas apicales. Se pueden utilizar solas o en combinación con auxinas. En el uso de reguladores del crecimiento es importante tener en cuenta su concentración y el tiempo de exposición. Se ha descrito que concentraciones altas de citoquininas pueden generar problemas en los explantes como hiperhidratación, variación somaclonal o formación de callo (George, 2008d). La utilización de los reguladores del crecimiento debe ser el adecuado para dar no sólo la tasa más alta de multiplicación, sino para que cada uno de los brotes que se generan sean de la máxima calidad posible.

La eficiencia del método de propagación aumenta cuando los cultivos son homogéneos ya que hacen más sencilla su manipulación a la hora de repicarlos.

Estadio III: Elongación y enraizamiento.

En este estadio se busca la elongación de brotes o plántulas y el enraizamiento de éstos en un medio adecuado. En algunas plantas es necesario conseguir una cierta elongación del tallo antes de pasar a su enraizamiento. Para favorecer la elongación de

los brotes se suelen utilizar giberelinas que alargarán los entrenudos del tallo. La inducción y el crecimiento de raíces pueden realizarse *in vitro* o *ex vitro*. En el enraizamiento *ex vitro*, los brotes suelen cultivarse previamente en un medio de cultivo suplementado con auxinas durante un corto período de tiempo antes de transplantarse. Los brotes enraizados *ex vitro* suelen tener un tamaño mayor que los enraizados *in vitro*. Sin embargo esta técnica no es extensible a todas las especies. En el enraizamiento *in vitro* también los brotes se cultivan en medio con auxinas antes de sub-cultivarlos a un medio libre de hormonas para permitir el desarrollo de las raíces.

Estadio IV: Aclimatación.

En la última etapa del proceso se busca el restablecimiento en el invernadero de las plántulas cultivadas *in vitro*. Se trata de una etapa crítica debido al peculiar ambiente al que se han sometido las plantas durante el cultivo *in vitro* y a los cambios sufridos en su fisiología y anatomía respecto a las plantas en condiciones naturales. Las plantas *in vitro* son muy sensibles a condiciones de ambiente no controladas, principalmente la intensidad luminosa y la humedad relativa. Las plántulas *in vitro* se desarrollan bajo una intensidad luminosa comparativamente más baja que en condiciones de campo y con una humedad relativa cercana al 100%. Además, debido al aporte nutricional de los medios de cultivo, tienen un crecimiento heterotrófico o mixotrófico, de modo que su capacidad fotosintética es pobre y requieren de una adaptación hacia una nutrición autótrofa.

2.6 EL CULTIVO *in vitro* DE *Leontopodium alpinum*

En el caso de *Leontopodium alpinum* Cass., los trabajos publicados de micropropagación *in vitro* son escasos. Hook (1993) estableció un protocolo de micropropagación de plantas de *L. alpinum* de origen alpino utilizando brotes apicales de plantas obtenidas a partir de semilla. Por su parte Zarpatan (1996), trabajando con material originario de Rumanía, utilizó como explantes para el cultivo *in vitro* flores inmaduras aisladas de inflorescencias jóvenes. En ambos casos el interés se centró en la conservación de variedades protegidas o en peligro de extinción. Kutyla y Chmiel (2000) también utilizaron meristemos apicales aislados de plantas obtenidas de semillas

cultivadas *in vitro*, estudiando las mejores combinaciones de la citoquinina 6-benziladenina (BAP) y de la auxina ácido naftalenacético (ANA). En el programa de mejora desarrollado para la empresa Weleda en el centro de investigación de Agroscope Changins-Wädenswil ACW, se utilizó la multiplicación *in vitro* de parentales seleccionados (Lê, 2005; Carron *et al.*, 2007), pero ni los materiales ni los protocolos aparecen reflejados en estas publicaciones. El último de los trabajos de micropropagación publicado hasta la fecha corresponde a Trejgell *et al.*, (2010). En él estudian las posibilidades de propagación de *L. alpinum* a partir de distintos explantes de plántulas germinadas *in vitro* mediante la combinación de distintas citoquininas con la auxina ANA. En todos estos trabajos utilizan medios de cultivo basados en la solución nutritiva MS incluyendo distintos reguladores del crecimiento, habiéndose obtenido los mejores resultados cuando la BAP se combinó con ANA. Por lo que hemos podido saber, no se ha realizado hasta la fecha ningún trabajo de aplicación de la técnicas de cultivo *in vitro* sobre las poblaciones españolas de *L. alpinum* Cass.

Tampoco hay muchas referencias de micropropagación en otras especies del género *Leontopodium*. Pace *et al.*, (2009) desarrollaron un protocolo de propagación de plantas de *L. nivale* partiendo de semillas, como parte de una posible estrategia de conservación de modo que las plantas regeneradas pudieran reintroducirse en la naturaleza. Investigadores coreanos desarrollaron un protocolo de micropropagación para *L. coreanum* (Park *et al.*, 1987), de nuevo utilizando sales MS y combinaciones de BAP y ANA.

Por otro lado se han desarrollado otras técnicas de cultivo *in vitro* distintas a la micropropagación motivadas sobre todo por la necesidad de material para los análisis fitoquímicos. Al tratarse de una especie protegida no se puede recolectar material silvestre para la obtención de los extractos necesarios para estos análisis. Los investigadores recurren normalmente a los bancos de germoplasma y al cultivo de material a partir de semilla, pero en ocasiones las cantidades de material, sobre todo de raíz, no son suficientes. Por este motivo, Hook (2001) desarrolló un protocolo de transformación de *L. alpinum* con *Agrobacterium rhizogenes* que permite la obtención de cultivos de raíces en cantidad suficiente. Actualmente también se ha implementado la utilización de cultivos celulares para la extracción de metabolitos de interés (del Tosso y Melandri, 2010).

3. CONTROL DE LA FLORACIÓN EN PLANTAS

Las plantas inician la floración después de un período de desarrollo vegetativo. A lo largo de este proceso, denominado inducción floral, el meristemo apical del tallo comienza a producir flores en lugar de hojas. El proceso de inducción floral está controlado por una compleja red de señalización molecular que aglutina factores ambientales (luz y temperatura, sobre todo) y factores endógenos (como la edad y el estado nutricional) para determinar el momento óptimo en el que florecer. Cada uno de estos factores activa cascadas de señalización particulares que acababan convergiendo en ciertos genes clave que integran información de distinta naturaleza. La complejidad de los mecanismos de control asociados a la floración, además, es muy alta. Las plantas incorporan una redundancia significativa en el proceso de floración para asegurarse de que el número de vías de señalización permite compensar las fluctuaciones ambientales (Amasino y Michaels, 2010; Wellmer y Riechmann, 2010; Andrés y Coupland, 2012).

Los principales avances en el conocimiento de los mecanismos que controlan la transición, la iniciación y el desarrollo floral, se han obtenido utilizando plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* o *Antirrhinum majus*. En *Arabidopsis*, una planta facultativa de día largo, se han descrito cuatro rutas principales de las que depende la floración: la *ruta del fotoperíodo*, la *ruta de la vernalización*, la *ruta de las giberelinas* y la *ruta autónoma*. A éstas se han sumado posteriormente otras dos rutas: la *ruta de la temperatura ambiental* y la *ruta de la edad* (Amasino y Michaels, 2010). Las rutas del fotoperíodo y la vernalización controlan la floración en respuesta a los cambios estacionales en la duración del día y la temperatura, la ruta de la temperatura ambiental responde al aumento diario de la temperatura, y las rutas de la edad, autónoma y de las giberelinas actúan de forma más independiente a los estímulos medioambientales (Fornara *et al.*, 2010). Estas rutas convergen en un grupo de genes que integran la información (Moon *et al.*, 2005) y regulan la expresión de los genes de identidad de meristemo floral, que dirigen el desarrollo de las flores (Irish, 2010). Estas rutas se esquematizan en la figura 7.

La duración del día se mide a través de la actividad de los fotorreceptores, fitocromos y criptocromos, que contienen pigmentos que se excitan con la luz. La información es integrada por el reloj circadiano que, en *Arabidopsis*, regula la expresión

del gen *CONSTANS* (*CO*). *CO* codifica un factor de transcripción que se acumula en las hojas en condiciones de día largo como resultado de la combinación de la expresión cíclica del ARN mensajero de *CO* y la estabilización de la proteína *CO* por la luz (de Montaigu, 2010; Wellmer y Riechmann, 2010). *CO* activa la expresión de *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) cuya proteína es un componente del estímulo floral transmisible (*florigeno*) que se moviliza desde su lugar de expresión en el tejido vascular de las hojas hacia el ápice (Turck 2008). Allí interacciona con la proteína *FLOWERING LOCUS D* (*FD*), un factor de transcripción tipo bZIP, que se expresa en el meristemo apical con anterioridad a la transición floral (Abe *et al.*, 2005; Michaels y Amasino, 2010), para regular los genes que promueven la floración. La expresión del gen *FT* además está regulada mediante la acción de distintos represores de modo que la floración se retrasa en condiciones no favorables.

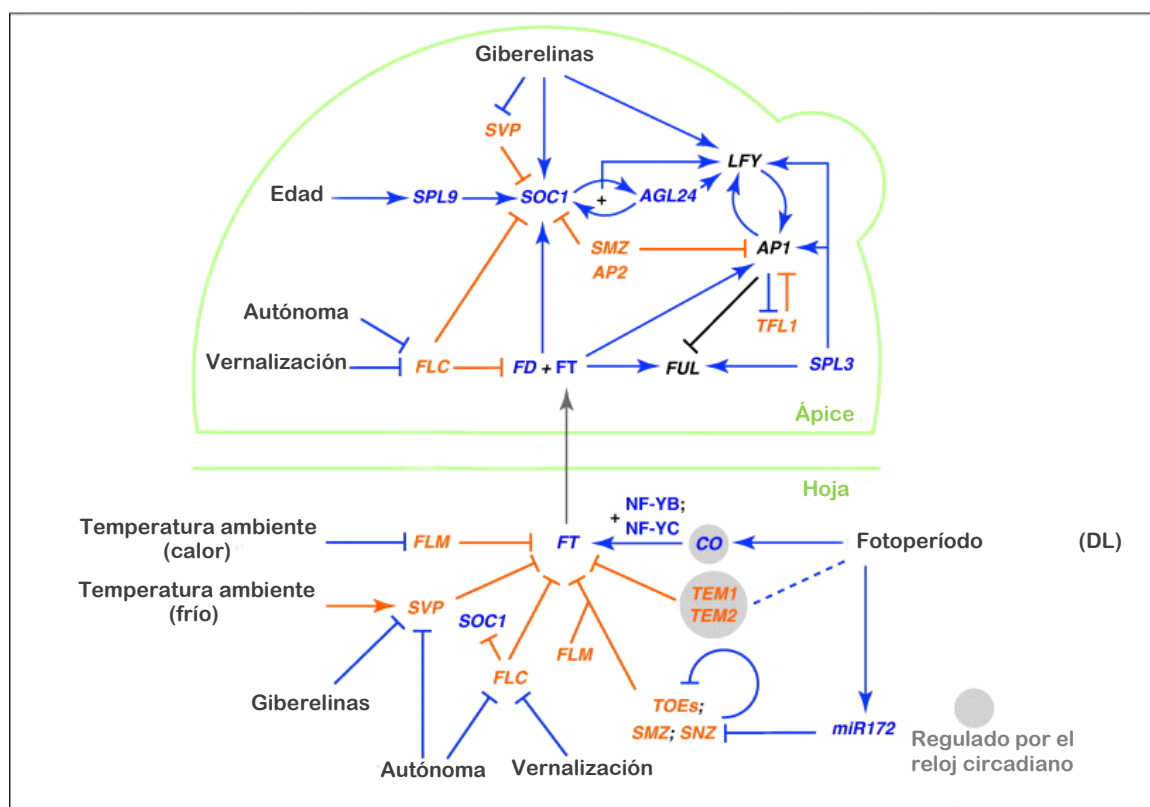


Figura 7. Diagrama esquemático de las rutas genéticas que controlan el tiempo de floración en *Arabidopsis*. Figura modificada a partir de Wellmer y Riechmann (2010). En color azul se indican las interacciones que promueven la floración, y los genes promotores florales. En color naranja se indican las interacciones que reprimen la floración, y los genes represores florales. En color negro se representan los genes de identidad de meristemo. Las flechas representan la promoción o activación de genes, y las líneas con barra, represión. **AGL24:** AGAMOUS-LIKE 24. **AP1:** APETALA 1. **AP2:** APETALA 2. **FD:** FLOWERING LOCUS D. **FLM:** FLOWERING LOCUS M. **FT:** FLOWERING LOCUS T. **FUL:** FRUITFULL. **LFY:** LEAFY. **SOC1:** SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1. **SMZ:** SCHLAFMÜTZE. **SNZ:** SCHNARCHZAPFEN. **SPL:** SQUAMOSA BINDING PROTEIN LIKE. **SVP:** SHORT VEGETATIVE PHASE. **TEM:** TEMPRANILLO. **TFL1:** TERMINAL FLOWER 1. **TSE:** TWIN SISTER OF FT. **TOE:** TARGET OF EAT.

La vernalización se define como el proceso por el cual la exposición al frío del invierno da lugar a plantas competentes para florecer (Kim *et al.*, 2009). El paso del invierno es una señal ambiental que, acoplada a la detección del fotoperíodo, proporciona la información necesaria para distinguir la primavera del otoño (Amasino y Michaels, 2010). Los requerimientos de vernalización se encuentran habitualmente en plantas anuales de invierno y en plantas bianuales, que florecen a comienzos de la primavera. Normalmente se necesita la exposición al frío durante varias semanas para una respuesta completa de vernalización, lo que contrasta con la inducción de la floración por fotoperíodo, en la que unos pocos días de exposición a longitudes de día apropiadas es suficiente para inducir la floración (Andrés y Coupland, 2012). Las plantas que necesitan de vernalización para florecer codifican represores que bloquean la floración durante el verano y el otoño hasta que la planta se expone a las bajas temperaturas. La exposición al frío desbloquea la floración, normalmente mediante la reducción de la expresión del represor permitiendo así la floración en la primavera siguiente. En *Arabidopsis*, la vernalización disminuye los niveles del complejo represor formado por las proteínas FLOWERING LOCUS C (FLC) y SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) (Kim *et al.*, 2009) que a su vez reprime a otros promotores florales como *FT* y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*.

Por su parte las giberelinas integran distintas señales ambientales y endógenas a través de la actividad de las proteínas DELLA. De esta forma, juegan un papel importante en el proceso de transición entre las distintas fases del desarrollo vegetativo y en la transición floral (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009). En *Arabidopsis*, las giberelinas tienen un papel fundamental en la floración en día corto cuando los niveles de *FT* son bajos (Wigge *et al.*, 2005). En estas condiciones de fotoperíodo, las giberelinas actúan induciendo la floración de manera independiente de *FT*, por un lado activando los genes integradores *LEAFY (LFY)* y *SOC1* (Blázquez *et al.*, 1998; Blázquez y Weigel, 2000; Moon *et al.*, 2003; Hisamatsu y King, 2008) y por otro reprimiendo la expresión de *SVP* (Li *et al.*, 2008). Asimismo se ha demostrado que las giberelinas inducen la floración promoviendo la expresión de *FT* en las hojas y de los genes *SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE (SPL)* en el meristemo (Galvão *et al.*, 2012).

En la ruta autónoma de la floración en *Arabidopsis* participan genes que presentan una actividad de disminución de los niveles de FLC a través de la

remodelación de la cromatina y de la unión a su ARN mensajero (Bäurle y Dean, 2008). Algunos de estos genes de la ruta autónoma, en concreto *FCA* y *FVE* también participan en la percepción de la temperatura ambiental (Blázquez et al., 2003).

La ruta de la edad en *Arabidopsis* integra la información del fotoperiodo y la edad de la planta. Esta ruta implica a los microARNs (mRNAs) 156 y 172 y factores transcripcionales como SPL y APETALA 2 (AP2) y modula la expresión de diferentes reguladores de la transición floral (Mathieu *et al.*, 2009; Wang *et al.* 2009).

La información de todas estas rutas converge en la regulación transcripcional de varios integradores florales (*LFY*, *FT*, *SOC1* y *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)* en *Arabidopsis*), que a su vez regulan la actividad de los genes de identidad del meristemo floral, como *LFY*, *APETALA 1 (AP1)* y *CAULIFLOWER (CAL)*, que en última instancia inducirán la formación de las flores en los laterales del meristemo inflorescente.

OBJETIVOS

Leontopodium alpinum Cass. es una especie silvestre que cuenta con un notable interés ornamental, medicinal y farmacológico. Sin embargo, se trata de una especie amenazada con un importante régimen de protección en todos los países en los que se encuentra, lo que condiciona las posibilidades de aprovechamiento desde un punto de vista comercial o industrial.

La utilización de las técnicas de micropropagación *in vitro* es una importante alternativa a la propagación convencional de plantas, permitiendo la obtención de gran número de plantas clonales a la vez que se reducen las necesidades de espacio y trabajo. En particular, estas técnicas resultan de gran utilidad cuando se aplican a especies amenazadas, contribuyendo a los programas de conservación y facilitando otros programas relacionados con la mejora vegetal o la explotación comercial de estas especies.

Por ello, resulta relevante el desarrollo de métodos de micropropagación *en L. alpinum* para la producción de material vegetal que pueda estar disponible para los fines comentados.

Dentro de este marco, nos planteamos los **objetivos** de la presente Tesis Doctoral:

PRIMERO: Obtener plantas de *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss) mediante propagación *in vitro* que permitan garantizar su producción en masa.

SEGUNDO: Evaluar y caracterizar morfológicamente el material propagado *in vitro* y cultivado en condiciones de invernadero a nivel del mar.

TERCERO: Estudiar la capacidad de inducción de la floración en el material propagado *in vitro* en condiciones ambientales distintas a las naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

En el presente trabajo se emplearon plantas silvestres de *Leontopodium alpinum* ssp. *alpinum*. Plantas adultas en plena floración y semillas de inflorescencias en senescencia fueron recolectadas en el Puerto de Bujaruelo, en el Pirineo Aragonés (provincia de Huesca, España).

1.1. RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL SILVESTRE

1.1.1. Localización

La situación geográfica de las plantas recolectadas en el Puerto de Bujaruelo correspondía a las coordenadas señaladas en la tabla 2.

Tabla 2. Coordenadas de la localización de las plantas silvestres de *L. alpinum*

Longitud	Latitud	Altitud
W 0° 04' 15 ''	N 42° 42' 10''	1900 m

Una ejemplo de las inflorescencias encontradas se muestra en la figura 8A. En este punto, el terreno presenta una estructura de tipo calcáreo (Figura 8B), con pastos pedregosos y grandes rocas que se han desprendido de las laderas de la formación montañosa de los Gabietos.



Figura 8. Localización de las plantas recolectadas de *L. alpinum* en el Puerto de Bujaruelo. A. Inflorescencias de *L. alpinum* presentes en la zona de recolección. B. Vista de la cadena montañosa de los Gabietos desde el lugar donde se localizaron las plantas.

El clima de la localización es de alta montaña. Se dispone de datos climáticos de la misma comarca de nuestra localización publicados por Benito-Alonso (2005). Estos datos están basados en las aportaciones de la estación meteorológica situada junto al refugio de Góriz, a 2200 m de altitud, así como en otras sondas de humedad y temperatura en localizaciones próximas a la de nuestro material.

Según estos datos los inviernos son fríos, con temperaturas medias diarias en torno a 0 °C, largos períodos de heladas y con el suelo permanentemente cubierto de nieve. El período de nevadas comprende habitualmente desde noviembre hasta mayo. Los meses más cálidos son los de julio y agosto, con temperaturas medias de 14 °C y fenómenos tormentosos habituales.

1.1.2. Recolección de material vegetal

La recolección de plantas silvestres se llevó a cabo en dos campañas diferentes, en julio de 2008 y 2009. El procedimiento de recolección se basó en la elección de tres plantas en plena floración representativas de la morfología de la población estudiada.

Las plantas fueron extraídas del suelo con un cepellón de tierra para minimizar el daño sobre las raíces y se colocaron en un recipiente en el que mantuvieron en ambiente húmedo para evitar su desecación durante el transporte hasta el laboratorio.

También se recogieron semillas de inflorescencias que habían completado su ciclo reproductivo y comenzaban su proceso de senescencia. Las semillas se guardaron en tubos de 1,5 mL y se almacenaron a 8 °C una vez en el laboratorio.

1.2. CONDICIONES DE CULTIVO DE PLANTAS DE SEMILLA

1.2.1. Cultivo de plantas en alvéolos

Las semillas de *L. alpinum*, se sembraron en semillero, repartiéndose en una mezcla de turba y vermiculita 1:1 (v/v) contenida en bandejas de plástico y regada por inmersión con agua destilada. Tras la siembra las bandejas se cubrieron con plástico transparente para mantener la humedad y evitar contaminaciones procedentes de plantas próximas y se colocaron en el invernadero. A los pocos días se perforó el plástico

y el número y tamaño de las perforaciones se fue aumentando progresivamente hasta que a los 7 días se retiró completamente.

Transcurridas unas cuatro semanas desde la siembra, cuando las plantas contaban con 6-8 hojas, se realizó el transplante a alvéolos de plástico de 8 x 8 x 6,5 cm que se dispusieron en bandejas a razón de 20 alvéolos por bandeja. Se empleó como sustrato mezcla de turba y fibra de coco 1:1 (v/v) y antes de colocar las plantas las radículas se mojaron en solución fungicida de 1 g/L de Benomilo 50 Vallés (IQV). El riego se llevó a cabo por inmersión con agua destilada según necesidad de la planta. Una vez por semana se regaron con solución Hoagland n°1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966).

En el invernadero la temperatura se mantuvo a 22 °C de día y 18 °C de noche con un fotoperíodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). Cuando fue necesario, la luz natural se suplementó con luz artificial mediante lámparas de halogenuro metálico POWERSTAR® HQI®-BT 400 W/D Daylight E40 (Osram) y de sodio a alta presión MASTER SON-T PIA PLUS Hg Free 400W/220 E40 1SL (Philips).

1.2.2. Cultivo de plantas *in vitro*

El cultivo *in vitro* se realizó en cámara de cultivo con temperatura constante de 24 °C bajo condiciones de fotoperíodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). La luz fue suministrada por tubos fluorescentes de tipo GroLux 36 W (Sylvania) con una intensidad de 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$.

Las semillas se esterilizaron por inmersión con agitación durante 3 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 15% (v/v) y 0,02% de Tritón X-100 (v/v). Posteriormente se eliminó la solución y se realizaron tres lavados con agua desionizada estéril. Las semillas esterilizadas se repartieron uniformemente en placas de Petri de 90 mm x 15 mm (Sterilin) que contenían medio de germinación [2,2 g/L de sales MS (Duchefa), 20 g/L sacarosa, 0,1 g/L MES pH 5,9, 0,6% agar (Pronadisa)]. Las placas de Petri se trasladaron a una cámara de cultivo *in vitro* con las condiciones señaladas anteriormente.

Las plantas cuyo cultivo se había iniciado en placas de Petri, fueron posteriormente transplantadas a alveolos en el invernadero por el mismo procedimiento

descrito en el apartado 1.2.1. Las bandejas permanecieron cubiertas con plástico transparente, en el que progresivamente se fueron haciendo perforaciones a fin de evitar una excesiva condensación de agua durante varios días. Tras el período de aclimatación, las plantas se cultivaron en cabinas de invernadero bajo condiciones controladas de luz y temperatura como se describe en el apartado 1.2.1.

1.3. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal fue caracterizado teniendo en cuenta diversos parámetros detallados a continuación.

1.3.1. Caracterización morfológica

1.3.1.1 Caracteres de la planta

- a) *Altura del tallo floral.* La distancia en centímetros desde la base de la roseta en suelo y el extremo superior de la inflorescencia. Para su medida se utilizó una regla graduada.
- b) *Número de hojas del tallo floral.* Definido como el número de hojas que se distribuyen a lo largo del tallo de la inflorescencia, contadas desde la base del tallo hasta la base de los capítulos.
- c) *Longitud de la hoja del tallo floral.* La distancia medida en milímetros desde el punto de unión con el tallo de la inflorescencia hasta el extremo distal de la hoja.
- d) *Anchura de la hoja del tallo floral.* Se define como la anchura máxima del limbo de la hoja medida en milímetros.
- e) *Número de capítulos,* que conforman la inflorescencia.
- f) *Número de brácteas,* que forman el involucre.
- g) *Longitud de la bráctea del involucre:* La distancia medida en milímetros desde el punto de unión con la base del involucre hasta el extremo distal de la bráctea.
- h) *Anchura de la bráctea del involucre.* Se define como la anchura en milímetros del limbo de la bráctea medida hacia la mitad de su largo.
- i) *Anchura de la inflorescencia.* El diámetro en milímetros del involucre de brácteas de la inflorescencia

1.3.1.2 Caracteres de la biología floral

- a) *Número y disposición de flores femeninas y hermafroditas.*
- b) *Morfología de las flores.*

Los caracteres morfológicos descritos fueron establecidos basándose en los utilizados para esta especie que se pueden encontrar en la bibliografía (Handel-Mazetti, 1928; Wagenitz, 1979; Oriol de Bolòs *et al.*, 1990). En el caso de la población silvestre el muestreo realizado fue del tipo al azar simple.

1.3.2. **Análisis de la germinación y la viabilidad de los granos de polen**

1.3.2.1 Ensayo de germinación de polen *in vitro*

Para realizar el ensayo de germinación de los granos de polen de las plantas de *L. alpinum* se preparó medio líquido de germinación del polen (sacarosa 0,292 M, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1,27 mM, H_3BO_3 1,62 mM, KNO_3 1 mM, KH_2PO_4 0,1 mM) modificado de Brewbaker y Kwack (1963). Se añadió agarosa al 0,5% y se fundió en el microondas. El medio se distribuyó uniformemente sobre portaobjetos de vidrio con una pipeta y, una vez solidificado, se espolvorearon los granos de polen correspondientes a un capítulo de la inflorescencia de *L. alpinum*. Los portaobjetos se incubaron en oscuridad a una temperatura de 24 °C durante cuatro horas tras las cuales se procedió al conteo de los granos de polen germinados en un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Eclipse E800). Se consideró que un grano de polen ha germinado cuando la longitud de su tubo polínico es igual o superior al diámetro del grano. El recuento se realizó considerando toda la superficie del portaobjetos en porcentaje de granos germinados dividido por granos totales.

1.3.2.2 Ensayo de viabilidad de los granos de polen

Para comprobar la viabilidad de los granos de polen de las plantas de *L. alpinum* se utilizó el método de fijación y teñido de los cromosomas con una solución de acetato de carmín. La solución se preparó diluyendo 0,5 g de carmín (Sigma) en ácido acético glacial al 45% (v/v), calentándola hasta ebullición. Luego se diluyó 1:1 en glicerol al 30% (v/v). Los granos de polen correspondientes a un capítulo se espolvorearon sobre un

portaobjetos y se tiñeron con unas gotas de la solución. Las muestras fueron observadas y fotografiadas con un microscopio óptico Eclipse E800 acoplado con una cámara DXM1200F (ambos de Nikon).

1.3.3. Otros métodos asociados al análisis fenotípico de plantas

1.3.3.1 Criomicroscopía electrónica de barrido

El uso del criomicroscopio evitó la necesidad de fijar y deshidratar las muestras para su estudio evitando con ello la aparición de artefactos en las muestras. Se utilizó para fotografiar flores de las plantas de semilla y de las planta micropropagadas de *Leontopodium alpinum*. Las muestras se procesaron en el servicio de microscopía de la Universidad Politécnica de Valencia, donde se utilizó un microscopio electrónico de barrido JSM-5410 (JEOL) acoplado al instrumental de criomicroscopía “CryoTrans 1500 Cryo-Preparation System” (Oxford Instruments)

1.3.3.2 Análisis del nivel de ploidía mediante citometría de flujo

Para el análisis del nivel de ploidía se utilizaron hojas de la roseta basal. El tejido vegetal (aproximadamente 1 cm²) se colocó en una placa, se añadieron 200 µL de tampón de extracción de núcleos (Partec Extraction Buffer) y se troceó con una cuchilla. A continuación se añadieron 800 µL de la solución colorante que contiene 1 mg/L de DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole; Partec Staining Buffer) para conseguir así la tinción de ADN. La mezcla se pasó a través de un filtro de nylon de 50 µm de poro y la fluorescencia del ADN de los núcleos aislados se midió utilizando un citómetro de flujo Partec PAS-II provisto de una lámpara de mercurio. La excitación del fluoróforo se realiza por debajo de 420 nm y la emisión de la fluorescencia ocurre, para el DAPI, en la región del azul, entre 435 y 500 nm. El resultado aparece trazado en un histograma donde el eje de abscisas representa la cantidad de ADN (proporcional a la fluorescencia) y el eje de ordenadas el número de núcleos. El sistema se calibró previamente situando el pico correspondiente a un contenido de ADN igual a 2C (diploide) sobre el valor 50 de la escala de abscisas. El patrón de mixoploidía se determina según el área relativa (en porcentaje) de los picos correspondientes a las distintas poblaciones celulares (2C, 4C, 8C, etc.).

1.4. POLINIZACIÓN CRUZADA

La polinización cruzada se realizó de forma manual espolvoreando polen de flores hermafroditas de una planta donadora sobre las flores femeninas de las inflorescencias de una planta receptora. Previamente a la polinización, las inflorescencias receptoras de polen se embolsaron mientras el botón floral todavía permanecía cerrado.

2. MICROPROPAGACIÓN DE *Leontopodium alpinum*

2.1. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE EXPLANTES

El material vegetal de origen silvestre se lavó con agua corriente durante 30 minutos y después con alcohol etílico al 1% (v/v) durante un minuto. A continuación se procedió a la desinfección superficial durante 20 minutos en solución de lejía comercial (50 g/L de cloro activo) diluida al 20% y adicionado con 0,005% de detergente Tween® 20 (Panreac) para romper la tensión superficial de los tejidos, mejorando así el contacto entre el tejido y el esterilizante. Tras la esterilización, se eliminó la solución de desinfección mediante tres lavados sucesivos de 5, 10 y 15 minutos respectivamente en agitación con abundante agua estéril. Posteriormente se procedió a la obtención de los explantes en condiciones axénicas. Se seleccionaron diferentes tipos de explantes para establecer el cultivo *in vitro*: segmentos nodales de tallo floral, flores y hojas.

2.1.1. Cultivo de segmentos nodales de tallo floral

Se realizaron secciones del tallo floral conteniendo un nudo y una yema axilar, con aproximadamente 0,5 cm de tallo a cada lado del nudo. Las secciones se cultivaron insertadas en el medio en posición vertical en botes de vidrio con tapa de plástico translúcido con 125 mL de medio MB.

El cultivo de los explantes se llevó a cabo en cámara de cultivo con condiciones de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) a una temperatura de 24 ± 2 °C y con una intensidad lumínica de $65 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Grolux F58 W. El subcultivo a medio fresco se realizó cada tres semanas.

2.1.2. Cultivo de hojas

Las hojas se separaron del tallo, se eliminó el extremo distal y se realizaron 3-4 cortes sobre el limbo de la hoja de forma transversal al nervio central.

Los explantes se cultivaron en placas de Petri de 90 x 25 mm (Phoenix Biomedical) con 25 mL de medio de organogénesis EDH con el envés en contacto con el medio. El cultivo se llevó a cabo inicialmente en oscuridad a una temperatura de 24 ± 2 °C durante dos semanas para posteriormente pasar a las mismas condiciones utilizadas para el cultivo de segmentos nodales de tallo floral (apartado 2.1.1).

2.1.3. Cultivo de flores

Las inflorescencias se separaron en capítulos y, utilizando un microscopio estereoscópico, (Olympus SZ60 acoplado a una fuente de luz Zeiss KL 1500 electronic) se aislaron las flores individuales que se cultivaron en placas de Petri de 90 x 25 mm con 25 mL de medio EDFL. El cultivo de flores femeninas y de flores hermafroditas se realizó por separado. Se cultivaron en condiciones de oscuridad durante tres semanas antes de trasladarse a las condiciones señaladas para los otros explantes (apartado 2.1.1). Para el ensayo se utilizaron como explantes 20 flores femeninas y 15 flores hermafroditas en la campaña 2008 y 45 flores femeninas y 40 flores hermafroditas en la campaña 2009. Las flores en ambas campañas se obtuvieron de varios capítulos de una única inflorescencia.

2.2. MULTIPLICACIÓN DE BROTES EN CULTIVO AXÉNICO

Los brotes de 1 a 1,5 cm obtenidos en los ensayos de implantación *in vitro* se aislaron de los explantes y se cultivaron en botes de vidrio con tapa de plástico translúcido con 125 mL de medio de multiplicación EDM. El cultivo se llevó a cabo en las condiciones de fotoperíodo y temperatura descritas en el apartado 2.1.1. Los brotes que aparecían en los distintos subcultivos (cada cuatro semanas) se repicaron a medio de cultivo fresco o, alternativamente, se pasaban a medio de enraizamiento.

2.3. ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN

Los brotes obtenidos de la fase de multiplicación se aislaron y se cultivaron en botes de vidrio con tapa de plástico traslúcido con 125 mL de medio de enraizamiento EDR. Los cultivos se sometieron a condiciones de fotoperíodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) con una intensidad lumínica de $50 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ suministrada por una fuente de luz fría (tubos fluorescentes Philips TLD 36W/33-640) y una temperatura de 20 ± 2 °C. A las 8 semanas de cultivo se procedió a su aclimatación en invernadero en las condiciones descritas en el apartado 1.2.2 de esta sección.

2.3.1. Efecto de la adición de distintas concentraciones de ácido indolacético (AIA) al medio de enraizamiento

Para determinar el medio de cultivo más adecuado para el enraizamiento de los brotes regenerados y multiplicados *in vitro*, se utilizó el medio EDR al que se añadieron distintas concentraciones de la auxina AIA (Sigma): 0; 0,2; 0,5 y 1 mg/L. Se utilizaron brotes regenerados a partir de flor femenina en la campaña 2008.

Por cada medio de cultivo ensayado se emplearon 25 brotes desarrollados, distribuidos en dos botes de cultivo. Los explantes se mantuvieron en el medio de cultivo durante ocho semanas. Tras este tiempo se contabilizó el número de plantas con emisión de raíces, el número de raíces por planta y la longitud máxima de las mismas. El ensayo se llevó a cabo por duplicado.

2.3.2. Evaluación de distintos sustratos para el cultivo de las plantas

Con el fin de determinar el sustrato idóneo para la aclimatación y cultivo de las plantas micropropagadas se evaluaron distintas composiciones del mismo: a) mezcla de turba : arena 1:1 (v/v), b) tacos de turba prensada Jiffy-7[®], c) mezcla de arena : perlita 1:1 (v/v) y d) mezcla de turba : fibra de coco 1:1 (v/v). El material vegetal del ensayo fueron plantas regeneradas a partir de flor femenina en la campaña 2008.

Se utilizaron 20 plantas enraizadas *in vitro* por sustrato ensayado. Las plantas se mantuvieron en cultivo durante seis semanas. Transcurrido este tiempo, las plantas se

extrajeran del sustrato y se procedió a la lectura de la altura y la anchura de la planta, el número de raíces por planta y la longitud máxima de las raíces. El ensayo se llevó a cabo por duplicado.

2.4. MICROPROPAGACIÓN A PARTIR DE HOJAS

Como fuente de explantes de hoja para nuevos experimentos de regeneración de plantas se utilizó material multiplicado *in vitro* en medio EDM.

Se extrajeran del medio de cultivo, en condiciones axénicas, brotes desarrollados de aproximadamente 4 cm y se realizó un corte cercano a la base de los mismos. A continuación se separaron del tallo hojas de 2-3 cm de longitud, incluyendo los peciolo, con ayuda de unas pinzas. Se eliminaron los bordes de la hoja y el extremo distal y se realizaron 3-4 cortes sobre el limbo de la hoja de forma transversal al nervio central. Las hojas se situaron con el envés en contacto con el medio de cultivo.

Los explantes se cultivaron en placas de Petri de 90 x 25 mm (Phoenix Biomedical) con 25 mL de medio de inducción de organogénesis en presencia de tiazurón (TDZ, Duchefa). El cultivo se llevó a cabo a una temperatura de 24 ± 2 °C inicialmente en oscuridad durante tres semanas para posteriormente pasar a un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. A las cuatro semanas se realizó un subcultivo a medio EDS, en el que se sustituye el TDZ por 1 mg/L de N⁶-benzilaminopurina (BAP, Duchefa), para promover el desarrollo de los brotes regenerados.

2.4.1. Ensayo de medios de inducción de organogénesis

Se ensayaron distintos medios de inducción basados en el medio EDH utilizado para el cultivo de hojas (apartado 2.1.2 de esta sección). En estos medios se ensayó la utilización de la solución mineral MS (Murashige y Skoog, 1962) o la solución mineral LP (Quoirin y Lepoivre, 1977) en combinación con tres concentraciones (0; 1,66 y 3 mg/L) de TDZ. Se utilizaron 45 explantes de hoja para cada combinación de sales minerales y concentración de TDZ.

Al final del ensayo se calculó el porcentaje de explantes que desarrollaban brotes (explantes organogénicos) y el número medio de brotes por explante organogénico.

2.4.2. Efecto de la presencia de yema axilar

Con el fin de determinar el efecto de la presencia de la yema en la base de la hoja para el desarrollo de nuevas estructuras organogénicas se realizó un ensayo en el que se eliminó o se conservó dicha yema en el momento del establecimiento de los explantes en el medio de cultivo con sales MS y 3 mg/L de TDZ.

El manejo del cultivo se realizó según lo descrito previamente. Se utilizaron 50 explantes de hoja para cada ensayo.

Al final del ensayo se evaluó la respuesta callogénica y la organogénica. Como variables de la respuesta callogénica se utilizó el porcentaje de explantes que formaban callo y el índice de formación de callo. Este índice se obtiene asignando un valor de 0 a 4 a cada explante en función de la zona en la que se forma el callo.

0= no hay formación de callo

1= formación de callo en el 0-25% de superficie del explante

2= formación de callo en el 25-50% de la superficie del explante

3= formación de callo en el 50-75% de la superficie del explante

4= formación de callo en el 75-100 % de la superficie del explante

Las variables de la respuesta organogénica fueron el porcentaje de explantes que desarrollaban brotes y el número medio de brotes por explante organogénico.

2.5. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Tras disolver en solución acuosa todos los componentes, se ajusta el pH a 5,8 con ayuda de NaOH 1N y HCl 1N, antes de añadir el agente gelificante, en el caso de los medios sólidos. Los medios se esterilizan por calor húmedo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Los medios que no se pueden autoclavar y los antibióticos se esterilizan por filtración.

2.6. SOLUCIONES MINERALES

Solución mineral A		mg/L
<i>Macronutrientes (DKW)*</i>	NH ₄ NO ₃	1416
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	149
	CaNO ₃ ·4H ₂ O	1969
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	740
	KH ₂ PO ₄	265
	K ₂ SO ₄	1559
<i>Micronutrientes (MSII)</i>	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ ·2H ₂ O	16,90
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
<i>FeNa·EDTA (MSIII)</i>	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
	Na ₂ ·EDTA	37,3

* Medio DKW/Juglans (Driver y Kuniyuki, 1984)

Solución mineral B		mg/L
<i>Macronutrientes (BI)</i>	NH ₄ NO ₃	400
	KNO ₃	2100
	CaNO ₃ ·4H ₂ O	1200
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	360
	KH ₂ PO ₄	270
<i>Micronutrientes (MSII)</i>	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ ·2H ₂ O	16,90
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
<i>FeNa·EDTA (MSIII)</i>	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
	Na ₂ ·EDTA	37,3

Solución mineral MS de Murashige y Skoog (1962)		mg/L
<i>Macronutrientes (MSI)</i>	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
<i>Micronutrientes (MSII)</i>	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ ·2H ₂ O	16,90
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
<i>FeNa·EDTA (MSIII)</i>	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
	Na ₂ ·EDTA	37,3

Solución mineral LP de Quoirin y Lepoivre (1977)		mg/L
<i>Macronutrientes (LPI)</i>	NH ₄ NO ₃	400
	KNO ₃	1800
	CaNO ₃ ·4H ₂ O	1200
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	360
	KH ₂ PO ₄	270
<i>Micronutrientes (LPII)</i>	KI	0,08
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ ·2H ₂ O	0,76
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
<i>FeNa-EDTA (MSIII)</i>	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
	Na ₂ -EDTA	37,3

2.7. SOLUCIONES VITAMÍNICAS

Solución vitamínica de Murashige y Skoog (1962)

Vitaminas	mg/L
Glicina	2
Myo-inositol	100
Ácido nicotínico	0,50
Piridoxina -HCl	0,50
Tiamina-HCl	0,10

2.8. MEDIOS DE CULTIVO

Medio de germinación

	g/L
Solución mineral	MS (Duchefa)
Sacarosa	20
MES	0,1
Agar Bacteriológico Europeo (Pronadisa)	6

Medio de establecimiento de segmentos de tallo nodal (MB)

	g/L
Solución mineral	MS (Duchefa)
Sacarosa	30
Solución vitamínica	MS (Duchefa)
Agar Bacteriológico Europeo (Pronadisa)	6

Medio de inducción de organogénesis a partir de hojas (EDH)

	g/L
Solución mineral	MS (Duchefa)
Sacarosa	30
Solución vitamínica	MS (Duchefa)
TDZ	$1,66 \cdot 10^{-3}$
AIB	$0,5 \cdot 10^{-3}$
Agar Bacteriológico Europeo (Pronadisa)	6

Medio de inducción de organogénesis a partir de flores (EDFL)

	g/L
Solución mineral	A
Sacarosa	30
Solución vitamínica	MS (Duchefa)
TDZ	$0,1 \cdot 10^{-3}$
AIA	$0,2 \cdot 10^{-3}$
Agar Bacteriológico Europeo (Pronadisa)	6

Medio de elongación de brotes (EDS)

	g/L
Solución mineral	MS (Duchefa)
Sacarosa	30
Solución vitamínica	MS (Duchefa)
BAP	$1 \cdot 10^{-3}$
AIB	$0,5 \cdot 10^{-3}$
Agar Bacteriológico Europeo (Pronadisa)	6

Medio de multiplicación de brotes (EDM)

	g/L
Solución mineral	B
Sacarosa	30
Solución vitamínica	MS (Duchefa)
Ácido fólico	$1 \cdot 10^{-3}$
BAP	$0,2 \cdot 10^{-3}$
AIA	$0,1 \cdot 10^{-3}$
Agar Bacteriológico Europeo (Pronadisa)	6

Medio de enraizamiento (EDR)

	g/L
Solución mineral	LP (Duchefa)
Sacarosa	20
Solución vitamínica	MS (Duchefa)
Agar Bacteriológico Europeo (Pronadisa)	5,5

3. ENSAYOS DE INDUCCIÓN DE LA FLORACIÓN EN PLANTAS CULTIVADAS EN INVERNADERO

Para los ensayos de inducción de la floración en condiciones de invernadero se utilizaron plantas micropropagadas a partir de flor femenina de plantas silvestres de *L. alpinum* de la campaña 2008. Todas las plantas se aclimataron en invernadero en condiciones de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) y temperatura de 22 °C de día y 18 °C de noche, según se describe en el apartado 1.2.2 de esta sección.

En cada uno de los ensayos se evaluó el número de plantas que desarrollaban inflorescencias, el número de inflorescencias por planta y las características fenotípicas de estas inflorescencias establecidas en el apartado 1.3.1 de esta sección.

3.1. ENSAYO DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO

Se transfirieron 20 plantas a una cámara de cultivo CONVIRON con una temperatura de 20 °C en condiciones de día y 8 °C durante la noche. La luz era suministrada por tubos de fluorescencia fría (Sylvania 215 W) siguiendo un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Otras 20 plantas se mantuvieron en cultivo a temperatura de 22 °C de día y 18 °C de noche y fotoperíodo de día largo en la misma cabina de invernadero en que se llevó a cabo la aclimatación.

El ensayo se mantuvo por un período de 24 semanas.

3.2. ENSAYO DE LAS CONDICIONES DE FOTOPERÍODO

Se utilizaron 50 plantas divididas en cinco lotes de 10 plantas. Uno de los lotes se mantuvo en cultivo en las condiciones de día largo mientras que los otros cuatro se trasladaron a una cámara de cultivo CONVIRON con un fotoperíodo de día corto (8 h de luz y 16 h de oscuridad). La luz en esta cámara fue suministrada por 12 tubos fluorescentes de tipo Cool-White 160V H168 (Sylvania) y cinco bombillas incandescentes de 100 W. Las condiciones de temperatura fueron las mismas que en el cultivo en día largo (22 °C de día y 18 °C de noche).

El ensayo se llevó a cabo en un período de 24 semanas según se muestra en la tabla 3. En este tiempo, cada lote se cultivó inicialmente un número determinado de semanas en condiciones de día corto. Posteriormente los lotes se trasladaron a condiciones de día largo hasta completar en conjunto las 24 semanas de ensayo.

Tabla 3. Distribución del número de semanas de cultivo en día largo y día corto de cada uno de los lotes del ensayo de influencia de las condiciones de fotoperíodo sobre la inducción de la floración.

Lote *	Día corto (semanas)	Día largo (semanas)
1	0	24
2	4	20
3	8	16
4	16	8
5	24	0

*El número total de semanas de cultivo de cada lote es la suma de las correspondientes a día corto más día largo

Al final del ensayo se evaluó el efecto sobre la floración en los distintos lotes.

3.3. ENSAYO DE VERNALIZACIÓN DE PLANTAS ACLIMATADAS

Se trasladaron 30 plantas a cultivo en una cabina de vernalización con temperatura a 4 °C y fotoperíodo de día largo (16 h de luz y 8h de oscuridad). La luz fue suministrada por tubos fluorescentes de tipo Cool-White (Sylvania) de 215 W aportando una intensidad lumínica de 23 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones durante cuatro semanas. Posteriormente volvieron a trasladarse a las condiciones de cultivo de partida descritas en el apartado 1.2.2 de esta sección, con temperaturas de 22 °C de día y 18 °C de noche.

El ensayo se mantuvo durante 24 semanas.

3.4. ENSAYOS DE APLICACIÓN DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO

3.4.1. Tratamientos

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes tratamientos hormonales:

- a) Ácido giberélico (**GA₃**, Duchefa) a concentración de $3 \cdot 10^{-4}$ M, equivalente a 100 mg/L. El tratamiento se preparó a partir de una solución stock en metanol de **GA₃** 10^{-2} M y también incorporaba Tween® 20 (Sigma-Aldrich) al 0,1%.
- b) **Promalín®** (Kenogard), un fitorregulador comercial en formulación líquida que contiene una mezcla de giberelinas **GA₄+GA₇** [1,9% (p/v)] y la citoquinina BAP [1,9% (p/v)]. Se utilizó como una dilución de 1 mL/L equivalente a una concentración de 20 mg/L de **GA₄+GA₇** y 20 mg/L de BAP.
- c) Mezcla de giberelinas **GA₄+GA₇** (Duchefa) a concentración de 20 mg/L. El tratamiento se preparó a partir de una solución stock en metanol de la mezcla **GA₄+GA₇** a 10 mg/mL y también incorporaba Tween® 20 (Sigma-Aldrich) al 0,1%.
- d) **AG-100®** (Químicas Oro), un fitorregulador comercial en formulación líquida que contiene **GA₃** [1,6% (p/v)]. Se utilizó a una dilución de 6,25 mL/L equivalente a 100 mg/L de **GA₃**.

Los tratamientos se aplicaron mediante rociado de la roseta basal de hojas utilizando un volumen de 3 mL por planta. En aquellos casos en los que se realizó más de una aplicación, éstas se realizaron con una semana de diferencia.

3.4.2. Ensayo de la aplicación de giberelinas

En un primer ensayo se utilizaron los tratamientos con **GA₃** y **Promalín®**. El tratamiento con **GA₃** se suministró en una única aplicación mientras que el tratamiento con **Promalín®** se suministró en una y tres aplicaciones.

Cada uno de los tratamientos, así como un control (sin tratar), se realizaron sobre 45 plantas.

3.4.3. Ensayo de dosis de regulador del crecimiento

En este ensayo se utilizaron los tratamientos con **GA₃**, **Promalín®** y **GA₄+GA₇**, a dos concentraciones diferentes. El tratamiento de **GA₃** se ensayó a concentraciones de $3 \cdot 10^{-5}$ M y $3 \cdot 10^{-4}$ M, equivalente a 10 y 100 mg/L. El tratamiento con **Promalín®** se ensayó como diluciones de 1 y 10 mL/L equivalentes a concentraciones de 20 y 200 mg/L de

GA₄+GA₇ y de BAP. Por su parte, el tratamiento de GA₄+GA₇ se ensayó a concentraciones de 20 y 200 mg/L.

Cada dosis de tratamiento se ensayó sobre un grupo de 36 plantas realizando una única aplicación.

3.4.4. Ensayo del número de aplicaciones de tratamiento

Se utilizaron los tratamientos con GA₃, Promalín® y GA₄+GA₇. Para cada tratamiento se probaron una, dos o tres aplicaciones. Así mismo se utilizó una aplicación continuada del tratamiento, una vez por semana durante todo el transcurso del ensayo (24 semanas). Cada tratamiento en combinación con el número de aplicaciones se ensayó sobre un grupo de 19 plantas.

3.4.5. Ensayo de la edad de la planta en el momento del tratamiento

Se utilizó el tratamiento con GA₃ con tres aplicaciones sobre lotes de plantas que variaban en el tiempo de cultivo en el invernadero. Se utilizaron tres grupos de 29 plantas que llevaban ocho semanas, 16 semanas y un año de cultivo, respectivamente, tras la aclimatación.

3.4.6. Ensayo de la formulación de GA₃

Se utilizaron los tratamientos con GA₃ y AG-100®, suministrados en una única aplicación. Cada tratamiento se realizó sobre un grupo de 10 plantas de 20 semanas de cultivo en invernadero.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados mediante ANOVA y sus medias comparadas mediante contrastes múltiples de igualdad utilizando el paquete estadístico "Statgraphics" versión 5.1.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL DE PARTIDA

El material de partida del presente trabajo fueron plantas y semillas silvestres de *Leontopodium alpinum* Cass. recogidas en la montaña, concretamente en el Puerto de Bujaruelo (Pirineo Aragonés). Las plantas silvestres se caracterizaron atendiendo a distintos aspectos de su morfología y a elementos relacionados con su capacidad reproductiva, como la fertilidad del polen y la capacidad de germinación de sus semillas. Con estos mismos criterios se caracterizaron las plantas obtenidas a partir de semilla silvestre, pero cultivadas en condiciones de invernadero.

1.1 PLANTAS SILVESTRES

1.1.1 Estudio de los caracteres morfológicos de las plantas silvestres

Diferentes estudios sobre *L. alpinum* constatan la existencia de una acusada variabilidad morfológica en esta especie, sobre todo en las estructuras aéreas (Resmerita, 1973; Siljak *et al.*, 1974), por lo que resulta necesario realizar una caracterización morfológica de las plantas silvestres que conforman la población original fuente del material vegetal de este estudio.

En el momento de la toma de datos experimentales en campo las plantas se encontraban en plena floración. El primer rasgo observado fue la gran variabilidad en el número de tallos florales por planta, desde 2 hasta 40 (Figura 9A y B). Las plantas mostraban un recubrimiento de pelos filamentosos en toda su superficie, coincidiendo con lo descrito en la bibliografía (Handel-Mazzetti, 1927; Tutin *et al.*, 1976; Wagenitz, 1979).

Las hojas eran enteras y con el haz de color verde glauco, mientras el envés tenía un color grisáceo debido a la mayor densidad de pelos. Las hojas basales, dispuestas en roseta, presentaban una forma ligeramente oblanceolada (Figura 9C) mientras que las hojas del tallo floral, distribuidas de forma alterna, eran lineares y prácticamente sésiles (Figura 9D).

De forma concordante con la descripción habitual de *L. alpinum*, la inflorescencia estaba conformada por un número variable de capítulos florales, dispuestos en círculo, con uno de ellos en posición central y maduración avanzada respecto a los otros. Los

capítulos estaban rodeados a su vez por un involucre de brácteas lanceoladas en las que se encontraba la mayor densidad de pelos de la planta, confiriéndoles un color blanco intenso (Figura 9E).



Figura 9. Plantas silvestres de *Leontopodium alpinum*. **A.** Planta con dos inflorescencias. **B.** Planta con múltiples inflorescencias. **C.** Hojas basales. **D.** Segmento del tallo de la inflorescencia. Las hojas caulinares se distribuyen de forma alterna a lo largo del mismo. La punta de flecha señala los pelos filamentosos que recubren la superficie de la planta. **E.** Cabezuela de la inflorescencia. Las flores se agrupan en capítulos (punta de flecha blanca) dispuestos en círculo que a su vez se rodean de brácteas (punta de flecha amarilla) de aspecto lanoso. La maduración de los capítulos se produce desde el interior hacia el exterior. Las barras indican 1 cm, excepto en B, donde indica 5 cm.

Se realizó la medición de los distintos caracteres morfológicos de la inflorescencia en 30 individuos. En la tabla 4 se presentan los resultados de estas mediciones.

Los tallos florales presentaban una longitud de entre 7 y 20 cm, con una media de 15 cm (Tabla 4). Datos previos señalan que éste es un carácter muy variable, con alturas entre 2 y 45 cm (Handel Mazzetti, 1928), limitando el rango de 5 a 40 cm para los tallos florales de la especie en el Pirineo aragonés (Villar-Pérez *et al.*, 2001).

Algo similar ocurre con la anchura de la inflorescencia que, en nuestro caso, es de ~3 cm, mientras que Handel-Mazzetti (1928) habla de un rango de 1,5 a 10 cm. Por su parte, el número de capítulos por inflorescencia, en promedio, fue de aproximadamente

9 (rango entre 5 y 13) aunque en la bibliografía no se encuentran referencias superiores a 12 capítulos (Handel-Mazzetti, 1928; Fedorov, 1978; Rey y Slacanin, 1999).

Tabla 4. Caracteres morfológicos de las inflorescencias de plantas silvestres de *L. alpinum*.

Carácter	Media (\pm EE)*
Altura del tallo floral (cm)	14,91 \pm 1,13
Número de hojas del tallo floral	7,13 \pm 0,42
Longitud de las hojas (mm)	19,63 \pm 1,33
Anchura de las hojas (mm)	2,81 \pm 0,13
Número de capítulos	8,63 \pm 0,60
Número de brácteas del involucre	9,5 \pm 0,54
Longitud de las brácteas (mm)	11,89 \pm 0,87
Anchura de las brácteas (mm)	4,54 \pm 0,22
Anchura de la inflorescencia (mm)	28,63 \pm 1,09

*Para cada uno de los caracteres se presenta el valor de la media \pm el error estándar.

En cuanto a la biología floral, todas las plantas analizadas de la población inicial silvestre eran heterógamas, con flores hermafroditas (H) y flores femeninas (F) sobre el mismo pie (Figura 10A). Las flores hermafroditas ocupaban la parte interior del capítulo mientras que las femeninas se localizaban hacia el exterior del mismo. Tal y como se describió previamente en la especie, las flores mostraban una forma tubulosa, con ovario ínfero y el cáliz transformado en un vilano de pelos (Figura 10B).

Las flores femeninas contaban con una corola de 4 lóbulos de color verde pálido y un estilo bifido (Figura 10C). Las flores hermafroditas (Figura 10D) poseían una corola de 5 lóbulos, de color verde algo más intenso. Las anteras estaban soldadas entre sí formando un tubo atravesado por el estilo. El número promedio de flores por capítulo fue cercano a 40 (Tabla 5), de las cuales las flores femeninas usualmente eran más de la mitad de las flores totales de un capítulo.

Tabla 5. Número y distribución de flores por capítulo en inflorescencias de plantas silvestres.

Número de flores	Media (\pm EE)*
Totales	38 \pm 0,6
Femeninas	22 \pm 0,9
Hermafroditas	16 \pm 0,4

*Para cada uno de los datos se presenta el valor de la media \pm el error estándar.

Estos valores promedio son algo inferiores a los apuntados por Erhardt (1993), (60-80 flores/capítulo) ó Bergh y Verboom (2011), (50 flores/capítulo) que, por otro lado, también registran proporciones similares de flores de uno y otro sexo.

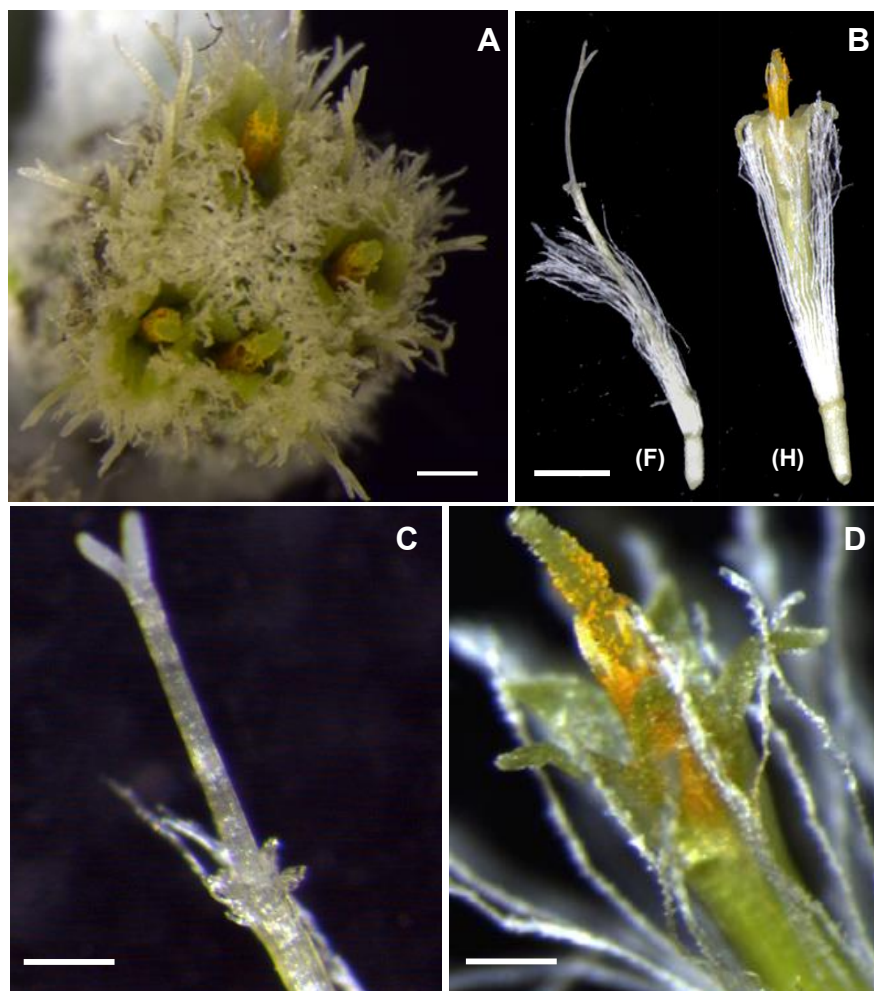


Figura 10. Flores de *Leontopodium alpinum*. A. Capítulo de flores de *L. alpinum*. Se distingue la presencia de flores femeninas y flores hermafroditas. B. Detalle de dos flores aisladas. Flor femenina (F) y flor hermafrodita (H). C. Flor femenina, con la corola de cuatro lóbulos. Se distingue el estilo bífido. D Flor hermafrodita, con la corola de cinco pétalos. El estilo atraviesa el tubo estaminal arrastrando los granos de polen. Las barras indican 1 mm en A y B y 0,5 mm en C y D.

1.1.2 Análisis de la viabilidad y de la capacidad de germinar del polen de las plantas silvestres

Las anteras de las flores hermafroditas disponían de abundante polen por lo que se procedió a analizar su funcionalidad mediante tinción con acetato de carmín, así como su capacidad de germinación *in vitro*.

La tinción de los granos de polen con acetato de carmín resultó positiva (Figura 11A), lo que indica que son viables. En el ensayo de germinación, cerca de un 60% de los granos presentaban emisión de tubo polínico en alguna medida (Figura 11B). Según Stanley y Liskens (1974), un grano de polen se considera germinado cuando el tubo polínico supera el diámetro del grano. Esto se observó en el 20% de los granos del ensayo. Actualmente no hay descrito ningún protocolo de germinación de polen en esta especie.

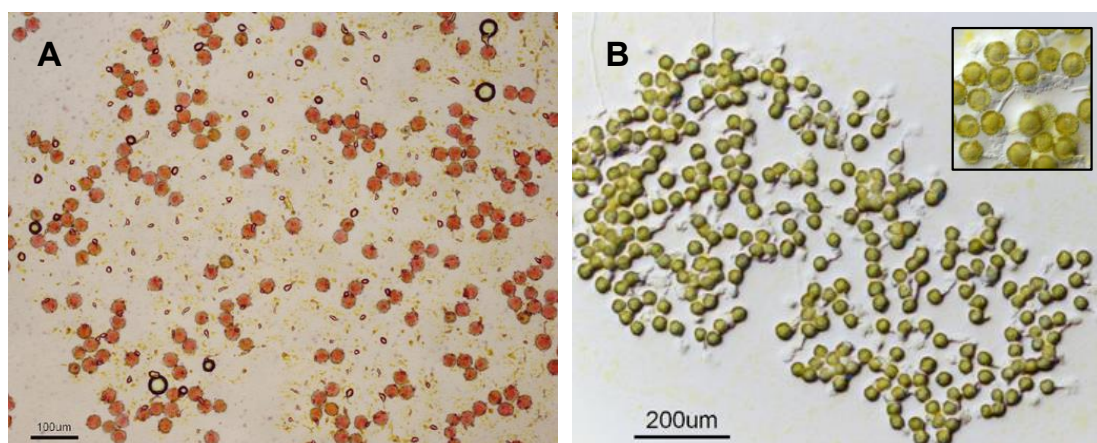


Figura 11. Ensayos de viabilidad de polen silvestre de *L. alpinum*. A. Tinción con acetato de carmín. B. Ensayo de germinación *in vitro* de granos de polen. En el detalle se observa el desarrollo de tubos polínicos.

1.1.3 Estudio de la capacidad de germinación de las semillas silvestres

Algunas de las plantas muestreadas habían completado su ciclo reproductivo y disponían de semillas. Para estudiar su capacidad de germinación se procedió a sembrarlas en semillero en el invernadero en condiciones estándar. En paralelo se realizó un ensayo de germinación *in vitro* a 24 °C de temperatura y fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. En ambos casos el porcentaje de semillas germinadas fue del 30%.

1.2 PLANTAS DE SEMILLA SILVESTRE CULTIVADAS EN INVERNADERO

La medida o valor que observamos al medir un carácter en un individuo es el valor fenotípico de ese individuo. Este valor fenotípico es el resultado de la suma de componentes atribuibles a la influencia del genotipo y a la influencia del ambiente. La

forma en que se expresa el fenotipo dentro de los límites impuestos por el genotipo depende de efectos ambientales (Pierce, 2009). Por este motivo, las características fenotípicas de una planta pueden variar entre las que muestran al crecer en condiciones silvestres a las que tienen al cultivarse en condiciones distintas a las de su hábitat natural.

Dado que uno de los objetivos de este trabajo es el desarrollo de un protocolo de micropropagación al final del cual las plantas se cultivan en condiciones de invernadero, se estudiaron las características del material silvestre en dichas condiciones. En este caso, se caracterizaron plantas obtenidas de semilla silvestre cultivadas en las condiciones estándar de invernadero.

1.2.1 Estudio de los caracteres morfológicos de las plantas procedentes de semilla silvestre

Las plántulas obtenidas en la siembra en semillero se trasplantaron a maceta y se cultivaron en condiciones de fotoperíodo de día largo (16 h luz, 8 h oscuridad) con temperatura de 24 °C de día y 18 °C de noche. Las plantas se desarrollaron en forma de roseta de hojas linear-lanceoladas (Figura 12A), de color verde intenso en el haz y verde grisáceo en el envés. Presentaban una cobertura de pelos más densa en el envés pero mucho menor que la de las plantas silvestres. En el transcurso del cultivo las hojas de la roseta tendieron a alargarse y estrecharse, de forma más patente tras realizar la transición floral (Figura 12B).

Las primeras inflorescencias aparecieron 24 semanas después de la siembra. La floración tuvo lugar en el 85% de las plantas que, mayoritariamente, produjeron una única inflorescencia por planta o a lo sumo dos (Figura 12B). Los caracteres morfológicos de las inflorescencias se muestran en la tabla 6.

Se observaron diferencias fenotípicas en comparación con las inflorescencias silvestres (Figura 12D; Tabla 6). Las inflorescencias de plantas de semilla presentaron menor altura y mayor número de brácteas del involucre. Estas brácteas eran más estrechas y largas que las de las inflorescencias silvestres (Figura 12C y D). Asimismo, las inflorescencias eran más anchas y las hojas del tallo floral de mayor tamaño. La cobertura de pelos de la planta fue menos densa, especialmente en tallo y hojas. Esta

cobertura también fue menor en las brácteas del involucre (Figura 12C y D), lo que hizo que perdieran parte del aspecto algodonoso que presentan las inflorescencias silvestres.

Tabla 6. Caracteres morfológicos de las inflorescencias de plantas procedentes de semilla silvestre comparados con los de las plantas silvestres

Caracteres	Plantas de semilla silvestre ^z	Plantas silvestres
Altura del tallo floral (cm)	8,93 ± 0,70 b ^y	14,91 ± 1,13 a
Número de hojas del tallo floral	8,50 ± 0,72 a	7,13 ± 0,42 a
Longitud de las hojas (mm)	34,14 ± 1,60 a	19,63 ± 1,33 b
Anchura de las hojas (mm)	3,79 ± 0,34 a	2,81 ± 0,13 b
Número de capítulos	9,43 ± 0,61 a	8,63 ± 0,60 a
Número de brácteas del involucre	14,17 ± 0,87 a	9,50 ± 0,54 b
Longitud de las brácteas (mm)	14,00 ± 0,52 a	11,89 ± 0,87 a
Anchura de las brácteas (mm)	2,33 ± 0,21 b	4,54 ± 0,22 a
Anchura de la inflorescencia (mm)	38,00 ± 2,45 a	28,63 ± 1,09 b

^zDatos seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellos.

^yPara cada uno de los datos se presenta el valor de la media ± el error estándar.



Figura 12. Plantas de semilla silvestre. A. Roseta de hojas. **B.** Inflorescencia única en una planta de semilla silvestre. Se observa que las hojas de la roseta se han alargado y estrechado. **C.** Cabezuela de la inflorescencia de una planta de semilla silvestre. **D.** Cabezuela de la inflorescencia de una planta silvestre. Las barras indican 1 cm en A y B y 0,5 cm en C y D.

Las inflorescencias de las plantas de semilla contaban con flores femeninas y flores hermafroditas en todos los capítulos florales. Comparadas con las inflorescencias de plantas silvestres, el promedio de flores por capítulo casi se duplicó y la proporción de flores femeninas también se vio ligeramente incrementada respecto a la de flores hermafroditas (Tabla 7)

Tabla 7. Número y distribución de flores por capítulo en inflorescencias de plantas semilla silvestre.

Número de flores	Plantas de semilla silvestre *	Plantas silvestres
Totales	70,9 ± 5,85	38 ± 0,6
Femeninas	45,1 ± 3,09	22 ± 0,9
Hermafroditas	25,7 ± 3,2	16 ± 0,4

* Para cada uno de los datos se presenta el valor de la media ± el error estándar.

1.2.2 Análisis de la viabilidad y de la capacidad de germinación del polen de las plantas procedentes de semilla silvestre

Las flores hermafroditas disponían de polen en las anteras. Al igual que en el caso de las plantas silvestres, se realizó un ensayo de funcionalidad y un ensayo de germinación *in vitro* del polen de estas flores (Figura 13).

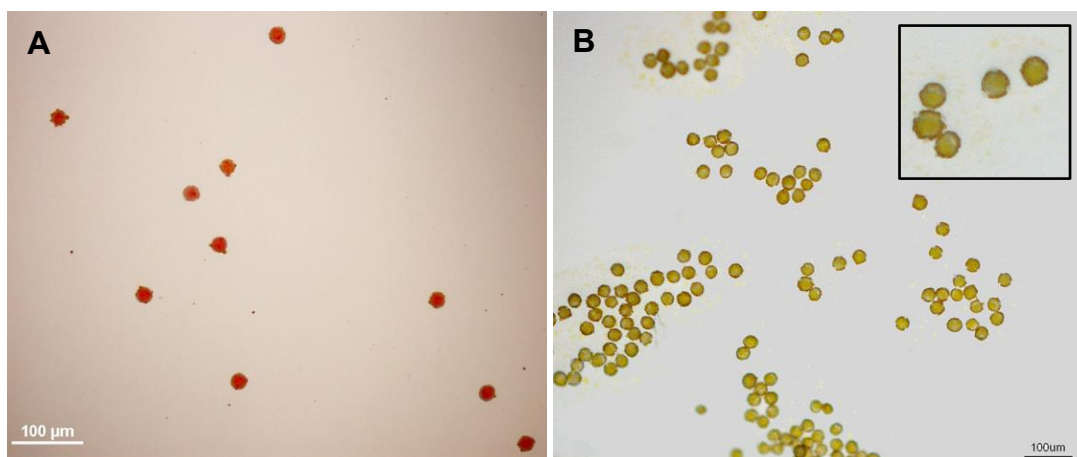


Figura 13. Ensayos de viabilidad del polen de las plantas procedentes de semilla silvestre. A. Tinción positiva con acetato de carmín. **B.** Ensayo de germinación *in vitro* de granos de polen. No se aprecia emisión de tubos polínicos. En el detalle, granos de polen sin germinar.

Los granos de polen se tiñeron con acetato de carmín (Figura 13A), lo que indica su viabilidad, pero no se observó emisión de tubos polínicos en el cultivo en medio de germinación (Figura 13B).

1.2.3 Estudio de la capacidad de germinación de las semillas de las plantas procedentes de semilla silvestre

Pese a que no se observó emisión de tubos polínicos en el ensayo de germinación de polen, las plantas de semilla silvestre se fecundaron y dieron semillas a su vez. Estas semillas se recolectaron y almacenaron a 4 °C. Posteriormente se realizó un ensayo de siembra *in vitro* en el que se registró un porcentaje de germinación cercano al 20 %.

1.3 ANÁLISIS DEL NIVEL DE PLOIDÍA

El número de cromosomas de la especie *Leontopodium alpinum* Cass. es de $2n = 48$ (Küpfer, 1974). Los estudios realizados por Siljak *et al.* (1974) establecieron una relación entre la variabilidad morfológica de las plantas de *Leontopodium alpinum* y el número cromosómico. Para detectar posibles variaciones en nuestro trabajo asociadas al nivel de ploidía, se determinó dicho nivel mediante citometría de flujo en las plantas silvestres recolectadas y en las plantas procedentes de semilla silvestre cultivadas en invernadero. En el ensayo de citometría se marcaron los núcleos con el fluorocromo DAPI y se ajustó el pico de células diploides en la fase G1 del ciclo celular (en división) en 50.

Todas las muestras analizadas, tanto de las plantas silvestres como de las plantas obtenidas a partir de semillas silvestres y comerciales, presentaban el mismo patrón correspondiente a plantas diploides (Figura 14).

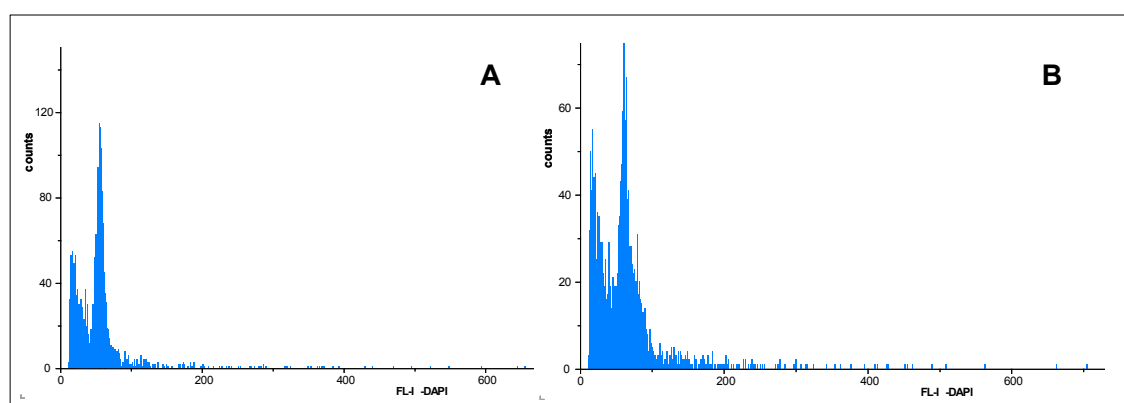


Figura 14. Patrón de ploidía de plantas de *L. alpinum*. A. Planta silvestre. B. Planta procedente de semilla silvestre. El patrón corresponde a plantas diploides.

2. MICROPROPAGACIÓN DE *Leontopodium alpinum*

Leontopodium alpinum es una planta protegida que cuenta con un interés comercial por su atractivo ornamental así como por ser fuente de metabolitos secundarios de uso medicinal y cosmético. Por ese motivo, el desarrollo de métodos de micropropagación que permitan la producción de plantas a gran escala resulta de interés tanto como herramienta complementaria en los programas de conservación como para asegurar la producción a gran escala de un posible material seleccionado con fines comerciales.

2.1 IMPLANTACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL E INDUCCIÓN DE LA ORGANOGÉNESIS

Los dos sistemas principales de la propagación vegetativa de plantas con genotipo similar al de la planta madre se basan en la multiplicación de brotes obtenidos a partir de meristemas existentes, como ápices caulinares o yemas axilares, o bien mediante la multiplicación de brotes adventicios regenerados a partir de otros órganos o tejidos de la planta. Una ventaja de la proliferación de brotes axilares respecto a los adventicios es la menor incidencia de variación somaclonal en aquellos, ya que al formarse a partir de meristemas ya existentes, la posibilidad de sufrir mutaciones es relativamente más baja. (Preece, 1997).

Para la implantación de explantes de *L. alpinum* en cultivo *in vitro* decidimos explorar estos dos sistemas. Por un lado se cultivaron segmentos nodales del tallo floral que contaban con una yema axilar buscando directamente el desarrollo de brotes axilares. Por otro lado se cultivaron segmentos de hoja del tallo floral y flores aisladas de la inflorescencia, con objeto de obtener brotes de tipo adventicio.

2.1.1 Cultivo de segmentos nodales

Los segmentos nodales de tallo floral, que incluían una yema axilar, se cultivaron en medio base sin reguladores del crecimiento (MB). El medio base contaba con las sales de Murashige y Skoog (MS), utilizadas frecuentemente tanto en el cultivo *in vitro* de *L. alpinum* (Hook, 1993; Zarpatan, 1996; Trejgell *et al.*, 2010) como en el cultivo de

segmentos nodales de tallo floral en otras Asteráceas (Cuenca *et al.*, 1999; Cuenca y Amo-Marco, 2000a).

A los pocos días de cultivo se produjo la brotación de las yemas axilares pero durante el transcurso del ensayo todos los explantes presentaron contaminación de tipo bacteriano de origen endógeno impidiendo su utilización en ensayos posteriores.

2.1.2 Cultivo de explantes de hoja

Las hojas del tallo floral se cultivaron en medio de inducción de organogénesis EDH que consistía en el medio basal MS que incorporaba la citoquinina TDZ (1,66 mg/L) y la auxina AIB (0,5 mg/L) como reguladores del crecimiento.

Tras varias semanas de cultivo se desarrolló callo en gran parte de los explantes a partir de las zonas de corte. El callo presentaba una textura semicompacta y con tendencia a la oxidación y en ningún caso mostró capacidad organogénica. Como en el caso de los segmentos de tallo floral, las hojas presentaron una tendencia acusada a manifestar contaminaciones de origen bacteriano durante el cultivo.

2.1.3 Cultivo de flores

También se utilizaron flores de los capítulos de la inflorescencia. Tras el proceso de esterilización de los capítulos, las flores hermafroditas y las flores femeninas se aislaron bajo lupa y se cultivaron en el medio inductor de organogénesis EDFL por separado. El medio EDFL incorpora como macronutrientes las sales DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) y una combinación de TDZ (0,1 mg/L) y AIA (0,2 mg/L) como reguladores del crecimiento. Las sales DKW en presencia de TDZ se han utilizado anteriormente con éxito en micropropagación a partir de explantes florales en otras especies (Li *et al.*, 1998; Preece *et al.*, 2011).

Durante la fase de oscuridad del cultivo se observó un ligero engrosamiento de la zona del ovario, independientemente del tipo de flor (femenina o hermafrodita) que conformaba el explante. Tras el traslado de los cultivos a condiciones de luz algunos explantes comenzaron a desarrollar callo a partir del ovario engrosado (Figura 15A). Este

callo continuó desarrollándose hasta englobar la totalidad del ovario y, finalmente, gran parte del explante.

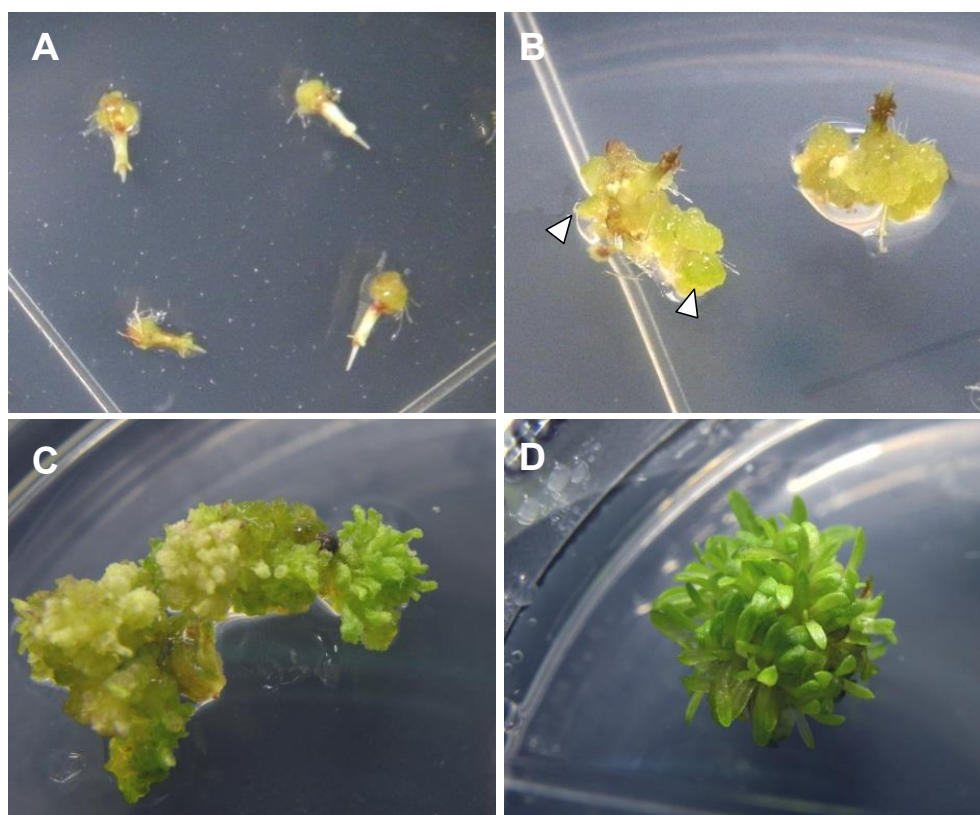


Figura 15. Cultivo de flores en medio inductor de organogénesis. A. Engrosamiento del ovario y formación de callo en flores hermafroditas. **B.** Formación de callo recubriendo el explante original. Las puntas de flecha señalan zonas del callo en las que se formarán estructuras organogénicas. **C.** Callo organogénico con formación de yemas-brote. **D.** Ápices caulinares recubriendo el callo organogénico de flor.

Tras cuatro semanas de cultivo en medio EDFL el callo formado presentaba una textura semicompacta, de color amarillo verdoso en el que también se comprobó la existencia de zonas con callo de color verde más intenso y de tipo organogénico (Figura 15B). Después de siete semanas de cultivo se constató la presencia de yemas en distintas zonas del callo (Figura 15C) que se desarrollaron posteriormente en brotes (Figura 15D).

Tal y como se muestra en la tabla 8, la respuesta organogénica de los explantes de flores en medio EDFL se caracterizó por su baja frecuencia. En la campaña 2008 se recuperaron tres brotes a partir de un único explante de flores femeninas y no se obtuvo respuesta organogénica en flores hermafroditas. En la campaña 2009 se recuperaron brotes de varios explantes de flor femenina así como en un explante de flor

hermafrodita. El número medio de brotes regenerados por explante de flor femenina de la campaña 2009 fue superior a cuatro. Así mismo se recuperaron cuatro brotes a partir del único explante organogénico de flor hermafrodita.

Tabla 8. Respuesta organogénica de los explantes de flores.

Tipo de explante	Campaña	Número de explantes	Número de explantes organogénicos	Explantes organogénicos (%)	Número medio de brotes por explante organogénico ^y
Flores femeninas	2008	20	1	0,05	3,0
	2009	45	5	11,11	4,60 ± 1,03
Flores hermafroditas	2008	15	0	0	0,0 ± 0,00
	2009	40	1	2,50	4,0

^yPara cada uno de los datos se presenta el valor de la media ± el error estándar.

2.2 MULTIPLICACIÓN DE BROTES REGENERADOS

Los brotes se aislaron del callo y se cultivaron en medio de multiplicación EDM, realizando un sub-cultivo en el mismo medio cada cuatro semanas.

El proceso de amplificación tuvo lugar por brotación axilar múltiple de las yemas preexistentes en el brote. Inicialmente, la tasa media de multiplicación a partir de un ciclo de cultivo (el número de nuevos brotes obtenidos en cada ciclo) fue de 4 pero en los sub-cultivos posteriores se comprobó que agrupar de 3 a 4 brotes incrementaba la tasa de multiplicación hasta 8 (Figura 16A y B).

En esta fase de amplificación se observaron diferencias en el comportamiento de algunos de los clones regenerados. Así, los brotes del clon obtenidos de flor hermafrodita dieron muestra de una alta tendencia a la hiperhidratación, agravada durante las diferentes rondas de sub-cultivo hasta resultar inviable la recuperación de plantas. Por su parte, el clon obtenido a partir de flor femenina de la campaña de 2008 presentó el mejor desarrollo de brotes y de aspecto más homogéneo. A excepción del clon de flor hermafrodita, estas líneas de plantas amplificadas se mantienen en la actualidad sin pérdida de su capacidad de multiplicación.

2.3 ENRAIZAMIENTO *in vitro* DE BROTES MULTIPLICADOS

Parte de los brotes en medio de multiplicación se individualizó al final de cada ciclo de amplificación y se transfirió a medio de enraizamiento EDR.

Uno de los métodos habituales para inducir el desarrollo de raíces *in vitro* es el tratamiento con auxinas (AIA) (George, 2008c). Con el fin de optimizar el enraizamiento se ensayaron distintas concentraciones esta hormona en el medio de cultivo EDR (0; 0,2; 0,5 y 1 mg/L) (Tabla 9).

Tabla. 9. Efecto de diferentes concentraciones de AIA en el medio de cultivo sobre la formación de raíces

AIA (mg/L)	Porcentaje de explantes con raíces	Número medio de raíces por explante	Longitud de las raíces (cm)
0	94,44 a	11,33 ± 5,57 ab	3,14 ± 1,68 a
0,2	94,12 a	8,94 ± 5,16 b	2,67 ± 1,52 b
0,5	98,15 a	12,59 ± 6,44 a	2,70 ± 1,58 b
1	98,18 a	13,29 ± 7,38 a	2,83 ± 1,64 b

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) usando el test de Duncan de separación de medias

Los porcentajes de enraizamiento obtenidos en todos los casos fueron muy similares así como el número y la longitud media de las raíces. Por otro lado, se detectó una mayor presencia de plantas hiperhidratadas a las concentraciones más altas de AIA (0,5 y 1mg/L). En función de los resultados, no se vio necesaria la adición de AIA al medio de cultivo para obtener un enraizamiento adecuado de los explantes micropropagados.

La emisión de raíces comenzó a las dos semanas de cultivo en medio de enraizamiento y se produjo directamente a partir de la base del brote sin mediar formación de callo. De forma paralela al desarrollo de las raíces, se produjo el desarrollo de la zona apical que permanecía inalterada hasta entonces. Las raíces se desarrollaron en forma de cabellera sin ramificaciones secundarias (Figura 16C y D).

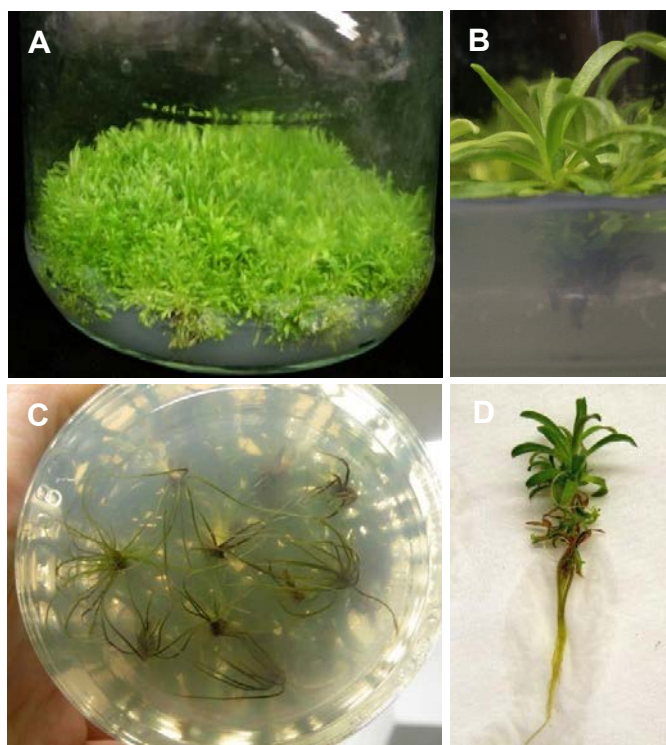


Figura 16. Multiplicación y enraizamiento de brotes de *L. alpinum*. A. Brotes en medio de multiplicación (EDM) tras varias semanas de cultivo. B. Detalle de la proliferación de brotes en medio EDM. C. Enraizamiento de brotes en medio EDR. D. Brote enraizado extraído del medio de cultivo EDR.

2.4 ACLIMATACIÓN EN INVERNADERO DE BROTES ENRAIZADOS

Cuando los brotes cultivados en el medio de enraizamiento desarrollan un sistema radicular suficiente se pueden trasplantar a maceta. En nuestro caso este tiempo fue de unas 8 semanas desde el inicio del cultivo.

Para el trasplante se ensayaron diferentes sustratos para determinar las mejores condiciones de cultivo (mezclas turba : fibra de coco, perlita : arena y turba : arena, así como tacos de turba prensada Jiffy-7®).

Tabla 10. Efecto del sustrato empleado sobre las plantas aclimatadas en el invernadero.

Sustrato	Altura media de las plantas (cm)	Anchura media de las plantas (cm)	Número medio de raíces por planta	Longitud máxima media de las raíces (cm)
Turba : Fibra coco	2,13 ± 0,63 a	4,58 ± 1,77 a	28,25 ± 9,41 a	9,1 ± 2,26 a
Perlita : Arena	1,39 ± 0,60 b	3,45 ± 1,97 b	14,95 ± 4,03 c	6,7 ± 1,58 b
Turba : Arena	1,61 ± 0,57 b	5,47 ± 2,45 a	30,85 ± 9,67 a	10,6 ± 2,13 a
Tacos de turba Jiffy®	2,23 ± 0,81 a	4,62 ± 2,15 a	20,35 ± 6,81 b	6,3 ± 1,82 b

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) usando el test de Duncan de separación de medias

En la tabla 10 se presenta el efecto de cada uno de estos sustratos sobre distintos caracteres morfológicos de la planta durante el proceso de aclimatación y hasta las 6 semanas de cultivo.

El mayor desarrollo de la parte aérea de la planta se obtuvo utilizando la mezcla turba : fibra de coco y los tacos Jiffy® de turba prensada. En cuanto al desarrollo de raíces los mejores resultados se obtuvieron con las mezclas de turba : fibra de coco y turba : arena (Figura 17). En el caso de la mezcla de perlita : arena, las raíces mostraban menor desarrollo y presentaban un aspecto fibroso y con pocos pelos radiculares.



Figura 17. Plantas aclimatadas en diferentes sustratos. Cada cuadro de la trama corresponde a 1 cm².

En conjunto, los mejores resultados para los caracteres estudiados se obtuvieron con la mezcla de turba : fibra de coco. Las tasas de supervivencia durante la aclimatación fueron elevadas (~90%) con independencia del sustrato utilizado para el cultivo.

2.5 CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL MICROPROPAGADO

El material propagado *in vitro* y aclimatado en invernadero se cultivó según lo descrito en el apartado 1.2 de Materiales y Métodos y se conservó en las mismas condiciones de luz y temperatura durante períodos de uno a tres años. En este tiempo

ninguna de las plantas, independientemente del clon, presentó formación de inflorescencias, permaneciendo en crecimiento vegetativo como roseta de hojas. Estas plantas provenientes del cultivo *in vitro* presentaron el desarrollo de varios brotes, que tenían un origen axilar, por planta enraizada (Figura 18A), en vez de una roseta principal como ocurría en las plantas de semilla silvestre cultivadas en las mismas condiciones. A lo largo del tiempo de cultivo los brotes mostraban senescencia pero el conjunto de la planta incrementaba su tamaño al desarrollarse nuevos brotes de forma continuada.

La forma y tamaño de las hojas de la roseta fueron similares a la de las plantas de semilla silvestres cultivadas en las mismas condiciones (Figura 18B).

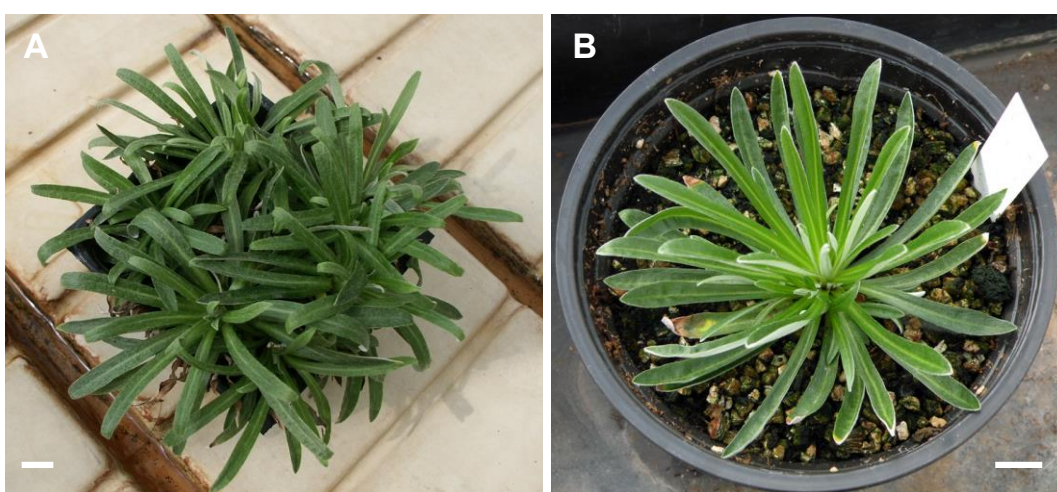


Figura 18. Comparación entre planta de *L. alpinum* propagada *in vitro* y planta de semilla silvestre. A. Planta propagada. Se aprecia el desarrollo de numerosos brotes axilares. **B.** Planta de semilla silvestre a las 20 semanas de cultivo creciendo como roseta de hojas. Las barras indican 1 cm.

En las primeras fases del protocolo de micropropagación establecido, la inducción de morfogénesis a partir de flores silvestres incluía una fase previa de formación de callo. Este hecho implica el riesgo de que se genere un cierto grado de variación somaclonal, es decir, la variabilidad genética que surge como consecuencia del cultivo *in vitro*. Por este motivo se estudió una posible existencia de variación cromosómica en las plantas micropropagadas. Sin embargo, el análisis de ploidía de las plantas propagadas *in vitro* y cultivadas en invernadero confirmó que en todos los casos analizados para cada clon se trataba de plantas diploides (Figura 19), al igual que el material silvestre de partida.

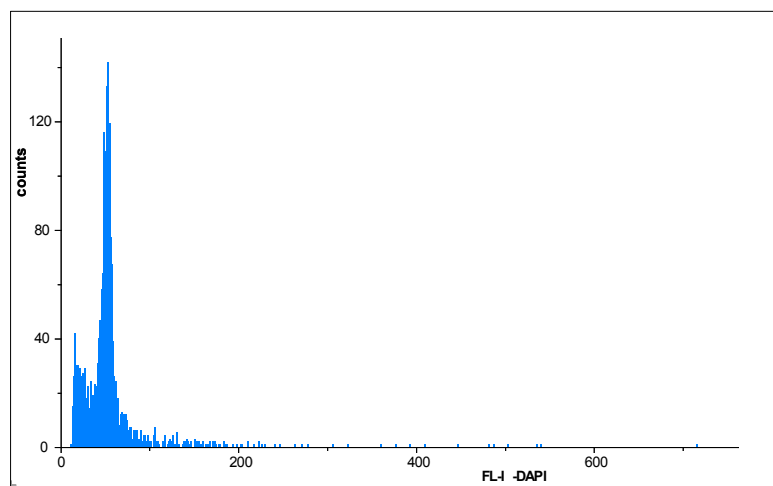


Figura 19. Patrón de ploidía de plantas micropropagadas a partir de flores

2.6 MICROPROPAGACIÓN A PARTIR DE HOJAS DE PLANTAS MULTIPLICADAS *in vitro*

Como alternativa al método de micropropagación a partir de flores de plantas silvestres se realizaron ensayos de regeneración organogénica utilizando hojas del material establecido *in vitro*. La utilización de brotes multiplicados *in vitro* como fuente de explantes para otros ensayos cuenta con ventajas respecto al material silvestre o cultivado en invernadero al tratarse de un material de partida libre de enfermedades, de fácil disponibilidad y con garantías de reproducibilidad.

En un primer ensayo se evaluó el efecto de la combinación de diferentes concentraciones de tiazurón (TDZ) y las sales MS y LP (ver Materiales y Métodos apartado 2.4) en el medio de inducción organogénica. A los pocos días de cultivo de los explantes de hoja en medios suplementados con TDZ (1,66 ó 3 mg/L) se produjo un engrosamiento de la zona de inserción de la yema preexistente en el peciolo, que derivó en callo (Figura 20A). Posteriormente también se formó callo en las zonas de corte y, en última instancia, se extendió por todo el explante.

De tres a cuatro semanas después se observó la formación de yemas. Estas estructuras organogénicas surgieron a partir del callo formado en la zona del peciolo. En un 40% de los casos también se desarrollaron a partir de callo formado en otras zonas del explante. A las cuatro semanas, cuando el callo ha proliferado por la superficie del explante (Figura 20B), se sustituyó en el medio de cultivo el TDZ como fuente de citoquininas por 6-bencilaminopurina (BAP). En este medio de cultivo se produjo la

elongación de brotes (Figura 20C y D). El desarrollo de los brotes y la multiplicación de los mismos se completaron en medio EDM.

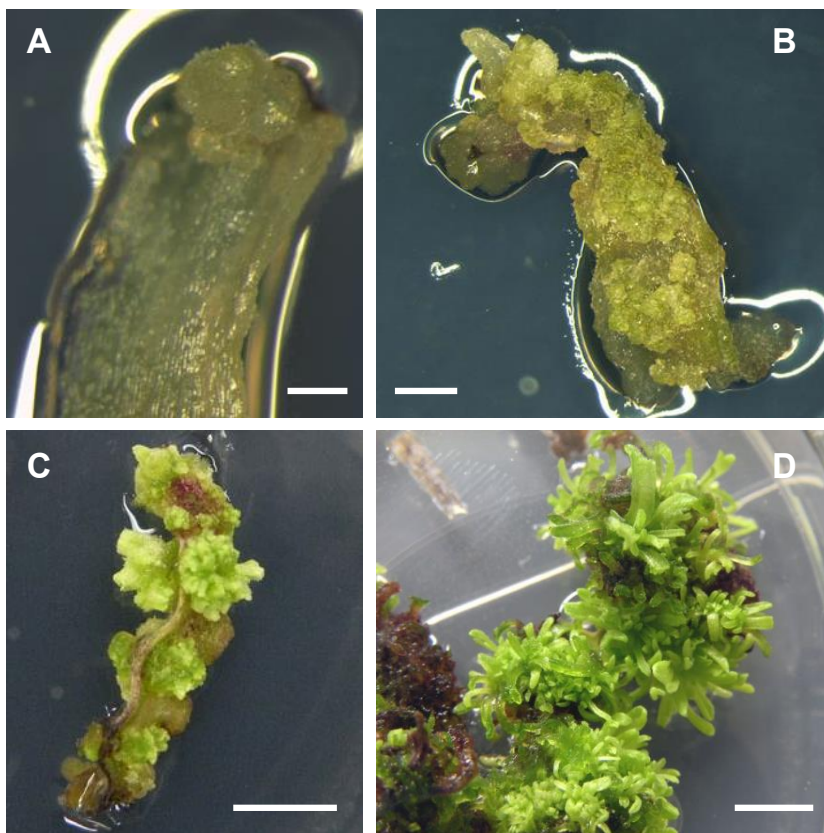


Figura 20. Regeneración de plantas a partir de hojas de plantas *in vitro*.

A. Explante a las dos semanas de cultivo. Formación de callo en el peciolo. **B.** Explante a las cuatro semanas de cultivo. El callo se extiende por la superficie y aparecen yemas. **C.** Explante a las ocho semanas de cultivo. El explante en medio EDS muestra el desarrollo y elongación de las yemas. **D.** Explante a las doce semanas de cultivo. Formación de brotes alargados. Las barras indican 0,5 mm en A, 1 mm en B y 5 mm en C y D.

El efecto de la combinación de diferentes concentraciones de TDZ y las sales de cultivo MS y LP en la formación de brotes se representa en la tabla 11.

Tabla 11. Efecto de la combinación de distintas concentraciones de TDZ y las sales minerales LP y MS en la formación de brotes a partir de hojas de plantas multiplicadas *in vitro*.

Sales minerales del medio de cultivo	TDZ (mg/L)	Porcentaje de explantes con brotes	Número medio de brotes por explante
LP	0	22,22 ± 6,20 c	1,00 ± 0,00 c
	1,66	55,56 ± 7,41 a,b	2,80 ± 0,49 b
	3	51,11 ± 7,45 b	4,74 ± 0,60 a
MS	0	15,56 ± 5,40 c	1,00 ± 0,00 c
	1,66	62,22 ± 7,23 a,b	2,96 ± 0,31 b
	3	73,33 ± 6,59 a	5,09 ± 0,50 a

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) usando el test de Duncan de separación de medias

En los explantes cultivados en ausencia de TDZ no hubo formación de callo. La yema preexistente de estos explantes normalmente no progresaba pero, en algunos casos (22% utilizando sales LP y 15% utilizando sales MS), se produjo desarrollo al transferirse a medio de elongación. Sin embargo, en ningún caso se produjo la formación de nuevas estructuras organogénicas. No hay diferencias entre la utilización de sales LP o MS para las concentraciones de TDZ de 0 y 1,66 mg/L. La combinación de las sales MS con 3 mg/L de TDZ mostró los mejores resultados para la producción de brotes.

En el transcurso del ensayo se analizó la relevancia de la presencia de la yema en la base de la hoja para el desarrollo de nuevas estructuras organogénicas. Se realizó un nuevo ensayo en el que se eliminó o se conservó dicha yema en el momento del establecimiento de los explantes en el medio de cultivo con sales MS y 3 mg/L de TDZ. Tras una semana de cultivo los explantes mostraron indicios de diferenciación tisular y se observó un engrosamiento de la yema axilar conservada. Una semana después se produjo la formación de callo de tipo semi-compacto y color blanquecino a partir de la base de la yema. En el caso de eliminación de la yema se observó la formación de callo en unos pocos explantes precisamente en la zona de corte y eliminación de la yema. Durante la tercera semana de cultivo el callo proliferó por toda la superficie de cultivo englobando en su caso a la yema.

Una vez realizado el traslado a condiciones de luz, el callo tomó un color amarillo verdoso con zonas de color verde más intenso y aspecto nodular. Conforme avanzó el ensayo, las estructuras nodulares derivaron en la formación de yemas organogénicas que se desarrollaron en brotes al cultivarse en medio de elongación (Figura 21). En la tabla 12 se muestran los resultados de regeneración.

Tabla 12. Efecto de la conservación o eliminación de la yema axilar en la hoja sobre la respuesta organogénica.

Yema preexistente	Explantes con callo (%)	Índice de formación de callo	Explantes con brote (%)	Número medio de brotes por explante
Conservada	86,00 a	3,14 ± 0,15 a	78,00 a	5,72 ± 0,52 a
Eliminada	62,00 b	2,14 ± 0,18 b	46,00 b	3,48 ± 0,56 b

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) usando el test de Duncan de separación de medias

El mayor porcentaje de explantes con callo se obtuvo en los explantes con la yema conservada (86 %). Por otro lado, los valores del índice de formación de callo en estas condiciones fueron de 3,14 lo que indica que, por término medio, más del 75% del explante presentaba formación de callo (Figura 21A). Por su parte, al eliminar la yema el porcentaje de explantes con callo fue menor (62%) así como la superficie de explante que ocupaba el callo, que quedaba en un 50% del mismo (2,14 de índice organogénico) (Figura 21B). También se comprobó que en todos los explantes la zona de la yema (conservada o ausente) era la más callogénica.

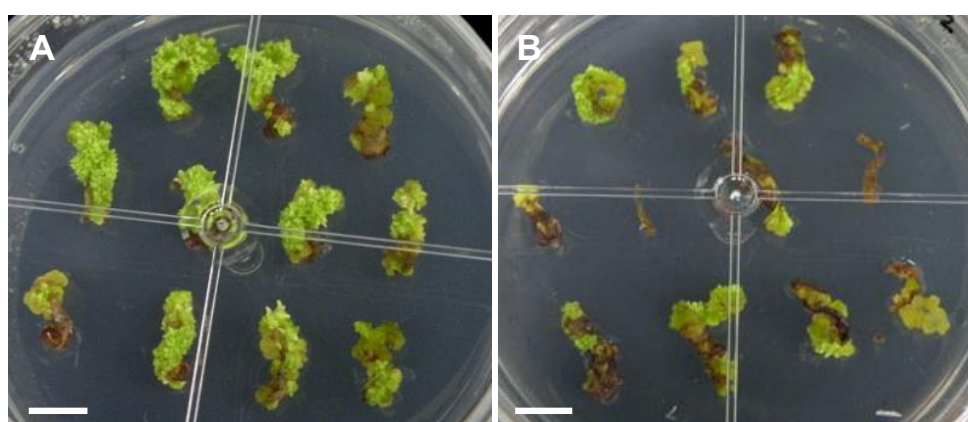


Figura 21. Efecto de la conservación o eliminación de la yema axilar de las hojas sobre la calogénesis de los explantes. A. Explantes con yema conservada. B. Explantes con yema eliminada. Las barras indican 1 cm.

En lo que respecta a la producción de brotes regenerados, el mayor porcentaje de explantes con brotes se obtuvo utilizando explantes de hoja conservando la axilar (78%). Lo mismo sucede con el número medio de brotes regenerados ($5,72 \pm 0,52$).

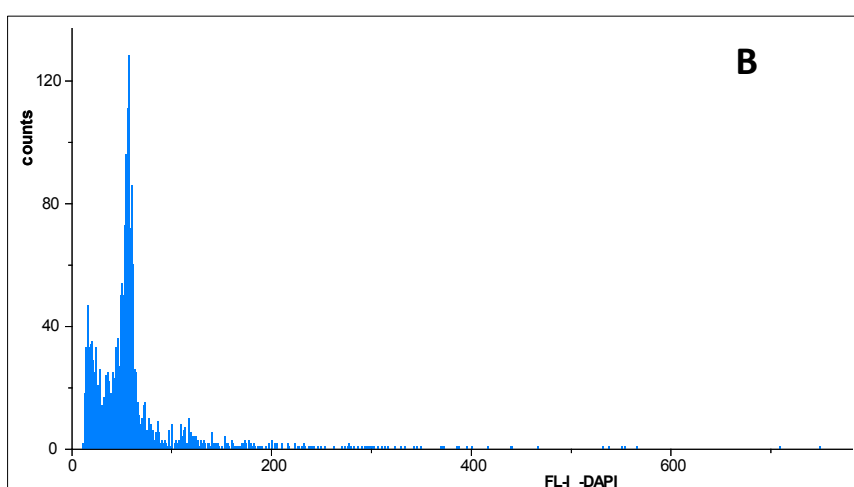
Este mismo experimento también se realizó manteniendo los explantes en condiciones de luz durante todo el ensayo. En estas condiciones, el porcentaje de explantes con brotes conservando la yema disminuyó hasta el 58% y la respuesta organogénica se concentró casi exclusivamente en la zona del peciolo con la yema.

Los brotes regenerados se multiplicaron a su vez y se enraizaron y aclimataron en invernadero del mismo modo descrito para los brotes regenerados a partir de flores silvestres (apartados 2.3 a 2.5 de esta sección). El fenotipo de estas plantas era similar al de las plantas micropropagadas a partir de flores (Figura 22A). También se determinó el

patrón de ploidía de las plantas regeneradas (Figura 22B), que resultaron diploides en todos los casos analizados.



Figura 22. Plantas regeneradas a partir de hoja. A. Detalle de planta micropropagada a partir de hoja, cultivada en invernadero. B. Patrón de ploidía mostrando que las plantas son diploides. La barra indica 1 cm



Las plantas se mantuvieron en cultivo en invernadero durante más de un año en el que no se observó formación de inflorescencias en ninguna de ellas.

3. ENSAYOS DE INDUCCIÓN DE LA FLORACIÓN EN PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Leontopodium alpinum*

La floración marca la transición del desarrollo vegetativo al reproductivo en las plantas. Esta transición está regulada por un complejo circuito que integra múltiples señales ambientales (fotoperíodo, calidad y cantidad de luz, temperatura) y de desarrollo (edad de la planta, nivel de desarrollo o de distintos reguladores del crecimiento). Tal y como se describió en el apartado anterior, las plantas micropropagadas y cultivadas en invernadero no desarrollaron inflorescencias. Con objeto de promover la transición floral de estas plantas, se llevó a cabo una serie de ensayos en los que se actuó sobre algunas de estas señales.

3.1 ENSAYO DE DISTINTAS CONDICIONES DE TERMOPERÍODO

En condiciones naturales, en la época de floración, las plantas silvestres están expuestas a un rango de temperatura con mayores fluctuaciones entre la máxima y la mínima que las utilizadas en las condiciones de cultivo estándar del invernadero. Según los datos climáticos registrados por Benito-Alonso (2005), en los meses de floración (julio y agosto, principalmente) las plantas silvestres soportan temperaturas máximas rondando los 23 °C y mínimas de hasta 5 °C mientras que la temperatura de cultivo en invernadero estaba fijada en 22 °C durante el día y 18 °C en la noche (Materiales y Métodos, apartado 1.2.1). Este hecho nos sugirió la conveniencia de experimentar el cultivo de las plantas en condiciones de temperatura más parecidas a las de la población silvestre. Así, se probaron condiciones de temperatura de 20 °C durante el día y 8 °C durante la noche.

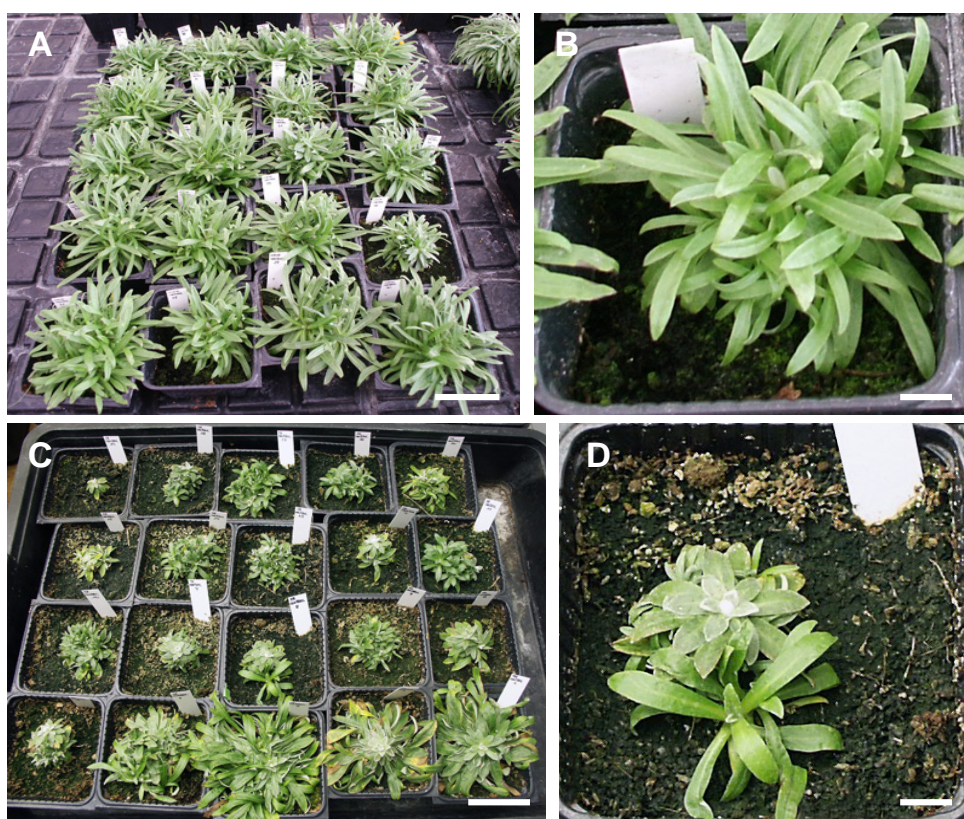


Figura 23. Cultivo en invernadero de plantas micropropagadas en diferente termoperíodo. A. Plantas cultivadas en temperatura de 22/18 °C. **B.** Detalle de planta cultivada en temperatura de 22/18 °C. Las hojas jóvenes son estrechas y alargadas. **C.** Plantas cultivadas en temperatura de 20/8 °C. **D.** Detalle de plantas cultivadas en temperatura de 20/8 °C. Las hojas jóvenes son pequeñas y redondeadas. Las barras indican 5 cm en A y C y 1 cm en B y D.

Los resultados evidenciaron diferencias morfológicas entre las plantas. Las cultivadas en las condiciones estándar (22/18 °C) son de mayor tamaño que las cultivadas a 20/8 °C. También se observaron diferencias en el desarrollo de hojas jóvenes, de modo que en las plantas cultivadas a 20/8 °C estas hojas eran más pequeñas y redondeadas que las de las plantas cultivadas a 22/18 °C (Figura 23).

En cuanto a la transición floral, en ninguna de las condiciones de temperatura ensayadas se observó formación de inflorescencias.

3.2 ENSAYO DE DISTINTAS CONDICIONES DE FOTOPERÍODO

Se utilizaron dos tipos de fotoperíodo: de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) y de día corto (8 h de luz y 16 h de oscuridad). En el ensayo se utilizaron cinco lotes de 10 plantas cada uno. Cada lote se cultivó un número variable de semanas en día corto para luego cambiar a condiciones de cultivo en día largo (Tabla 13).

Tabla 13. Floración en plantas cultivadas en combinaciones de fotoperíodo de día corto y día largo.

Lote	Semanas de cultivo		Plantas con inflorescencias (%)	Número de inflorescencias por planta ^z
	Día corto	Día largo		
1	0	24	0 b ^y	0,0 ± 0,00 b
2	4	20	0 b	0,0 ± 0,00 b
3	8	16	30 a	1,33 ± 0,92 a
4	16	8	40 a	2 ± 0,8 a
5	24	0	0 b	0,0 ± 0,00 b

^yLetras distintas junto a las medias de un mismo carácter indican diferencias significativas estadísticamente ($p < 0,05$) entre ellas.

^zSe presenta el valor de la media ± error estándar.

Las plantas control cultivadas únicamente en las condiciones estándar de cultivo en día largo (lote 1) se desarrollaron como una roseta de hojas estrechamente oblanceoladas y no presentaron floración (Figura 24A y Tabla 13). En las plantas cultivadas en día corto, las hojas jóvenes que se formaban en estas condiciones de fotoperíodo eran más pequeñas y redondeadas que las de las planta control en día largo (Figura 24B). Este fenotipo de la hoja joven se modificaba si se cambiaban las plantas a condiciones de cultivo en día largo, hasta semejarse al de las plantas control al final del ensayo (Figura 24C).

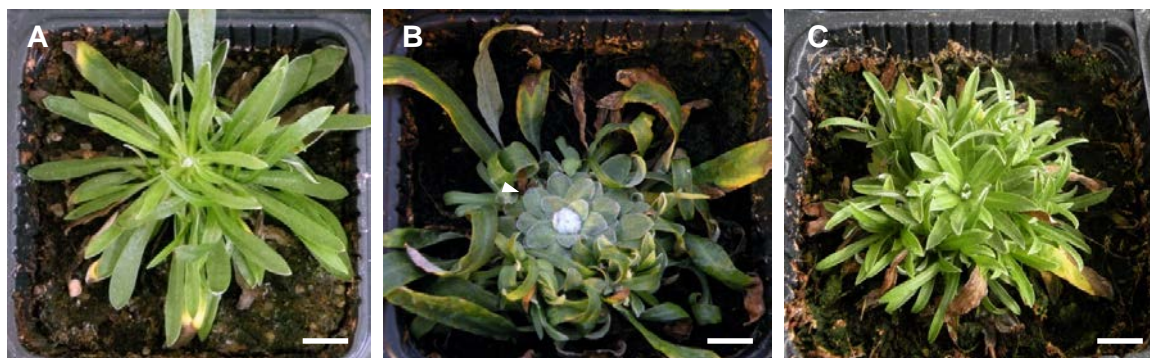


Figura 24. Morfología de hoja de las plantas cultivadas en el ensayo de fotoperíodo. **A.** Planta cultivada en fotoperíodo de día largo. Las hojas son alargadas y oblanceoladas. **B.** Planta cultivada en fotoperíodo de día corto. La punta de flecha señala una hoja joven pequeña y redondeada. **C.** Planta cultivada en fotoperíodo de día corto seguido de día largo. El fenotipo de hoja redondeada se ha modificado hacia el de las plantas control, tres semanas después del cambio de fotoperíodo.

Las plantas cultivadas exclusivamente en día corto durante todo el ensayo no florecieron (lote 5, Tabla 13). En las plantas sometidas a los dos tipos de fotoperíodo sí se observó floración, pero únicamente en los lotes 3 y 4, que se mantuvieron un mínimo de 8 semanas de cultivo en día corto antes del cambio a condiciones de día largo (Figura 25). En ambos lotes los porcentajes de plantas con inflorescencias fueron similares, del 30% y el 40% respectivamente (Tabla 13). También se observó que en los dos lotes las inflorescencias aparecieron tras 19-20 semanas de cultivo, independientemente de que llevaran más o menos tiempo de cultivo en día largo. En ambos lotes se obtuvieron entre 1-2 inflorescencias por planta.

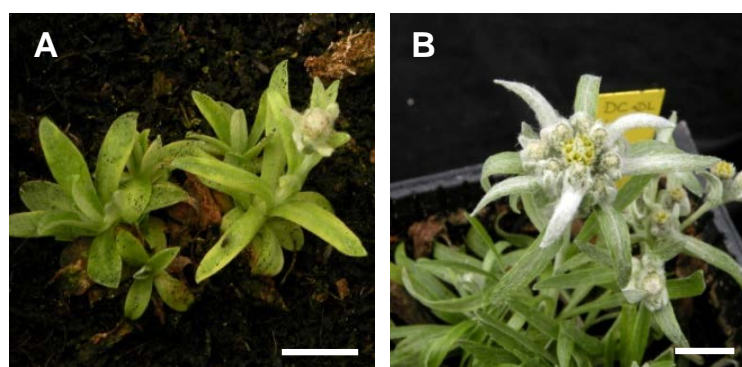


Figura 25. Floración en plantas cultivadas en fotoperíodo de día corto seguido de día largo. **A.** Inflorescencia de una planta cultivada ocho semanas en día corto y 16 semanas en día largo (lote 3). **B.** Inflorescencia de una planta cultivada 16 semanas en día corto y ocho semanas en día largo (lote 4). Las barras indican 1 cm.

En cuanto a la morfología de las inflorescencias, los caracteres morfológicos principales se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Caracteres morfológicos de las inflorescencias de plantas cultivadas en día corto seguido de día largo

Caracteres	Lote 3 ^z	Lote 4
Altura del tallo floral (cm)	2,38 ± 0,66 b ^y	3,75 ± 0,46 a
Número de hojas del tallo floral	8,5 ± 0,42 a	7 ± 0,30 b
Longitud de las hojas (mm)	25 ± 1,87 a	15,38 ± 1,32 b
Anchura de las hojas (mm)	3,63 ± 0,25 a	2,88 ± 0,18 b
Número de capítulos	1,25 ± 1,21 b	4,5 ± 0,86 a
Número de brácteas del involucre	4,5 ± 0,88 a	6 ± 0,62 a
Longitud de las brácteas (mm)	6,5 ± 1,32 a	9 ± 1,29 a
Anchura de las brácteas (mm)	2 ± 0,20 a	2,38 ± 0,13 a
Anchura de la inflorescencia (mm)	18 ± 4,32 a	22,38 ± 3,06 a

^z Para cada uno de los caracteres se presenta el valor de la media ± error estándar.

^y Letras distintas junto a las medias de un mismo carácter indican diferencias significativas estadísticamente ($p < 0,05$) entre ellas.

Las inflorescencias de los dos lotes, en comparación con las de las plantas silvestres y las de las procedentes de semilla, se caracterizaron por tener menor altura y menor número de capítulos y brácteas del involucre. En el caso del lote 3, el número de capítulos se reducía prácticamente a uno por inflorescencia y también presentaba brácteas del involucre más pequeñas (Figura 25, Tabla 14). En cuanto a la cobertura de pelos filamentosos de las plantas, también era menor que la de las plantas silvestres y al mismo nivel que las de las plantas de semilla cultivadas en invernadero.

3.3 ENSAYO DE VERNALIZACIÓN DE PLANTAS MICROPROPAGADAS

En los meses de invierno las plantas silvestres están expuestas a una media de temperaturas máximas inferior a 5 °C (Benito-Alonso, 2005) y pasan gran parte de este tiempo cubiertas por la nieve. Con esta premisa se estudió la vernalización de las plantas micropropagadas como factor desencadenante de la transición floral en *L. alpinum*.

Treinta plantas micropropagadas y aclimatadas se sometieron a una temperatura de cultivo de 4 °C durante cuatro semanas. Después de este período inductivo las plantas se trasladaron a las condiciones estándar de cultivo a 22/18 °C. Como resultado de este ensayo, el 16,6% de las plantas que fueron vernalizadas desarrolló una única inflorescencia. La aparición de inflorescencias comenzó a las cinco semanas del cese del período inductivo a baja temperatura y se prolongó por un período de dos semanas.

Los caracteres morfológicos principales de las inflorescencias se presentan en la tabla 15.

Tabla 15. Caracteres morfológicos de las inflorescencias de plantas vernalizadas

Caracteres	
Altura del tallo floral (cm)	4,50 ± 0,95 ^z
Número de hojas del tallo floral	6,6 ± 0,27
Longitud de las hojas (mm)	20 ± 2,26
Anchura de las hojas (mm)	2,70 ± 0,29
Número de capítulos	4,2 ± 1,08
Número de brácteas del involucre	6 ± 0,71
Longitud de las brácteas (mm)	7,9 ± 1,35
Anchura de las brácteas (mm)	2,0 ± 0,30
Anchura de la inflorescencia (mm)	20,2 ± 3,25

^z Para cada uno de los caracteres se presenta el valor de la media ± error estándar

Las inflorescencias de las plantas vernalizadas se caracterizaron por su pequeño tamaño en comparación con las de las plantas control de semilla y silvestres, con menor número de capítulos y de brácteas del involucre (Figura 26). La cobertura de pelos filamentosos se asemejó al de las plantas de semilla cultivadas en invernadero.

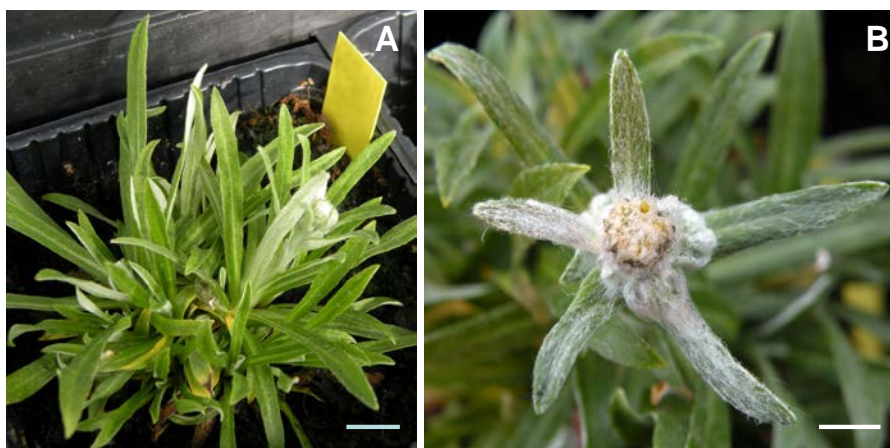


Figura 26. Floración en plantas vernalizadas. **A.** Inflorescencia seis semanas post-vernalización. **B.** Detalle de la inflorescencia.

3.4 APLICACIÓN EXÓGENA DE GIBERELINAS SOBRE PLANTAS MICROPROPAGADAS

Las giberelinas tienen influencia en diversos procesos de la planta (Stowe y Yamaki, 1959), incluyendo la transición floral (Boss *et al.*, 2004). Es bien conocido el hecho de que las giberelinas son capaces de promover el desarrollo del tallo floral

(*bolting*) y la formación de flores en plantas de día largo y en plantas bianuales en condiciones en las que normalmente no florecerían (Lang, 1957; Zeevart, 1983; Bernier 1988). Este efecto se ha utilizado ampliamente de forma práctica, entre otras cosas, para estimular el desarrollo floral en especies de interés ornamental (da Silva Vieira *et al.*, 2010).

3.4.1 Efecto de la aplicación de giberelinas sobre la formación de inflorescencias en plantas micropropagadas

Para determinar si la aplicación exógena de giberelinas era capaz de inducir el desarrollo de inflorescencias en las plantas micropropagadas de *L. alpinum*, se realizaron tratamientos en las mismas con el producto comercial Promalín® (combinación de GA₄+GA₇ y de BAP a concentraciones de 20 mg/L) y con GA₃ (100 mg/L). Los tratamientos se aplicaron mediante rociado de la roseta basal de hojas. En el caso de Promalín® se realizaron 1 ó 3 aplicaciones, con una semana de diferencia entre ellas (Materiales y Métodos, apartados 3.4.1 y 3.4.2). Los resultados se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Efecto de los tratamientos con giberelinas en la floración de plantas micropropagadas. Ensayo piloto.

Tratamiento	Número de aplicaciones	Plantas tratadas	Plantas con inflorescencias (%)	Flores totales	Número de inflorescencias por planta ^z	Número de inflorescencias por planta inflorescente	Días para la aparición de la primera inflorescencia
Promalín®	1	45	0 b	0	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 c
	3	45	55,56 a ^y	49	1,09 ± 0,22 a	1,96 ± 0,29 a	37,91 ± 0,68 a
GA ₃	1	45	53,33 a	28	0,62 ± 0,10 b	1,17 ± 0,10 b	34,40 ± 0,66 b
Control	-	45	0 b	0	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00c	0,00 ± 0,00 c

^y Datos seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellos.

^z Se presenta el valor de la media ± error estándar.

Las plantas control y las plantas tratadas con Promalín® en una única aplicación no desarrollaron inflorescencias. En cambio, el tratamiento con GA₃ y el tratamiento con Promalín® realizando tres aplicaciones estimularon la formación de tallos inflorescentes.

En ambos casos alrededor de la mitad de las plantas tratadas desarrollaron inflorescencias (Tabla 16, Figura 27). En plantas tratadas con GA₃, el número de días necesarios para la aparición de la primera inflorescencia fue inferior al de plantas tratadas con Promalín® (Figura 27), aunque en los dos casos esta aparición siempre fue posterior a las cuatro semanas de la aplicación del tratamiento.

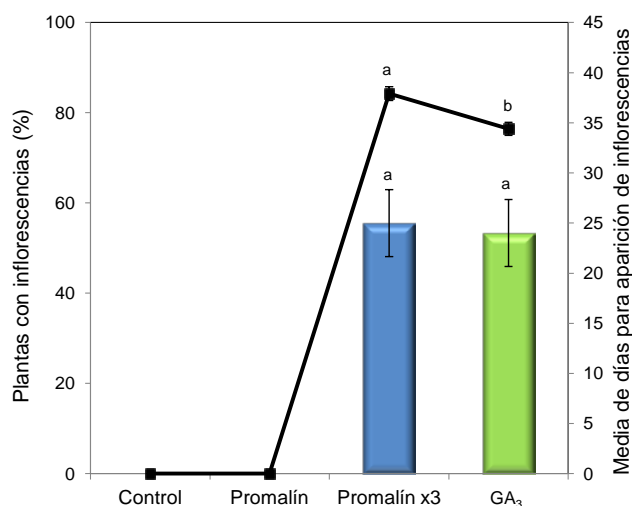


Figura 27. Efecto de los tratamientos con Promalín® y GA₃ sobre la formación de inflorescencias en plantas micropropagadas de *L. alpinum*. Las barras de colores muestran el porcentaje de plantas con inflorescencias. Los puntos unidos por una línea continua indican el promedio de días necesarios para la aparición de la primera inflorescencia en las plantas tratadas.

Las plantas tratadas con Promalín® en tres aplicaciones desarrollaron más inflorescencias que las plantas tratadas con GA₃ (Tabla 16). En ambos casos, la mayoría de las plantas desarrolló una única inflorescencia, pero utilizando Promalín® el número de plantas con más de una inflorescencia fue superior al de las tratadas con GA₃. (Figura 28).

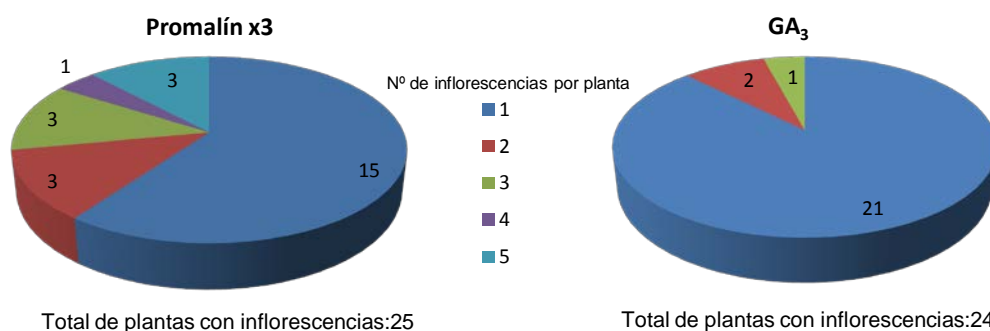


Figura 28. Distribución del número de inflorescencias por planta en plantas tratadas con Promalín® o con GA₃.

Después de la aparición de las primeras inflorescencias la producción floral en las plantas tratadas se extendió por un período de dos semanas. Con posterioridad no se observó en ningún caso la formación de nuevas inflorescencias.

En cuanto a la morfología de las inflorescencias, se encontró bastante similitud entre tratamientos (Figura 29), aunque las plantas tratadas con Promalín® con tres aplicaciones alcanzaron mayor altura y contaban con hojas del tallo floral más pequeñas que las tratadas con GA₃. (Tabla 17).



Figura 29. Inflorescencias obtenidas mediante la aplicación exógena de giberelinas sobre plantas micropropagadas. A. Planta tratada con Promalín® (tres aplicaciones). **B.** Planta tratada con GA₃. Las barras indican 1 cm.

Tabla 17. Caracteres morfológicos de las inflorescencias de plantas tratadas con Promalín® (tres aplicaciones) y GA₃

Caracteres	Promalín®x3 ^z	GA ₃
Altura del tallo floral (cm)	9,30 ± 0,53 a ^y	6,00 ± 0,35 b
sNúmero de hojas del tallo floral	7,72 ± 0,28 a	9,50 ± 0,67 a
Longitud de las hojas (mm)	25,76 ± 0,81 a	20,34 ± 0,78 b
Anchura de las hojas (mm)	4,04 ± 0,12 a	3,04 ± 0,13 b
Número de capítulos	6,00 ± 0,50 a	7,57 ± 0,64 a
Número de brácteas del involucre	6,83 ± 0,54 a	8,63 ± 0,48 a
Longitud de las brácteas (mm)	15,24 ± 0,47 a	16,02 ± 0,46 a
Anchura de las brácteas (mm)	3,38 ± 0,07 a	3,07 ± 0,14 a
Anchura de la inflorescencia (mm)	29,30 ± 1,68 a	25,36 ± 1,41 a

^zPara cada uno de los caracteres se presenta el valor de la media ± error estándar.

^yLetras distintas junto a las medias de un mismo carácter indican diferencias estadísticas significativas estadísticamente ($p < 0,05$) entre ellas.

3.4.2 Efecto de la dosis de giberelina aplicada sobre la formación de inflorescencias en plantas micropropagadas

Mediante el ensayo anterior se comprobó que es posible inducir la transición floral en plantas de *L. alpinum* en condiciones no propicias mediante la aplicación exógena de giberelinas. La necesidad de realizar varias aplicaciones del tratamiento con Promalín® frente a una única aplicación con GA₃ para obtener resultados similares llevó a considerar la importancia de la concentración de principio activo utilizado. Con esta idea se diseñó un experimento en el que se utilizaron los tratamientos con Promalín® y GA₃ a dos concentraciones con una diferencia de un orden de magnitud entre ellas, siendo una de las mismas la utilizada en el ensayo previo. Por otro lado, estudiamos por separado el efecto de los reguladores del crecimiento presentes en Promalín® (GA₄₊₇ y BAP) en la formación de inflorescencias. En el ensayo se incluyeron tratamientos con GA₄₊₇ y con BAP a las mismas concentraciones que las del tratamiento con Promalín®. Los tratamientos se realizaron en forma de una única aplicación.

Los resultados del ensayo se muestran en la tabla 18. Como se esperaba, los resultados obtenidos con el tratamiento con GA₃ a 100 mg/L, la concentración del ensayo previo, son equivalentes a los obtenidos en dicho ensayo. Sin embargo, al reducir la concentración a 10 mg/L, el tratamiento ya no fue capaz de promover el desarrollo de tallos inflorescentes. Por su parte, se confirmó que el tratamiento con Promalín® a la concentración utilizada en el ensayo previo (20 mg/L) no permite la formación de inflorescencias realizando una única aplicación. Cuando la concentración se incrementa a 200 mg/L, en cambio, los resultados son equivalentes a los obtenidos en el ensayo piloto con el tratamiento a 20 mg/L realizando tres aplicaciones.

En lo que respecta al efecto de GA₄₊₇ y BAP, los tratamientos con BAP a las concentraciones ensayadas no consiguieron que las plantas desarrollaran inflorescencias. Por su parte, la utilización de GA₄₊₇ a la concentración más baja tampoco produjo inflorescencias mientras que a 200 mg/L el porcentaje de plantas con inflorescencias es equivalente estadísticamente al obtenido con Promalín® a la misma concentración aunque hay una disminución en el número de inflorescencias por planta (Tabla 18, Figura 30).

Tabla 18. Efecto de la dosis de reguladores del crecimiento aplicada en la floración de plantas micropropagadas.

Tratamiento	Dosis (mg/L/)	Plantas tratadas	Plantas con inflorescencias (%)	Inflorescencias totales	Número de inflorescencias por planta ^z	Número de inflorescencias por planta inflorescente
Promalín®	20	36	0 c ^y	0	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 c
	200	36	66,67 a	70	1,94 ± 0,49 a	2,92 ± 0,65 a
GA ₄₊₇	20	36	0 c	0	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 c
	200	36	52,78 a	33	0,94 ± 0,19 b	1,79 ± 0,21 a,b
BAP	20	36	0 b	0	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 c
	200	36	0 c	0	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 c
GA ₃	10	36	0 c	0	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 c
	100	36	38,89 b	14	0,53 ± 0,13 b	1,36 ± 0,17 b

^y Datos seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellos.

^z Se presenta el valor de la media ± error estándar.

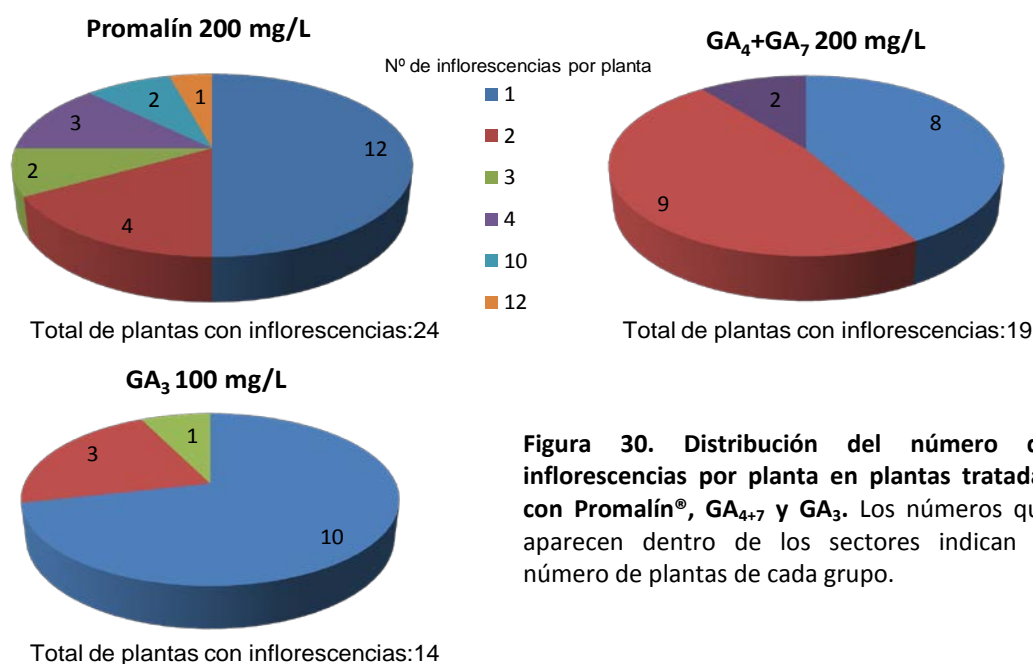


Figura 30. Distribución del número de inflorescencias por planta en plantas tratadas con Promalín®, GA₄₊₇ y GA₃. Los números que aparecen dentro de los sectores indican el número de plantas de cada grupo.

No obstante, el principal efecto de los tratamientos se observó en la morfología de las inflorescencias (Tabla 19, Figura 31). Mientras que las plantas tratadas con GA₃, respondían fenotípicamente de acuerdo con lo observado en el ensayo previo y se asemejaban a las plantas de semilla silvestre (Figura 31C), el tratamiento con Promalín®

a 200 mg/L dio lugar a inflorescencias de menor altura, con capítulos pequeños y brácteas del involucre deformadas y con escasa cobertura de pelos. Las hojas del tallo floral eran pequeñas y sinuosas y, en general, en la planta se apreció un incremento en la proliferación de brotes conformados por hojas de tamaño reducido (Figura 31A). Las inflorescencias tratadas con GA₄₊₇ se asemejaron más a las del tratamiento con GA₃ pero presentaban hojas y brácteas más estrechas y menor anchura de la inflorescencia (Tabla 19, Figura 31B).

Tabla 19. Caracteres morfológicos de las inflorescencias de plantas tratadas con Promalín® 200 mg/l, GA₄₊₇ 200 mg/L y GA₃ 100 mg/L

Caracteres	Promalín® 200 mg/L	GA ₄ +GA ₇ 200 mg/L	GA ₃ 100 mg/L
Altura del tallo floral (cm)	3,59 ± 0,32 b	6,13 ± 0,64 a	6,20 ± 1,22 a
Número de hojas del tallo floral	8,63 ± 0,41 b	10,91 ± 0,60 a	9,22 ± 1,14 a,b
Longitud de las hojas(mm)	16,24 ± 1,31 c	22,55 ± 1,07 b	31,83 ± 2,33 a
Anchura de las hojas (mm)	2,81 ± 0,14 b	2,95 ± 0,11 b	3,71 ± 0,25 a
Número de capítulos	4,23 ± 0,33 a	4,64 ± 0,48 a	5,67 ± 0,93 a
Número de brácteas del involucre	6,40 ± 0,29 b	8,30 ± 0,43 a	7,89 ± 0,82 a,b
Longitud de las brácteas (mm)	6,64 ± 0,71 c	11,93 ± 0,79 b	15,41 ± 1,13 a
Anchura de las brácteas (mm)	1,76 ± 0,16 b	2,09 ± 0,17 b	3,58 ± 0,23 a
Anchura de la inflorescencia (mm)	13,23 ± 1,81 c	24,09 ± 1,96 b	32,68 ± 2,91 a

^z Para cada uno de los caracteres se presenta el valor de la media ± error estándar.

^y Letras distintas junto a las medias de un mismo carácter indican diferencias estadísticas significativas estadísticamente ($p < 0,05$) entre ellas.

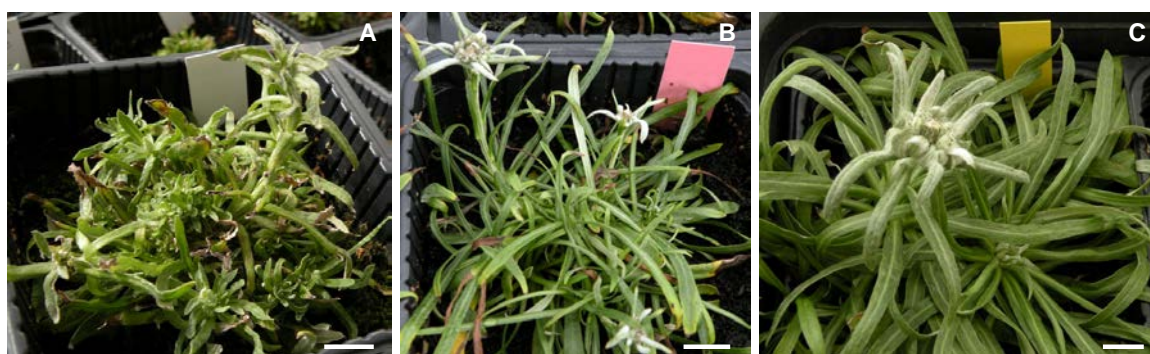


Figura 31. Inflorescencias obtenidas en el ensayo de dosis de giberelinas. **A.** Planta tratada con Promalín® 200 mg/L. **B.** Planta tratada con GA₄₊₇ 200 mg/L. **C.** Inflorescencia de planta tratada con GA₃ (100 mg/L). Las barras indican 1 cm.

3.4.3 Efecto del número de aplicaciones del tratamiento con giberelinas sobre la formación de inflorescencias en plantas micropropagadas

Después de comprobar el efecto de la concentración del tratamiento, se realizó un ensayo en el que se modificó el número de aplicaciones de tratamiento estudiando su efecto en la formación de inflorescencias y su semejanza fenotípica con las de las plantas control. En el ensayo se utilizaron los tratamientos con Promalín®, GA₄₊₇ y GA₃ realizando una, dos o tres aplicaciones. También se mantuvo un lote de plantas para cada tratamiento sobre el que se realizó una aplicación semanal de forma continuada durante todo el ensayo.

Tabla 20. Efecto del número de aplicaciones del tratamiento con giberelinas en la floración de plantas micropropagadas.

Tratamiento	Número de aplicaciones	Número de plantas tratadas	Plantas con inflorescencias (%)	Número de inflorescencias	Número de inflorescencias por planta	Número de inflorescencias por planta con inflorescencias
Promalín®	1	19	0 e	0	0,00 ± 0,00 f	0,00 ± 0,00 d
	2	19	10,53 d	4	0,21 ± 0,16 e	2,00 ± 1,00 a,b,c
	3	19	36,84 c	14	0,74 ± 0,34 d,e	2,00 ± 0,72 c
	Continuado	19	68,42 b	46	2,42 ± 0,59 b,c	3,54 ± 0,67 a,b,c
GA ₄₊₇	1	19	0 e	0	0,00 ± 0,00 f	0,00 ± 0,00 d
	2	19	5,26 d	1	0,05 ± 0,05 e	1,00 a,b,c
	3	19	10,53 d	2	0,11 ± 0,07 e	1,00 ± 0,00 c
	Continuado	19	21,05 c,d	26	1,37 ± 0,63 c,d,e	6,50 ± 0,29 a
GA ₃	1	19	42,11 c	11	0,58 ± 0,19 e	1,38 ± 0,26 c
	2	19	89,47 a,b	40	2,11 ± 0,38 b,c,d	2,35 ± 0,38 c
	3	19	94,74 a	63	3,32 ± 0,67 b	3,50 ± 0,68 b,c
	Continuado	19	94,74 a	95	5,00 ± 0,99 a	5,28 ± 1,01 a,b

^z Para cada uno de los caracteres se presenta el valor de la media ± error estándar.

^y Letras distintas junto a las medias de un mismo carácter indican diferencias estadísticas significativas estadísticamente ($p < 0,05$) entre ellas.

Los resultados se presentan en la tabla 20 y en la figura 32, donde puede verse que la mayor respuesta de inducción de la floración, en conjunto, se obtuvo utilizando el tratamiento con GA₃, seguido del tratamiento con Promalín® y, finalmente del tratamiento con GA₄₊₇. En cuanto al número de aplicaciones, la realización de una segunda aplicación de producto afecta significativamente a la formación de

inflorescencias, posibilitándola en el caso de Promalín® y GA₄₊₇ y duplicando el porcentaje de plantas con inflorescencias en el caso de GA₃. La respuesta a una tercera aplicación no es homogénea, aumentando el número de inflorescencias formadas en los tratamientos con Promalín® y GA₃ pero sin apenas respuesta en el tratamiento con GA₄₊₇. Por su parte, la aplicación continuada de Promalín® o GA₄₊₇ eleva drásticamente los porcentajes de plantas con inflorescencias y el número de inflorescencias por planta. En el caso de GA₃, el porcentaje de plantas con inflorescencias no supera el obtenido con tres aplicaciones, que ya era cercano al 100%, pero sí aumenta el número de inflorescencias por planta.

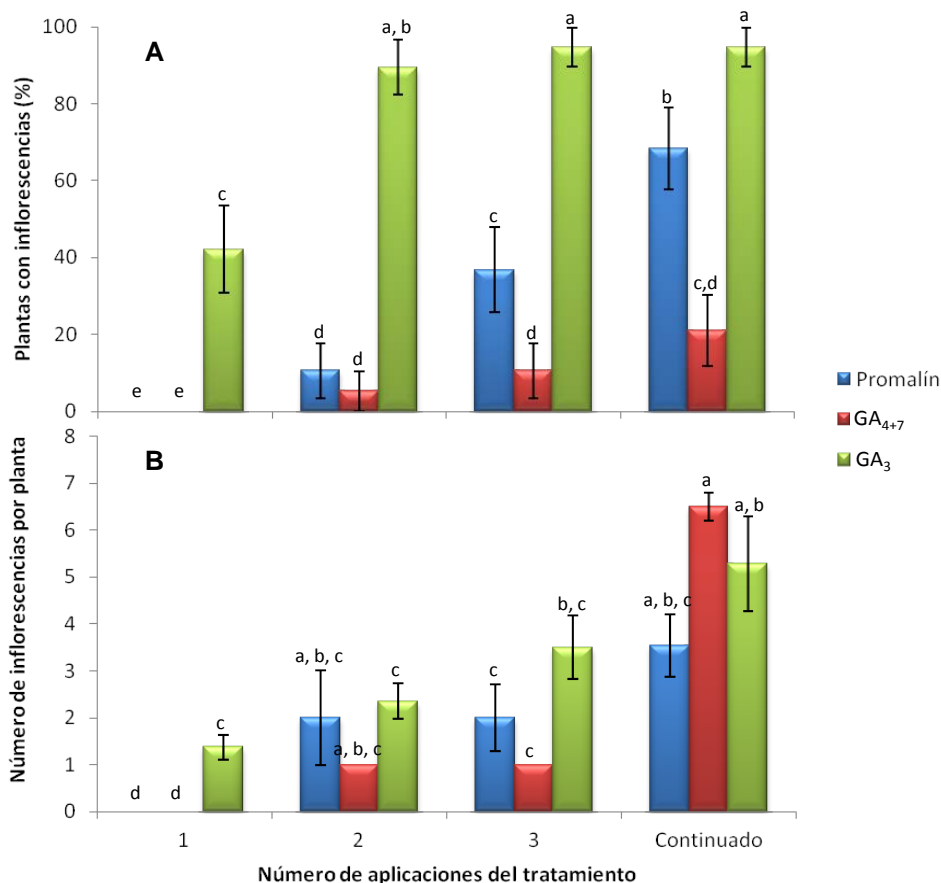


Figura 32. Efecto del número de aplicaciones de los tratamientos de Promalín®, GA₄₊₇ y GA₃ en la floración de plantas micropropagadas. A. Sobre el porcentaje de plantas con inflorescencias B. Sobre el número de inflorescencias por planta.

En cuanto a los caracteres morfológicos de las inflorescencias según los distintos tratamientos y el número de aplicaciones de los mismos, los resultados se muestran en la tabla 21 y en la figura 33.

Tabla 21. Caracteres morfológicos de las inflorescencias de plantas tratadas con una, dos y tres aplicaciones así como con la aplicación continuada de Promalín®, GA₄₊₇ y GA₃.

Tratamiento	Número de aplicaciones	Altura de tallo floral (cm) ^{z,y}	Número de hojas de tallo floral	Longitud de las hojas (mm)	Anchura de las hojas (mm)	Número de capítulos ^{z,y}
Promalín®	1	0,00 ± 0,00 e	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 e	0,00 ± 0,00 e	0,00 ± 0,00 d
	2	5,79 ± 1,42 c	8,86 ± 1,36 b	20,40 ± 2,15 b,c,d	2,78 ± 0,23 a, b,c	5,00 ± 0,90 a,b,c
	3	6,79 ± 1,00 b,c	7,29 ± 0,96 b	20,30 ± 1,31 b,c,d	3,25 ± 0,16 a	5,64 ± 0,81 a,b
	Continuada	2,37 ± 0,78 d	8,09 ± 0,76 b	16,83 ± 1,21 d	2,35 ± 0,13 c	2,77 ± 0,64 c
GA ₄₊₇	1	0,00 ± 0,00 e	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 e	0,00 ± 0,00 e	0,00 ± 0,00 d
	2	3,00 ^x a,b,c,d	5,00 ^x b	25,00 ^x d	3,00 ^x a,b,c,d	6,00 ^x a,b,c
	3	6,25 ± 2,66 a,b,c,d	8,50 ± 2,54 a,b	20,38 ± 4,01 b,c	2,25 ± 0,43 b,c	6,5 ± 2,15 a,b,c
	Continuada	9,40 ± 0,94 a,b	7,85 ± 0,88 b	30,87 ± 1,81 a	3,06 ± 0,15 a,b	4,38 ± 0,84 b,c
GA ₃	1	6,09 ± 1,13 c	8,45 ± 1,08 b	22,25 ± 1,71 b,c	3,05 ± 0,18 a,b	5,81 ± 0,87 a,b
	2	8,11 ± 0,61 b,c	9,20 ± 0,57 b	19,71 ± 1,13 c,d	2,88 ± 0,11 a,b	6,33 ± 0,46 a
	3	9,72 ± 0,47 a	12,69 ± 0,49 a	21,72 ± 1,18 b,c	2,91 ± 0,13 a,b	6,13 ± 0,38 a,b
	Continuada	8,20 ± 0,58 b,c	8,81 ± 0,57 b	24,16 ± 1,27 b	3,22 ± 0,15 a	2,71 ± 0,47 c

^z Para cada uno de los caracteres se presenta el valor de la media ± error estándar.

^y Letras distintas junto a las medias de un mismo carácter indican diferencias estadísticas significativas estadísticamente ($p < 0,05$) entre ellas.

^x Dato de una única inflorescencia.

Tabla 21. (Continuación) **Caracteres morfológicos de las inflorescencias de plantas tratadas con una, dos y tres aplicaciones así como con la aplicación continuada de Promalín®, GA₄₊₇ y GA₃ de los mismos.**

Tratamiento	Número de aplicaciones	Número de brácteas del involucre	Longitud de las brácteas (mm)	Anchura de las brácteas (mm)	Anchura de la inflorescencia (mm)
Promalín®	1	0,00 ± 0,00 d	0,00±0,00 e	0,00 ± 0,00 e	0,00 ± 0,00 d
	2	7,57 ± 1,05 a,b	15,75 ± 0,84 a	3,29 ± 0,21 a	21,24 ± 2,60 b
	3	6,50 ± 0,75 b	14,88 ± 0,79 a	3,22 ± 0,20 a	24,89 ± 1,90 a,b
	Continuada	5,41 ± 0,60 b,c	4,46 ± 0,67 d	1,46 ± 0,17 d	7,85 ± 1,46 c
GA ₄₊₇	1	0,00 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 e	0,00 ± 0,00 e	0,00 ± 0,00 d
	2	6,00 ^x a,b,c	9,50 ^x b,c	2,00 ^x b,c,d	25,00 ^x a,b
	3	6,5 ± 1,97 a,b,c	12,55 ± 1,6 a,b,c	2,75 ± 0,40 a,b	23,80 ± 4,85 a,b
	Continuada	5,00 ± 0,77 b,c	12,34 ± 0,67 b	2,07 ± 0,18 b,c	23,78 ± 2,28 a,b
GA ₃	1	5,18 ± 0,84 b,c	15,27 ± 0,79 a	3,31 ± 0,19 a	23,83 ± 3,07 a,b
	2	9,10 ± 0,44 a	14,77 ± 0,41 a	3,22 ± 0,10 a	26,69 ± 1,08 a,b
	3	8,31 ± 0,35 a	15,43 ± 0,43 a	3,25 ± 0,11 a	28,67 ± 1,78 a
	Continuada	4,40 ± 0,43 c	9,74 ± 0,74 c	1,77 ± 0,18 c,d	8,00 ± 1,58 c

^z Para cada uno de los caracteres se presenta el valor de la media ± error estándar.

^y Letras distintas junto a las medias de un mismo carácter indican diferencias estadísticas significativas estadísticamente ($p < 0,05$) entre ellas.

^x Dato de una única inflorescencia.

Desde el punto de vista de la morfología de las inflorescencias, no hay grandes diferencias entre tratamientos considerando el uso de dos o tres aplicaciones (Tabla 21, Figura 33). La excepción la constituye la única inflorescencia obtenida con dos aplicaciones de GA₄₊₇, que presenta menor altura, menor número de hojas y brácteas más pequeñas (Tabla 21, Figura 33E). En los tratamientos con Promalín® y GA₄₊₇ se observa un incremento en la altura media del tallo floral al aumentar el número de aplicaciones de dos a tres. Este efecto se da igualmente con GA₃ considerando también las inflorescencias obtenidas con una única aplicación. La mayor altura media se obtiene con tres aplicaciones de GA₃, posiblemente explicada por la presencia puntual de inflorescencias con alturas superiores a los 15 cm (figura 33I). El incremento en la altura media no supone un incremento en el número de hojas del tallo floral a excepción del caso de tres aplicaciones de GA₃. Tal y como se vio en el ensayo inicial, las inflorescencias con tres aplicaciones de Promalín® (Figura 33C) se asemejan a las de una aplicación de GA₃ (Figura 33G). Por su parte, con los tratamientos con GA₃ en dos y tres aplicaciones se aprecia cierto aumento en el número de brácteas y en el ancho de la inflorescencia (Figura 33H e I).

En general, las inflorescencias obtenidas con una a tres aplicaciones se asemejan a las inflorescencias de plantas de semilla pero con menor número de brácteas que, además, tienden a ser más anchas.

Figura 33. Efecto del número de aplicaciones de giberelinas en la floración de plantas micropropagadas. A. Planta tratada con una aplicación de Promalín®. B. Inflorescencias de planta tratada con dos aplicaciones de Promalín®. C. Inflorescencia de planta tratada con tres aplicaciones de Promalín®. D. Planta tratada con una aplicación de GA₄₊₇. E. Inflorescencia de planta tratada con dos aplicaciones de GA₄₊₇. F. Inflorescencia de planta tratada con tres aplicaciones de GA₄₊₇. G. Inflorescencias de planta tratada con una aplicación de GA₃. H. Inflorescencias de planta tratada con dos aplicaciones de GA₃. I. Inflorescencias de planta tratada con tres aplicaciones de GA₃. Las barras indican 1 cm.



Figura 33. Efecto del número de aplicaciones de giberelinas en la floración de plantas micropropagadas.

Caso aparte merecen los datos del tratamiento continuado. Independientemente del tratamiento, las plantas presentan caracteres morfológicos muy alterados respecto al fenotipo silvestre o de semilla. Las plantas tratadas continuamente con Promalín® tienen inflorescencias pequeñas, tanto en altura como en anchura de la inflorescencia, un número reducido de capítulos y hojas pequeñas (Tabla 21, Figura 34A). Las plantas tratadas continuamente con GA_{4+7} , por el contrario, muestran una altura significativamente mayor que con dos o tres aplicaciones e igualmente cabezuelas estrechas con pocos capítulos (Tabla 21, Figura 34B). Por su parte, la aplicación continuada de GA_3 reduce drásticamente el número de capítulos y brácteas así como la anchura de la inflorescencia (Tabla 21, Figura 34C).

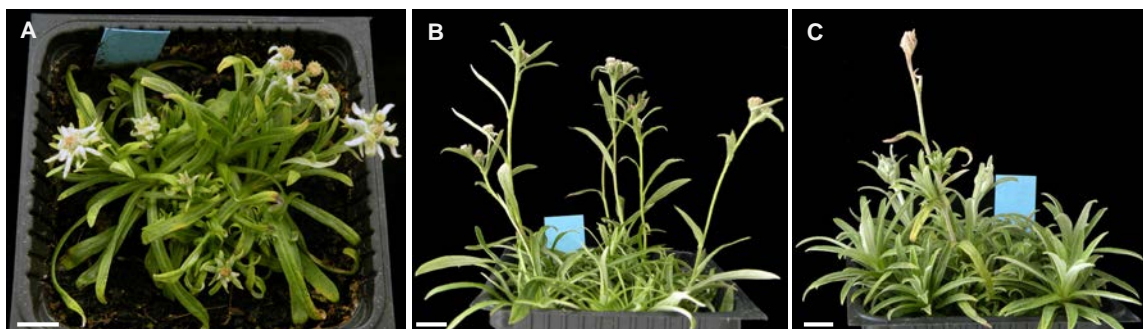


Figura 34. Efecto de la aplicación continuada de los tratamiento de Promalín®, GA_{4+7} y GA_3 en la floración de plantas micropropagadas. **A.** Inflorescencias de planta tratada de forma continuada con Promalín®. **B.** Inflorescencias de planta tratada de forma continuada con GA_{4+7} . **C.** Inflorescencias de planta tratada de forma continuada con GA_3 . Las barras indican 1 cm.

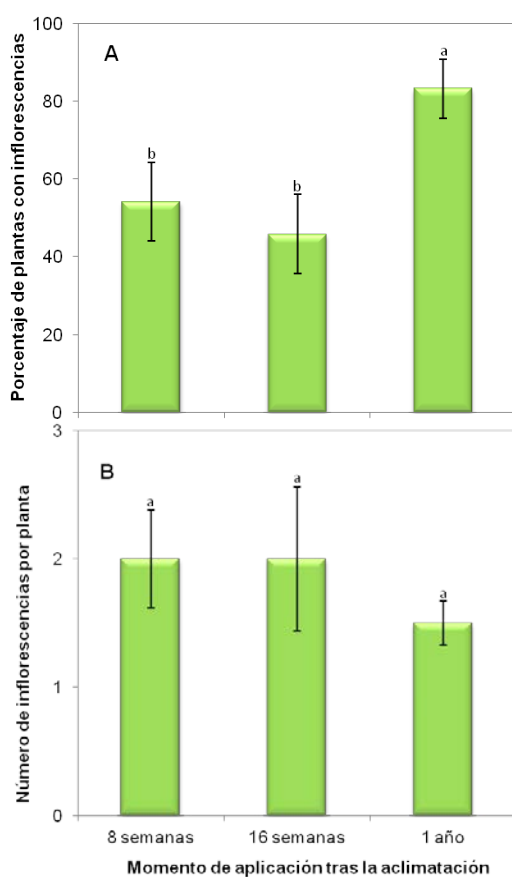
3.4.4 Efecto de la edad de la planta sobre la formación de inflorescencias en plantas micropropagadas tratadas con GA_3

Uno de los factores que influyen en la floración es la edad de la planta y su estadio de desarrollo. En los ensayos anteriores, las plantas utilizadas fueron transplantadas desde condiciones *in vitro* a invernadero ocho semanas antes de realizar la aplicación de los tratamientos con giberelinas. Para comprobar el efecto del estadio de desarrollo de las plantas sobre la eficacia del tratamiento con GA_3 , en el presente ensayo utilizamos plantas de 8 semanas y plantas de 16 semanas con mayor desarrollo de la roseta de hojas, así como plantas que llevaban un año de cultivo en invernadero (Figura 35).



Figura 35. Plantas utilizadas en el ensayo del momento de aplicación del tratamiento con GA_3 . **A.** Planta de ocho semanas de cultivo en invernadero. **B.** Planta de 16 semanas de cultivo en invernadero. **C.** Planta de un año de cultivo en invernadero. Las barras indican 1 cm.

Estos tres grupos de plantas se trataron con 100 mg/L de GA₃ en una única aplicación. Los resultados del ensayo se presentan en la figura 36. No se observó diferencias entre las plantas tratadas a las ocho semanas o a las 16 semanas después del trasplante a invernadero desde condiciones *in vitro* ni en el porcentaje de plantas con inflorescencias ni en el número de inflorescencias por planta. En cuanto a las plantas de un año, el porcentaje de plantas con inflorescencias fue mayor al de las otras dos condiciones, superando el 80% (Figura 36A). Sin embargo esto no supuso un incremento en el número de inflorescencias por planta (Figura 36B).



En cuanto a la morfología de las inflorescencias, en las tres condiciones ensayadas, las plantas mostraron un aspecto similar, aunque las plantas de un año presentaron inflorescencias más altas, con mayor tamaño de las hojas del tallo floral y brácteas del involucre más largas y estrechas (Tabla 22).

Tabla 22. Caracteres morfológicos de las inflorescencias de plantas micropropagadas tratadas con GA₃ a las ocho semanas, a las dieciséis semanas y al año de su transplante al invernadero.

Caracteres	8 semanas ^z	16 semanas	1 año
Altura del tallo floral (cm)	8,64 ± 0,76 b ^y	9,24 ± 0,74 b	11,90 ± 0,97 a
Número de hojas del tallo floral	10,89 ± 0,71 a	11,13 ± 1,06 a	10,12 ± 0,81 a
Longitud de las hojas (mm)	28,93 ± 1,62 b	27,89 ± 1,09 b	33,32 ± 1,42 a
Anchura de las hojas (mm)	2,91 ± 0,13 b	2,76 ± 0,11 b	4,22 ± 0,20 a
Número de capítulos	8,29 ± 0,66 a	7,42 ± 0,62 a	7,04 ± 0,58 a
Número de brácteas del involucro	9,32 ± 0,53 a	8,83 ± 0,46 a	8,52 ± 0,67 a
Longitud de las brácteas (mm)	14,22 ± 0,70 b	13,38 ± 0,32 b	16,87 ± 0,74 a
Anchura de las brácteas (mm)	3,41 ± 0,11 a	3,30 ± 0,08 a	2,42 ± 0,17 b
Anchura de la inflorescencia (mm)	31,01 ± 1,85 a	27,78 ± 1,09 a	31,71 ± 1,92 a

^z Para cada uno de los caracteres se presenta el valor de la media ± error estándar.

^y Letras distintas junto a las medias de un mismo carácter indican diferencias estadísticas significativas estadísticamente ($p < 0,05$) entre ellas.

3.4.5 Efecto de la formulación de GA₃ sobre la formación de inflorescencias en plantas micropropagadas

A diferencia de los tratamientos con Promalín®, que es una formulación comercial, los tratamientos con GA₃ se prepararon a partir de producto puro de laboratorio. El uso de un producto puro encarece el tratamiento y dificulta su aplicación a efectos empresariales. Por este motivo se realizó un ensayo comparativo de dos tratamientos de GA₃ como producto puro y como una formulación comercial (AG-100®). En ambos casos se utilizó una concentración de 100 mg/L de GA₃ y se realizó una única aplicación. Los resultados se muestran en la tabla 23

Tabla 23. Efecto de la formulación de GA₃ en la floración de plantas micropropagadas

Tratamiento	Plantas tratadas	Plantas con inflorescencias (%)	Inflorescencias totales	Número de inflorescencias por planta ^z	Número de inflorescencias por planta inflorescente
AG-100®	10	70 a	11	1,10 ± 0,31 a	1,57 ± 0,30 a
GA ₃	10	70 a	12	1,20 ± 0,39 a	1,71 ± 0,42 a

^y Datos seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellos.

^z Se presenta el valor de la media ± error estándar.

Tal y como se muestra en la tabla 23, la aplicación de la misma concentración de GA₃ a partir de producto puro o de una formulación comercial tuvo un efecto equiparable en

la inducción de la floración. Se obtuvieron los mismos porcentajes de plantas inflorescentes (70%) así como un número similar de inflorescencias formadas.

Por lo que respecta a los caracteres morfológicos (Tabla 24), las inflorescencias son muy similares, todo y que las de plantas tratadas con formulación comercial (AG-100) tienen hojas del tallo ligeramente más cortas y estrechas además de brácteas también más estrechas.

Tabla 24. Caracteres morfológicos de las inflorescencias de plantas tratadas con GA₃ puro o en formulación comercial.

Caracteres	AG-100® ^z	GA ₃
Altura del tallo floral (cm)	11,22 ± 0,95 a ^y	12,23 ± 0,76 a
Número de hojas del tallo floral	11,33 ± 0,55 a	12,00 ± 0,60 a
Longitud de las hojas (mm)	33,13 ± 1,23 b	37,27 ± 1,44 a
Anchura de las hojas (mm)	2,56 ± 0,16 b	3,05 ± 0,14 a
Número de capítulos	7,63 ± 0,27 a	7,73 ± 0,32 a
Número de brácteas del involucre	9,78 ± 0,51 a	9,27 ± 0,45 a
Longitud de las brácteas (mm)	11,38 ± 0,69 a	12,00 ± 0,58 a
Anchura de las brácteas (mm)	3,17 ± 0,14 b	3,45 ± 0,12 a
Anchura de la inflorescencia (mm)	30,75 ± 1,47 a	31,64 ± 1,25 a

^z Para cada uno de los caracteres se presenta el valor de la media ± error estándar.

^y Letras distintas junto a las medias de un mismo carácter indican diferencias estadísticas significativas estadísticamente ($p < 0,05$) entre ellas.

En la práctica se trata de diferencias poco distinguibles visualmente (Figura 37), teniendo en cuenta además la variabilidad existente entre plantas dentro de un mismo tratamiento.

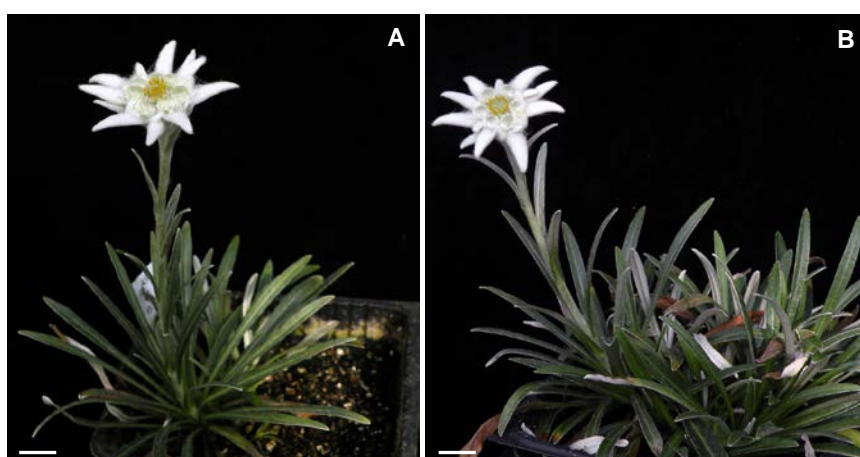


Figura 37. Inflorescencias obtenidas en el ensayo de inducción de la floración con distintas formulaciones de GA₃. A. Planta tratada con AG-100®. B. Planta tratada con GA₃. Las barras indican 1 cm.

En definitiva, los resultados indican que es factible emplear una formulación de GA₃ en lugar del producto puro sin menoscabo de la producción y la calidad de las inflorescencias, y con menores costes.

3.5 CARACTERIZACIÓN DE LAS INFLORESCENCIAS DE PLANTAS MICROPROPAGADAS

Las inflorescencias de las plantas micropropagadas difieren en sus caracteres morfológicos según el tratamiento realizado. En común, todas mostraron menor cobertura de pelos y menor altura del tallo floral que las plantas silvestres, características que comparten con las plantas procedentes de semilla silvestre. Tal y como se ha mostrado previamente, las inflorescencias obtenidas en los ensayos de termoperíodo y vernalización se apartaban fenotípicamente tanto de las inflorescencias de plantas silvestres como de las procedentes de semilla silvestre por su pequeño tamaño y el número reducido de capítulos y brácteas. Con los tratamientos con giberelinas se obtienen inflorescencias que se asemejan más a las silvestres y a las procedentes de semilla silvestre. De entre ellos, los tratamientos con Promalín® en tres aplicaciones y los tratamientos con 1-3 aplicaciones de GA₃ dan lugar a las inflorescencias más parecidas a las de plantas procedentes de semilla silvestre cultivadas en invernadero (Figura 38A). Pese a esto, las inflorescencias de estas plantas micropropagadas tienden a ser más estrechas y a tener menos brácteas en el involucre y menor número de hojas en el tallo floral que las inflorescencias de plantas procedentes de semilla silvestre. Además, dentro de un mismo tratamiento con giberelinas también es importante la variabilidad fenotípica entre las inflorescencias (Figura 38B y C). Como caso particular, el tratamiento con GA₃ aplicado sobre plantas micropropagadas de un año dio lugar a las inflorescencias más parecidas a las de plantas procedentes de semilla silvestre pero con menor número de brácteas (Figura 38D).

Todas las inflorescencias de las plantas micropropagadas en las que se indujo la floración, contaban tanto con flores femeninas como flores hermafroditas. En particular se observó que, en las plantas tratadas con giberelinas, el número promedio de flores era superior al registrado en plantas silvestres y plantas de semilla silvestre. Asimismo, la proporción de flores femeninas respecto a flores hermafroditas también era superior (Tabla 25).

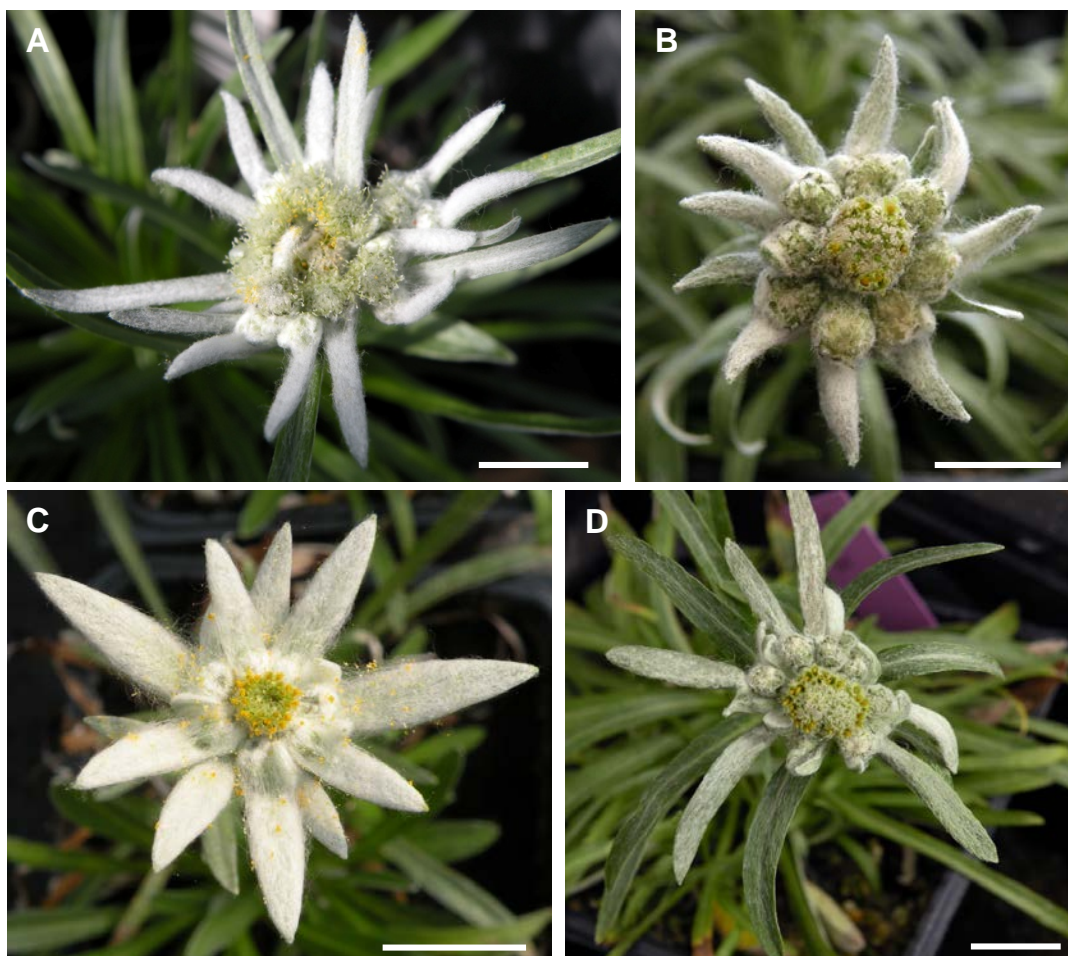


Figura 38. Ejemplo de inflorescencias de plantas micropropagadas tratadas con GA₃. A. Inflorescencia de planta obtenida a partir de semilla silvestre. B. Inflorescencia de planta micropropagada tratada con dos aplicaciones de GA₃. C. Inflorescencia de planta micropropagada tratada con dos aplicaciones de GA₃. D. Inflorescencia de planta micropropagada de un año de cultivo tratada con GA₃. Las barras indican 1 cm.

Tabla 25. Número y distribución de flores por capítulo en plantas micropropagadas con inducción de la floración por tratamiento con giberelinas.

Número de flores	Media (\pm EE)*
Totales	98,83 \pm 4,50
Femeninas	70,04 \pm 3,04
Hermafroditas	28,78 \pm 2,25

*Para cada uno de los datos se presenta el valor de la media \pm el error estándar.

Pese a la existencia de flores de ambos sexos en las plantas micropropagadas, y de constatar la presencia de polen en las flores hermafroditas, no se formaban semillas. Se realizó un análisis mediante criomicroscopía electrónica de barrido comparando estas flores con las de plantas procedentes de semilla silvestre que habían mostrado ser fértiles en las condiciones de cultivo en invernadero (Figura 39).

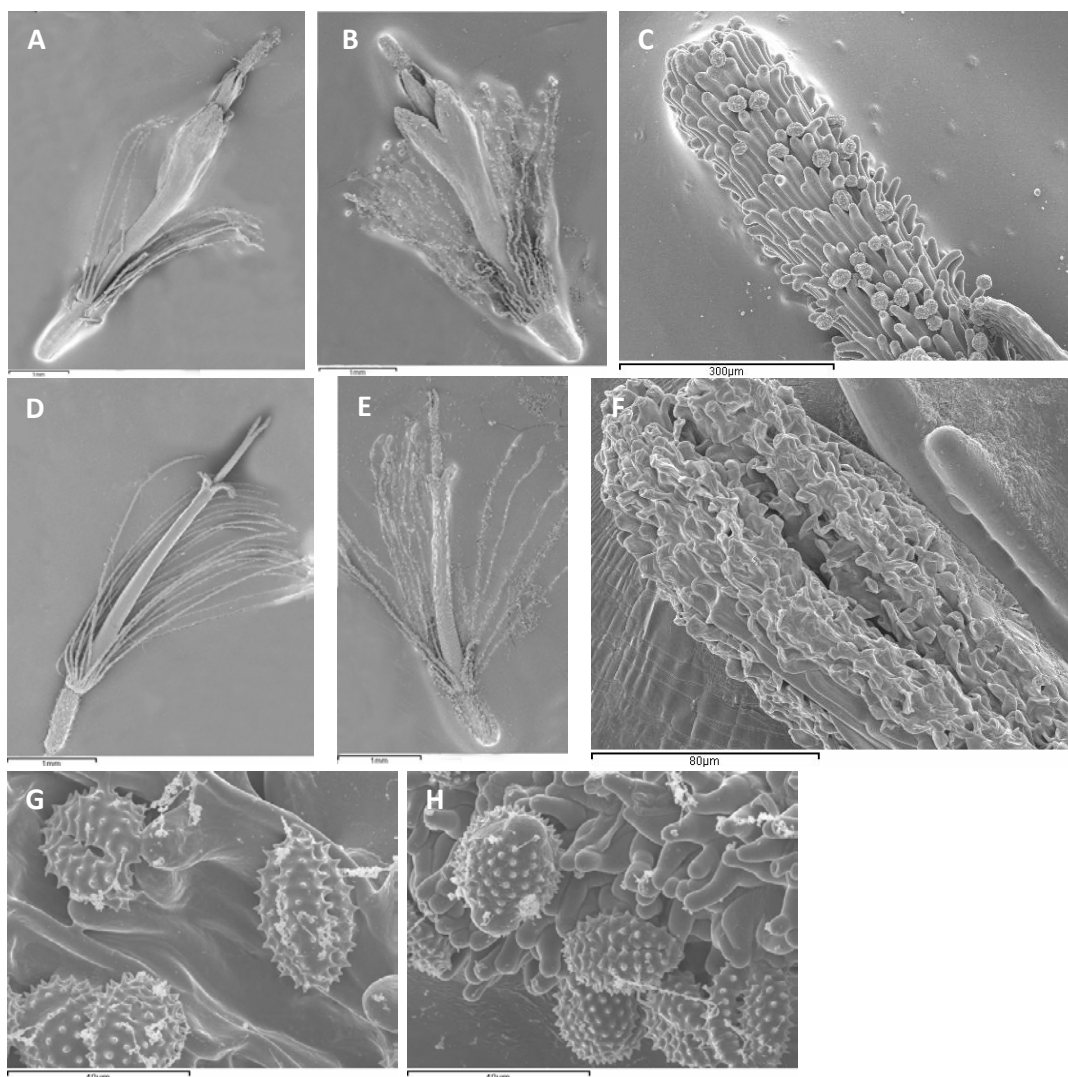


Figura 39. Fenotipo de las flores de plantas micropropagadas tratadas con GA_3 . A. Flor hermafrodita de planta de semilla silvestre. B. Flor hermafrodita de planta micropropagada tratada con GA_3 . C. Estigma de flor hermafrodita de planta micropropagada exponiendo el polen de las anteras al exterior. D. Flor femenina de planta obtenida a partir de semilla silvestre. E. Flor femenina de planta micropropagada tratada con GA_3 . F. Estigma de flor femenina de planta micropropagada. G. Polen de planta obtenida a partir de semilla silvestre adherido al estigma de la flor femenina. H. Polen de planta micropropagada adherido al estigma de la flor femenina.

En la figura 39 se observa que el fenotipo de las flores de plantas micropropagadas es similar al de las plantas obtenidas a partir de semilla silvestre pero de tamaño más pequeño. Aparentemente las flores hermafroditas liberan normalmente el polen, ya que puede observarse granos del mismo adheridos al estigma de estas flores (Figura 39C). El estigma de las flores femeninas también parece ser receptivo ya que su morfología es idéntica a la de las flores de las plantas procedentes de semilla silvestre (Figura 39F). Así mismo el polen recuerda al de las flores de semilla y se adhiere al estigma de las flores femeninas (Figura 39H).

También se realizó un ensayo de funcionalidad y germinación *in vitro* del polen (Figura 40). Se comprobó que el polen era viable mediante tinción con carmín acético (Figura 40A). El ensayo de germinación, siguiendo el protocolo utilizado para el polen de plantas silvestres, no produjo emisión de tubos polínicos (Figura 40B). Ya se había observado que el polen de plantas de semilla silvestre no germinaba pero sí era capaz de fecundar y dar lugar a semillas (apartado 1.2.2 de esta sección), lo que hizo pensar que se requería de una optimización del protocolo de germinación. Por este motivo se ensayaron diversas modificaciones del protocolo (Tabla 26).

Tabla 26. Factores estudiados en la optimización del protocolo de germinación *in vitro* de granos de polen utilizando polen de plantas micropropagadas

Factor	Niveles estudiados	Germinación de polen
Temperatura de incubación	20, 22, 24 y 28 °C	Negativa
Tiempo de incubación	4, 8, 12 y 24 h	Negativa
Sales minerales	(BK) Brewbaker y Kwack (1963) (GK) Benito-Moreno <i>et al.</i> (1988) (GM) Chesnokov (2000) (MG) Roque. (2004)	Negativa
Concentración de sacarosa	0, 10, 20 y 40 g/L	4 % en sacarosa 20 g/L

En general, las modificaciones ensayadas dieron lugar a resultados negativos de germinación, pero un 4% de los granos germinó al utilizar 20 g/L de sacarosa en el medio (Figura 40C).

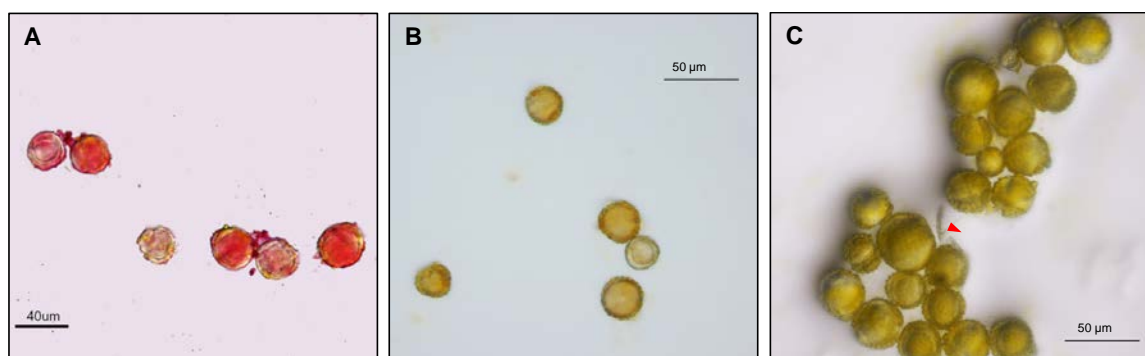


Figura 40. Estudio de la funcionalidad del polen de plantas micropropagadas. A. Tinción con acetato de carmín. B. Ensayo de germinación *in vitro* en presencia de 10 g/L de sacarosa. No se aprecia germinación. C. Ensayo de germinación *in vitro* en presencia de 20 g/L de sacarosa. La punta de flecha señala la emisión de tubo polínico.

Una vez comprobado que, al menos en condiciones *in vitro*, el polen era funcional, se realizaron ensayos forzando la polinización cruzada entre inflorescencias de

plantas micropropagadas. En los primeros intentos de polinización, el polen se espolvoreaba sobre las flores femeninas en cuanto eran visibles. (Figura 41A). Mediante esta acción no se obtuvo formación de semillas. Posteriormente se estableció un procedimiento por el cual las flores femeninas se espolvoreaban con polen cada día durante dos semanas o hasta que se observara un oscurecimiento del extremo del estilo. Con este procedimiento un porcentaje de flores femeninas cercano al 5% era capaz de fertilizarse con éxito y formar semillas (Tabla 27, Figura 41B).

Tabla 27. Resultados de la polinización cruzada de plantas micropropagadas

Flores femeninas polinizadas	Flores con semilla	Eficiencia de la polinización (%)	Semillas sembradas <i>in vitro</i>	Semillas germinadas <i>in vitro</i>	Porcentaje de germinación (%)
1611	80	4,96	38	11	28,95

Además, estas semillas eran viables (Figura 41C) y presentaron porcentajes de germinación cercanos al 30%, que coincide con el obtenido para las semillas de plantas silvestres (apartado 1.1.3).

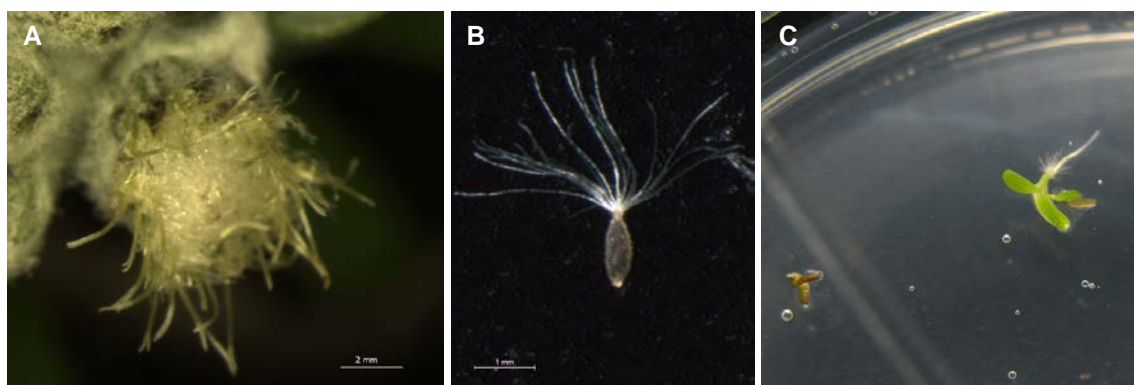


Figura 41. Polinización cruzada de plantas micropropagadas. **A.** Detalle del capítulo de una inflorescencia con flores femeninas aptas para la polinización manual. **B.** Ejemplo de semilla resultante de la fertilización de estas flores. **C.** Ejemplo de la germinación de semillas.

En conjunto, los resultados muestran la capacidad de inducir la floración en plantas micropropagadas de *L. alpinum* en condiciones no naturales. En particular, la aplicación de giberelinas permite la obtención en cantidad y de forma controlada de inflorescencias de calidad apreciable. Estos resultados se plantean como parte de una posible transferencia al sector de la producción de planta ornamental.

DISCUSIÓN

Las técnicas de micropropagación *in vitro* han demostrado una gran eficacia a la hora de contribuir a la conservación de especies vegetales amenazadas que resultan de interés desde un punto de vista tanto económico como ambiental (Reed *et al.*, 2011). A través de las técnicas de micropropagación se puede producir una gran cantidad de plantas en un corto período de tiempo a partir del mínimo material vegetal de partida y en un óptimo estado sanitario. El uso final del material vegetal micropropagado puede ser diverso, desde la reintroducción posterior en la naturaleza a la comercialización de plantas sin alterar las poblaciones naturales, así como su utilización como fuente de material para investigación o para la extracción y purificación de moléculas de uso cosmético y/o farmacéutico.

En los últimos 20 años se ha desarrollado una intensa actividad por parte de varios grupos españoles para generar protocolos de micropropagación destinados a distintas especies vegetales amenazadas en España (González-Benito y Martín, 2011). Una gran parte de estos protocolos se centran en especies de la familia *Asteraceae* (Clemente *et al.*, 1991; Cuenca *et al.*, 1999; Cuenca y Amo-Marco, 2000a; Iglesias *et al.*, 2000; Ortiz *et al.*, 2004 y Mallón *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ningún protocolo de micropropagación para las poblaciones naturales de *Leontopodium alpinum* en España.

En el presente trabajo se han desarrollado dos protocolos de micropropagación de plantas de *L. alpinum* pertenecientes a la población española de esta especie. El primero de ellos a partir de material silvestre (flores maduras) y el segundo a partir de material establecido *in vitro* (hojas). En ambos casos, la fase I de implantación se basa en la inducción de organogénesis con un papel preponderante del TDZ. Las siguientes fases del programa de micropropagación (amplificación, enraizamiento y aclimatación) son iguales para los dos métodos y muestran una eficiencia muy alta en la obtención de plantas clonales.

A la hora de afrontar el desarrollo de un protocolo de micropropagación para *L. alpinum* se decidió utilizar como material de partida explantes obtenidos de plantas silvestres. Otros autores (Hook, 1993; Kutyla y Chmiel, 2000 y Trejgell *et al.*, 2010) han utilizado semillas germinadas *in vitro* pero en nuestro caso estábamos interesados en un protocolo que evitara la segregación inherente a las semillas respecto de la planta madre y garantizara la clonación de un futuro material seleccionado por sus

características morfológicas o fitoquímicas. En el presente trabajo también se han utilizado semillas silvestres, pero no para su introducción *in vitro* sino como control del desarrollo y comportamiento de las plantas derivadas de estas semillas en las condiciones de cultivo del invernadero, muy diferentes de las de su hábitat natural.

Además de las condiciones ambientales, las plantas micropropagadas tiene unas condiciones de generación muy diferentes a las del material silvestre y de ahí el esfuerzo realizado por caracterizar estos materiales y disponer de datos para poder realizar una comparación.

Según los datos recogidos, la población silvestre presentaba las características acordes a lo descrito previamente en la bibliografía para la especie y, en particular, para las poblaciones de *L. alpinum* en España (Bolòs *et al.*, 1993; Villar-Pérez *et al.*, 2001). En la caracterización se encontró un notable grado de variabilidad para un mismo carácter, lo que parece ser un rasgo habitual de las poblaciones silvestres de *L. alpinum* (Siljak *et al.*, 1974). También se hallaron algunos caracteres que se desvían más de la descripción bibliográfica o no están igualmente representados, como el número de inflorescencias por planta o el número de flores por capítulo. En el caso particular de las flores, además no se encontraron capítulos unisexuales como los descritos por Tutin (1976) y Hook y Reid (1996), sino que todos contenían flores de ambos sexos.

Sin embargo, al cultivar en invernadero las semillas de estas plantas silvestres, se observaron ciertas diferencias en el desarrollo y morfología de las plantas crecidas que podrían atribuirse al cultivo en condiciones diferentes a las de su hábitat natural. Una de las diferencias más visuales es la reducción en la cobertura tomentosa por toda la planta. Esta cubierta la protege de agresiones ambientales como la deshidratación y el frío, salvaguardando además a las células que reviste de la acción dañina de la radiación ultravioleta (Vigneron *et al.*, 2005). Al cultivarse la planta en un ambiente menos expuesto a estas agresiones sus necesidades de protección se reducen y, consecuentemente, disminuye la cobertura de pelos, tal y como constatan otros autores (Prevedello *et al.*, 2004, Pace *et al.*, 2009). De modo parecido, otros caracteres aparecen modificados en función de unas condiciones ambientales menos exigentes, de modo que las hojas pueden ser más grandes y la cabezuela de la inflorescencia más ancha. Curiosamente algunos caracteres no responden de la forma más esperable. Así, las plantas en invernadero tenían una altura menor a la de las plantas silvestres, cuando tal

y como señalan Prevedello *et al.* (2004), el crecimiento de las plantas de *L. alpinum* a menor altitud resulta en un alargamiento del tallo de la inflorescencia. Además el número de tallos florales por planta se limitó a uno o dos por inflorescencia en contraste con Handel-Mazzetti (1928) que señala el desarrollo de un mayor número de inflorescencias en planta cultivada que en planta silvestre.

En todo caso, uno de los aspectos más destacables de estas plantas cultivadas fue el hecho de que mayoritariamente llevaran a cabo la transición floral seis meses después de la siembra en invernadero. Wagenitz (1979) señala que las plantas cultivadas de *L. alpinum* generalmente no florecen hasta el segundo año desde el momento de la siembra, aunque otros autores como Rey y Slacanin (1999) sí que documentan cierto nivel de producción floral el primer año de cultivo. A la vista de nuestros resultados, estas plantas de semilla silvestre no requieren vernalización para florecer.

En lo que respecta a la capacidad reproductiva, tanto las plantas silvestres analizadas como las plantas de semilla silvestre eran viables según los estudios de fecundación realizados. No obstante, a la hora de realizar estos estudios se encontraron algunos inconvenientes como la ausencia de un protocolo de germinación de polen optimizado para esta especie. En el caso de las plantas silvestres, la aplicación de un protocolo puesto a punto para tomate sirvió para comprobar la viabilidad del polen. Sin embargo, en su aplicación con plantas de semilla silvestre, donde no se observó germinación de polen pero se comprobó que éste sí era capaz de fecundar y formar semillas, quedó de manifiesto las carencias de este protocolo y la necesidad de una alternativa más adecuada para *L. alpinum*. Por este motivo, en el presente trabajo también planteamos por primera vez un protocolo de germinación de polen específico para esta planta.

1. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN A PARTIR DE PLANTAS SILVESTRES DE *Leontopodium alpinum*

Para la micropropagación de especies de la familia *Asteraceae* a partir de planta silvestre los explantes más empleados han sido los ápices caulinares (Ortega y González, 1985; Clemente *et al.*, 1991) y los segmentos nodales obtenidos de tallos de la inflorescencia (Cuenca *et al.*, 1999; Cuenca y Amo-Marco, 2000b). En ocasiones también

se han empleado explantes de hoja (Koroch *et al.*, 2002) y flores (Wildi *et al.*, 1998; Kintzios y Michaelakis, 1999, Wadl *et al.*, 2011). Estos dos últimos tipos de explantes tienen el inconveniente, a efectos de clonación, de incrementar las posibilidades de variación genética en el material generado y se utilizan sobre todo en casos en los que el uso de otro tipo de explantes no proporciona garantías suficientes del buen estado sanitario (Debergh, 1994).

Dada la condición de especie protegida, el número de ejemplares silvestres de *L. alpinum* que se pudo utilizar fue reducido. La limitada disponibilidad del material vegetal es un factor que siempre acompaña a las actividades de conservación de especies raras o amenazadas, de manera que la capacidad de ensayar protocolos y llevar a cabo experimentos con replicación se encuentra a menudo muy limitada (Pence, 1999). Por este motivo se eligió una estrategia basada en el uso de varios tipos de explantes obtenidos de unas pocas plantas.

Los segmentos nodales de tallo floral mostraron buena disposición para la brotación de yemas axilares sin la aportación de reguladores del crecimiento exógenos. Sin embargo la contaminación endógena que se manifestó durante la fase de implantación del material hizo inviable su uso. Con los explantes de hoja de tallo floral se buscaba la obtención de brotes adventicios utilizando una modificación de un protocolo empleado con éxito en nuestro laboratorio para la regeneración de plantas de distintas especies. El medio de inducción organogénica inicial de dicho protocolo incorporaba las sales minerales LP de Quoirin y Lepoivre (1977), empleado ampliamente con especies leñosas. En nuestro caso nos decidimos por sustituir la solución mineral LP por la solución MS de Murashige y Skoog (1962) por ser la utilizada en todos los trabajos previos realizados con *L. alpinum*. Pese a que los explantes tuvieran una amplia respuesta callogénica, los problemas de contaminación endógena igualmente fueron insalvables, sin que se llegara a ver una respuesta organogénica. Los problemas de contaminación, que pueden tener un origen tanto endógeno como exógeno, no son infrecuentes, y de hecho son el principal obstáculo en el cultivo *in vitro* de plantas silvestres (Sarasán *et al.*, 2006).

El tipo de explantes que finalmente pudo implantarse fueron las flores aisladas de la inflorescencia. Este tipo de explante ya había sido utilizado con éxito en *L. alpinum* por Zarpatan (1996). En este trabajo la autora parte de inflorescencias inmaduras

mientras que en nuestro caso utilizamos inflorescencias plenamente desarrolladas. Una de las ventajas de partir de un estado más desarrollado es que permite comprobar previamente ciertas características de la inflorescencia como el tipo y disposición de flores. Otras diferencias con el trabajo de Zarpatan residen en el medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado contenía los macronutrientes DKW de Driver y Kuniyuki (1984) con una combinación de TDZ (0,1 mg/L) y AIA (0,2 mg/L). Las sales del medio DKW se utilizan ampliamente en la propagación *in vitro* de plantas leñosas y en combinación con TDZ se ha visto que estimulan el desarrollo de callo embriogénico en explantes de flores de cacao (Li *et al.*, 1998).

En nuestros ensayos, el cultivo de flores de *L. alpinum* tuvo como resultado la formación de brotes adventicios regenerados a partir de callo (organogénesis indirecta). Esta formación de brotes adventicios a partir de explantes de flores cultivados en medios con TDZ se ha observado en otras especies de interés ornamental de la familia *Asteraceae* como margarita (*Leucanthemum vulgare* Lam.; Franklin *et al.*, 2005) y gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hooker f.; Ray *et al.*, 2005; Kanwar y Kumar, 2008). Los porcentajes de regeneración a partir de flores de *L. alpinum* fueron bajos. El mejor de los resultados se obtuvo con flores hermafroditas con un 11,1% de explantes organogénicos y 4,60 brotes por explante. En el caso de las flores hermafroditas la regeneración se llevó a cabo a partir de un único explante y los brotes mostraron además síntomas de hiperhidratación y acabaron muriendo. Wildi *et al.* (1998) también dan cuenta de este problema de hiperhidratación en brotes regenerados a partir de flores de *Asteraceae* y que achacan a la excesiva exposición al TDZ.

En el medio de multiplicación de brotes se sustituyó el TDZ por BAP con objeto de prevenir los problemas de hiperhidratación y también porque no se aconseja su uso para la fase de multiplicación clonal por su tendencia a formar callo y desarrollar brotes adventicios (Huetterman y Preece, 1993). La multiplicación de brotes de *L. alpinum* resultó muy eficiente con una elevada producción de brotes saludables y aptos para pasar al medio de enraizamiento. Inicialmente las tasas de multiplicación fueron similares a las obtenidas por Zarpatan (1996) a partir de flores silvestres e inferiores a las de Trejgell *et al.* (2010) con semillas germinadas *in vitro*. Sin embargo, la estrategia del cultivo en grupos de 3-4 brotes incrementó notablemente la tasa de multiplicación en los subcultivos posteriores.

En la puesta a punto de la fase de enraizamiento, se comprobó que el enraizamiento de brotes multiplicados puede realizarse eficientemente en ausencia de auxinas. La adición de AIA no supone un incremento significativo en el porcentaje de brotes enraizados ni en el número de raíces, y sí repercute negativamente en la longitud de las mismas. Trejgell *et al.* (2010) también obtienen enraizamiento de brotes de *L. alpinum* sin la adición de reguladores del crecimiento pero mientras en su caso los porcentajes de enraizamiento rondan el 60-70%, en nuestro protocolo el porcentaje de brotes enraizados supera el 90%. En la mejor de las situaciones, estos autores obtienen resultados similares mediante un proceso de dos etapas, una en medio con AIA (0,01 mg/L) durante dos semanas y luego subcultivando a medio sin hormonas.

En cuanto a la aclimatación en invernadero de los brotes enraizados, se ensayaron distintos sustratos que en su mayoría contaban con turba en su composición. Hook (1993) y Pace *et al.* (2009) también utilizan sustratos basados en turba para el cultivo de plantas del género *Leontopodium* mientras que Sigg *et al.* (2009) abogan por el uso de sustrato inerte o cuasi inerte (fibra de coco) controlando el aporte nutritivo mediante el riego. En nuestros ensayos, los mejores resultados se obtuvieron con la mezcla de turba con fibra de coco que se utilizó como sustrato a partir de ese momento. En realidad tampoco se vieron grandes diferencias con la mezcla de turba y arena pero la diferencia de coste también favorece el uso de la mezcla de turba y fibra de coco. Las plantas además mostraron una alta tasa de supervivencia con independencia del sustrato utilizado, lo cual nos indica la calidad que tiene la planta obtenida mediante este protocolo cuando llega a esta fase de aclimatación.

En el conjunto del protocolo establecido, la fase más comprometida es la de implantación, donde la respuesta regenerativa de los explantes de flores no es muy elevada y deberían realizarse esfuerzos por incrementarla. Sin embargo, a la vista de los resultados en las siguientes fases, pensamos que variaciones en esta fase del protocolo permitirían la micropropagación a partir de otro tipo de explantes. En el caso de los ya ensayados (segmentos de tallo y hojas), en los que el principal inconveniente fueron las contaminaciones endógenas, los esfuerzos deberían centrarse en hacer una mejor selección del material para garantizar el estado sanitario y perfeccionar las técnicas de esterilización. Esto sería especialmente recomendable para los segmentos de tallo en los que se pudo observar la movilización de yemas axilares. En el caso de las hojas, los

resultados con el material *in vitro* son además un buen punto de referencia para posibles futuros ensayos.

2. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN A PARTIR DE BROTES CULTIVADOS *in vitro* DE *Leontopodium alpinum*

Asimismo, se ha desarrollado por primera vez en esta especie un método de micropropagación a partir de hojas de plantas clonales establecidas *in vitro*.

El uso de explantes obtenidos de plantas previamente cultivadas *in vitro* tiene diversos puntos a su favor. El primero y más evidente es el estado de asepsia que evita la necesidad de descontaminación del material y las pérdidas de material. Además, comparadas con las plantas silvestres o cultivadas en invernadero, las plantas *in vitro* no presentan problemas de estacionalidad, cuentan con uniformidad clonal y sus explantes suelen responder mejor en cultivo. También el hecho de que los brotes micropropagados se hayan visto expuestos a la presencia de reguladores del crecimiento puede hacer que los explantes obtenidos de aquellos muestren mayor aptitud al desarrollo morfogénico en otros ensayos (Preece, 1997).

En los ensayos de regeneración a partir de hojas de brotes micropropagados se retomó el medio utilizado para el establecimiento en cultivo *in vitro* de hojas de plantas silvestres (ver Materiales y Métodos, apartado 2.8) ensayando tanto las sales MS como las sales LP, así como distintas dosis de TDZ.

El TDZ, una citoquinina sintética derivada de la difenilurea, no se había utilizado hasta el momento en los trabajos previos de cultivo *in vitro* de *L. alpinum*. Sin embargo, el TDZ ha demostrado tener mayor efecto que la BAP en la morfogénesis *in vitro* en un gran número de plantas (Malik y Saxena, 1992; Vinocur *et al.*, 2000), incluyendo a las pertenecientes a la familia *Asteraceae* (Sauve *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007; Sujatha y Kumari, 2007; Lata *et al.*, 2013). Pese a que se ha comprobado que el TDZ por sí solo es capaz de cubrir los requerimientos tanto de citoquininas como de auxinas en la respuesta morfogénica de distintas plantas (Jones *et al.*, 2007), su uso combinado con auxinas (como el AIB) parece aumentar la respuesta regenerativa (Çöçü *et al.*, 2004; Başalma *et al.*, 2008).

Comparado con otras sustancias con actividad citoquímica, se necesitan cantidades más pequeñas de TDZ para promover el desarrollo de brotes o la embriogénesis somática en plantas (Guo *et al.*, 2011). Mithila *et al.* (2003) observaron que a bajas concentraciones de TDZ se inducía la organogénesis de brotes en explantes de violeta africana, mientras que a dosis “altas” (1,1-2,3 mg/L) se obtenían embriones somáticos. Husaini y Abdin (2007), por su parte, constataron que al utilizar una concentración de 2 mg/L de TDZ se estimulaba la regeneración de brotes en hojas de fresa, mientras que al duplicar esta concentración se inducía la embriogénesis.

En nuestros experimentos utilizamos concentraciones de TDZ que podrían considerarse como “medio-alta” (1,66 mg/L) y “alta” (3 mg/L). Sin embargo, la respuesta morfogénica obtenida fue exclusivamente de tipo organogénico. Los resultados muestran que la combinación de las sales MS con la concentración más alta de TDZ (3 mg/L) resulta la más organogénica de las ensayadas, con el mayor porcentaje de explantes con brotes (73,33%) y el mayor número de brotes por explante (5,09).

Pese a que las concentraciones elevadas de TDZ suelen dificultar el crecimiento y desarrollo posterior de los regenerantes (Shirani *et al.*, 2010) y hacen que los brotes sean proclives a la hiperhidratación y la fasciación (Huetteman y Preece, 1993), las concentraciones de TDZ utilizadas no indujeron estos problemas en las plantas regeneradas de *L. alpinum* a partir de hojas. Presumiblemente y, al contrario de lo que sucedió con los explantes de flor hermafrodita silvestre, los explantes de hoja de planta micropropagada son menos sensibles a los efectos nocivos del TDZ, y la limitación del tiempo de exposición a este regulador del crecimiento (3 ó 4 semanas) es suficiente para permitir el adecuado desarrollo posterior de los brotes.

Tanto la respuesta callogénica como la respuesta organogénica tuvieron mayor incidencia en la zona del peciolo de la hoja. El peciolo de la hoja muestra gran capacidad organogénica en muchas plantas, incluyendo las de la familia *Asteraceae* (Wildi *et al.*, 1998; Dhar y Jorhi, 2005; Kumar y Kanwar, 2006; Hasbullah *et al.*, 2008). En nuestros ensayos la respuesta callogénica de todos los explantes comenzaba por esta zona y en un 60 % de los casos fue la única en dar una respuesta organogénica.

Frecuentemente, en las hojas puestas en cultivo se observó la presencia de una yema axilar remanente que había permanecido adherida a la base del peciolo durante la obtención de los explantes. La incidencia de esta estructura en la respuesta

organogénica estudiada queda de manifiesto al comprobar la disminución de dicha respuesta al eliminar estas yemas previamente. En el desarrollo del cultivo se observó que, en presencia de TDZ, el tejido de las yemas se desdiferenciaba y proliferaba como callo al poco de iniciarse el cultivo. Por este motivo es razonable pensar que la aportación organogénica derivada de esta estructura es de tipo adventicio y no resultado del desarrollo de estructuras ya formadas. En todo caso, próximos estudios histológicos vendrán a confirmar o rechazar esta hipótesis.

Tal y como ocurre con el protocolo de micropropagación de planta silvestre, la implantación y obtención inicial de brotes pasa por una regeneración organogénica. A la vista de los resultados de regeneración en hojas, este protocolo resulta además un método de regeneración de plantas *in vitro* eficaz y reproducible que puede suponer un primer paso para el abordaje de la transformación genética de plantas de *L. alpinum*.

3. LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Leontopodium alpinum* DIVERGEN DE LAS DE SEMILLA SILVESTRE EN LA RESPUESTA DE FLORACIÓN

Las plantas micropropagadas, tanto a partir de flores de plantas silvestres como de hojas de plantas *in vitro*, se desarrollaron en el cultivo en invernadero de forma similar. Además, comparadas con las plantas de semilla silvestre, no se observaron variaciones particulares en la morfología de las hojas en crecimiento vegetativo. Tampoco se encontraron cambios numéricos en la dotación cromosómica analizada por citometría. Como particularidad, las plantas de semilla silvestre formaron inicialmente una única roseta de hojas mientras que en las plantas micropropagadas se desarrollaron distintas rosetas a partir de las yemas axilares de la planta aclimatada. Este hecho se puede explicar por el propio proceso de micropropagación en el que se promueve la pérdida de la dominancia apical y se favorece el desarrollo axilar. Por otro lado, este tipo de crecimiento vegetativo recuerda más al de las plantas silvestres adultas que forman un rizoma más o menos leñoso del que salen varias rosetas de hojas.

Sin embargo, las plantas de semilla silvestre y las plantas micropropagadas se diferenciaron en un aspecto esencial, ya que estas últimas no florecían en las condiciones de cultivo en invernadero.

La floración es la etapa del desarrollo con la que se inicia la fase reproductiva de la planta. En las angiospermas, la transición desde el crecimiento vegetativo al reproductivo es un paso crítico del desarrollo que se encuentra bajo un estricto control genético. En *L. alpinum* no existen estudios relacionados con las bases moleculares de la floración, así que es necesario recurrir a los estudios con plantas modelo. Como ya se ha comentado con anterioridad, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se han descrito varias rutas génicas (la *ruta dependiente del fotoperíodo*, la *ruta de la vernalización*, la *ruta de las giberelinas*, la *ruta autónoma*, la *ruta de la temperatura ambiental* y la *ruta de la edad*), de las que depende la floración y que están estrechamente relacionadas con las condiciones ambientales y endógenas.

Teniendo en cuenta estas posibles rutas y otros conocimientos de la fisiología de la transición floral tratamos de determinar la respuesta de floración que podía obtenerse en las plantas micropropagadas.

Las plantas necesitan hacer una transición de una fase juvenil a una fase adulta vegetativa para adquirir la capacidad de formar estructuras reproductivas. La fase juvenil puede durar desde unos pocos días en algunas herbáceas a varios años en leñosas. Las plantas de semilla silvestre de *L. alpinum* florecieron seis meses después de la siembra y, dado que las condiciones de cultivo permanecieron inalteradas en todo el ciclo de la planta, podemos considerar que realizaron la transición de la fase juvenil a la fase adulta de forma normal.

Las plantas micropropagadas tienen un origen que no pasa por la fecundación y la formación de un embrión zigótico que es una estructura juvenil por definición. Estas plantas provienen del cultivo *in vitro* de tejidos. La estimulación de la morfogénesis en cultivo *in vitro* conlleva un cierto proceso de rejuvenecimiento. Los brotes o plántulas pueden adquirir una o varias características propias de la fase juvenil del desarrollo de la planta, como hojas más pequeñas o mayor capacidad de formación de raíces adventicias (George, 2008a). Características como estas pudieron observarse en las plantas micropropagadas durante el cultivo *in vitro* pero en cuanto se cultivaron *ex vitro* no se distinguían, más allá de lo ya señalado, de las plantas de semilla en crecimiento vegetativo.

Hook (1993) comprobó en sus ensayos que las plantas micropropagadas de *L. alpinum* eran idénticas a las plantas parentales (obtenidas de semilla) pero más

pequeñas. Asimismo observó que dichas plantas eran capaces de florecer pero lo hacían más tarde, entre agosto y octubre, en vez de entre junio y agosto. Las plantas micropagadas en cuestión coinciden con las obtenidas en el presente trabajo en su iniciación a partir de un callo. Sin embargo se diferencian en el material de partida, ya que en su caso provienen de una única plántula *in vitro* obtenida de semilla mientras que en el nuestro partimos de material silvestre.

En algunas plantas, muchas de ellas bianuales, es el tamaño más que la edad lo que resulta de especial importancia, al parecer por su relación con la cantidad de reservas acumuladas (Bernier y Perilloux, 2005). En nuestro caso, las plantas micropropagadas estuvieron más de dos años en cultivo, lo que supone tiempo presumiblemente suficiente para alcanzar la madurez y el tamaño propicio para florecer. Igualmente, la ausencia de la floración en sí misma no es un indicador de la fase juvenil, sino que la expresión de la competencia reproductiva de la fase adulta depende de señales ambientales y específicas de desarrollo. De hecho, las plantas micropropagadas respondieron a condiciones específicas de inducción floral, lo que es una capacidad propia de plantas no juveniles.

4. EL AJUSTE DEL TERMOPERIODISMO NO INDUCE LA FLORACIÓN DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Leontopodium alpinum*

Tal y como se ha señalado para *Arabidopsis*, la temperatura es una de las principales señales ambientales que tienen control sobre la floración. Uno de los fenómenos regulados por la temperatura y que puede afectar a la floración es el termoperiodismo. Las plantas tienen un crecimiento reducido en condiciones de temperatura constante al compararlas con aquellas que crecen bajo el efecto de cambios periódicos de temperatura (relativamente más frío durante la noche y un poco más caliente durante el día), (Went, 1944 a y b; Mortensen, 1994; Yin *et al* 1996). Aparentemente, los procesos que ocurren durante el día y durante la noche tienen temperaturas óptimas diferentes. Este fenómeno se denomina termoperiodismo y parece estar muy relacionado con un ritmo endógeno propio de la planta (de Montaigu *et al.*, 2010). Las condiciones de cultivo en invernadero establecen un termoperiodismo (22 °C de día y 18 °C de noche) que se aparta del que suelen soportar las plantas

silvestres en su hábitat natural, donde las temperaturas nocturnas son menores. Tratando de comprobar si este hecho era un factor determinante en el desencadenamiento de la floración en las plantas micropropagadas se ensayaron temperaturas de cultivo más parecidas a las silvestres (20 °C de día y 8 °C de noche). Los resultados fueron nulos en cuanto a la formación de flores, lo que podía ser hasta cierto punto esperable ya que los efectos del termoperiodismo sobre la floración parecen ser más de tipo cuantitativo que inductivo. Es decir, en algunas especies las fluctuaciones adecuadas de temperatura pueden tener como consecuencia la presencia de un mayor número de flores por planta, así como otros efectos del crecimiento, pero no tienen un papel determinante en la inducción floral (Myster y Moe, 1995; Guevara y Jiménez, 2006).

5. LA VERNALIZACIÓN DE LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Leontopodium alpinum* PROMUEVE SU FLORACIÓN

En algunas plantas, para poder florecer se necesita de la exposición prolongada a bajas temperaturas (vernalización) de la planta o sus semillas. En nuestros ensayos, la vernalización a 4 °C durante 30 días de las plantas micropropagadas permitió la floración de un porcentaje de las mismas al pasarlas a las condiciones de cultivo en invernadero. El hecho de que no todas las plantas lleguen a florecer podría deberse a una insuficiente exposición al frío, ya que el tiempo necesario para la completa vernalización varía entre especies. Por ejemplo, *Lunaria biennis* L. necesita de nueve semanas de exposición a bajas temperaturas (Wellensiek, 1958), y el centeno (*Secale cereale* L.) de seis semanas (Friend, 1965), mientras que a algunos cultivares de rábano (*Raphanus sativus* L.) les basta con 6-8 días (Englen-Eigles y Erwin, 1997). Además, cabe recordar que el transcurso de un período de frío no induce la floración inmediata, sino que confiere a las plantas la competencia para florecer cuando el resto de las condiciones ambientales y endógenas sean las adecuadas. Así, es posible que aunque la vernalización realizada fuera efectiva, las condiciones de cultivo posterior o el estado fisiológico de las plantas micropropagadas no fueran las óptimas.

6. LAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Leontopodium alpinum* RESPONDEN AL FOTOPERÍODO COMO PLANTAS DE DÍA CORTO-LARGO.

El fotoperíodo es otro factor determinante del tiempo de floración. Las plantas silvestres de *L. alpinum* florecen en los meses de julio y agosto, en los que las condiciones de fotoperíodo corresponden claramente a lo que serían “días largos”. Del mismo modo, las plantas de semilla silvestre florecen normalmente en este tipo de fotoperíodo.

Al ensayar distintas combinaciones de fotoperíodo corto y largo para el cultivo de las plantas micropropagadas se comprobó que la floración no se producía al mantener las plantas en un único tipo de fotoperíodo. Al contrario, se requería de una secuencia de días cortos seguidos de días largos para florecer. Esta particular necesidad fotoperiódica se ha visto en especies como dáctilo (*Dactylis glomerata*; Heide, 1987), trébol (*Trifolium repens*), campanilla de Canterbury (*Campanula medium*; Wellensiek, 1985) y *Echeveria harmsii* (Rünger, 1962; revisado por Taiz y Zeiger, 2006). El período de cultivo en día corto, además, presentaba un valor crítico que se encuentra entre las cuatro y las ocho semanas, por debajo del cual las plantas micropropagadas no florecían una vez trasladadas a día largo. Este período necesario de cultivo en días cortos podría estar relacionado con las necesidades acumulativas de ciertos productos o metabolitos. Esta necesidad acumulativa podría explicar también que la respuesta de floración no fuera completa en todas las plantas sino en un cierto porcentaje (entre el 30 y el 40%). Este requerimiento de fotoperíodo coincide con el de las plantas denominadas de día corto-largo. En estas plantas además, los requerimientos de día corto pueden sustituirse parcialmente por un tratamiento de vernalización (Thomas y Vince-Prue, 1997), que es justo lo que observamos en la plantas micropropagadas.

7. LA APLICACIÓN EXÓGENA DE GIBERELINAS INDUCE LA FLORACIÓN EN PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Leontopodium alpinum*

Las giberelinas pueden sustituir los requerimientos de días fríos o días largos para que se produzca la floración en muchas plantas, especialmente las especies que crecen en roseta (Lang, 1957). En el caso de las plantas micropropagadas de *L. alpinum*,

comprobamos que la aplicación exógena de giberelinas (GA_3 ó GA_4+GA_7) sobre plantas cultivadas en invernadero promueve la floración.

La señalización por giberelinas suscita el desarrollo de los órganos florales y la extensión del tallo que acompaña a la floración en estas especies de roseta. Sin embargo, su implicación en la iniciación floral no está tan clara ya que promueven la floración en algunas plantas de día largo o bianuales, pero no en otras, e incluso inhiben la floración en algunas plantas perennes (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009). En el caso de muchas plantas de día largo se ha demostrado su papel a través de la activación de genes que codifican integradores de las rutas florales (Blázquez y Weigel, 1998; Bonhomme *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003), pero su implicación en la respuesta de fotoperíodo se ha establecido sólo en unos pocos casos. En *Arabidopsis*, las giberelinas tienen influencia en la floración en día corto, en ausencia de la principal ruta de inducción por fotoperíodo vía CONSTANS (CO). Actuarían como indicadores de la progresión del desarrollo, permitiendo la floración sólo en la etapa adecuada para las condiciones ambientales (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009).

En conjunto, nos encontramos con una situación de cultivo en invernadero en la que las plantas de semilla silvestre florecían pero las micropropagadas no. Sin embargo, al someter a las plantas micropropagadas a condiciones inductivas de la floración como la vernalización o un régimen de fotoperíodo de días cortos, las plantas responden floreciendo. Curiosamente, estas condiciones responden a una teórica señalización del paso del invierno. Igualmente, la aplicación exógena de giberelinas, que sustituyen la necesidad de frío o días largos en muchas especies, tiene una respuesta muy potente de floración. Estas señales sin embargo no deben de ser necesarias en las plantas de semilla silvestre.

Teniendo en cuenta que las condiciones de cultivo fueron idénticas, la diferencia fundamental entre las plantas de semilla silvestre y las micropropagadas se encuentra en su generación y pudiera ser que ahí resida la naturaleza del comportamiento señalado. Las plantas micropropagadas provienen de un proceso de regeneración adventicia en cultivo *in vitro*. Este proceso se fundamenta en la habilidad de las planta para redirigir su desarrollo (George, 2008a; de Klerk, 2009). Durante la vida de las plantas las marcas epigenéticas proporcionan una memoria transitoria del programa de desarrollo e influyen en las reacciones de las células y en su futuro desarrollo (Roudier *et*

al., 2009). Para readquirir la totipotencia (la capacidad de generar una nueva planta completa) o la pluripotencia (la capacidad de generar un órgano como un brote o una raíz), las células deben desdiferenciarse, lo que implica borrar al menos una parte de las marcas genéticas previas (Tanurdzic *et al.*, 2008). Así, se especula que los cambios epigenéticos observados en plantas regeneradas estarían causados por una eliminación incorrecta, posiblemente incompleta, del programa de desarrollo epigenético (Smulders y de Klerk, 2011). Alternativamente, también se ha sugerido que las condiciones de estrés a las que se ven sometidas los tejidos en cultivo *in vitro* (heridas, fotosíntesis alterada, altos niveles de auxinas y citoquininas, etc) contribuyen a la variación epigenética.

Según estas consideraciones, una posible hipótesis que explicaría la ausencia de floración en plantas micropropagadas estaría ligada a un borrado deficiente de marcas epigenéticas de las células de las que derivan. Las plantas micropropagadas mantendrían ciertas marcas adquiridas por las plantas origen que implicarían la necesidad de la acción de factores de inducción floral (que indicaran a la planta que el invierno ha pasado, por ejemplo) para que la floración fuera efectiva. Las plantas de semilla silvestre, por su parte sí habrían perdido estas marcas y, al no generarse durante su desarrollo en invernadero, no requerirían acciones adicionales para florecer.

Por otro lado, no podemos descartar una posible incidencia de cambios genéticos durante el cultivo *in vitro*, como mutaciones o nuevas inserciones. Sí que se puede afirmar que no se han producido cambios en la dotación cromosómica como confirmaron los estudios de citometría realizados. De todos modos, este tipo de cambios genéticos se producen al azar, por lo que resulta altamente improbable que se hayan dado con el mismo resultado en todos los regenerantes y en dos experimentos independientes. En cambio, resulta característico de los cambios epigenéticos que las aberraciones resultantes tienen una frecuencia muy alta entre la población generada y pueden “reproducirse” cuando se imponen las mismas condiciones en la producción de otra población (Smulders *et al.*, 1995).

8. LA APLICACIÓN DE GIBERELINAS EXÓGENAS COMO ESTRATEGIA PARA EL USO ORNAMENTAL DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Leontopodium alpinum*

Uno de los aspectos de interés de *L. alpinum* es el valor ornamental que le confiere su vistosa inflorescencia en forma de estrella. Al tratarse de una especie protegida su incorporación al sector de la floricultura tiene ciertas restricciones, pero en la actualidad varias empresas han comenzado a comercializar la planta con este propósito. Las principales limitaciones de la explotación comercial se centran en los requisitos de localización del cultivo (altitudes elevadas de montaña) y la estacionalidad de la producción (los meses de junio a agosto).

En el presente trabajo hemos desarrollado una alternativa de producción, basada en el tratamiento de las plantas con giberelinas, que permite la obtención de inflorescencias en cualquier época del año.

Los tratamientos con giberelinas son utilizados en floricultura por muchos productores para promover el adelanto de la floración e incrementar los rendimientos y la calidad de las flores (Vieira *et al.*, 2010). En nuestros ensayos hemos comprobado que la aplicación exógena de GA₃ y la mezcla de giberelinas GA₄₊₇, todas giberelinas bioactivas, promueven la formación de tallos florales en plantas micropropagadas de *L. alpinum*. Igualmente este efecto se observa con la aplicación de GA₄₊₇ en combinación con la citoquinina BAP a través de una formulación comercial (Promalín®).

El uso del ácido giberélico (GA₃) está ampliamente extendido en floricultura. En algunas plantas como los tulipanes (*Tulipa* spp.) o los lirios (*Lillium* spp.) se ha empleado como sustituto de los tratamientos de temperaturas bajas para promover la floración (Rudnicki *et al.*, 1976; Ohkawa, 1979). En estos y otros ejemplos se señala que su eficiencia es menor que la de los tratamientos con frío (Viera *et al.*, 2010), pero en nuestros ensayos la utilización de GA₃ resulta más eficaz en la promoción de la floración que el tratamiento de vernalización. En otras especies de la familia *Asteraceae* como caléndula (*Calendula officinalis* L.), crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev), y solidago (*Solidago x Hybrida*) las aplicaciones de GA₃ dan lugar a adelantos de la floración e incrementos en el número de flores (Hassan *et al.*, 2007; Dalal *et al.*, 2009; Kazaz y Karagüzel, 2010).

La combinación de giberelinas GA₄₊₇ se ha usado como promotor de la iniciación floral fundamentalmente en coníferas (Ross *et al.*, 1984; Eysteinson, y Greenwood, 1995; Ho y Eng, 1995), pero también se ha visto su efecto en *Asteraceae* como *Gaillardia x grandiflora* (Evans y Lyons, 1988) o *Rudbeckia hirta* (Harkess y Lyons 1994).

Por su parte, la mezcla de giberelinas GA₄₊₇ con BAP (Promalín®) se emplea habitualmente para mejorar el cuajado y las características del fruto en especies como manzano y peral. No obstante, existen diversas referencias a su uso en como promotor de la floración en especies florícolas como *Zantedeschia 'Galaxy'*, (Funnel *et al.*, 1992) *Aquilegia x hybrida* (Gianfagna y Merritt, 1998) u *Ornithogalum arabicum* (Suh *et al.*, 2000) con mejores resultados que con el uso de GA₃.

El efecto observado con las aplicaciones de Promalín® es una consecuencia de los efectos de los componentes, las giberelinas GA₄₊₇ y la BAP. La aplicación exógena de citoquininas en plantas se ha visto que induce el adelanto de la floración en algunas especies ornamentales (Gupta y Maheshwari, 1970; Day *et al.*, 1994; Blanchard y Runkle, 2008) mientras que en otras no parece tener ningún efecto visible sobre la floración (Gianfagna y Merritt, 1998; Subbaraj *et al.*, 2010). En nuestro caso, la aplicación de BAP sin el acompañamiento de giberelinas no promueve la floración a las concentraciones ensayadas. No obstante, sí hemos observado un efecto potenciador de la formación de flores en combinación con las giberelinas GA₄₊₇ (Promalín®). Estos datos concuerdan con lo visto en otras especies (Gianfagna y Merritt, 1998; Subbaraj *et al.*, 2010).

La respuesta de floración obtenida con los tratamientos con giberelinas sobre plantas micropropagadas de *L. alpinum* es transitoria. Es decir, una vez cesa el efecto del tratamiento la planta no mantiene la capacidad de producir inflorescencias sino que se necesitan nuevas aplicaciones para que vuelva a florecer. Por otro lado, el desarrollo floral se manifiesta en todos los tratamientos ensayados hacia las cuatro semanas desde el inicio del tratamiento. Uniendo estos dos hechos, las aplicaciones con giberelinas permiten establecer una estrategia de programación de la producción de flores de gran interés desde el punto de vista de la comercialización de *L. alpinum*.

Ahondando más en la respuesta de floración a los tratamientos con giberelinas de las plantas micropropagadas, vemos que ésta depende tanto de la concentración de producto como del número de aplicaciones realizadas. Esta hecho se ha comprobado en tratamientos similares en otras plantas florícolas (Brooking y Cohen, 2002; Kazaz y

Karagüzel, 2010, Zalewska y Antkowiak, 2013). En nuestro caso, realizando una única aplicación, las concentraciones más bajas ensayadas (decenas de mg) de GA₃, GA₄₊₇ y GA₄₊₇+BAP (Promalín®) no son capaces de promover la floración. Las concentraciones más altas (centenas de mg), por su parte, ofrecen respuestas distintas en función del producto. La aplicación de GA₃ promueve el desarrollo de inflorescencias fenotípicamente semejantes a las inflorescencias de plantas de semilla silvestre mientras que las aplicaciones de GA₄₊₇ y Promalín® producen inflorescencias aberrantes.

Realizando mayor número de aplicaciones la respuesta de floración mejora en todos los casos. No obstante, es en el tratamiento con GA₃ donde se consigue una respuesta generalizada en todas las plantas tratadas, a lo que acompaña un aumento apreciable de la formación de inflorescencias por planta. La aplicación continuada de giberelinas sobre las plantas micropropagadas nos permite comprobar que éstas responden indefinidamente produciendo inflorescencias. Sin embargo dicha aplicación tiene un claro efecto negativo sobre la morfología de las inflorescencias, que presentan fenotipos aberrantes. Este efecto podría ser achacable a la acción acumulativa de las giberelinas sobre las plantas y sobre las inflorescencias ya en desarrollo en particular. A la vista de estos resultados, una estrategia a plantear sería la realización de ciclos de tratamientos sobre las plantas respetando ciertos períodos de descanso o reposo entre ellos. De este modo todavía se podrían obtener varias cosechas de flores al año sin perjuicio de la calidad de las mismas.

Asimismo, la “edad” de la planta, entendida como el tiempo transcurrido entre el trasplante desde cultivo *in vitro* hasta el momento de aplicación de giberelina exógena también tiene un papel relevante. Los tratamientos con GA₃ aplicados a plantas de un año en cultivo en invernadero obtenían mejores porcentajes de floración que con plantas con menos tiempo de cultivo. Discrepancias entre las respuestas a la aplicación de giberelinas según el momento de la aplicación han sido señaladas por otros autores (Vieira *et al.*, 2011; Zalewska y Antkowiak, 2013) y según Grzesik (1989), el momento de aplicación puede ser incluso más importante que la concentración.

Aunque, como hemos señalado anteriormente, las plantas micropropagadas mantenidas hasta dos años en cultivo no florecen sin señales inductoras adicionales, es posible que su capacidad de respuesta a dichas señales aumente con la edad. Autores como Erwin (2006) postulan que la tendencia a florecer de una planta una vez alcanzada

la fase adulta se incrementa con la edad. Una posible explicación estaría en la acumulación de ciertos compuestos como los carbohidratos, que pueden afectar al tamaño del ápice y condicionar la iniciación de los primordios florales hasta que el ápice alcanza un tamaño mínimo.

En cuanto a la morfología de las inflorescencias, con los tratamientos con giberelinas se obtienen inflorescencias reconocibles como flores de “edelweiss”. Comparadas con las inflorescencias silvestre presentan una menor cobertura de pelos, pero en la misma medida que ocurre con las plantas de semilla cultivadas en invernadero, a las que se asemejan en general. Por tanto estas diferencias se deben fundamentalmente a las condiciones de cultivo y no a un efecto del tratamiento. De todos modos, entendiendo que esta característica puede suponer una mejor aceptación del producto, se plantea la opción de explorar estrategias complementarias para incrementar la cobertura pilosa, como tratamientos de frío o la exposición a luz UV.

Como curiosidad el número de flores en los capítulos se ve incrementado con la aplicación de giberelinas Sin embargo esto no supone el aumento en la proporción de flores de uno y otro sexo, como sí se pone de manifiesto en otras *Asteraceae* como girasol (*Helianthus annuus* L.; Sladký, 1986) en la que aumenta el número de flores femeninas. En todo caso se ha comprobado estas flores son normales y mantienen su capacidad reproductiva.

9. OTRAS PERSPECTIVAS DE APLICACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE *Leontopodium alpinum*

Otro de los aspectos biotecnológicos de interés con que cuenta la especie *L. alpinum*, y que no han sido desarrollados en esta Tesis Doctoral, es su capacidad de producir compuestos bioactivos.

Los análisis fitoquímicos preliminares (datos no mostrados) de las plantas micropropagadas de *L. alpinum* generadas en el presente trabajo muestran la presencia de compuestos fenólicos de interés, principalmente flavonoides pero también ácido clorogénico y ácido leontopódico. Estos metabolitos se encuentran en los tejidos de distintas partes de la inflorescencia pero también en la roseta de hojas durante el crecimiento vegetativo y en los brotes en cultivo *in vitro*. La aplicación del protocolo de

micropropagación sobre un posible material seleccionado por su perfil fitoquímico permitiría pues la producción de gran cantidad de material para la extracción de estos compuestos.

Con todo, es necesario considerar que la producción de metabolitos secundarios depende en gran medida del estado fisiológico y de desarrollo de la planta (Dixon, 2001; Oksman-Caldenteyl e Inzé, 2004). En muchos casos, esta producción puede verse incrementada mediante la aplicación de elicitores: factores físicos o químicos que introducidos en los cultivos pueden inducir o favorecer la biosíntesis de compuestos específicos (Namdeo, 2007). En el caso particular de los compuestos de tipo fenólicos, se ha comprobado que la aplicación de tratamientos con luz ultravioleta de onda corta (UV-C) incrementan la concentración fenólica en uva de mesa (Cantos *et al.*, 2000 y Cantos *et al.*, 2001), en limón (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992) o en mango (González-Agilar *et al.*, 2007), así como en plantas de interés medicinal como *Boswellia serrata* Roxb (Ghorpade *et al.*, 2011). Con estos referentes, una de las líneas de trabajo con *L. alpinum* que se pretende seguir es el estudio del efecto de tratamientos con luz UV-C sobre los niveles de compuestos fenólicos en plantas micropropagadas.

Asimismo, para que los métodos de micropropagación tengan aplicación en la producción industrial de metabolitos o en la producción de planta ornamental de forma rentable, es necesario que éstos puedan producirse a gran escala y de manera estable. En este sentido, el uso de biorreactores se ha convertido en una buena opción para la producción comercial de plantas (Rout *et al.*, 2006), ya que cuenta con ventajas como la automatización, el ahorro en los costes de producción, la reducción de la mano de obra y puede presentar importantes incrementos en la producción (Ziv, 2005; Takayama y Akita, 2006). En el caso de *L. alpinum* estamos comenzando a estudiar la utilización de los biorreactores de inmersión temporal (TIB, *Temporary Immersion Bioreactors*) donde el medio de cultivo líquido es aplicado a intervalos al material vegetal, que se localiza en un compartimento separado. Si los resultados son los adecuados, el uso de este sistema aseguraría, por ejemplo, la producción masiva de plantas de *L. alpinum* para facilitar la extracción de productos bioactivos.

CONCLUSIONES

De los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes **conclusiones:**

PRIMERA: Las plantas obtenidas de semilla silvestre de *Leontopodium alpinum* Cass. cultivadas en invernadero (con temperaturas de 22/18 °C y en días largos) a nivel del mar realizan la transición floral seis meses después de la siembra y sin necesidad de vernalización. Los caracteres morfológicos analizados en estas plantas muestran cierta variación respecto de la población silvestre de la que provienen como resultado de las diferentes condiciones ambientales.

SEGUNDA: Se ha desarrollado un método de micropropagación de *L. alpinum* Cass. a partir de flores maduras aisladas de plantas silvestres recolectadas en campo. Este método se basa en la inducción de organogénesis indirecta en las flores cultivadas *in vitro* para la obtención de brotes que se incorporan a un proceso de multiplicación y enraizamiento de elevada eficiencia, garantizando la producción de gran cantidad de plantas clonales.

TERCERA: Se ha desarrollado un segundo método de micropropagación para *L. alpinum* Cass. utilizando como material de partida hojas de plantas micropropagadas cultivadas *in vitro*. Este tipo de explante muestra una elevada capacidad organogénica en medios de cultivo con TDZ, lo que hace que este protocolo suponga un método de regeneración de plantas *in vitro* eficaz y reproducible que podría emplearse en el abordaje de la transformación genética de plantas de esta especie.

CUARTA: Las plantas de *L. alpinum* obtenidas mediante los protocolos de micropropagación establecidos no presentan modificaciones en el nivel de ploidía y se desarrollan vegetativamente de forma similar a las plantas obtenidas de semilla silvestre cuando se cultivan en las mismas condiciones de invernadero, pero no realizan la transición floral.

QUINTA: Las plantas micropropagadas de *L. alpinum* responden a condiciones específicas de la inducción floral. Se ha comprobado que la vernalización promueve la

floración en estas plantas y que responden al fotoperíodo como plantas de día cortolargo, requiriendo una secuencia de días cortos seguidos de días largos para florecer. Igualmente, la aplicación exógena de giberelinas induce la floración en las plantas micropropagadas con gran efectividad. Estas particulares necesidades de señalización exógena podrían deberse a modificaciones genéticas generadas o no eliminadas durante el proceso de des-diferenciación y regeneración en cultivo *in vitro*.

SEXTA: La aplicación de giberelinas exógenas, particularmente de GA₃, resulta una alternativa muy efectiva para la producción de inflorescencias de *L. alpinum*, permitiendo la obtención de inflorescencias en invernadero a nivel del mar, de manera sincronizada y sin restricciones estacionales.

BIBLIOGRAFÍA

Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. y Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*. **309**(5737), 1052-1056.

Amasino, R.M. y Michaels, S.D. (2010). The timing of flowering. *Plant Physiology*. **154**(2), 516-520.

Ammirato, P.V. (1986). Control and expression of morphogenesis in culture. En: *Plant Tissue Culture and its agricultural applications*. Withers, L.A. y Alderson, P.G. eds. (London, Butterworths), 23-46.

Andrés, F. y Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*. **13**(9), 627-639.

ANTHOS. (2012). Sistema de información de las plantas de España. Real Jardín Botánico, CSIC-Fundación Biodiversidad. [<http://www.anthos.es>].

Bacchetta, G., Bueno Sanchez, A., Fenu, G., Jimenez-Alfaro, B., Mattana, E., Piotto, B. y Virevaire M. (eds). (2008). Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias / La Caixa. 378 pp.

Bäurle, I. y Dean, C. (2008). Differential interactions of the autonomous pathway RRM proteins and chromatin regulators in the silencing of Arabidopsis targets. *PLoS One*. **3**(7), e2733.

Benito Alonso, J.L. (2005). Flora y vegetación del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido (Sobrarbe, Pirineo aragonés). Bases científicas para su gestión sostenible. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.

Benito Moreno, R.M., Macke, F., Alwen, A. y Heberle-Bors, E. (1988). *In situ* seed production after pollination with *in vitro* matured isolated pollen. *Planta* **176**, 145-148.

Ben-Yehoshua, S. (1992). Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **40** (7), 1217-1221.

Bergh, N.A. y Verboom, G.A. (2011). Anomalous capitulum structure and monoecy may confer flexibility in sex allocation and life history evolution in the *Ifloga* lineage of paper daisies (Compositae: Gnaphalieae). *American Journal of Botany*. **98**(7): 1113–1127.

Bernier, G. (1988). The Control of Floral Evocation and Morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **39**, 175-219.

Bernier, G. y Périlleux, C. (2005). A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal*. **3**(1), 3-16.

Berry, R. (2009). Edelweiss. Flor de Leyenda. [Vídeo] Co-Producción: Looks, ORF, Arte, Avro. Austria-Francia-Holanda. 51 minutos. Audio: Español.

Blanchard, M.G. y Runkle, E.S. (2008). Benzyladenine promotes flowering in *Doritaenopsis* and *Phalaenopsis* orchids. *Journal of Plant Growth Regulation*. **27**(2), 141-150.

Blázquez, M.A. y Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature*. **404**, 889-892.

Blázquez, M.A., Ahn, J.H. y Weigel, D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature genetics*. **33**(2), 168-171.

Blázquez, M.A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R. y Weigel, D. (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter. *The Plant Cell*. **10**, 791–800.

Blöch, C., Dickoré, W.B., Samuel, R. y Stuessy, T.F. (2010). Molecular phylogeny of the edelweiss (*Leontopodium*, Asteraceae: Gnaphalieae). *Edinburgh Journal of Botany*. **67**, 235–264.

Bolòs, O. de (1998) Atlas corològic de la flora dels Països catalans. Primera compilació general. Part II: *Lagurus-Zygophyllum*. Barcelona. Institut d'Estudis Catalans.

Bolòs, O. de y Vigo, J., Masalles, R.M. y Ninot, J.M. (1993). Flora manual dels Països Catalans. Editorial Pòrtic. Barcelona. 855.

Bonhomme, F., Kurz, B., Melzer, S., Bernier, G. y Jacquard, A. (2000). Cytokinin and gibberellin activate *SaMADS A*, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in *Sinapis alba*. *The Plant Journal*. **24**(1), 103-111.

Boss, P.K., Bastow, R.M., Mylne, J.S. y Dean, C. (2004). Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell*. **16**, S18-S31.

Brewbaker, J.L. y Kwack, B.H. (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany*. **50**, 747-858.

Brooking, I.R. y Cohen, D. (2002). Gibberellin-induced flowering in small tubers of *Zantedeschia* 'Black Magic'. *Scientia horticultrae*. **95**(1), 63-73.

Cantos, E., Espín, J.C. y Tomás-Barberán, F.A. (2001). Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: A new "functional" fruit?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**(10), 5052-5058.

Cantos, E., García-Viguera, C., De Pascual-Teresa, S. y Tomás-Barberán, F.A. (2000). Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **48**, 4606-4612.

Carpita, N. y McCann, M. (2000). The cell wall. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B.B., Gruissem, W. y Jones, R. eds. (USA, American Society of Plant Physiologists). 52-108.

Carreras, J., Carrillo, E., Ninot, J.M., Soriano, I. y Vigo, J. (1996). Plantas vasculares del piso alpino de los Pirineos catalanes raras o amenazadas. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. **54**, 521-527.

Carron, C.A., Rey, C., Previdoli, S. y Baroffio, C. (2007). Helvetia, a new hybrid clones Edelweiss cultivar. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*. **39**, 125-130.

Catálogo de Especies Amenazadas de Aragón. (2008) Zaragoza: Gobierno de Aragón. Departamento de Medio Ambiente.
http://www.aragon.es/DepartamentosOrganismosPublicos/Departamentos/AgriculturaGanaderiaMedioAmbiente/AreasTematicas/MA_Biodiversidad/ci.05_Catalogo_especies_amenazadas_Aragon.detalleDepartamento?channelSelected=4ab736552883a210VgnVCM100000450a15acRCRD

Chesnokov, Y.V. (2000) Kanamycin resistance of germination pollen of transgenic plants. *Sexual Plant Reproduction*. **12**(4), 232-236.

Chiej, R. (1988). Edelweiss. En: The Macdonald Encyclopoedia of Medicinal Plants. Ed. Macdonald Orbis (Hallatrow, UK).

Clemente, M., Contreras, P., Susin, J. y Pliego-Alfaro, F. (1991). Micropropagation of *Artemisia granatensis*. *HortScience*. **26**, 420-420.

Comey, N., Hook, I., Sheridan, H. y Walsh, J. (1997). Isolation of (S)-(-)-2,3-dihydro-2,6-dimethyl-4Hbenzopyran-4-one from roots of *Leontopodium alpinum*. *Journal of Natural Products*. **60**, 148-149.

Constabel, F. y Shyluk, J.P. (1994). Initiation, Nutrition, and Maintenance of Plant Cell and Tissue Culture. In: Plant Cell and Tissue Culture. Vasil, I.K. y Thorpe, T.A., eds. (Dordrecht, Kluwer Academic Publishers). 3-15.

Costa, S., Schwaiger, S., Cervellati, R., Stuppner, H., Speroni, E. y Guerra, M.C. (2009). In vitro evaluation of the chemoprotectiveaction mechanisms of leontopodic acid against aflatoxin B1 and deoxynivalenol-induced cell damage. *Journal of Applied Toxicology*. **29**(1), 7-14.

Cuenca, S. y Amo-Marco, J.B. (2000a). In vitro propagation of two Spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. **36**, 225-229.

Cuenca, S. y Amo-Marco, J.B. (2000b). In vitro propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems. *Plant. Growth. Regul.* **30**, 99-103.

- Cuenca, S., Amo-Marco, J.B. y Parra R.** (1999). Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea pawi* Loscos ex Willk. (Compositae). *Plant Cell Rep.* **18**, 674-679.
- Da Silva Vieira, M.R., Citadini, V., Pereira Lima, G.P., Vacaro de Souza, A. y de Souza Alves, L.** (2010). Use of gibberellins in floriculture. *African Journal of Biotechnology.* **9**(54), 9118-9121.
- Dal Toso, R. y Melandri, F.** (2010). Plant cell cultura technology: a new ingredient source. *Personal Care Asia Pacific*, 35-38.
- Dalal, S.R., Karale, G.D. y Momin, K.C.** (2009). Effect of growth regulators on growth, yield and quality of chrysanthemum under net house conditions. *Asian Journal of Horticulture.* **4**(1), 161-163.
- Day, J.S., Loveys, B.R. y Aspinall, D.** (1995). Cytokinin and carbohydrate changes during flowering of *Boronia megastigma*. *Functional Plant Biology.* **22**(1), 57-65.
- De Hertogh, A.A. y Le Nard, M.** (1993). En: The physiology of flower bulbs. De Hertogh, A. y Le Nard, M. ed. (Amsterdam, Elsevier).761-764.
- de Klerk, G.J.** (2009) Adventitious regeneration. En: Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology, vol 1. Flickinger, M.C. ed. (London, Wiley). 72–87.
- de Montaigu, A., Tóth, R. y Coupland, G.** (2010). Plant development goes like clockwork. *Trends in Genetics.* **26**(7), 296-306.
- Debergh, P.C.** (1994). *In vitro* culture of ornamentals. En: Plant Cell and Tissue Culture. Vasil, I.K. y Thorpe, T.A., eds. (Dordrecht, Kluwer Academic Publishers). 561-573.
- Debergh, P.C. y Maene, L.** (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulture.* **14**, 335-345.

Dhar, U. y Joshi, M. (2005). Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew.(*Asteraceae*): effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant cell reports*. **24**(4), 195-200.

Dixon, R.A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*. **411**(6839), 843-847.

Dobner, M.J., Ellmerer-Müller, E.P., Schwaiger, S., Batsugh, O., Narantuya, S., Stütz, M. y Stuppner, H. (2003a). New lignan, benzofuran and sesquiterpene derivatives from the roots of *Leontopodium alpinum*. *Helvetica Chimica Acta*. **86**, 733–738.

Dobner, M.J., Schwaiger, S., Jenewein, I.H. y Stuppner, H. (2003b). Antibacterial activity of *Leontopodium alpinum* (Edelweiss). *Journal of Ethnopharmacology*. **89**, 301–303.

Dobner, M.J., Sosa, S., Schwaiger, S., Altinier, G., Della Loggia, R., Kaneider, N.C. y Stuppner, H. (2004). Anti-inflammatory activity of *Leontopodium alpinum* and its constituents. *Planta Medica*. **70**, 502–508.

Driver, J.A. y Kuniyuki, A.H. (1984) In vitro propagation of paradox walnut rootstock. *HortScience*. **19**, 507–509.

Dweck, A.C. (2004). A review of edelweiss. *SÖFT-Journal*. **130**, 65–68.

Engelen-Eigles, G. y Erwin, J.E. (1997). A model plant for vernalization studies. *Scientia Horticulturae*. **70**, 197-202.

Erhardt, A. (1993). Pollination of the edelweiss, *Leontopodium alpinum*. *Botanical Journal of Linnean Society*. **111**, 229-240.

Erwin, J. (2006). Factors affecting flowering in ornamental plants. En: Flower Breeding and Genetics. Anderson, N.O. ed. (Netherlands, Springer). 7-48.

Evans, M.R. y Lyons, R.E. (1988). Photoperiodic and gibberellin-induced growth and flowering responses of *Gaillardia X grandiflora*. *HortScience*. **23**, 584-586

- Eysteinnsson, T. y Greenwood, M.S.** (1995). Flowering on long and short shoots of *Larix laricina* in response to differential timing of GA4/7 applications. *Tree physiology*. **15**(7-8), 467-469.
- Ferl, R. y Paul A.L.** (2000). Genome organization and expression. En: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan, B., Gruissem, W. y Jones, R. M. eds. (USA, American Society of Plant Physiologists). 312-357.
- Font Quer, P.** (1946). El Edelweis en los Pirineos. *Montaña-Anales del Centro Excursionista de Cataluña*. Barcelona. 1-12.
- Font Quer, P.** (1980). Plantas medicinales: El Dioscórides renovado. 6ª edición. Ed. Península Barcelona. 783 pp.
- Fornara, F., de Montaigu, A. y Coupland, G.** (2010). Snapshot: Control of flowering in Arabidopsis. *Cell*. **141**, 550 e1-2.
- Fowler, M.W.** (1987). Products from plant cells. En: Basic Biotechnology. Bullock, J., Kristiansen, B., eds. (London, Academic Press). 525-544.
- Franklin, G., Alaiwi, W.A. y Goldman, S.L.** (2005). Regeneration and *Agrobacterium* - Mediated Transient Transformation of Button Daisy (*Leucanthemum vulgare*). *Journal of plant biotechnology*; **7**(1), 37-43.
- Friend, D.J.C.** (1965). Interaction of red and far red radiations with the vernalization process in winter rye. *Canadian Journal of Botany*. **43**, 161-170.
- Funnell, K.A., MacKay, B.R. y Lawoko, C.R.O.** (1992). Comparative effects of Promalin and GA3 on flowering and development of *Zantedeschia* 'Galaxy'. *Acta Horticulturae*. **292**, 173-179.
- Galvão, V.C., Horrer, D., Küttner, F. y Schmid, M.** (2012). Spatial control of flowering by DELLA proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. **139**(21), 4072-4082.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. y Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. **50**, 151-158.

García Casanova, J., Rodríguez Luego, J.L. y Rodríguez Piñero, C. (2001). Especies amenazadas. En: Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y Conservación. Fernández-Palacios, J.M. y Martín-Esquivel, J.L., eds. (SantaCruz de Tenerife, Turquesa). 167-172.

George, E.F., de Klerk, G-J. (2008a). Micropropagation:Uses and Methods. In: Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, Vol. 1. The Background. George, E.F., Hall, M.A., de Klerk, G-J, eds. (Dordrecht, Springer-Verlag). 29-64.

George, E.F., de Klerk, G-J. (2008b). Plant Tissue Culture Procedure-Background. In: Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, Vol. 1. The Background. George, E.F., Hall, M.A., de Klerk, G-J, eds. (Dordrecht, Springer-Verlag). 1-28.

George, E.F., de Klerk, G-J. (2008c). Plant Growth Regulators I: Introduction. In: Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, Vol. 1. The Background. George, E.F., Hall, M.A., de Klerk, G-J, eds. (Dordrecht, Springer-Verlag). 175-204.

George, E.F., de Klerk, G-J. (2008d). Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, Vol. 1. The Background. George, E.F., Hall, M.A., de Klerk, G-J, eds. (Dordrecht, Springer-Verlag). 205-226.

George, E.F., de Klerk, G-J. (2008e). Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analoguesand Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, Vol. 1. The Background. George, E.F., Hall, M.A., de Klerk, G-J, eds. (Dordrecht, Springer-Verlag). 205-226.

Ghorpade, R.P., Chopra, A. y Nikam, T.D. (2011). Influence of biotic and abiotic elicitors on four major isomers of boswellic acid in callus culture of *Boswellia serrata* Roxb. *Plant Omics Journal*. **4**(4), 169-176.

Gianfagna, T.J. y Merritt, R.H. (1998). GA4/7 promotes stem growth and flowering in a genetic line of *Aquilegia x hybrida* Sims. *Plant growth regulation*. **24**(1), 1-5.

González-Aguilar, G.A., Villegas-Ochoa, M.A., Martínez-Téllez, M.A., Gardea, A.A. y Ayala-Zavala, J.F. (2007). Improving Antioxidant Capacity of Fresh-Cut Mangoes Treated with UV-C. *Journal of food science*. **72**(3), S197-S202.

González-Benito, M. y Martín, C. (2011). *In vitro* preservation of Spanish Biodiversity. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant*. **47**, 46-54.

Grabley, S., Thiericke, R. (1999). Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. **64**, 101–154.

Greuter, W. (2003). The Euro+Med treatment of Gnaphalieae and Inuleae (Compositae) – generic concepts and required new names. *Willdenowia*. **33**, 239-244.

Grey, A.I., Hook, I.L., James, P. y Sheridan, H. (1999) Sesquiterpenes from *Leontopodium alpinum*. *Phytochemistry*. **50**, 1057–1060. Corrigendum: *Phytochemistry* (2000) **54**, 551.

Grzesik M. (1989). Factors influencing the effectiveness of growth regulators in nursery production. *Acta Horticulturae*. **251**, 371-375.

Guevara, E. y Jiménez, V. (2006). La floración. En: La reproducción de las plantas. Villalobos-Rodríguez, E. ed. (San José, UCR). 1-34.

Guo, B., Abbasi, B.H., Zeb, A., Xu, L.L. y Wei, Y.H. (2011). Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*. **10**, 8984-9000.

Gupta, S. y Maheshwari, S.C. (1970). Growth and flowering of *Lemna paucicostata* II. Role of growth regulators. *Plant and Cell Physiology*. **11**(1), 97-106.

Handel-Mazzetti, H. (1928). Systematische Monographie der Gattung *Leontopodium*. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt*. **44** (2), 1-178.

Harkess, R.L. y Lyons, R.E. (1994). Gibberellin-and Cytokinin-induced Growth and Flowering Responses in *Rudbeckia hirta* L. *HortScience*. **29**(3), 141-142.

Hasbullah, N.A., Taha, R. M. y Awal, A. (2008). Growth optimization and organogenesis of *Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook f. *in vitro*. *Pakistan journal of biological sciences*. **11**(11), 1449-54.

Hassan, N.A., Azzaz, E.A. y El Emarey, F.A. (2007). Physiological, anatomical, and biochemical studies on pot marigold (*Calendula officinalis* L.) plants. *African Crop Science Conference Proceedings*. **8**, 1727-1738.

Hennessy, D., Hook, I., Sheridan, H. y McGee, A. (1989). Hydroxycinnamic acid esters from cell suspension cultures and plants of *Leontopodium alpinum*. *Phytochemistry*. **28**, 489-490.

Heywood, V.H. (1985). *Las Plantas con Flores*. Ed. Reverté, S.A. Barcelona. 332 p.

Hisamatsu, T. y King, R.W. (2008). The nature of floral signals in Arabidopsis. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) and gibberellin. *Journal of experimental botany*. **59**(14), 3821-3829.

Ho, R.H. y Eng, K. (1995). Promotion of cone production on field-grown eastern white pine grafts by gibberellin A47 application. *Forest ecology and management*, **75**(1), 11-16.

Hook, I.L.I. (1993). *Leontopodium alpinum* Cass (Edelweiss); *in vitro* culture, micropropagation, and the production of secondary metabolites. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 21. Medicinal and Aromatic Plants IV. Bajaj, Y.P.S. ed. (Heidelberg, Springer-Verlag), 217-232

Hook, I.L.I. (1994). Secondary metabolites in hairy root cultures of *Leontopodium alpinum* Cass. (edelweiss). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **38** (2-3), 321-326.

Hook, I.L.I. y Reid, C. (1996). The microscopic structure of *Leontopodium alpinum* (Edelweiss). En: *Compositae: Biology & Utilization*. Caligari, P.D.S. y Hind, D.J.N. eds. (Kew, Royal Botanic Gardens). **2**, 383-392.

Hook, I.L.I. y Sheridan, H. (2001). Transgenic *Leontopodium* (Edelweiss). In: Transgenic Crops III. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Bajaj, Y.P.S. ed. (Heidelberg, Springer). **48**, 221-236.

Hornick, A., Schwaiger, S., Rollinger, J.M., Vo, N.P., Prast, H. y Stuppner, H. (2008). Extracts and constituents of *Leontopodium alpinum* enhance cholinergic transmission: brain ACh increasing and memory improving properties. *Biochemical Pharmacology*. **76**(2), 236-248.

Huetteman, C.A. y Preece, J.E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant cell, tissue and organ culture*. **33**(2), 105-119.

Husaini, A.M. y Abdin, M.Z. (2007). Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *Fragaria x ananassa* Duch. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. **43**(6), 576-584.

Iglesias, I., Feijóo, M.C. y Ortiz, S. (2000). Contribution to the conservation studies of *Santolina melidensis* (Rodr.-Oubiña & S. Ortiz) Rodr.-Oubiña & S. Ortiz. *Portugaliae Acta Biol*. **19**, 107–112.

Irish, V.F. (2010). The flowering of Arabidopsis flower development. *The Plant Journal*. **61**(6), 1014-1028.

Jones, M.P., Yi, Z., Murch, S.J. y Saxena, P.K. (2007). Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: micropropagation in solid and liquid culture systems. *Plant cell reports*. **26**(1), 13-19.

Kanwar, J.K. y Kumar, S. (2008). *In vitro* propagation of *Gerbera*—A Review. *Hort. Sci.(Prague)*. **35**(1), 35-44.

Kazaz, S. y Karagüzel, O. (2010). Influence of Growth Regulators on the Growth and Flowering Characteristics of Goldenrod (*Solidago x Hybrida*). *European Journal of Scientific Research*. **45**(3), 498-507.

Kim, D.H., Doyle, M.R., Sung, S. y Amasino, R.M. (2009). Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental*. **25**, 277-299.

Kintzios, S. y Michaelakis, A. (1999). Induction of somatic embryogenesis and *in vitro* flowering from inflorescences of chamomile (*Chamomilla recutita* L.). *Plant Cell Reports*. **18**(7-8), 684-690.

Koroch, A., Juliani, H.R., Kapteyn, J. y Simon, J.E. (2002). *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **69**, 79–83.

Kumar, S. y Kanwar, J.K. (2006). Regeneration ability of petiole, leaf and petal explants in gerbera cut flower cultures *in vitro*. *Folia Horticulturae*. **18**(2), 57-64.

Küpfer, P. (1974). Recherches sur les liens de parenté entre la flore orophile des Alpes et celle des Pyrénées. *Boissiera*. **23**, 3-322.

Kuppusamy, U.R. y Das N.P. (1991). Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. *Experientia*. **47**, 1196-1200.

Kutyła, M. y Chmiel, H. (2000). Propagation of *Leontopodium alpinum* Cass. using *in vitro* techniques. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. **473**, 113-117.

Lang, A. (1957). The effect of Gibberellin upon flower formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **43**(8), 709-717.

Lata, H., Chandra, S., Wang, Y.H., Raman, V. y Khan, I.A. (2013). TDZ-Induced High Frequency Plant Regeneration through Direct Shoot Organogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni: An Important Medicinal Plant and a Natural Sweetener. *American Journal of Plant Sciences*. **4**, 117-128.

Lê C.L. (2005). L'edelweiss se multiplie à grande vitesse à Changins. *Comunicado de prensa de 22 diciembre 2005*, 1 p.

- Li, Z., Traore, A., Maximova, S., y Gultinan, M. J.** (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. **34**(4), 293-299.
- Lindsey, K. y Jones, M.G.K.** (1989). Plant Biotechnology in Agriculture. Ed. Milton Keynes (Manchester, Open University Press). 241 p.
- Litvay, J.D., Johnson, M.A., Verma, D., Einsphar, D. y Weyrauch, K.** (1981) Conifer suspension culture medium development using analytical data from developing needs. *Institute of Paper Chemistry*. **115**, 1-17.
- Lloyd, G. y McCown, B.** (1980). Commercial feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*. **30**, 421-427.
- Loyola-Vargas, V.M. y Vázquez-Flota, F.** (2006). An Introduction to Plant Cell Culture. En: Plant Cell Culture Protocols: Methods in Molecular Biology. Eds. V.M. Loyola-Vargas y F. Vázquez-Flota, (USA , Humana Press). **318**(393), 59-86.
- Lulli, D., Potapovich, A., Riccardo, M., Dellambra, E., Pressi, G., Kostyuk, V., Dal Toso, R., De Luca, C., Pastore, S. y Korkina L.** (2012) Anti-Inflammatory Effects of Concentrated Ethanol Extracts of Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) Callus Cultures towards Human Keratinocytes and Endothelial Cells. *Mediators of Inflammation*. doi: 10.1155/2012/498373
- Lynch, P.T.** (1999). Tissue culture techniques in *in vitro* plant conservation. In: Plant Conservation Biotechnology. Benson, E.E. ed. (London, Taylor & Francis, Ltd). 41-62.
- Maene, L.J. y Debergh, P.C.** (1986) Optimization of plant micropropagation. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*. **51**(4), 1479–1488.
- Malik, K.A. y Saxena, P.K.** (1992). Thidiazuron Induces High Frequency Shoot Regeneration in Intact Seedlings of Pea (*Pisum sativum*) and Lentil (*Lens culinaris*). *Australian Journal of Plant Physiology*. **19**(6) 731-740.

Mallón, R., Rodríguez-Oubiña, J. y González, M.L. (2010). *In vitro* propagation of the endangered plant *Centaurea ultriae*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **101**, 31-39.

Marcon N., Kühn, Y., Quennoz, M., Schwaiger, S., Stuppner, H., Simonnet, X., Grogg, A.F. y Frey, U. (2006). Incidence under real conditions of altitude on the development and properties of *Leontopodium alpinum* Cass. En: 4th International Conference on natural products: "Natural Products: a chance for the future of mankind" (Leysin, Suiza, 28-31 de mayo de 2006). Libro de actas. P-075.

Mathieu, J., Yant, L.J., Mürdter, F., Küttner, F. y Schmid, M. (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS biology.* **7**(7), e1000148.

Meusel H. y Jäger, E.J. (1992). En: Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora. Band III. Ed. H. Meusel y E.J. Jäger. (Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag, Jena).

Mithila, J., Hall, J., Victor, J. M.R. y Saxena, P. (2003). Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Plant Cell Reports.* **21**(5), 408-414.

Moon, J., Lee, H., Kim, M., y Lee, I. (2005). Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology.* **46**(2), 292-299.

Moon, J., Suh, S.S., Lee, H., Choi, K.R., Hong, C.B., Paek, N.C., Kim, S.G. y Lee, I. (2003). The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal.* **35**(5), 613-623.

Mortensen, L.M. (1994). Effects of day/night temperature variations on growth, morphogenesis and flowering of *Kalanchoe blossfeldiana* v. Poelln. at different CO₂ concentrations, daylengths and photon flux densities. *Scientia Horticulturae.* **59**, 233-241.

Müller, C. (1998). Etude de quelques populations de *Leontopodium alpinum* (edelweiss) dans le val d'Herens (Valais). Institut de Botanique systématique et de Géobotanique, Université de Lausanne, 17 p.

Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*. **25**, 135-166.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. **15**(3), 473-497.

Mutasa-Göttgens, E. y Hedden, P. (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*. **60**(7), 1979-1989.

Myster, J. y Moe, R. (1995). Effect of diurnal temperature alternations on plant morphology in some greenhouse crops—a mini review. *Scientia Horticulturae*. **62**(4), 205-215.

Namdeo, A.G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*. **1**(01), 69-79.

Nitsch, J.P. y Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*. **163**, 85-87.

Ohkawa, K. (1979). Effects of gibberellins and benzylandenine on dormancy and flowering of *Lilium speciosum*. *Scientia Horticulturae*. **10**(3), 255-260.

Oksman-Caldentey, K.M. e Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in plant science*. **9**(9), 433-440.

Okuda, T., Yoshida, T. y Hatano, T. (1991). Chemistry and biological activity of tannins in medicinal plants. En: Economic and medicinal plant research. Ed. Wagner, H., Hikino, H. y Farnsworth, N.R. (London, Academic Press). Vol. 5, 129-165.

- Ortega, C. y González C.** (1985). Contribución a la conservación *ex situ* de especies canarias en peligro: propagación *in vitro* de *Senecio hermosae* Pitard. *Bot. Macarones.* **14**, 59–72.
- Ortiz, S., Buide, M.L., Rodríguez-Oubiña, J. y Iglesias, E.I.** (2004). *Crepis novoana*. S. Ortiz, Soñora & Rodr. Oubiña. En: Atlas y LibroRojo de la Flora Vasculare Amenazada de España. Bañares A.; Blanca G.; Güemes J.; Moreno J. C.; Ortiz S., eds. (Madrid, Dirección General de Conservación de la Naturaleza). 216–217
- Pace, L.G., Bruno, A.A. y Spanò, L.** (2009). *In vitro* plant regeneration and clonal micropropagation of *Leontopodium nivale* (Ten.) Heut ex Hand.-Mazz. (*Asteraceae*). *Plant Biosystems.* **143**, (1), 12-16.
- Park, J.I., Shim, S.Y., Kim, J.H., Lee, B.C. y Moon, H.K.** (1987) *In-vitro* rapid propagation of edelweiss *Leontopodium coreanum*. *Res Rep Inst Genet* **0**(22), 128–131.
- Park, K.Y., Lee, S.H., Min, B.K. Lee, K.S., Choi, J.S., Chung, S.R. Min, K.R. y Kim, Y.** (1999). Inhibitory effect of luteolin 4'-O-glucoside from *Kummerowia striata* and other flavonoids on interleukin-5 bioactivity. *Planta medica.* **65**(5), 457-459.
- Pence, V.** (1999). The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants. En: Plant Conservation Biotechnology. Benson, E. ed. (London, Taylor & Francis). 227-250.
- Pierce, B.A.** (2009). Principios básicos de la herencia. En: Genética; un enfoque conceptual. 3ª edición. (Madrid, Editorial Panamericana). 43-62.
- Pierik, R.L.M.** (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores, 3rd edn. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 326
- Preece, J.E.** (1997). Axillary Shoot Proliferation. In: Biotechnology of Ornamental Plants. Geneve, R.L., Preece, J.E. y Merkle, S.A. eds. (Wallingford, CAB International). 35-44.

Preece, J.E., Vahdati, K., Compton, P.J., Ibañez, A.M., Tran, Q., Gunawan, D., Duggal, A., Leslie, C. y Dandekar, A. (2012). Regeneration systems for pyramiding disease resistance into walnut rootstocks. En : Walnut Research Conference. 57-64.

Prevedello, M., Vertuani, S., Besco, E., Ziosic, P. y Manfredinic, S. (2004). Estratto di *Leontopodium alpinum* Cass.: capacità antiossidante di formulazioni cosmetiche. *L'Erborista*. Mayo 2004, 78-81.

Quoirin, M. y Lepoivre, P. (1977). Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus. *Acta Horticulturae*. **78**, 437-442

Ray, T., Saha, P. y Roy S.C. (2005). *In vitro* plant regeneration from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. **6**, 35-40.

Reed, B.M., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., y Pence, V.C. (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **47**(1), 1-4.

Reisinger, U., Schwaiger, S., Zeller, I., Messner, B., Stigler, R., Wiedemann, D., Mayr, T., Seger, C., Schachner, T., Dirsch, V.M., Vollmar, A.M., Bonatti, J.O. Stuppner, H., Laufer, G. y Bernhard, D. (2009). Leoligin, the major lignan from Edelweiss, inhibits intimal hyperplasia of venous bypass grafts. *Cardiovascular Research*. **82**, 542-549.

Resmerita, I. (1973) Cartarea speciei *Leontopodium aldinum* Cass. din Carpatii romanesti. *Stud. Circ. Biol., Bot.* **25**(5), 385-398.

Rey, C. y Slacanin, I. (1999). Approche culturale et phytochimique de l'edelweiss. *Revue suisse de viticulture, arboriculture et horticulture*. **31** (2), 89-96.

Rice-Evans, C.A. y Miller N.M. (1994) Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*. **234**, 279-29.

Rivas-Martínez, S., Bascónes, J. C., Díaz, T.E., Fernandez-Gonzalez, F. y Loidi, J. (1991). *Leontopodium alpinum* Cass. En: Vegetación del Pirineo-Occidental y Navarra.; *Itinera Geobot.* **5**, 5-455.

Ross, S.D., Bollmann, M.P., Pharis, R.P. y Sweet, G.B. (1984). Gibberellin A4/7 and the Promotion of Flowering in *Pinus radiata*. Effects on Partitioning of Photoassimilate within the Bud during Primordia Differentiation. *Plant physiology*. **76**(2), 326-330.

Roudier, F., Teixeira, F.K. y Colot, V. (2009). Chromatin indexing in *Arabidopsis thaliana*: an epigenomic tale of tails and more. *Trends in genetics*. **25**(11), 511-517.

Rout, G.R., Mohapatra, A. y Jain, S.M. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*. **24**(6), 531-560.

Rudnicki, R.M., Nowak, J. y Saniewski, M. (1976). The effect of gibberellic acid on sprouting and flowering of some tulip cultivars. *Scientia Horticulturae*. **4**(4), 387-397.

Rumary, C. y Thorpe, T.A. (1984). Plantlet formation in white and black spruce. I. *In vitro* techniques. *Canadian Journal of Forest Research*. **14**, 10-16.

Runger, W. (1962). Über den einfluß der tageslänge auf wachstum, blütenbildung und-entwicklung von *Echeveria harmsii*. *Gartenbauwissenschaft* **27**:279–294.

Safer, S., Tremetsberger, K., Guo, Y-P., Kohl, G., Samuel, M.R., Stuessy, T.F. y Stuppner, H. (2011). Phylogenetic relationships in the genus *Leontopodium* (Asteraceae: Gnaphalieae) based on AFLP data. *Botanical Journal of Linnean Society*. **165** (4), 364-377.

Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G. y Rowntree, J.K. (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants : Progress in the past decade. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **42**(3), 206-214.

Sauve, R. J., Mmbaga, M.T. y Zhou, S. (2004). *In vitro* regeneration of the Tennessee coneflower (*Echinacea tennesseensis*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **40**(3), 325-328.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. **30**, 3875-3883.

Scheidegger, T. (2011). Edelweiss: la naissance d'un mythe. En: Colloque 2011-Anne de l'edelweiss. (Orsières, Valais. 15-16 de julio de 2011). Disponible en Web:

http://www.florealpe.ch/data/download/Objets/Id_1419_edelweiss%20mythe_Scheidegger.pdf

Schwaiger, S., Adams, M., Seger, C., Ellmerer, E.P., Bauer, R. y Stuppner, H. (2004). New constituents of *Leontopodium alpinum* and their in vitro leukotriene biosynthesis inhibitory activity. *Planta Medica*. **70** (10), 978–985.

Schwaiger, S., Cervellati, R., Seger, C., Ellmerer, E.P., About, N., Renimel, I., Godenir, C., André, P., Gafner, F. y Stuppner, H. (2005). Leontopodic acid—a novel highly substituted glucaric acid derivative from edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) and its antioxidative and DNA protecting properties. *Tetrahedron*. **61**, 4621–4630.

Schwaiger, S., Seger, C., Wiesbauer, B., Schneider, P., Ellmerer, E.P., Sturm, S. y Stuppner, H. (2006). Development of an HPLC-PAD-MS assay for the identification and quantification of major phenolic edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) constituents. *Phytochemical Analysis*. **17**(5), 291–298.

Shirani, S., Mahdavi, F. y Maziah, M. (2010). Morphological abnormality among regenerated shoots of banana and plantain (*Musa* spp.) after *in vitro* multiplication with TDZ and BAP from excised shoot-tips. *Afr. J. Biotechnol.* **8**(21): 5755-5761.

Sigg, P. (2008). Culture de l'edelweiss pour la fleur coupée. *Revue suisse de viticulture, arboriculture et horticulture*. **40**, 350-352.

Siljak, S., Cartier, D. y Gorenflot, R. (1974). Introduction à l'étude de *Leontopodium alpinum* Cass.: Variabilité morphologique et du nombre chromosomique dans les populations naturelles. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris. Série D, T.* **278**, 2905-2908.

Sladký, Z. (1986). The role of growth regulators in the differentiation of flowers and inflorescences. *Biologia plantarum*. **28**(1), 31-37.

Smulders, M.J.M. y de Klerk, G.J. (2011). Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*. **63**(2), 137-146.

Smulders, M.J.M., Rus-Kortekaas, W. y Vosman, B. (1995). Tissue culture-induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants. *Theoretical and Applied Genetics*. **91**(8), 1257-1264.

Sokołowska-Kulczycka, A. (1959). Apomiksja u *Leontopodium alpinum* Cass. *Acta Biologica Cracoviensia, Serie Botanica*. **2**, 51-63.

Speroni, E., Schwaiger, S., Egger, P., Berger, A.T., Cervellati, R., Govoni, P., Guerra, M.C. y Stuppner, H. (2006). In vivo efficacy of different extracts of edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*. **105**(3), 421–426.

Stowe, B.B. y Yamaki, T. (1959). Gibberellins: stimulants of plant growth: thirty years' work in Japan has initiated world-wide research with a a novel group of plant hormones. *Science*. **129**, 807-816.

Street, H.E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. En: Plant tissue and cell culture. Ed. Street H. E. (Oxford, Blackwell Scientific Publishing), 61-102.

Stuppner, H., Ellmerer, E. P., Ongania, K. H. y Dobner, M. J. (2002). Bisabolane derivatives from *Leontopodium alpinum*. *Helvetica Chimica Acta*. **85**, 2982–2989.

Subbaraj, A.K., Funnell, K.A. y Woolley, D.J. (2010). Dormancy and flowering are regulated by the reciprocal interaction between cytokinin and gibberellin in *Zantedeschia*. *Journal of Plant Growth Regulation*. **29**(4), 487-499.

Suh, J.K., Lee, A.K. y Lee, J.S. (2000). Flowering Response of *Ornithogalum* as Influenced by Temperature and Plant Growth Regulators Treatment. *Acta Horticulturae* (ISHS). **541**, 335-341.

Sujatha, G. y Kumari, B.R. (2007). High-frequency shoot multiplication in *Artemisia vulgaris* L. using thidiazuron. *Plant Biotechnology Reports*. **1**(3), 149-154.

Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fotoperiodismo. En: Fisiología vegetal. Vol.2 Crecimiento y desarrollo. (Publicacions de la Universitat Jaume I, Castelló de la Plana). 1093-1111.

Takayama, S. y Akita, M. (2006). Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. En: *Plant Tissue Culture Engineering*. Gupta, S.D. e Ibaraki, Y. eds. (Amsterdam, Springer). Vol.6. 83-100.

Tanurdzic, M., Vaughn, M.W., Jiang, H., Lee, T.J., Slotkin, R.K., Sosinski, B., Thompson, W.F., Doerge, R.W. y Martienssen, R.A. (2008). Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. *PLoS biology*. **6**, 2880-2895.

Thomas, B. y Vince-Prue, D. (1997). The physiology of photoperiodic floral induction. En: *Photoperiodism in plants*. (London, Academic Press). 143-179.

Thorpe, T.A. (2006). History of Plant Tissue Culture. En: *Plant Cell Culture Protocols: Methods in Molecular Biology*. Eds. V.M. Loyola-Vargas y F. Vázquez-Flota, (USA , Humana Press) Segunda edición. **318**(393), 59-86.

Trejgell, A., Szczepanek, D., Domzalska, L. y Tretyn, A. (2010). *In vitro* propagation of *Leontopodium alpinum* Cass. from various explants of seedlings. *Propagation of ornamental plants*. **10** (2), 81-87.

Turck, F., Fornara, F. y Coupland, G. (2008). Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annual Review of Plant Biology*. **59**, 573-594.

Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Walters, S.M. y Webb, D.A. (1976). *Leontopodium*. En: *Flora europaea*. Vol.4., (Cambridge, The university Press). 132.

Tzvelov, N.N., Fedorov, A.A. (2002). *Leontopodium*. En: *Flora of Russia: the European part and bordering regions*. Vol.7., Balkema A. A. ed., (Rotterdam, Brookfield). 320.

Vasil, I.K. (1960). Studies of pollen germination of certain *Cucurbitaceae*. *American Journal of Botany*. **47**(4), 239-248.

Vieira, M.R.S., Souza A.V., Santos C.M.G., Alves L.S., Cerqueira R.C., Paes R.A., Souza A.D. y Fernandes L.M.S. (2011). Stem diameter and height of chrysanthemum cv. Yoko

Ono as affected by gibberellic acid. *African Journal of Biotechnology*. **10**(56), 11943-11947.

Villar Pérez, L., Sesé Franco, J.A. y Ferrández Palacio, J.V. (2001). *Leontopodium alpinum* Cass. subsp. *alpinum*. En: Atlas de la Flora del Pirineo Aragonés. Vol.2.,(Huesca, Instituto de Estudios Altoaragoneses-Consejo de Protección dela Naturaleza). 266.

Vinocur, B., Carmi, T., Altman, A. y Ziv, M. (2000). Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media. *Plant Cell Reports*. **19**(12), 1146-1154.

von Arnold, S. y Eriksson, T. (1981). *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contortu*. *Canadian Journal of Botany*. **59**, 870-874.

Wadl, P.A., Dattilo, A.J., Vito, L.M. y Trigiano, R.N. (2011). Shoot organogenesis and plant regeneration in *Pytiopsis ruthii*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **106**, 513-516.

Wagenitz, G. (1979). *Leontopodium alpinum*. En: Illustrierte Flora Mitteleuropa Band VI, Teil 3. Hegi G., ed., (Berlin, Paul Parley). 131-136.

Wang, J.W., Czech, B. y Weigel, D. (2009). miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*. **138**(4), 738-749.

Wellensiek, S.J. (1958). Vernalization and age in *Lunaria biennis*. *Kon. Ned. Akad. Wet.,Proc. Ser. C*. **61**, 561-571.

Wellensiek, S.J. (1985).*Campanula medium*. En: CRC hand-book of flowering, vol. 2. Halevey, A.H. ed. (CRC Press, BocaRaton). 123–126.

Wellmer, F. y Riechmann, J.L. (2010). Gene networks controlling the initiation of flower development. *Trends in Genetics*. **26**(12), 519-527.

Went, F.W. (1944a) .Plant growth under controlled conditions. II. Thermoperiodicity in growth and fruiting of the tomato. *American Journal of Botany*.**31**, 135-149.

- Went, F.W.** (1944b). Plant growth under controlled conditions. III. Correlation between various physiological processes and growth in the tomato plant. *American Journal of Botany*. **31**, 537-596.
- White, P.R.** (1963). The cultivation of plant and animal cells, Segunda edición. Ronal Press Co., New York.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U. y Weigel, D.** (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*. **309**(5737), 1056-1059.
- Wildi, E., Schaffner, W., y Büter, K.B.** (1998). *In vitro* propagation of *Petasites hybridus* (Asteraceae) from leaf and petiole explants and from inflorescence buds. *Plant Cell Reports*. **18**(3-4), 336-340.
- Yin, X., Kropff, M.J. y Goudriaan, J.** (1996). Differential effects of day and night temperature on development to flowering in rice. *Annals of Botany*. **77**(3), 203-213.
- Zalewska, M. y Antkowiak, M.** (2013). Gibberellic Acid Effect on Growth and Flowering of *Ajania Pacifica*/Nakai/Bremer et Humphries. *Journal of Horticultural Research*. **21**(1), 21-27.
- Zapartan, M.** (1996). Conservation of *Leontopodium alpinum* using *in vitro* techniques in Romania. *Botanic Gardens Micropropagation News*. **2**, 26-29.
- Zeevaart, J.A.D.** (1983). Gibberellins and flowering. En: The biochemistry and physiology of gibberellins. Vol.2. Crozier, A. ed. (New York, Praeger). 333-374.
- Ziv, M.** (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. **81**, 277-285.