

# Análisis molecular y micropropagación de *Helianthemum inaguae* Marrero Rodr., González-Martín & González-Artiles y *Pericallis hadrosoma* (Svent.) B. Nord.



Autora: Isabel Santana López

Directores: F. Valdés González, J. Caujapé Castells y J. C. Luis Jorge

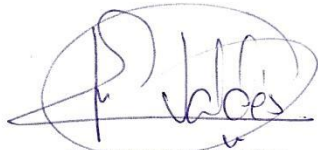


El Dr. Francisco Valdés González, profesor titular del Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de la ULL, el Dr. Juli Caujapé-Castelles, Director del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" –Unidad Asociada CSIC y de la cátedra UNESCO-Unitwin para la conservación de la biodiversidad vegetal en Macaronesia y el oeste de África y el Dr. J. C. Luis Jorge,

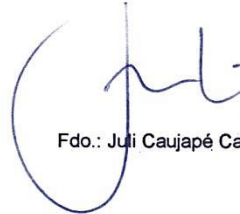
CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación resumido en la memoria titulada "ANÁLISIS MOLECULAR Y MICROPROPAGACIÓN DE *HELLANTHEMUM INAGUAE* Y *PERICALLIS HADROSOMA*", ha sido realizado bajo nuestra dirección y tutela por la Lcda. M<sup>a</sup> Isabel Santana López, como alumna adscrita al área de Fisiología Vegetal del departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de la Universidad de La Laguna. Considerando que el mencionado trabajo reúne las condiciones de calidad y rigor científico, autorizamos su presentación y defensa ante un tribunal nombrado al efecto, para optar al grado de Doctora en Biología.

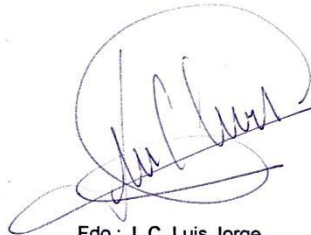
Y para que conste y sufra los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en San Cristóbal de La Laguna, a 10 de diciembre de 2015.



Fdo.: F. Valdés González



Fdo.: Juli Caujapé Castells.



Fdo.: J. C. Luis Jorge





**TESIS DOCTORAL**

**Análisis molecular y Micropropagación de *Helianthemum  
inaguae* Marrero Rodr., González-Martín & González-Artiles y  
*Pericallis hadrosoma* (Svent.) B. Nord.**

**Isabel Santana López**

**Año 2015**



**A mis hermanas, Lore y Rita**



## **Agradecimientos**

Al Cabildo de Gran Canaria, por concederme la beca que hizo posible que realizara este trabajo.

A mis directores, Paco, Juli y Cristo, por haber dedicado su tiempo al desarrollo de esta tesis. Especialmente a Paco, por no perder nunca la confianza en mí y por su amistad durante estos años.

A todo el personal del vivero del Jardín Canario, que me prestó su ayuda en todos los momentos que necesité de sus servicios, especialmente a Antonio y a Pepe Cruz. Y a Oswaldo, por su buen humor.

A David Bramwell y a Tano Navarro, por apoyarme en todo los trabajos que realicé durante los años que trabajé en el jardín.

A Pepe Naranjo, por su apoyo y cariño durante todos estos años. Sin su ayuda habría sido mucho más difícil, por no decir imposible.

A Pedro Sosa, porque siempre me ha animado y ha estado dispuesto a ayudarme en todo lo que necesitaba.

A Blas Vilches, por su amistad, su compañía y su ayuda durante todo el tiempo que compartimos.

A todas las personas con las que compartí todos esos años en el jardín y que contribuyeron de alguna forma a hacerme la vida más fácil, a Felicia, Óscar, Ruth, Moisés, Miguel, Nereida, Leticia, Yolanda, Águedo, Dulce, Magui y un largo etc.

A Miriam y a Marco, por todos los buenos momentos que vivimos por Inagua y por otros lugares inolvidables.

A mis compañeros y compañeras del Servicio de Biodiversidad, por enseñarme la dura realidad de la conservación en Canarias. Especialmente a Sonia, Michel, Ángel (gracias por los consejos estadísticos), Gorgonio, Pepe y Rogelio (por su continua motivación).

A Augusto, Carmen, Maite y Héctor, por haberme ofrecido un lugar en el que hacer más agradable mis estancias en La Laguna.

A mis padres, Adela y Agustín, por haber contribuido a mis estudios y apoyarme en todas mis decisiones.

A Lore, Nacho, Lucía, Rita y Lázaro, por estar siempre presente y dispuestos a echar una mano.

A Juan, por su apoyo, compañía y cariño cuando más me hacía falta.

Índice general





## Contenido

1.	La protección de la biodiversidad.....	25
2.	Especies objeto de estudio.....	35
2.1	<i>Helianthemum inaguae</i> Marrero Rodr., González-Martín & González-Artiles 35	
2.2	<i>Pericallis hadrosoma</i> (Svent.) B. Nord.....	43
3.	Objetivos.....	55
4.	Micropropagación .....	59
4.1	El cultivo de tejidos vegetales in vitro.....	59
4.1.1	La propagación <i>in vitro</i> .....	61
4.1.2	Etapas del cultivo de tejidos in vitro .....	63
4.1.3	Establecimiento de las condiciones de esterilidad .....	65
4.1.4	Medios de cultivo .....	67
4.1.5	Ventajas y desventajas del cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .....	69
4.1.6	La aplicación del cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> a la conservación de las especies.....	72
4.2	Materiales y métodos .....	75
4.2.1	Material vegetal: procedencia .....	75
4.2.2	Esterilización del material vegetal.....	77

4.2.3	Medios de cultivo .....	80
4.2.4	Establecimiento <i>in vitro</i> .....	82
4.2.5	Multiplicación .....	84
4.2.6	Elongación .....	85
4.2.7	Enraizamiento.....	85
4.2.8	Siembra e incubación .....	86
4.2.9	Aclimatación .....	86
4.2.10	Toma de datos y análisis.....	90
4.3	Resultados .....	91
4.3.1	Micropropagación de <i>Helianthemum inaguae</i> .....	91
4.3.2	Discusión.....	110
4.3.3	Micropropagación de <i>Pericallis hadrosoma</i> .....	115
4.3.4	Discusión.....	135
5.	Análisis genético .....	143
5.1	Introducción .....	143
5.1.1	Medida de la diversidad genética intrapoblacional .....	147
5.1.2	Medida de la diversidad genética interpoblacional .....	149
5.2	Materiales y métodos.....	153

5.2.1	Recolección del material vegetal .....	153
5.2.2	Análisis genético.....	157
5.2.3	Extracción de ADN.....	158
5.2.4	Evaluación cualitativa y cuantitativa del ADN.....	160
5.2.5	Purificación del ADN.....	162
5.2.6	Amplificación del ADN.....	163
5.2.7	Visualización de los patrones de polimorfismo RAPD.....	165
5.2.8	Interpretación de bandas .....	167
5.2.9	Análisis de datos.....	168
5.3	Resultados del análisis genético de <i>Helianthemum inaguae</i> .....	169
5.3.1	Extracción de ADN.....	169
5.3.2	Cebadores y amplificación .....	169
5.3.3	Diversidad genética de la población natural de <i>Helianthemum inaguae</i> 170	
5.3.4	Fidelidad genética de las plantas obtenidas <i>in vitro</i> .....	174
5.4	Discusión .....	177
5.5	Resultados del análisis genético de <i>Pericallis hadrosoma</i> .....	180
5.5.1	Extracción de ADN.....	180
5.5.2	Cebadores y amplificación .....	180

5.5.3	Diversidad genética de las poblaciones naturales de <i>Pericallis hadrosoma</i> .....	181
5.5.4	Fidelidad genética de las plantas obtenidas <i>in vitro</i> .....	188
5.6	Discusión.....	192
5.7	Implicaciones para la conservación de <i>Helianthemum inaguae</i> y <i>Pericallis hadrosoma</i> .....	201
6.	Conclusiones.....	205
6.1	Micropropagación de <i>Helianthemum inaguae</i> y <i>Pericallis hadrosoma</i> 205	
6.2	Análisis genético de <i>Helianthemum inaguae</i> y <i>Pericallis hadrosoma</i>	207
7.	Bibliografía .....	211
8.	Anexo.....	237

## Índice de tablas y figuras





## Índice de tablas

Tabla 2.1. Tamaño poblacional de *H. inaguae* según los seguimientos realizados en los últimos años.

Tabla 2.2. Tamaño poblacional de *P. hadrosoma* según los seguimientos realizados en los últimos años.

Tabla 4.1. Tratamientos de esterilización aplicado a *P. hadrosoma*.

Tabla 4.2. Formulación de los medios de cultivo utilizados en el cultivo de *H. inaguae* y de *P. hadrosoma*.

Tabla 4.3. Concentraciones de los reguladores ensayados en la fase de multiplicación.

Tabla 4.4. Concentraciones de IBA ensayadas en la fase de enraizamiento.

Tabla 4.5. Multiplicación de yemas apicales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de KIN. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 4.6. Multiplicación de segmentos nodales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de KIN. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 4.7. Multiplicación de yemas apicales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de BA. Para cada medio, distintas letras

muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 4.8. Multiplicación de segmentos nodales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de BA. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 4.9. Porcentajes de formación de tejidos hiperhídricos observados en el cultivo de yemas apicales.

Tabla 4.10. Porcentajes de formación de tejidos hiperhídricos observados en el cultivo de segmentos nodales.

Tabla 4.11. Resultados obtenidos en la etapa de enraizamiento de *H. inaguae*: nº de raíces y longitud (cm). Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 4.12. Resultados obtenidos en la esterilización de los explantos de *P. hadrosoma*: porcentaje de contaminación; tipo de contaminación (cont.) y porcentaje de necrosamiento (nec.).

Tabla 4.13. Multiplicación de yemas apicales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de KIN. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 4.14. Multiplicación de segmentos nodales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de KIN. Para cada medio, distintas letras

muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 4.15. Multiplicación de yemas apicales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de BA. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 4.16. Multiplicación de segmentos nodales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de BA. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 4.17. Porcentajes de formación de tejidos hiperhídricos observados en el cultivo de yemas apicales.

Tabla 4.18. Porcentajes de formación de tejidos hiperhídricos observados en el cultivo de segmentos nodales.

Tabla 4.19. Resultados obtenidos en la etapa de enraizamiento de *P. hadrosoma*: nº de raíces y longitud (cm). Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

Tabla 5.1. Número de ejemplares de la población de *H. inaguae* y número de muestras recolectadas (junio de 2006).

Tabla 5.2. Número de ejemplares de las poblaciones de *P. hadrosoma* y número de muestras recolectadas (mayo de 2006).

Tabla 5.3. Códigos y numeración de las muestras de ADN para cada población/núcleo de *H. inaguae* y *P. hadrosoma*.

Tabla 5.4. Secuencia y nombre de los cebadores utilizados en las amplificaciones de las dos especies objeto de esta tesis doctoral.

Tabla 5.5. Parámetros descriptores de la estructura genética de *H. inaguae*; *n*: nº muestras; *na*: nº de alelos observado; *ne*: nº efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964); *h*: diversidad genética de Nei (1973); *I*: índice de Shannon (Lewontin, 1972); *P*: % de polimorfismo.

Tabla 5.6. Valores del test de neutralidad para los 90 loci polimórficos obtenidos en la población natural de *H. inaguae*.

Tabla 5.7. Comparación de los parámetros descriptores de la estructura genética de *H. inaguae* con el grupo de plantas obtenidas *in vitro*; *n*: nº muestras; *na*: nº de alelos observado; *ne*: nº efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964); *h*: diversidad genética de Nei; *I*: índice de Shannon (Lewontin, 1972); *P*: % de polimorfismo.

Tabla 5.8. Bandas exclusivas presentes en los ejemplares de *H. inaguae* analizados.

Tabla 5.9. Valores de diversidad genética observados en *H. inaguae* y su comparación con otras especies amenazadas, obtenidos mediante RAPD.

Tabla 5.10. Parámetros descriptores de la estructura genética de *P. hadrosoma*; *n*: nº muestras; *na*: nº de alelos observado; *ne*: nº efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964); *h*: diversidad genética de Nei (1973); *I*: índice de Shannon (Lewontin, 1972); *P*: % loci polimórficos.

Tabla 5.11. Valores del test de neutralidad para 28 loci polimórficos en la población Roque Sardina.

Tabla 5.12. Valores del test de neutralidad para 24 loci polimórficos en la población de La Portillada.

Tabla 5.13. Valores de Identidad genética de Nei (encima de la diagonal) y distancia genética de Nei (1978) (debajo de la diagonal) entre las poblaciones de *P. hadrosoma* muestreadas.

Tabla 5.14. Valores de  $F_{ST}$  (encima de la diagonal) y de  $Nm$  (debajo de la diagonal) obtenidos para las poblaciones de *P. hadrosoma*.

Tabla 5.15. Análisis de la varianza para las poblaciones naturales de *P. hadrosoma*.  $GL$ : grados de libertad;  $F_{st}$ : coeficiente de diferenciación genética entre todas las poblaciones (\* $p < 0,005$ ).

Tabla 5.16. Comparación de los parámetros descriptores de la estructura genética de *P. hadrosoma* con el grupo de plantas obtenidas *in vitro*;  $n$ : nº muestras;  $na$ : nº de alelos observado;  $ne$ : nº efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964);  $h$ : diversidad genética de Nei;  $l$ : índice de Shannon (Lewontin, 1972);  $P$ : % polimorfismo.

Tabla 5.17. Poblaciones de *P. hadrosoma* en las que se observó la presencia de bandas exclusivas.

Tabla 5.18. Bandas compartidas entre pares de poblaciones de *P. hadrosoma* y el grupo de plantas procedentes de cultivo.

Tabla 5.19. Valores de diversidad genética observados en *P. hadrosoma* y comparación con otras especies amenazadas, obtenidos mediante RAPD.

\*Valores para Gran Canaria.

Tabla 5.20. Distancia geográfica (m) (encima de la diagonal) y distancia genética de Nei (1978) (debajo de la diagonal) entre las poblaciones naturales de *P. hadrosoma*.

## Índice de figuras

Figura 2.1. Distribución de *H. inaguae* en los Andenes de Tasarte. Grafcan ©.

Figura 2.2. Ejemplares de *H. inaguae* en floración y en fructificación.

Figura 2.3. Distribución de *P. hadrosoma* en El Salado. Grafcan ©.

Figura 2.4. Ejemplares de *P. hadrosoma* en El Salado (izda.) y en La Portillada (dcha.).

Figura 2.5. Distribución de *P. hadrosoma* en Tenteniguada. Grafcan ©.

Figura 2.6. Distribución de *P. hadrosoma* en La Portillada. Grafcan ©.

Figura 2.7. Distribución de *P. hadrosoma* en Roque Sardina y Roque Cayo. Grafcan ©.

Figura 4.1. Principales métodos de propagación *in vitro*. Extraído de George & Debergh *in* George et al., 2008.

Figura 4.2. Medios de cultivo comerciales de uso frecuente en la micropropagación de plantas. Fte. Catálogo Sigma-Aldrich.

Figura 4.3. Detalle de la semilla (10x) y del fruto (7x) de *H. inaguae*.

Figura 4.4. Recolección del material vegetal de *P. hadrosoma* y detalle de los segmentos antes de la esterilización.

Figura 4.5. Esquema de la micropropagación de *H. inaguae*.



Figura 4.6. Esquema de la micropropagación de *P. hadrosoma*.

Figura 4.7. Porcentaje de germinación y tiempo (en semanas) transcurrido para alcanzar el máximo de la germinación para cada tratamiento.

Figura 4.8. Detalle de la germinación de semillas *in vitro* de *H. inaguae*.

Figura 4.9. Representación de los valores de multiplicación para el cultivo en medios con KIN (concentración de KIN en mg/l)

Figura 4.10. Multiplicación de segmentos nodales (izda.) y yemas apicales (dcha.) en medio MS con KIN.

Figura 4.11. Multiplicación de segmentos nodales en medio MS modificado con KIN.

Figura 4.12. Representación de los valores de multiplicación para el cultivo en medios con BA (concentración de BA en mg/l)

Figura 4.13. Multiplicación de segmentos nodales (izda.) y yemas apicales (dcha.) en medio MS con BA.

Figura 4.14. Multiplicación de yemas apicales en medio MS modificado con BA.

Figura 4.15. Representación de los porcentajes de hiperhidricidad para todos los medios ensayados en función de la concentración de cada regulador (KIN y BA).

Figura 4.16. Formación de tejidos hiperhídricos en el cultivo de segmentos nodales (arriba) y de yemas apicales (abajo).

Figura 4.17. Valores obtenidos en el enraizamiento de *H. inaguae* para cada concentración de IBA ensayada (mg/l)

Figura 4.18. Plantas enraizadas en medio MS modificado (izda.) y en medio MS, sin IBA.

Figura 4.19. Plantas de *H. inaguae* tras su aclimatación.

Figura 4.20. Representación de los valores de multiplicación para el cultivo en medios con KIN. Concentración de KIN en mg/l.

Figura 4.21. Multiplicación de segmentos nodales (izda.) y de yemas apicales (dcha.) en medio MS mod. con KIN

Figura 4.22. Multiplicación de segmentos nodales (izda.) y de yemas apicales (dcha.) en medio MS con KIN.

Figura 4.23. Representación de los valores de multiplicación para el cultivo en medios con BA. Concentración de BA en mg/l.

Figura 4.24. Multiplicación en medio MS con BA.

Figura 4.25. Multiplicación en medio MS modificado con BA.

Figura 4.26. Representación de los porcentajes de hiperhidricidad para todos los medios ensayados en función de la concentración del regulador de crecimiento.

Figura 4.27. Formación de tejidos hiperhídricos en el cultivo de segmentos nodales (arriba) y de yemas apicales (abajo).

Figura 4.28. Valores obtenidos en el enraizamiento de *P. hadrosoma* para cada concentración de IBA ensayada (mg/l)

Figura 4.29. Enraizamiento de *P. hadrosoma*. Arriba MS modificado + 0,5 IBA (izda) y MS modificado sin reguladores. Abajo medio MS sin reguladores.

Figura 4.30. Plantas aclimatadas de *P. hadrosoma*.

Figura 5.1. Ejemplos de geles de agarosa correspondientes a la electroforesis realizada para la valoración de las muestras. La numeración corresponde a la detallada en la Tabla 5.3.

Figura 5.2. Ejemplo de gel de agarosa correspondiente a la electroforesis de los productos de amplificación de *H. inaguae* con el cebador OPA-4.

Figura 5.3. Gel de agarosa correspondiente a la electroforesis de los productos de amplificación con el cebador OPK-7 para todas las muestras de *H. inaguae*..

Figura 5.4. Análisis de coordenadas principales para los ejemplares analizados de *H. inaguae*.

Figura 5.5. Análisis de coordenadas principales para los ejemplares analizados de *H. inaguae*, incluyendo las muestras de las plantas obtenidas *in vitro*.

Figura 5.6. Gel de agarosa correspondiente a la electroforesis de los productos de amplificación con el cebador OPN-6 para algunas de las muestras de *H. inaguae*.

Figura 5.7. Gel de agarosa correspondiente a la electroforesis de los productos de amplificación con el cebador OPN-16 para todas las muestras de *P. hadrosoma*.

Figura 5.8. Análisis de coordenadas principales para los ejemplares analizados de las poblaciones naturales de *P. hadrosoma*.

Figura 5.9. Análisis de coordenadas principales para los ejemplares analizados de *P. hadrosoma*, incluyendo las muestras de las plantas obtenidas *in vitro*.

Figura 5.10. Gel de agarosa correspondiente a la electroforesis de los productos de amplificación con el cebador OPK-7 para todas las muestras de *P. hadrosoma*.



## Glosario





## **Glosario de siglas y abreviaturas**

ADN: ácido desoxirribonucleico

BA: benciladenina

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio

DKW: Driver Kuniyuki Walnut

EDTA: ácido etilen diamino tetra acético

ISSR: inter-microsatélites

JBCVCSIC: Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” – Unidad asociada al CSIC

KIN: quinetina

MS: Murashige & Skoog

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

SEGA: seguimiento de poblaciones de especies amenazadas

SEVAG: cloroformo/alcohol isoamílico

TBE: Tris-borato EDTA

WPM: Woody Plant Medium



## Capítulo 1

# La protección de la biodiversidad



## **1. La protección de la biodiversidad**

Desde los inicios del siglo XX se han abordado numerosas iniciativas de protección de la fauna y de la flora silvestre. En las primeras etapas de redacción y firma de convenios o de creación de normativa para la protección de las especies silvestres, estos documentos estaban destinados casi exclusivamente a la protección de la fauna e, incluso, del tipo de fauna que pudiera reportar algún beneficio al ser humano. Durante los últimos años del siglo XX será cuando se empiece a hacer efectiva la protección de las especies amenazadas, incluyendo además la protección de hábitats naturales como medida para salvaguardar la biodiversidad en Europa.

Aunque existe multitud de tratados, convenios, normas, etc., se ha intentado realizar una síntesis con los documentos más relevantes, que han supuesto un cambio real en el tipo de protección de las especies silvestres, principalmente en Europa y, más concretamente en el estado español y en Canarias.

La primera norma internacional para la defensa de la vida silvestre, jurídicamente vinculante, la constituye el Convenio Internacional para la Protección de las Aves útiles a la Agricultura, firmado en París el 19 de marzo de 1902 (Ferrero-García, 2012). Es uno de los primeros tratados mundiales que se centra en la protección de determinadas especies de aves; si bien, la protección de las mismas tenía un fin más centrado en la agricultura, y por tanto de carácter económico, que en las especies a proteger.

Unas décadas más tarde, en 1933, se firmó en Londres el Convenio relativo a la conservación de la fauna y flora, el cual promueve la necesidad de protección de determinadas especies que hayan sido consideradas como especies raras o amenazadas. Fue adoptado por la Convención relativa a la preservación de la

## ***Capítulo 1. La protección de la biodiversidad***

flora y de la fauna en su estado natural en África, y estaba dirigido a la preservación de especies en peligro de extinción de los territorios colonizados.

En 1971 se llevó a cabo una convención internacional en Ramsar (Irán) sobre protección de las aves acuáticas y las zonas húmedas. Esta reunión, conocida como Convención Ramsar, tenía como objetivo alcanzar un uso racional de todos los humedales, con la creación de una lista de Humedales de Importancia Internacional (Lista Ramsar), que garantizara un manejo más eficaz y una mayor cooperación entre países con áreas de humedales y de especies compartidas. Entró en vigor en 1975, y es considerado el más antiguo de los acuerdos intergubernamentales adoptados sobre el medio ambiente ([www.ramsar.org](http://www.ramsar.org)). El Convenio Ramsar fue ratificado por España en 1982, con la publicación en el BOE del Instrumento de 18 de mayo de 1982 de adhesión de España al Convenio relativo a Humedales de Importancia Internacional, especialmente como hábitat de aves acuáticas, hecho en Ramsar el 2 de febrero de 1971 (BOE nº 199, de 20 de agosto de 1982).

La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) es un acuerdo internacional que tiene como finalidad velar por que el comercio internacional de especies silvestres no constituya una amenaza para su supervivencia ([www.cites.org](http://www.cites.org)). Podría considerarse como uno de los primeros catálogos de protección de especies silvestres, tanto animales como vegetales. Fue firmado en Washington el 3 de marzo de 1973, convirtiéndose en un instrumento jurídico internacional para regular la exportación e importación de especies silvestres amenazadas. La adhesión de España a este convenio tuvo lugar el 16 de mayo de 1986, mediante el Instrumento de Adhesión de España al Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, hecho en Washington el 3 de marzo de 1973 (BOE nº 181, de 30 de julio de 1986).

## *Capítulo 1. La protección de la biodiversidad*

En 1979 se firmó en la ciudad de Bonn el Convenio sobre conservación de las especies migratorias de la fauna silvestre, conocido como Convenio de Bonn. Tiene como objetivo la protección de las especies de aves migratorias mediante la adopción de acuerdos entre los distintos países que forman parte de sus áreas de distribución. Estas medidas se centran principalmente en los hábitats, con especial atención a aquellas especies con un estado de conservación desfavorable. Incluye dos apéndices, el Apéndice I, que incluye a las especies migratorias que se consideran amenazadas y el Apéndice II, que alberga a las especies migratorias que necesitan o se beneficiarían considerablemente de una cooperación internacional ([www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es)). Su incorporación al régimen jurídico europeo se realizó a través de la Decisión 82/461/CEE del Consejo, de 24 de junio, relativa a la celebración del Convenio sobre conservación de las especies migratorias de la fauna silvestre (Convenio de Bonn). En España, fue ratificado en 1985, mediante el Instrumento de Ratificación de la Convención sobre la Conservación de las Especies Migratorias de Animales Silvestres, hecho en Bonn el 23 de junio de 1979 (BOE nº 259, de 29 de octubre de 1985).

El Convenio de Berna, Convenio relativo a la Conservación de la Vida Silvestre y del Medio Natural en Europa, fue firmado en septiembre de 1979. Tiene por objetivo promover la cooperación entre los estados firmantes para garantizar la conservación de la fauna y de la flora silvestres, así como de sus hábitats naturales. Incluye un listado o catálogo de especies protegidas, tanto de fauna como de flora, así como los medios y métodos de caza y otras formas de protección prohibidos. Tiene como novedad el establecimiento de medidas de protección para las especies incluidas en sus anexos, como son, en el caso de las especies de flora, la prohibición de recolectar, cortar o desarraigar los ejemplares; o bien, en el caso de la fauna, la captura, posesión o muerte intencionadas, la perturbación de zonas de reproducción, etc. Se incorporó al ordenamiento jurídico europeo mediante la Decisión 82/72/CEE del Consejo, de

## *Capítulo 1. La protección de la biodiversidad*

3 de diciembre de 1981, referente a la celebración del Convenio relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural de Europa. En España, este Convenio fue ratificado en 1986, mediante el Instrumento de ratificación del Convenio relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural en Europa, hecho en Berna el 19 de septiembre de 1979 (BOE nº 235, de 1 de octubre de 1986).

El mismo año de la adopción del Convenio de Berna, fue aprobada la Directiva 79/409/CEE relativa a la conservación de las aves silvestres, conocida como Directiva Aves. Ha tenido una gran relevancia en la protección de las aves silvestres que viven en estado salvaje en el territorio europeo y ha supuesto la obligación, para los estados miembros, de adoptar medidas de protección de los hábitats de determinadas especies mediante la designación de Zonas de Especial Protección para las Aves (ZEPA). Entró en vigor en España mediante el Real Decreto 1997/1995, de 7 de diciembre, derogado por la Ley 42/2007, de 13 de diciembre. En 2009 se publicó una nueva Directiva Aves (D2009/147/CE), que venía a sustituir (y derogaba) la publicada en 1979, pero en la que prevalece la misma filosofía de protección y conservación de la primera.

En 1992 se aprueba la Directiva 92/43/CEE relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestre, la Directiva Hábitat. En este documento, además de la protección estricta de numerosas especies, se recoge un listado de hábitats naturales que deben ser protegidos mediante la designación de Zonas Especiales de Conservación (ZEC).

Además, en 1992 tuvo lugar la Cumbre de la Tierra, celebrada en Río de Janeiro, que culminó en la redacción del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD), considerado como uno de los grandes acuerdos internacionales en materia de conservación del medio natural en general y de las especies en particular. Dicho documento aborda la diversidad biológica en sus tres dimensiones: ecosistemas,



## *Capítulo 1. La protección de la biodiversidad*

especies y recursos genéticos, y establece que su conservación debe ser preocupación común para la humanidad y formar parte del proceso de desarrollo. En su artículo 12 Investigación y capacitación, el CBD prevé que “las partes contratantes, promoverán y fomentarán la investigación que contribuya a la conservación y a la utilización sostenible de la diversidad biológica [...]”,

En el ámbito estatal, de acuerdo por lo previsto en la ya derogada Ley 4/1989, de 27 de marzo, se crea en 1990 el primer catálogo de especies protegidas, el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (Real Decreto 439/1990, de 30 de marzo). En este documento y en las posteriores actualizaciones, se recogía un conjunto de especies a las que se aplicó un régimen de protección, con distintas categorías, y con el establecimiento de una serie de prohibiciones y restricciones cuyo incumplimiento llevaba asociado un régimen sancionador.

Tanto la Ley 4/1989, de 27 de marzo, como el RD 439/1990, de 30 de marzo, fueron derogados con la aprobación de la Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad, modificada recientemente por la Ley 33/2015, de 21 de septiembre.

La Ley 42/2007, de 13 de diciembre, supone una adaptación del CBD, así como la incorporación de las figuras de protección que no habían sido incluidas en la Ley 4/1989, de 27 de marzo: Red Natura 2000 (ZEPA y LIC/ZEC) y las Reservas de la Biosfera. Asimismo, esta ley crea determinados instrumentos para la gestión de la biodiversidad (Inventario y Plan Estratégico del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad; Catálogo Nacional de Hábitats en Peligro de Desaparición, Catálogo Español de Especies Amenazadas, Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial, etc.). Se crean además el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y el Catálogo Español de Especies Amenazadas, que serían aprobados posteriormente, en 2011, mediante el Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero.

## Capítulo 1. La protección de la biodiversidad

La Ley 42/2007, de 13 de diciembre, establece, como complemento a las acciones de conservación in situ, para las especies incluidas en el Catálogo Español de Especies Amenazadas, la obligación de impulsar el desarrollo de programas de cría o propagación fuera de su hábitat natural, en especial cuando tales programas hayan sido previstos en las Estrategias de conservación, o en los Planes de recuperación o conservación. Asimismo, con el fin de preservar el patrimonio genético y biológico de las especies silvestres y de integrar en los programas de conservación las operaciones *ex situ* e *in situ*, la ley establece que las Administraciones Públicas promoverán la existencia de una red de bancos de material biológico y genético y un Inventario Español de Bancos de Material Biológico y Genético de Especies Silvestres, en el que se incluirán todos los datos disponibles al efecto.

En el ámbito autonómico, la primera norma de protección de especies de flora silvestre en Canarias fue la Orden de 20 de febrero de 1991, de la Consejería de Política Territorial, sobre protección de especies de la flora vascular silvestre de la Comunidad Autónoma de Canarias. Este documento, aún vigente, contiene unos listados de especies para los que se establecieron diferentes categorías de protección, a las que se asoció una serie de prohibiciones y recomendaciones, así como la necesidad de solicitud de autorizaciones para el uso de las mismas, bajo criterios preestablecidos.

Posteriormente, en 2001, se aprobó el primer catálogo de protección de especies de Canarias, mediante el Decreto 151/2001, de 23 de julio. Este documento establecía diferentes categorías de protección para numerosas especies presentes en Canarias, basadas en la Ley 4/1989, de 27 de marzo. Además, se incluía la necesidad (y obligatoriedad) de establecer medidas de conservación mediante la aprobación de planes de recuperación, conservación o manejo, en función de la categoría de protección en que se incluyera la especie. Este catálogo fue finalmente sustituido por la Ley 4/2010, de 4 de junio, del

## ***Capítulo 1. La protección de la biodiversidad***

Catálogo Canario de Especies Protegidas, la cual constituye la normativa de protección autonómica más reciente. Aunque esta ley modificó notablemente los listados de protección de algunos grupos de especies, así como los criterios de evaluación anteriormente en vigor, sigue asumiendo la necesidad de establecer y ejecutar medidas y actuaciones de conservación en el marco de los planes de recuperación que se realicen para las especies protegidas que se incluyen en esta norma.

Tanto la normativa internacional, como la estatal y autonómica incorporan en sus objetivos la protección del medio ambiente y de la diversidad como una necesidad actual y futura. Dentro de la obligatoriedad que conlleva estas normas, se hace imprescindible la realización de estudios e investigaciones que permitan obtener la información necesaria para establecer adecuados programas de conservación y de recuperación de estas especies.



## Capítulo 2

# Especies objeto de estudio



## 2. Especies objeto de estudio

En este capítulo se ha querido destacar la información más relevante referida a las especies objeto de esta tesis: *Helianthemum inaguae* Marrero Rodr., González-Martín & González-Artiles y *Pericallis hadrosoma* (Svent.) B. Nord. Por ello, hemos incluido el presente capítulo fuera de los apartados de *Materiales y Métodos* que, por supuesto, serían su sitio protocolario.

### 2.1 *Helianthemum inaguae* Marrero Rodr., González-Martín & González-Artiles

*Helianthemum inaguae* es una especie de la familia *Cistaceae* conocida como “jarilla de Inagua”. Es descrita por Marrero y colaboradores (1995), como un nanofanerófito o caméfito leñoso, de porte erguido y poco denso, con una altura de entre 40 y 60 cm, alcanzando en ocasiones los 100 cm. Su ramificación es erecta en su parte más alta. Las hojas son lineares o linear-decusadas, glabras y verdes, algo lustrosas por ambas caras y de bordes ciliados. Las inflorescencias son en panículas cincinoideas, con racimos principales de entre 6,9 a 10,1 cm y con 4 a 10 flores. Flores de pétalos obovados unguiculados, de color amarillo. Los frutos, en cápsula elipsoidea trígona, son ligeramente tomentosos con pelos muy cortos, bi o trifurcados desde la base. Las semillas son numerosas (de 12 a 41), de color negruzco, angulosas y finamente tuberculadas. Es una especie monoica, que florece entre los meses de mayo y junio y fructifica entre junio y julio.

Habita en pequeños andenes, grietas y escarpes del límite inferior del pinar, en comunidades de *Pinetum canariensis* Esteve 1969 y de *Greenovio* – *Aeonietum caespitosi* Sunding 1972, entre los 1200 y 1400 metros sobre el nivel del mar (Marrero *et al.*, in Bañares *et al.*, 2003). Como especies acompañantes destacan *Asphodelus ramosus* ssp. *distalis*, *Descurainia preauxiana*, *Lavandula minutolii*,

## Capítulo 2. Especies objeto de estudio

*Aeonium simsii*, *Chrysoprenanthes pendula*, *Sonchus pinnatifidus*, *Echium onosmifolium*, *Chamaecytisus proliferus* y *Pinus canariensis*.

Hasta el momento, sólo se conoce una única población de esta especie, situada en los escarpes de la Montaña de Los Hornos, sobre los andenes de Tasarte, en el oeste de Gran Canaria (Ver Figura 2.1 y Figura 2.2 ). Sin embargo, su presencia en grietas y escarpes inaccesibles parece derivarse de una situación de refugio frente a la presencia de herbívoros en su área de distribución. La especie se distribuye en un área bastante limitada, en pequeñas repisas en las que ha sido posible la acumulación de suelo. A pie de risco, en el andén situado bajo estos escarpes (Andén de Cho Cabral), proliferan cada año numerosas plántulas a partir de las semillas que llegan al andén, procedentes de los ejemplares inaccesibles. Sin embargo, en las visitas realizadas a este andén se pudo comprobar, durante el periodo entre 2004 y 2008, que estas plántulas eran continuamente ramoneadas por los herbívoros, principalmente cabras, y no conseguían prosperar. Esta afección por parte de los herbívoros constituye la principal amenaza que afecta a *H. inaguae*, y que impide que pueda desarrollarse y alcanzar un estado de conservación óptimo.

Esta situación de fragilidad ha propiciado su inclusión en listas rojas, como la Lista Roja de la Flora Vascular Española (Moreno, 2011), en la que se le ha designado la categoría de “en peligro crítico” (CR), según criterios de la Unión Internacional de Protección de la Naturaleza (UICN). Además, se encuentra protegida mediante su inclusión en catálogos de protección legal. Así, la Ley 4/2010, de 4 de junio, del Catálogo Canario de Especies Protegidas (BOC nº 112, de 9 de junio de 2010), incluye a *H. inaguae* en su Anexo I, que incluye a aquellas especies en la categoría de “en peligro de extinción”. Además, posee protección a nivel estatal al estar incluida también en la categoría de “en peligro de extinción” en el Catálogo Español de Especies Amenazadas, aprobado según el Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de



Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas (BOE nº 46, de 23 de febrero de 2011).

Tanto la Ley 4/2010, de 4 de junio, como la Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad (BOE nº 299, de 14 de diciembre), establecen la obligatoriedad de redactar un plan de recuperación para las especies incluidas en la categoría de “en peligro de extinción”. De acuerdo con esta legislación, *H. inaguae* cuenta con un plan de recuperación aprobado mediante el Decreto 330/2011, de 22 de diciembre, por el que se aprueba el Plan de Recuperación de las especies vegetales “turmero peludo o jarilla peluda” y de la “jarilla de Inagua” (*Helianthemum bystropogophyllum* y *Helianthemum inaguae*) (BOC nº 3, de 4 de enero de 2012). Este documento contiene las medidas y actuaciones designadas para mejorar el estado de conservación de *H. inaguae* y que han ido desarrollándose a partir de su aprobación en 2012.

Por otro lado, el área de distribución de *H. inaguae* se sitúa dentro de los límites del Parque Rural del Nublo (C-11), que coincide territorialmente con la Zona Especial de Conservación ES7010039 El Nublo II (ZEC 40\_GC), perteneciente a la Red Natura 2000.

Desde su descripción en 1995, se han abordado diferentes trabajos de seguimiento de esta población. El primero, fue realizado en 2002 para el Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculosa Amenazada de España (Marrero *et al.*, in Bañares *et al.*, 2004). En este caso se contabilizó un total de 64 plantas adultas.

En 2005 esta especie fue incluida en el programa de Seguimiento de Poblaciones de Especies Amenazadas del Gobierno de Canarias (SEGA), realizándose una visita a su población con el fin de establecer su tamaño poblacional y valorar su estado de conservación. Se contabilizaron 5 ejemplares (Bonilla Perdomo & Santana López, 2005), no obstante, en este caso sólo se realizó el recuento de

## Capítulo 2. Especies objeto de estudio

las plantas que crecían en el andén de Cho Cabral, bajo las repisas inaccesibles que constituyen el núcleo principal, que no fue posible prospectar.

Posteriormente, en 2006 y con motivo de la realización de esta tesis, visitamos la población con el fin de recolectar muestras vegetales para este trabajo (Santana López, 2006). Se observaron 35 plantas, 32 de las cuales se situaban en repisas totalmente inaccesibles a los herbívoros y 3 en el andén bajo el grupo de mayor tamaño.

Tras el incendio ocurrido en la isla en 2007, y que afectó ampliamente al área de distribución de esta especie, se procedió a realizar el seguimiento de la misma (en el marco del proyecto SEGA), con el fin de verificar su estado de conservación tras este suceso. En esta ocasión, una semana tras el incendio, sólo se pudo comprobar la presencia de 11 ejemplares, algunos de los cuales presentaban evidentes signos de haber sido dañados por el fuego (Santana López & Naranjo Suárez, 2007). Durante el siguiente año, en 2008, se realizó un seguimiento periódico, con diferentes visitas a lo largo del año para estudiar su desarrollo tras el incendio. Durante este periodo, se pudo comprobar la recuperación paulatina de esta especie, con el desarrollo de numerosas plántulas y juveniles, ejemplares jóvenes aún sin florecer. Inicialmente se contabilizaron solo cinco ejemplares adultos y algunas plántulas, durante el mes marzo, mientras que a finales de octubre la población contaba con los cinco adultos iniciales, 33 juveniles y 182 plántulas (Hernández García & Santana López, 2008).

A partir de 2009 se inicia el proyecto “*LIFE07 NAT/E/000759 Restauración de pinares endémicos afectados por incendios forestales y recuperación de su flora y fauna*”, desarrollado hasta 2013, y que incluyó el seguimiento y la ejecución de medidas de conservación de *H. inaguae*. Con este trabajo se comprobó la recuperación de la especie tras el incendio, a la vez que se observaron algunas

fluctuaciones en su tamaño poblacional. Así, en 2009 se realizó un recuento exhaustivo de toda la población, donde se observaron 128 ejemplares adultos y 207 plántulas. La mayor parte de los efectivos se situaba en las repisas del núcleo principal (159 adultos y 19 plántulas), mientras que en el andén de Cho Cabral se contabilizaron 19 ejemplares adultos y 138 plántulas (Saturno Hernández, 2009). En los años siguientes sólo se visitó el núcleo situado en el andén, donde se contabilizaron 122 ejemplares adultos en 2010, 150 en 2011, 25 en 2012 y 21 en 2013 (Dracaena Consultoría Ambiental, 2014).

Es de destacar además que, en el marco de este proyecto, se estableció una parcela de reintroducción, en la que se plantaron 84 ejemplares procedentes de la germinación en vivero de semillas recolectadas en la población natural. Esta parcela se situó en la montaña de Los Hornos, completamente vallada para evitar el acceso de los herbívoros, y con la instalación de riego por goteo (Gesplán, 2011).

Los tamaños poblacionales observados en casa trabajo se muestran en la siguiente en la Tabla 2.1. Para establecer el tamaño poblacional no se han tenido en cuenta los ejemplares procedentes de los trabajos de reintroducción.

Tabla 2.1. Tamaño poblacional de *H. inaguae* según los seguimientos realizados en los últimos años.

Año de muestreo	Tamaño poblacional			Plántulas/juveniles
	Repisas	Andén de Cho Cabral	Total	
2002	64	0	-	-
2005	-	5	-	-
2006	32	3	35	-
2007	11	0	11	-
2008	5	0	5	+ 33 juveniles + 182 plántulas
2009	159	19	179	+ 207 plántulas
2010	-	122	-	+ 38 juveniles +15 plántulas
2011	-	150	-	+ 30 juveniles + 6 plántulas
2012	-	25	-	-
2013	-	21	-	-
2014	-	29	-	+ 4 juveniles

Como puede observarse en la tabla anterior, el número de ejemplares puede variar considerablemente entre distintos periodos, como ocurrió entre los años 2002 y 2006. Marrero y colaboradores señalan en algunas publicaciones (Marrero *et al.*, 1995; Marrero *et al.*, in Bañares *et al.*, 2004) que estas fluctuaciones pueden estar relacionadas con la existencia de efectos alelopáticos de los ejemplares adultos sobre las semillas presentes en el suelo, lo que inhibe su germinación.

Por otro lado, después del incendio se observó una notable recuperación del tamaño poblacional, con un incremento continuado durante distintos años consecutivos. En este caso, la elevada germinación de semillas en este periodo podría estar relacionada con el efecto de “escarificación” que produjo el fuego y/o la elevada temperatura durante el incendio de 2007 sobre el banco de semillas del suelo, con un incremento en la tasa de germinación. Además, la pérdida de prácticamente la totalidad de los adultos pudo también contribuir a

la germinación de semillas, mediante la eliminación de los efectos alelopáticos que ejercían los adultos sobre éstas.

Además del desarrollo de nuevos ejemplares en las repisas, se observó también un mayor incremento en la formación de nuevas plantas en el andén situado bajo las mismas. A ello habría también contribuido el desarrollo de algunas medidas de conservación ejecutadas durante el proyecto LIFE, ya que se llevó a cabo el cierre a los herbívoros del andén (y su eliminación en este entorno) mediante la colocación de un vallado. Esto propició enormemente que el desarrollo de las plántulas de este andén a partir del banco de semillas del suelo no estuviera limitado por la acción de los herbívoros. Estas plántulas llegaron incluso a convertirse en adultos y a fructificar con normalidad (Gesplán, 2011).

La posterior reducción del tamaño poblacional, observado durante los últimos años (2012-2014), puede estar relacionada con la recuperación de la dinámica natural de la población, donde el tamaño fluctúa de un periodo a otro. El hecho de que los últimos años hayan sido especialmente secos puede también estar afectando a esta especie. Este hecho se ha observado en otras especies del género *Helianthemum*, como es el caso de *Helianthemum juliae*, para la que se observó que la mortalidad de las plántulas de esta especie estaba relacionada con el régimen de precipitaciones de cada año (Marrero Gómez *et al.*, 2007).

Los ejemplares situados en la parcela con riego por goteo tuvieron una supervivencia mayor que los del andén, sin que se observara un gran declive en el número de ejemplares. Sólo se comprobó una reducción de su tamaño tras la eliminación del riego por goteo debido a una avería del sistema (Dracaena Consultoría ambiental, 2014).



Figura 2.2. Ejemplares de *H. inaguae* en floración y en fructificación.



Figura 2.1. Distribución de *H. inaguae* en los Andenes de Tasarte. Grafcan ©.

## 2.2 *Pericallis hadrosoma* (Svent.) B. Nord.

*Pericallis hadrosoma* es una especie de la familia *Asteraceae* conocida como “flor de mayo leñosa”. Es un arbusto multicaule, ascendente, que puede sobrepasar el metro y medio de altura. Las hojas son grandes y acorazadas (hasta 15 cm de longitud), glabras y rugosas en el haz y blanco-lanudas en el envés. Las inflorescencias son densas, con capítulos de entre uno y cinco cm. de diámetro, con centro y lígulas moradas (adaptado de Nordenstan, 1978). Florece principalmente durante el mes de junio, mientras que su fructificación ocurre entre finales de junio y durante el mes de julio.

En la actualidad, *P. hadrosoma* se desarrolla en escarpes y repisas, de suelo escaso y elevada humedad, en el sector nororiental de la cumbre de Gran Canaria, entre 1600 y 1750 metros sobre el nivel del mar, en comunidades de *Greenovio* – *Aeonietum caespitosi* Sunding 1972. Como especies acompañantes destacan *Aeonium spathulatum*, *Babcokia platylepis*, *Aeonium simsii*, *Ranunculus cortusifolius*, *Sideritis dasignaphala*, *Hypericum grandifolium*, etc.

Su carácter rupícola podría deberse a una situación de refugio, consecuencia de la degradación de su hábitat y de la depredación por parte de los herbívoros. Los ejemplares que han sido plantados fuera de estas condiciones suelen adquirir un mayor porte.

En la actualidad el pastoreo en la zona se ha reducido casi en su totalidad, pero se ha observado la existencia de síntomas de ramoneo en el único ejemplar que se encontraba accesible. Este ramoneo se debe principalmente a los conejos y es observado únicamente en las ramas más bajas, junto al suelo. Aunque este tipo de ramoneo no conlleve la muerte de los ejemplares adultos, puede ser muy dañino en el caso de las plántulas.



## Capítulo 2. Especies objeto de estudio

Dado su tamaño poblacional tan reducido esta especie ha sido considerada como una de las especies más amenazadas a nivel mundial (Ortega González & González Alemán, 1991). Al igual que *H. inaguae*, la Lista Roja de la Flora Vasculare Española la recoge como “en peligro crítico” (Moreno, 2011), a la vez que ha sido protegida de acuerdo a múltiples legislaciones. Así, la Orden de 20 de febrero de 1991, sobre protección de la flora vasculare silvestre de la Comunidad Autónoma de Canarias (BOC nº 35, de 18 de marzo de 1991), incluye a *P. hadrosoma* en su Anexo I, de especies “estrictamente protegidas). Se encuentra incluida además, en el Catálogo Canario de Especies Protegidas (Ley 4/2010, de 4 de junio) y en el Catálogo Español de Especies Amenazadas (Real Decreto 139/2011m de 4 de febrero) en la categoría de “en peligro de extinción”. En cuanto a la legislación y convenios internacionales, *P. hadrosoma* ha sido designada como “especie de interés comunitario” (especie prioritaria), de acuerdo a la Directiva 92/43/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitat naturales y de la fauna y flora silvestres (DO L 206, de 22 de julio de 1992) y se encuentra además recogida en el Anexo I del Convenio de Berna, relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural en Europa, hecho en Berna el 19 de septiembre de 1979 y ratificado por el Estado Español el 13 de mayo de 1986 (BOE nº 121, de 21 de mayo de 1997).

En aplicación de la legislación vigente, *P. hadrosoma* cuenta también con un plan de recuperación, aprobado mediante el Decreto 329/2011, de 22 de diciembre, por el que se aprueba el Plan de Recuperación de la especie vegetal “flor de mayo leñosa” (*Pericallis hadrosoma*) (BOC nº 3, de 4 de enero de 2012). Este documento contiene las medidas y actuaciones propuestas para mejorar su estado de conservación.

Por otro lado, el área de distribución de *P. hadrosoma* se sitúa dentro de los límites de espacios protegidos, tanto de la Red Canaria de Espacios Naturales Protegidos como de la Red Natura 2000. Así, posee una población en la Reserva



Natural Especial de Los Marteles (C-6), declarada como Zona Especial de Conservación ES701006 (ZEC 55\_GC Los Marteles) y cuatro en el Paisaje Protegido de Las Cumbres (C-25), parte del cual coincide con la Zona Especial de Conservación ES7010040 (ZEC 41\_GC Hoya del Gamonal).

E. Sventenius describe esta especie a partir de los ejemplares de la población de Tenteniguada (Sventenius, 1950). Originalmente fue citada como *Senecio hadrosomus* y, según G. Kunkel, se llegó a dudar de su existencia tras varias campañas de campo en la zona y en las que su búsqueda fue infructuosa (Kunkel, 1977). En décadas posteriores vuelve a ser de nuevo localizada, con la aparición además de dos nuevos enclaves en la Hoya del Gamonal, que se denominaron como Roque Cayo y Roque Sardina (Suárez Rodríguez, 1982). Finalmente, en 2003, se publica el descubrimiento de dos nuevas poblaciones, situadas una sobre la Hoya de La Portillada y la otra en el Risco de El Salado (Almeida *et al.*, 2003) (ver Figuras 2.3 a 2.7).

Su distribución actual queda finalmente establecida en cinco poblaciones: Tenteniguada, Roque Cayo, Roque Sardina, La Portillada y El Salado. Al igual que en el caso de *H. inaguae*, existen diversos trabajos que recogen el tamaño poblacional de esta especie.

En la nueva adición realizada por Almeida y colaboradores en 2003 se establece un tamaño poblacional de unos seis-ocho ejemplares para la población de La Portillada y de un ejemplar para El Salado. Aunque no se especifica el tamaño para el resto de sus poblaciones, sus autores consideran que la totalidad de sus efectivos estaría en torno a los 15 ejemplares. Además, reconocen la dificultad de contabilizar estos ejemplares, debido a su carácter rizomatoso. En la población de El Salado advierten de que se trata de un ejemplar de gran porte que podría estar formado en realidad por dos individuos (Almeida *et al.*, 2003).

## *Capítulo 2. Especies objeto de estudio*

En 2004, se publica el censo de sus poblaciones naturales. En este caso, se establece el siguiente tamaño poblacional: dos ejemplares en Tenteniguada (Risco del Laurel); dos en Roque Cayo; dos en Roque Sardina y nueve en La Portillada. La población de El Salado no fue visitada (Santana y Naranjo in Bañares et al. 2004).

En los años 2005, 2007 y 2011, esta especie se incluyó dentro del programa seguimiento del Gobierno de Canarias (SEGA). En estos trabajos se contabilizaron 16 ejemplares en 2005 (Riera Cillanueva, 2005), 17 en 2007 (Riera Cillanueva, 2007) y 16 en 2011 (Hernández García, 2011). Las variaciones en el número ejemplares tienen que ver con el criterio de cada técnico a la hora de identificarlos, ya que los valores variaron entre uno o dos ejemplares en El Salado, ocho o nueve en La Portillada y entre dos y cuatro en Roque Sardina. Asimismo, hay que destacar que en 2005 no se localizó la población de Roque Cayo, mientras que en 2011 se advertía de la presencia de un ejemplar muerto en la población de Roque Sardina, situado a pie de risco, y que correspondía a una plantación realizada en la década de los 90 por el Jardín Canario (Tabla 2.2).

Estos resultados evidencian la dificultad de recuento que posee esta especie, ya que diferentes autores establecen distintos tamaños poblacionales en función de su criterio para diferenciar los ejemplares que se encuentran muy cercanos.

De acuerdo con nuestro criterio, en 2006, establecimos los siguientes tamaños poblacionales: dos ejemplares en Tenteniguada; uno en Roque Cayo; cuatro en Roque Sardina; seis en La Portillada y dos en El Salado. La especie contaría entonces con 15 ejemplares. A excepción de la población de Roque Sardina, se trataba siempre de ejemplares perfectamente aislados, en repisas o grietas perfectamente diferenciadas y que impedían cualquier confusión en cuanto al número de individuos. En el caso de Roque Sardina, se contabilizaron tres ejemplares situados en la misma repisa. Si bien, estos habían sido identificados

con anterioridad como ejemplares diferenciados por el personal del Jardín Canario que había contribuido a las labores de reintroducción realizadas en los años 90 (Naranjo Suárez, com. per.).

Además, en el marco del proyecto BIOTA-GENES del Gobierno de Canarias (programa INTERREG III-B Atlántico), se realizó un estudio de variabilidad genética que incluyó esta población y de la que se recolectaron cuatro muestras: una procedente del ejemplar situado a pie de risco y tres de los ejemplares de la repisa. Dado que estos ejemplares habían adquirido un gran porte, las muestras se recolectaron de manera que pudieran ser identificados los tres individuos por separado. Según este estudio, los cuatro individuos analizados presentaron una diversidad genética media de 0.1731 (Índice de Shannon). Del análisis de componentes principales (PCA), se concluyó que los cuatro ejemplares se encontraban genotípicamente diferenciados (Batista Hernández *et al.*, 2005).

En 2015, con el fin de actualizar los datos para esta tesis, visitamos todas las poblaciones de *P. hadrosoma*, donde pudimos constatar la estabilidad de las mismas. Todas presentaban el mismo número de ejemplares observado en 2006, a excepción de Roque Sardina, donde el ejemplar situado en la base del risco había desaparecido, tal y como constató M. Hernández en 2011. En los últimos años no se ha constatado la regeneración de la población y los ejemplares actuales parecen mantenerse por reproducción vegetativa. Los datos poblacionales se muestran en la Tabla 2.2. Las diferencias entre los distintos años reflejan la dificultad para censar esta especie, el tamaño poblacional depende de cada autor.

Tabla 2.2. Tamaño poblacional de *P. hadrosoma* según los seguimientos realizados en los últimos años.

Año de muestreo	Tamaño poblacional					Total
	Tenteniguada	Roque Cayo	Roque Sardina	La Portillada	El Salado	
2003	-	-	-	6-8	1-2	-
2004	2	2	2	9	-	15
2005	2	-	4	9	1	16
2006	2	1	4	6	2	15
2007	2	1	4	9	1	17
2011	2	2	2	8	2	16
2015	2	1	3	6	2	14

Por otro lado, algunos autores han señalado la presencia de larvas del díptero *Oedosphenella canariensis* (Macquart, 1839) en sus frutos, como una limitación en la capacidad de germinación de sus semillas (Suárez, 1982). Aunque se ha observado la germinación de semillas procedentes de ejemplares cultivados a los que se había procedido a embolsar las inflorescencias como medida de prevención ante la depredación de las semillas (J. Cruz, com. pers.), no se dispone de ningún estudio o trabajo documentado que pueda aclarar si existe algún problema en la reproducción de esta especie. Los ejemplares actuales tienen un gran porte y parecen mantenerse por reproducción asexual.

En los años noventa se realizaron algunas experiencias previas de micropropagación, en las que se incluyó el reforzamiento de una de sus poblaciones (Ortega González & González Alemán, 1991). Hasta hace unos años, aún se mantenía con vida uno de los ejemplares procedentes de estas poblaciones, en Roque Sardina, y cuya muerte se verificó en 2011 (Hernández García, 2011).



Figura 2.4. Ejemplares de *P. hadrosoma* en El Salado (izda.) y en La Portillada (dcha.).



Figura 2.3. Distribución de *P. hadrosoma* en El Salado. Grafcan ©.





Figura 2.6. Distribución de *P. hadrosoma* en La Portillada. Grafcan ©.

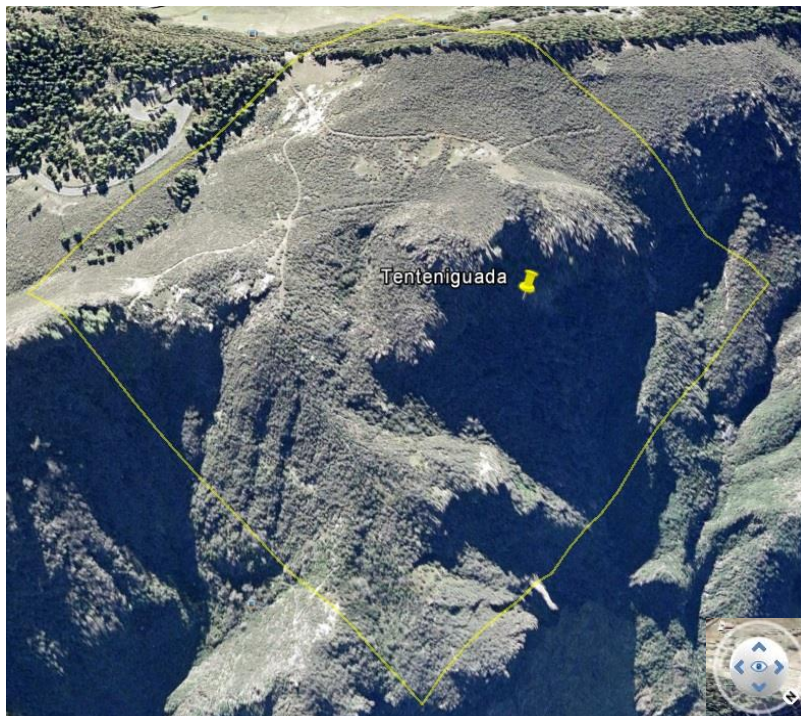


Figura 2.5. Distribución de *P. hadrosoma* en Tenteniguada. Grafcan ©.

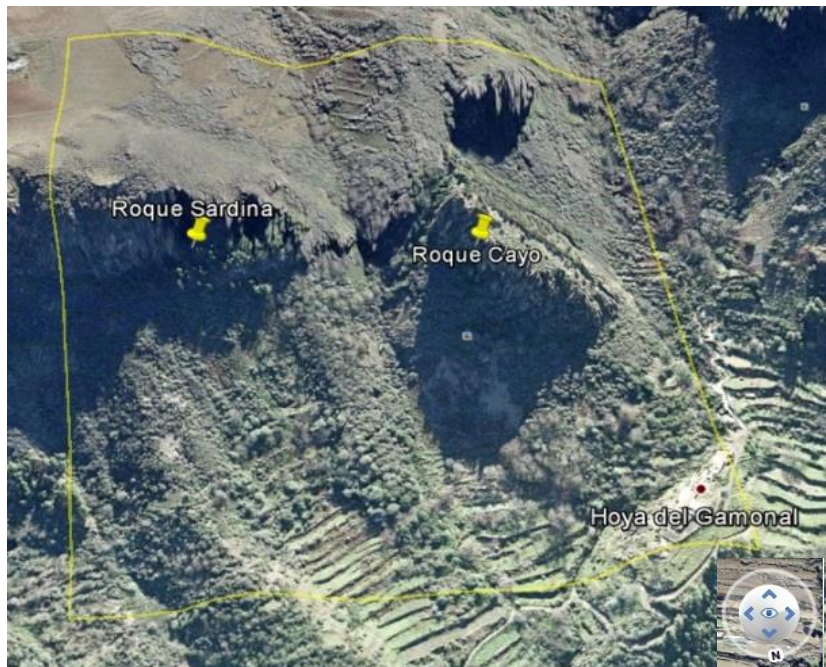


Figura 2.7. Distribución de *P. hadrosoma* en Roque Sardina y Roque Cayo. Grafcan ©.





## Capítulo 3

Objetivos



### 3. Objetivos

El principal objetivo de este proyecto se centra en el acercamiento biotecnológico al problema de la pérdida de biodiversidad de los taxones *Helianthemum inaguae* y *Pericallis hadrosoma* mediante el diseño de protocolos de micropropagación capaces de ser empleados en programas de conservación y recuperación de ambas especies.

Para ello, se evaluará la situación genética de las poblaciones naturales de ambas especies y de las vitroplantas obtenidas mediante los protocolos de micropropagación seleccionados. Mediante el contraste de los resultados de ambos estudios y de las observaciones morfológicas se valorará la variabilidad genética resultante del proceso de micropropagación. Se analizará además la diversidad genética de sus poblaciones naturales.

En el caso de *P. hadrosoma*, de la cual no existe material conservado en Bancos de Germoplasma, como ya señalamos anteriormente, se pretende establecer una colección (y su réplica) de germoplasma representativo de esta especie *in vitro*.

La recogida de documentación y material se abordará de manera que se realice de acuerdo a métodos y tiempos que nos permitan colaborar en la ampliación de los conocimientos (evolución de su distribución, estado de conservación, comportamiento de la/s poblaciones, germinación de semillas, etc.) que se tienen de ambas especies.



## Capítulo 4

# Micropropagación



## 4. Micropropagación

### 4.1 El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

El cultivo de órganos, tejidos y células vegetales *in vitro*, o cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (nomenclatura más extendida), a grandes rasgos, consiste en un conjunto de técnicas que se basan en cultivar órganos, tejidos, células vegetales bajo condiciones de esterilidad y sobre un medio de cultivo que les aporte los nutrientes y metabolitos (vitaminas, hormonas...) necesarios para que puedan llevar a cabo el patrón de desarrollo que interese.

Así, partiendo de un fragmento del vegetal – que se denomina explanto – y que puede ser muy diverso:

- ✗ Células aisladas o protoplastos (células vegetales sin pared) o células germinativas (ej.: granos de polen)
- ✗ Tejidos, por ej.: meristemas, tejido parenquimático...
- ✗ Estructuras vegetales, por ej.: ápices, segmentos de tallo o raíz (entre nudos, peciolos...)
- ✗ Órganos vegetales, por ej.: Yemas, embriones, anteras

Podemos conseguir:

- ✗ Producción de metabolitos a partir de células cultivadas en bioreactores (Artemisina a partir de células de *Artemisia annua*, Baldi y Dixit, 2008)
- ✗ Producción de metabolitos a partir de cultivo de órganos, obtención de alcaloides de *Atropa belladonna* a partir de cultivo de raíces (Yang *et al.*, 2011)

## Capítulo 4. Micropropagación

- ✘ Producción de embriones a partir de cultivos de células o tejidos, producción de semillas artificiales (ej.: *Yucca* spp., CIAT)
- ✘ Obtención de plántulas, micropropagación, Ej.: obtención de semilla de papa
- ✘ Saneamiento de plantas, mediante diferentes estrategias (termoperíodo, cultivo de meristemos, empleo de antivirales, antibióticos... se obtienen plántulas sanas, libres de virus y otras enfermedades, Ej.: obtención de plantas certificadas como libres de virus.
- ✘ Mejora vegetal, la posibilidad de obtener y multiplicar plantas haploides, conseguir nuevos híbridos..., junto a la posibilidad de llevar a cabo ensayos de selección de resistencias a estrés biótico (patógenos vegetales) o abiótico (salinidad de suelos y aguas, sequia...), estas posibilidades hacen de las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales *In Vitro* una herramienta indispensable para los programas de mejora.
- ✘ Realización fiable y económica de ensayos de diferentes tipos de sustancias: fitosanitarios, sustancias bioactivas... que aporten ventajas de algún tipo en los cultivos o en la preservación del medio ambiente
- ✘ Obtención de plantas modificadas genéticamente, Sin estas herramientas sería imposible la obtención de Plantas transgénicas y las ventajas que ello puede aportarnos.

La importancia de estas técnicas radica en su versatilidad para poder ser empleadas para multitud de objetivos, y su capacidad de escalabilidad, pudiendo ser aplicadas con rentabilidad y altos porcentajes de éxito en la producción de millones de plántulas.



En la actualidad, están demostrando que son también una excelente herramienta para conservar la biodiversidad vegetal. Aquellas especies en las que la recolección de semillas para su conservación es realmente dificultosa, ya sea por la existencia de poblaciones muy escasas y con pocos individuos, por el bajo número de semillas viables o bien porque dichas semillas no pueden ser conservadas mediante protocolos de desecación y almacenamiento en frío, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se han convertido en un aliado muy útil a la hora de conservar especies amenazadas.

Hoy en día su uso en el rescate de organismos vegetales se está extendiendo, gracias a la puesta a punto de protocolos cada vez más respetuosos con la identidad génica de las especies en peligro. Lo que a nuestro entender hace perentorio el establecer estrategias que nos permitan no sólo conservar, sino también propagar la multitud de especies vegetales que hoy día están en bajo amenaza de extinción. Esto implicaría estudiar los protocolos de conservación y propagación más adecuados, huyendo de protocolos estándar que pueden no garantizar la estabilidad genética.

En la presente memoria, abordamos con dicho enfoque el uso de estas técnicas para establecer protocolos de rescate para estas especies endémicas de Canarias.

### **4.1.1 La propagación *in vitro***

Existen diferentes vías para abordar la propagación *in vitro* de plantas. En general, la propagación *in vitro* se realiza mediante la multiplicación de yemas pre-existentes, axilares o apicales, o bien, mediante la formación yemas adventicias y/o embriones somáticos. Estos son promovidos a través del cultivo directo de algún tejido de la planta; mediante el cultivo de células o tejidos indiferenciados (células en suspensión o cultivo de callos).

A continuación se enumeran algunos de los tipos de propagación *in vitro* de plantas más utilizados, y que son descritos con mayor detalle en George & Debergh *in George et al.*, 2008 (Figura 4.1).

Métodos de propagación a partir de yemas

- ✗ Propagación a partir de yemas pre-existentes axilares o apicales.
- ✗ Propagación a partir de meristemos (caulinares, radicales, florales...)
- ✗ Propagación a partir de segmentos-internodales.

Métodos de propagación mediante organogénesis directa

- ✗ Formación de yemas adventicias.
- ✗ Embriogénesis directa.

Métodos de propagación mediante organogénesis indirecta

- ✗ Formación de yemas adventicias a partir de callo.
- ✗ Embriogénesis indirecta.

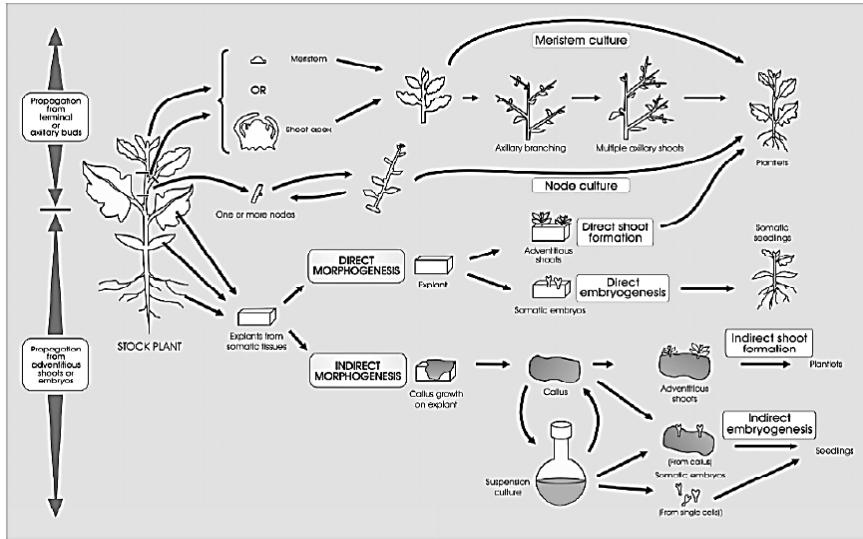


Figura 4.1. Principales métodos de propagación *in vitro*. Extraído de George & Debergh in George et al., 2008.

#### 4.1.2 Etapas del cultivo de tejidos *in vitro*

Ya en 1974 fueron definidas tres etapas en el cultivo *in vitro* de plantas (Murashige, 1974): etapa de iniciación del cultivo (I), etapa de multiplicación (II) y etapa de preparación para la transferencia al suelo (III). Estas etapas o fases se mantienen en la actualidad, con algunas modificaciones:

##### Fase 0

Se trata de una fase introducida por Debergh y Maene (Debergh & Maene, 1981) en la que el material vegetal es tratado previamente a la etapa de establecimiento con el fin de mejorar los resultados de dicha etapa y hacerla además reproducible. El material vegetal se somete a una selección y a una serie de tratamientos para mejorar su estado sanitario: cultivo bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, eliminación de patógenos, etc.

### Etapa I - Establecimiento del cultivo *in vitro* (etapa de iniciación)

Tiene como objetivo el establecimiento de un cultivo aséptico, mediante la esterilización del material vegetal y la siembra de éste en condiciones asépticas en el medio de cultivo seleccionado. El medio de cultivo dependerá en gran medida del tipo de material vegetal inicial y de las características de la especie.

### II - Etapa de multiplicación

Esta etapa tiene como fin la producción de nuevas plántulas a partir de los explantos iniciales, las cuales darán lugar a plantas independientes o a nuevo material vegetal para siguientes subcultivos.

### III - Etapa de elongación y de enraizamiento

En general, las plántulas obtenidas en la etapa de multiplicación suelen tener un tamaño inadecuado para su enraizamiento, así que son sometidas a una fase de elongación hasta que alcanzan la longitud deseada. Posteriormente se transfieren a un medio con capacidad para promover la formación de raíces. Coincide con la etapa III dada por Murashige en 1974 y con las etapas definidas en Debergh & Maene en 1981 como IIIa y IIIb.

### IV- Etapa de aclimatación (transferencia a las condiciones *ex vitro*)

Esta etapa, cuyo principal objetivo es la adaptación de las plantas obtenidas *in vitro* (vitroplantas) al medio exterior, aunque no fue incluida en las etapas establecidas por Murashige en 1974, hoy se destaca su gran importancia, ya que si no se realiza cuidadosamente puede llevar la pérdida de material vegetal de manera significativa (George & Debergh *in* George *et al.* (eds.), 2008) debido a que las vitroplantas son muy sensibles a los cambios ambientales con lo que el éxito o no de todo el protocolo depende de esta etapa.

Por tanto hemos de diseñarla para permitir a la vitroplanta que ha vivido en ambientes con una humedad relativa muy elevada, temperaturas suaves y estables se vayan adaptando a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen de los tubos o frascos de cultivo, sus estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) no son aun funcionales y carecen de la coordinación necesaria frente a descensos de la humedad relativa. Además, al desarrollarse en ambientes húmedos no han desarrollado adecuadamente la cutícula cerosa, por lo que carecen de esta barrera física que evita la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. Presentan también un déficit fotosintético motivado en gran parte por la presencia de azúcares en la formulación del medio, por tanto sus cloroplastos no están del todo desarrollados. En el caso de las vitroplantas, podemos observar como sus raíces carecen de pelos radiculares (debido a la alta humedad existente en el recipiente de cultivo).

### 4.1.3 Establecimiento de las condiciones de esterilidad

Una de las principales características del cultivo *in vitro* de tejidos es que debe ser realizado en condiciones de esterilidad y desinfección, es decir, en un ambiente estéril, libre de microorganismos. Por ello, tanto el material vegetal a utilizar (plantas, tejidos vegetales, semillas...), como los medios nutritivos donde se desarrollaran los cultivos y el material de soporte y trabajo (placas de *Petri*, tubos, pinzas, bisturís, etc.) tienen que estar debidamente esterilizados. Y por supuesto la zona donde se han de hacer las manipulaciones ha de garantizar el manteniendo esta condición.

En términos generales, la esterilización del material vegetal es superficial y se realiza mediante el empleo de agentes químicos, (Ej: óxido de etileno, formaldehído, agentes oxidantes clorados o iodados), solo si el material no está sano se emplean agentes fitosanitarios (antibióticos, antifúngicos, etc.). La

intensidad (tiempo de aplicación, concentración y combinaciones de estos tratamientos) va a depender en gran medida del tipo de material vegetal a utilizar y de su origen, estado fenológico y fitosanitario.

Mientras que la esterilización de los medios de cultivo y del material de laboratorio es realizada mediante tratamientos físicos de calor húmedo, a temperatura y presión elevadas a través de su autoclavado. En el caso de que en la formulación del medio de cultivo este presente alguna sustancia termolábil (Ej. Ac. giberélico) para la misma se emplean métodos físicos de esterilización, como es la esterilización mediante filtrado.

Entre los medios químicos para la esterilización del material vegetal destacan el hipoclorito sódico ( $\text{NaClO}$ ), conocido como lejía, el hipoclorito cálcico ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ), y el cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ). El hipoclorito sódico es el agente esterilizante de mayor disponibilidad, dado su uso como desinfectante doméstico. Si bien, posee una capacidad de penetración en los tejidos vegetales muy alta, lo que puede provocar la necrosis de los tejidos antes de que la esterilización sea efectiva. El hipoclorito cálcico es más difícil de preparar y tiene problemas de almacenamiento pero posee la ventaja de penetrar de una manera más lenta en los tejidos vegetales, lo que le confiere una mayor efectividad para la esterilización sin que se produzcan excesivos daños en los tejidos. El cloruro de mercurio es también un agente esterilizante muy efectivo pero su uso se ve limitado por su alta toxicidad y capacidad contaminante, que hacen necesarios protocolos de protección de los operarios y de costosos tratamientos de sus residuos.

La manipulación del material vegetal, así como su siembra en los recipientes donde han de ser cultivados debe hacerse a su vez en condiciones de asepsia. Todo el trabajo se realiza en cabinas de flujo laminar, las cuales mantienen un

ambiente estéril mediante la circulación de aire a través de filtros, que se mantienen estériles mediante radiación ultravioleta tipo C (280 – 250 nm).

#### 4.1.4 Medios de cultivo

El medio de cultivo es un factor determinante en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. El éxito en el establecimiento de una línea de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* depende en gran medida de la elección de una formulación adecuada para el material vegetal a cultivar (George & Klerk *in* George *et al.*, 2008). Los requerimientos nutricionales para un óptimo crecimiento *in vitro* puede variar para distintas especies, incluso para explantos provenientes de diferentes partes de una misma planta (Murashige & Skoog, 1962).

Hemos de tener en cuenta que es el que va a suministrar los nutrientes esenciales para el crecimiento y el desarrollo del explanto. Los tejidos y órganos aislados no son autótrofos, carecen por tanto de la capacidad de sintetizar su suministro de carbohidratos, la mayoría de las vitaminas y de las sustancias reguladoras del crecimiento... (Ozias & Vasil, 1985)

Hoy en día existe una amplia literatura sobre las técnicas de cultivos vegetales *in vitro*, con protocolos definidos para muchas especies vegetales (Dixon, 1985; Vidalie, 1986; Conger, 1987; Bajaj, 1988; Pollard & Walker, 1990; Roca & Mroginski, 1991). Sin embargo, aún existen especies en las cuales el establecimiento, multiplicación y/o enraizamiento de los cultivos no se ha conseguido, por lo que se requiere una intensa tarea experimental para lograr su micropropagación. Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulados en forma más o menos empírica (Krikorian, 1991), estamos lejos aún de contar con un diseño fundamentado en la composición de la célula vegetal y el conjunto de elementos que controlan el crecimiento, la

diferenciación y morfogénesis. Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* (Heller, 1953, 1954; Murashige & Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1970; Schenk & Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). En la Figura 4.2 se resumen las utilidades de algunos medios comerciales de uso frecuente.

Nombre del medio	Tipo de respuesta	Ejemplos de especies cultivadas
Andersons	Multiplic. ápices	<i>Rhododendron, Kalmia, Rubus</i>
Chu's (N6)	Cultivo anteras, embr. somática	<i>Oryza, Triticum, Hordeum, Zea</i>
DCR sales basales	Multiplic. Ápices, céls. suspensión, embr. somática	<i>Pseudotsuga, Pinus</i>
DKW sales basales	Multiplic. Ápices	<i>Juglans</i>
De Greef y Jacobs	Multiplic. Ápices, organogénesis	<i>Beta</i>
Eriksson's sales basales	céls. suspensión	<i>Haplopappus, Vicia</i>
Gamborg's sales basales	Multiplic. Ápices, cultivo protoplastos, Organogénesis	<i>Glycine, Dioscorea, Solanum, Trifolium</i>
Gresshoff & Doy	Cultivo anteras, organogénesis	<i>Vitis, coffea</i>
Heller's sales basales	Cultivo callo	Dicotiledóneas, <i>Digitalis</i> , orquídeas
Hoagland's sales basales	Plantas enteras, organogénesis	Plantas enteras, <i>Passiflora</i>
Kao & Michayluk	Cultivo protoplastos	<i>Vicia, Solanum, Trifolium, Malus</i>
Litvay's sales basales	Céls. suspensión, embr. Somática	<i>Pinus, Daucus, coníferas</i>
McCown's sales basales	Multiplic. Ápices, organogénesis	<i>Kalmia, Quercus, Rosa, Vaccinium</i>
Nitsch & Nitsch	Cultivo anteras, organogénesis	<i>Nicotiana, Solanum, Petunia, Begonia</i>
Quorin & Lepoivre	Organogénesis, multip. Ápices	<i>Pinus, Prunus</i>
Schenk & Hildebrandt	Cultivo callo, embrio. Somática, Organogénesis	<i>Dactylis, Picea, Medicago, Sorghum</i>
White's sales basales	Organogénesis, embrio. Somática, Cultivo de órganos	<i>Lilium, Santalum, Gypsophila</i>

**Fuente:** adaptado de SIGMA Pant Cell Culture. Catálogo 1991-'92.

Figura 4.2. Medios de cultivo comerciales de uso frecuente en la micropropagación de plantas. Fte. Catálogo Sigma-Aldrich.

Los medios de cultivo están constituidos por una serie de componentes habituales y otros específicos cuya presencia y concentración dependerá de los objetivos que se persigan al emplear estas técnicas. En general, el medio de cultivo debe contener todos o algunos de los siguientes componentes: macronutrientes o macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca, presentes a concentraciones mayores a 0.5 mM/l), micronutrientes o microelementos (Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe, presentes a concentraciones inferiores a 0.5 mM/l), vitaminas, aminoácidos o, fuente de carbono, suplementos orgánicos definidos



(ej.: aminoácidos) o indefinidos (leche de coco, extracto de levaduras, peptona, extracto de pulpas...), reguladores de crecimiento y agentes solidificantes (p. ej.: agar-agar) ya que los medios pueden ser líquidos o tener un soporte sólido (De Fossard, 1976).

#### **4.1.5 Ventajas y desventajas del cultivo de tejidos *in vitro***

Las ventajas y las desventajas de la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales vienen resumidas en George *et al.*, 2008.

Como principales beneficios de estos métodos destacan los requerimientos de muy poco material de partida (explanto) para el inicio del cultivo, así como el espacio necesario para su desarrollo, mucho menor que en la aplicación de métodos convencionales. Además, es un método efectivo para producir plantas libre de patógenos, como hongos, bacterias u otros microorganismos. En el caso de los virus, es posible la obtención de plantas que puedan ser certificadas como “libre de virus” mediante la aplicación de determinados métodos, como la termoterapia o el cultivo de meristemas.

El ajuste de factores condicionantes del cultivo (luz, reguladores de crecimiento, temperatura, etc.) permite la obtención de tasas de producción más elevadas que con los métodos de propagación tradicional. Esto resulta de gran utilidad cuando se necesita una gran producción de plantas en periodos de tiempo reducido. El control de estos factores hace también posible la continuación del cultivo durante todo el año, sin depender de las condiciones climáticas del lugar. El mantenimiento requerido entre subcultivos es mínimo, y es posible además la conservación por largos periodos de las plantas sin que tengan que ser subcultivadas.

Como inconvenientes de la aplicación de estos métodos de cultivo cabe destacar la elevada especificidad que puede presentarse en la aplicación de protocolos, lo

que conllevaría la adaptación de estos para diferentes especies y, por tanto, la elevación del coste de producción. Requiere de una infraestructura y un equipamiento determinado, así como de personal muy especializado en la aplicación de estas técnicas. El uso comercial de las técnicas de micropropagación es aún limitado debido a sus altos costes de producción, a la baja tasa de crecimiento *in vitro* y a una pobre tasa de supervivencia de la plántula durante la etapa de aclimatación (Kozai *et al.*, 1997).

Uno de los problemas que puede aparecer en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es la vitrificación. Se trata de un desorden anatómico, morfológico y fisiológico, caracterizado por la formación de tejidos hiperhidratados, traslúcidos, succulentos y de apariencia cristalina (Ziv in Debergh & Zimmerman, 1991). El término vitrificación puede referirse a dos tipos de procesos relacionados con el cultivo de tejidos vegetales: la descripción del desorden fisiológico definido anteriormente y la formación de cristales de hielo durante el almacenamiento a bajas temperaturas de tejidos vegetales. Por ello, Debergh *et al.* (1992) recomendaron el uso del término hiperhidricidad para definir la formación de este tipo de tejidos de apariencia vítrea, los cuales se nombrarían como tejidos hiperhídricos.

La formación de tejidos hiperhídricos en micropropagación aparece como resultado de la incapacidad de los órganos a adaptarse completamente a las condiciones de estrés que supone su cultivo *in vitro* (Gaspar *et al.*, 1997).

Muchos factores han sido nombrados como responsables de la hiperhidricidad. Sin embargo, algunos de estos factores sólo promueven la formación de tejidos hiperhídricos cuando ciertas condiciones del cultivo no están optimizadas: medio de cultivo, recipientes, etc. (Debergh *et al.*, 1992).

Entre los factores más citados por su capacidad para promover la formación de tejidos hiperhídricos se encuentran la concentración de agar en el medio de

cultivo; la elevada concentración de algunos componentes del medio de cultivo (por ejemplo, la elevada concentración de nitrato de amonio del medio Murashige & Skoog, 1962); el recipiente de cultivo, debido a su influencia en el intercambio de gases y la concentración de vapor de agua, dióxido de carbono o etileno; la presencia de auxinas y/o citoquininas en el medio; el tipo de explanto, etc. (Debergh, 1983; Ziv *et al.*, 1983; Dillen & Buysens, 1989; De Proft *et al.*, 1985; Gaspar *et al.*, 1987; Beauchesne, 1981).

Por otro lado, durante el proceso de micropropagación pueden aparecer diferencias fenotípicas, morfológicas o bioquímicas, entre las plantas obtenidas *in vitro* en comparación con el fenotipo de las plantas donadoras de los explantos (Patiño Torres, 2010). Este fenómeno es el que se conoce como variación somaclonal y puede ser una consecuencia tanto de variaciones epigenéticas transitorias debidas a las condiciones de estrés, como a variaciones genéticas producidas mediante cambios en el genoma. En el primer caso se trata de cambios reversibles y no heredables (Pierik, 1997; Jain 2001), mientras que en el caso de las variaciones genéticas, son heredables y se asocian a cambios cromosomales, deleciones y mutaciones (Sánchez-Teyer *et al.*, 2003; Noro *et al.*, 2007).

Entre los factores que podrían inducir la variación somaclonal, los más citados en la bibliografía se refieren al método de cultivo y su patrón de desarrollo; a la edad del cultivo y de los subcultivos y al medio de cultivo y sus componentes (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2009; Leval *et al.*, 2012; Pierik, 1989).

Si lo que se busca es evitar este tipo de variación, se recomienda la aplicación de métodos que minimicen el riesgo de variación, como la obtención de yemas mediante multiplicación de yemas axilares o apicales, evitando siempre la formación de yemas adventicias procedentes de tejidos indiferenciados. Así, el uso de tejidos meristemáticos como materiales de partida para el cultivo de

tejidos reduce la posibilidad de variación (Sahijram *et al.*, 2003), mientras que los tejidos altamente diferenciados (hojas, raíces y tallos) producen una mayor tasa de variación debido a la formación de una etapa de callo antes de la organogénesis (Sharma *et al.*, 2007).

Tanto el tipo de regulador de crecimiento seleccionado, como su concentración deben ser debidamente controlados. Se ha relacionado una mayor tasa de variación con el uso de reguladores sintéticos, como es el caso del 2,4-D, así como de la aplicación de elevadas concentraciones para promover el desarrollo de yemas adventicias en los tejidos de callo (Nehra *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 2006). Por ello, se debe seleccionar bien el regulador a emplear y ajustar su concentración al mínimo que permita estimular la producción de yemas a partir de tejidos meristemáticos sin la formación de una etapa de tejido desdiferenciado.

### **4.1.6 La aplicación del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* a la conservación de las especies**

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se han aplicado con éxito en la conservación de especies endémicas y, en especial, de aquellas que se encuentran amenazadas u ostentan algún grado de protección (incluidas en catálogos o listados legales de protección). En general, resultan de gran utilidad por permitir el incremento en el número de individuos en un corto periodo de tiempo, de especies que pudieran tener algún problema reproductivo o que posean un número extremadamente reducido de ejemplares en sus poblaciones naturales (González-Benito & Martín, 2011). El hecho de que se necesiten cantidades pequeñas de material de partida para la micropropagación de plantas supone un beneficio añadido para aquellas especies con un número de ejemplares reducido. Dado que las técnicas de cultivo *in vitro* permiten, a su vez establecer protocolos de conservación a largo plazo (almacenamiento), su

utilidad se amplía además, dentro del campo de la conservación, en lograr la conservación *ex situ* de aquellas especies con semillas recalcitrantes o con problemas de reproducción. En España, se han desarrollado protocolos de micropropagación para más de 60 especies (González Benito & Martín, 2011), entre las que destacan *Artemisia granatensis* (Clemente *et al.*, 1991), *Centaurea ultriae* (Mallón Moure, 2008), *Helianthemum marminorense* (Serrano Martínez, 2012), entre otras.

En Canarias, las primeras experiencias realizadas en el campo de la micropropagación de especies amenazadas fueron llevadas a cabo a partir de los años ochenta en el laboratorio de cultivo *in vitro* del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”. Aunque de estos trabajos nunca se llegó a publicar un protocolo de micropropagación completo, sí están disponible algunas publicaciones con las experiencias observadas para diferentes etapas de la micropropagación de especies tan emblemáticas como *Lotus berthelotii* (Ortega González, 1982), *Senecio hermosae* (Ortega González & González Alemán, 1986), *Euphorbia handiense* (González Alemán *et al.*, 1988), *Globularia ascanii* (Cabrera Pérez, 1995), entre otras. Más recientemente, y en colaboración con el grupo de Biología Vegetal Aplicada (GBVA) de la Universidad de La Laguna (ULL), se han desarrollado también experiencias de cultivo *in vitro* de especies como *Helianthemum bystropogophyllum* (Santana López *et al.*, 2004) o *Kunkeliella canariensis* (Pérez Francés *et al.*, 2009).

El departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal (ULL) ha trabajado también en las últimas décadas en la propagación de diferentes especies endémicas de Canarias con dificultades en su conservación, como es el caso de *Bencomia extipulata* (Tacoronte *et al.*, 2008) o de *Myrica rivas-martinezii* (Pérez Francés *et al.*, 2009). Se han desarrollado también protocolos de micropropagación para otras especies que, aún algunas consideradas como amenazadas, son de interés para la producción de determinados metabolitos

secundarios. Es el caso de *Isoplexis chalcantha*, *Maytenus canariensis*, *Salvia broussonetti* (Mederos Molina, 2008, 2002, 2006), entre otras.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Material vegetal: procedencia

#### 4.2.1.1 *Helianthemum inaguae*

El establecimiento del cultivo *in vitro* de *Helianthemum inaguae* se realizó a partir de semillas germinadas en condiciones asépticas. Las semillas procedían de la colección de planta viva de Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” – Unidad Asociada al CSIC.

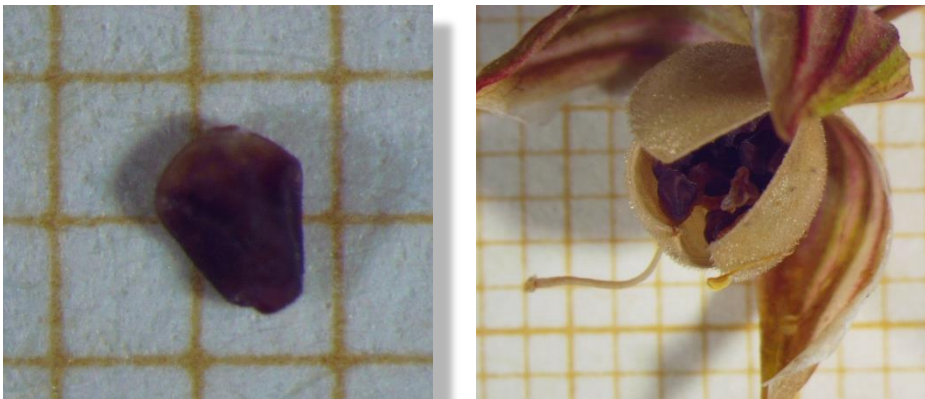
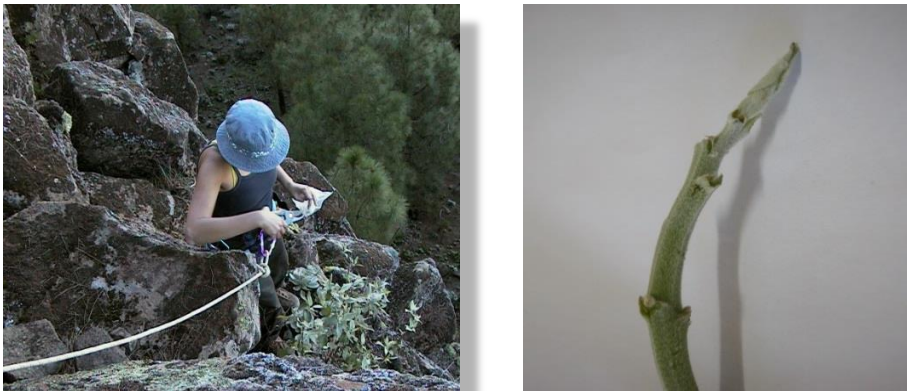


Figura 4.3. Detalle de la semilla (10x) y del fruto (7x) de *H. inaguae*.

#### 4.2.1.2 *Pericallis hadrosoma*

Ante la escasez de semillas de esta especie y para evitar incidir negativamente en la débil dinámica reproductora de sus poblaciones, se optó por el uso de material vegetal procedente de sus poblaciones naturales para el inicio del cultivo *in vitro* de *Pericallis hadrosoma*.

Para poder ensayar la escasa biodiversidad de este taxón, la recolección de material vegetal se llevó a cabo en cada una de las sus poblaciones naturales, durante la época en que la especie se encontraba en estado vegetativo, poco antes del periodo de floración, entre los meses de abril y mayo de 2006. Dado que todos los ejemplares se encuentran en sitios inaccesibles, fue necesario el uso de material de escalada, así como la utilización de una sierra de pértiga para aquellos ejemplares a los que no era posible acceder directamente.



**Figura 4.4. Recolección del material vegetal de *P. hadrosoma* y detalle de los segmentos antes de la esterilización.**

Aunque se procedió a la introducción *in vitro* de explantos de cada una de sus poblaciones naturales, los ensayos de multiplicación se llevaron a cabo con aquéllas que ofrecieron un mayor éxito en la fase de establecimiento, con un mayor número de explantos sanos introducidos. El resto de material se conservó a modo de colección *ex situ* de la especie.



## 4.2.2 Esterilización del material vegetal

### 4.2.2.1 *Helianthemum inaguae*

El cultivo *in vitro* de órganos y tejidos vegetales requiere la necesidad de mantener unas condiciones asépticas, por lo que es imprescindible realizar una esterilización del material vegetal de partida, en este caso las semillas de *H. inaguae* recolectadas en el propio Jardín Botánico.

Así, una vez seleccionadas, se inició su esterilización con un lavado de agua corriente con unas gotas de Tween\* (Polyoxyethylenesorbitan monooleate Polysorbate 20) durante un minuto, seguido de una pre-esterilización mediante un enjuague con etanol al 70% durante 30 segundos. Con este paso se disminuye la presencia de microorganismos e impurezas en las cubiertas seminales (grasas, polvo...) lo que facilita la posterior acción del agente esterilizante, que en este caso fue el hipoclorito sódico (NaClO).

A continuación se realizaron dos lavados con hipoclorito sódico a diferentes concentraciones, durante 10 minutos cada uno. El primero con una concentración de 2 g/l de Cloro activo y el segundo con una concentración de 1 g/l de Cloro activo. Tras el tratamiento con el agente esterilizante, éste fue eliminado mediante el lavado enérgico de las semillas con abundante agua destilada estéril, durante 10 minutos y repetido tres veces.

### Esterilización de las semillas

- Lavado con agua corriente y Tween 20 – 1 minuto
- Enjuague con etanol al 70% - 30 segundos
- Lavados con hipoclorito sódico:
  - 2 g Cl activo – 10 minutos
  - 1 g Cl activo – 10 minutos
- 3 lavados con agua destilada estéril – 10 minutos cada uno

#### 4.2.2.2 *Pericallis hadrosoma*

Tras la recolección del material vegetal en las poblaciones naturales de la especie, éste fue transportado a las instalaciones del laboratorio para su introducción *in vitro*. Todo el material se mantuvo en todo momento, desde su recolección, debidamente etiquetado e hidratado, a 4º C y oscuridad, hasta el momento de su esterilización, realizado unas 18 horas después.

Como tratamiento de esterilización se realizaron diversos ensayos preliminares en los que se utilizaron diferentes concentraciones y tiempos tanto de hipoclorito sódico como de cálcico, agentes esterilizantes ensayados.

La decisión de optar por el uso de hipoclorito cálcico se debió a los resultados obtenidos en los primeros ensayos. Así, se había observado una tasa de contaminación fúngica bastante elevada a bajas concentraciones, que decrecía al aumentar la concentración de hipoclorito sódico en detrimento de la calidad de los explantos, la mayoría resultaron inviables por el daño ocasionado a los tejidos. El protocolo se mejoró a tenor de la carga fúngica mostrada por los explantos en los ensayos preliminares, mediante la introducción de un paso más

en el protocolo de esterilización, un lavado con un antifúngico de amplio espectro, de uso agrícola.

La preparación del material vegetal comenzó con la eliminación de las hojas restantes y la disección de tallos en segmentos nodales y apicales de unos 5 cm de longitud. El proceso de esterilización se inició con un lavado en agua corriente y tween 20 durante 1 minuto. A continuación, se realizó un lavado en una disolución de un fungicida de amplio espectro (1 g/l), en un erlenmeyer de 500 ml y agitación suave (500 revoluciones por minuto) y continua, durante 30 minutos. Seguido de una pre-esterilización mediante un enjuague con etanol al 70% durante 30 segundos. Con este paso se disminuye la presencia de microorganismos e impurezas en las cubiertas seminales (grasas, polvo...), además de permeabilizar las ceras y grasas que protegen la epidermis vegetal, lo que facilita la posterior acción del agente esterilizante. Posteriormente se procedió a realizar un lavado con hipoclorito sódico o cálcico, también en agitación continua, para el que se ensayaron diferentes concentraciones y tiempos (Tabla 4.1). El tratamiento finalizó tras la acción del hipoclorito, con tres enjuagues en abundante agua destilada estéril con una duración de 10 minutos cada uno.

Tabla 4.1. Tratamientos de esterilización aplicado a *P. hadrosoma*.

Tratamiento	Tween 20	Fungicida	Etanol 70 %	NaClO	Ca(ClO) <sub>2</sub>
1	1 min	-	30 seg	5 y 2,5 g/l Cl activo 30 min c/u	-
2	1 min	-	30 seg	10 y 5 g/l Cl activo 20 min c/u	-
3	1 min	0,1% 15 min	30 seg	-	3 g/l Cl activo 30 min
4	1 min	0,1% 90 min	30 seg	-	4 g/l Cl activo 30 min
5	1 min	0,1% 120 min	30 seg	-	4 g/l Cl activo 90 min

#### 4.2.3 Medios de cultivo

En todas las etapas del cultivo *in vitro* de *H. inaguae* y de *Pericallis hadrosoma* se han utilizado como medios de cultivo las formulaciones de sales y vitaminas de MS (Murashige y Skoog, 1962) y MS modificado, las cuales se detallan en la Tabla 4.2. A cada formulación se añadió además 30 g/l de sacarosa.

Como reguladores de crecimiento para promover la multiplicación de yemas se ensayaron diferentes concentraciones de las citoquininas benciladenina (en adelante BA) y quinetina (en adelante KIN). En el caso del enraizamiento, se ensayaron diferentes concentraciones de ácido indol butírico (en adelante IBA).

Todos los medios se solidificaron mediante la adición de 4,5 g/l de agar (LAB Associates – Vitro tissue agar 1200; 1100 g/cm<sup>2</sup>). El pH fue ajustado a 5,8±0,05 con NaOH o HCl antes del proceso de esterilización que consistió en su autoclavado a 120° C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

Tabla 4.2. Formulación de los medios de cultivo utilizados en el cultivo de *H. inaguae* y de *P. hadrosoma*.

Formulación de los medios de cultivo MS y MS modificado (mg/l)			
Componentes		MS	MS mod.
Nitrato amónico	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650,00	825,00
Cloruro cálcico (anhidro)	CaCl <sub>2</sub>	332,20	332,20
EDTA disódico dihidratado	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	37,26	37,26
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,80	27,80
Sulfato magnésico (anhidro)	MgSO <sub>4</sub>	180,70	180,70
Nitrato potásico	KNO <sub>3</sub>	1.900,00	950,00
Fosfato potásico monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	170,00
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	6,20
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
Sulfato de manganeso monohidratado	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16,90	16,90
Ioduro potásico	KI	0,830	0,83
Molibdato sódico dihidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,250	0,25
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	8,60	8.60
Glicina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	2,00	2,00
Myo-Inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	100,0	100,0
Ácido nicotínico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	0,50	0,50
Piridoxina clorhidrato	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl	0,50	0,50
Tiamina clorhidrato	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OS+	0,10	0,10

#### 4.2.4 Establecimiento *in vitro*

##### 4.2.4.1 *Helianthemum inaguae*: germinación *in vitro* y establecimiento

El diseño de la metodología a seguir en la germinación de semillas *in vitro* de *Helianthemum inaguae* se realizó de acuerdo a los resultados previos obtenidos en el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” y a los resultados aportados por otros autores (Iriondo *et al.*, 1995; Corral *et al.*, 1990).

Una vez estériles las semillas, se les aplicaron tres tratamientos de escarificación, que consistían en la imbibición de semillas durante 24 h. en agua destilada, previamente esterilizada, a temperatura ambiente, combinada o no con la inmersión de las mismas en ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ; 95,0-98,0 %) durante 1 – 2 min. Se realizó además un ensayo control, sin escarificación.

#### Tratamientos de germinación realizados

- Control (sin escarificación)
- Escarificación acuosa: Imbibición en agua destilada durante 24 h.
- Escarificación ácida: Inmersión en ácido sulfúrico durante 1 – 2 min.
- Escarificación mixta: Imbibición en agua destilada durante 24 h + inmersión en ácido sulfúrico durante 1 – 2 min.

Las semillas fueron incubadas para obtener su germinación en condiciones asépticas sobre un medio de cultivo constituido por la combinación de sales y vitaminas MS, enriquecido con 30 g/l de sacarosa y solidificado con 4,5 g/l de agar. Como recipientes se utilizaron placas de Petri de poliestireno de un solo uso, estériles, de 100 x 20 mm, en las que se sembraron 20 semillas por placa. Tanto los medios de cultivo como el material necesario para las siembras, fue esterilizado durante 20 minutos, a 120° C y 1 atmósfera de presión. La incubación se realizó en la cámara de cultivo, a una temperatura de 20° C y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Las plántulas procedentes de la germinación de semillas fueron sub-cultivadas a tubos de cristal (22 x 2,5 cm) con 20 ml de medio con idéntica formulación al empleado en la germinación (sales y vitaminas MS + 3% sacarosa + 0,45% de agar), pero al que se adicionó 0,2 mg/l de quinetina para promover la elongación de las plántulas y facilitar así la posterior disección de los explantos.

### **4.2.4.2 *Pericallis hadrosoma*: establecimiento *in vitro* de los explantos**

Tras el proceso de esterilización, el material vegetal se sembró, en condiciones asépticas, en un medio con la formulación MS (Murashige y Skoog, 1962), enriquecido con 30 g/l de sacarosa y con citoquinina, a 0,05 mg/l de KIN. El medio fue solidificado con 4,5 g/l de agar. Dado que tanto las hojas como los tallos de esta especie son claramente pubescentes, fue necesaria la extracción de las yemas, apicales y axilares, y su posterior siembra individualizada. Para el correcto desarrollo de este proceso, se utilizó un microscopio estereoscópico (10x) y una lámpara de luz fría para evitar la desecación del material. Una vez realizado el proceso de establecimiento en condiciones asépticas, las plántulas se sometían a un segundo repicado en un medio de idénticas características para promover su elongación.

Una vez fueron obtenidas las yemas en condiciones de esterilidad, éstas se repicaron a un medio idéntico, con 0,2 mg/l de KIN para promover su elongación antes del proceso de multiplicación.

#### 4.2.5 Multiplicación

A la hora de propagar y multiplicar *in vitro* se seleccionaron como explantos tanto segmentos apicales como segmentos nodales. Éstos se sembraron en medios de cultivo con la formulación MS (sales y vitaminas), con 30 g/l de sacarosa, 4,5 g/l de agar y diferentes concentraciones de BA y de KIN (Tabla 4.3). Se ensayó además una formulación de sales MS modificada, en la que se reducía a la mitad la concentración de nitrógeno mediante la disminución de la presencia de nitrato potásico ( $\text{KNO}_3$ ) y nitrato amónico ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Las concentraciones de los reguladores se mantuvieron fueron idénticas a las empleadas para la anterior formulación.

En el caso de *P. hadrosoma*, aunque se procedió a la introducción *in vitro* de explantos de cada una de sus poblaciones naturales, los ensayos de multiplicación se llevaron a cabo únicamente con aquéllas que ofrecieron un mayor éxito en la fase de establecimiento, con un mayor número de explantos sanos introducidos. El resto de material se conservó a modo de colección *ex situ* de la especie.

La multiplicación de yemas se llevó a cabo a través de la siembra de segmentos nodales y apicales obtenidos a partir de las plántulas elongadas en la fase de establecimiento.



Tabla 4.3. Concentraciones de los reguladores ensayados en la fase de multiplicación.

Concentraciones de las citoquininas ensayadas en la fase de multiplicación						
BA	0	0.5	1	1.5	2	mg/l
	0	2.22	4.44	6.66	8.88	μM/l
KIN	0	0.5	1	1.5	2	mg/l
	0	2.325	4.65	6.975	9.3	μM/l

#### 4.2.6 Elongación

La elongación de las yemas obtenidas en la etapa de propagación y multiplicación, y previo a la fase de enraizamiento, se obtuvo mediante la transferencia de las mismas a medios con concentraciones reducidas de citoquinina, en concreto se empleó BA a 0,05 mg/l y KIN a 0,2 mg/l. El traspaso a la fase de enraizamiento se realizó cuando las plántulas alcanzaban los 1,5 cm de longitud.

#### 4.2.7 Enraizamiento

El enraizamiento de las plántulas obtenidas en la fase de multiplicación, para ambas especies, se llevó a cabo en medios de cultivo MS y MS modificado con 30 g/ l de sacarosa, 4,5 g/l de agar y diferentes concentraciones de ácido indol-butírico (IBA) (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Concentraciones de IBA ensayadas en la fase de enraizamiento.

Concentraciones de IBA ensayadas en la fase de enraizamiento							
IBA	0	0.5	1	2	3	4	mg/l
	0	2.45	4.90	9.80	14.70	19.6	μM/l

#### 4.2.8 Siembra e incubación

Las siembras de todo el material vegetal se llevaron a cabo bajo un ambiente estéril, en una cámara de flujo laminar horizontal (Telstar CLF).

Todos los experimentos, incluida la germinación de semillas, se desarrollaron en la cámara de cultivo del laboratorio de cultivo *in vitro* del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” – Unidad Asociada al CSIC, actualmente desaparecido. Las condiciones de cultivo se establecieron en  $20\pm 3^\circ$  C de temperatura, con un fotoperiodo de 16 hora de luz y 8 de oscuridad. La luz provenía de fluorescentes blancos marca PHILIPS TL-D Super 80 23W 830-97 cm. La humedad relativa se encontraría en torno al 60-70% de humedad.

#### 4.2.9 Aclimatación

La aclimatación a condiciones *ex vitro* fue realizada en condiciones de invernadero utilizando las *vitro* plantas con aspecto más sano y vigoroso, que presentaban un sistema radicular bien desarrollado. Las plántulas enraizadas en condiciones *in vitro* fueron extraídas del medio de cultivo y lavadas en agua destilada tibia para eliminar restos de agar en las raíces. Posteriormente, las raíces se pusieron en contacto con una solución de fungicida (1 g/l) y se sembraron en macetas de 7,5 cm de diámetro utilizando como sustrato una mezcla de tierra, turba y vermiculita (en proporciones 2:1:1) previamente esterilizada. Las *vitro* plantas, una vez sembradas en macetas, se colocaron en

recipientes de poliespan, donde fueron cubiertas con un plástico para conservar un alto grado de humedad ambiental. Esta elevada humedad, fue reduciéndose poco a poco mediante la retirada paulatina del plástico, lo que permitió la aclimatación de las plantas a las condiciones de humedad del invernadero donde se situaron, en el vivero central del Jardín Canario.

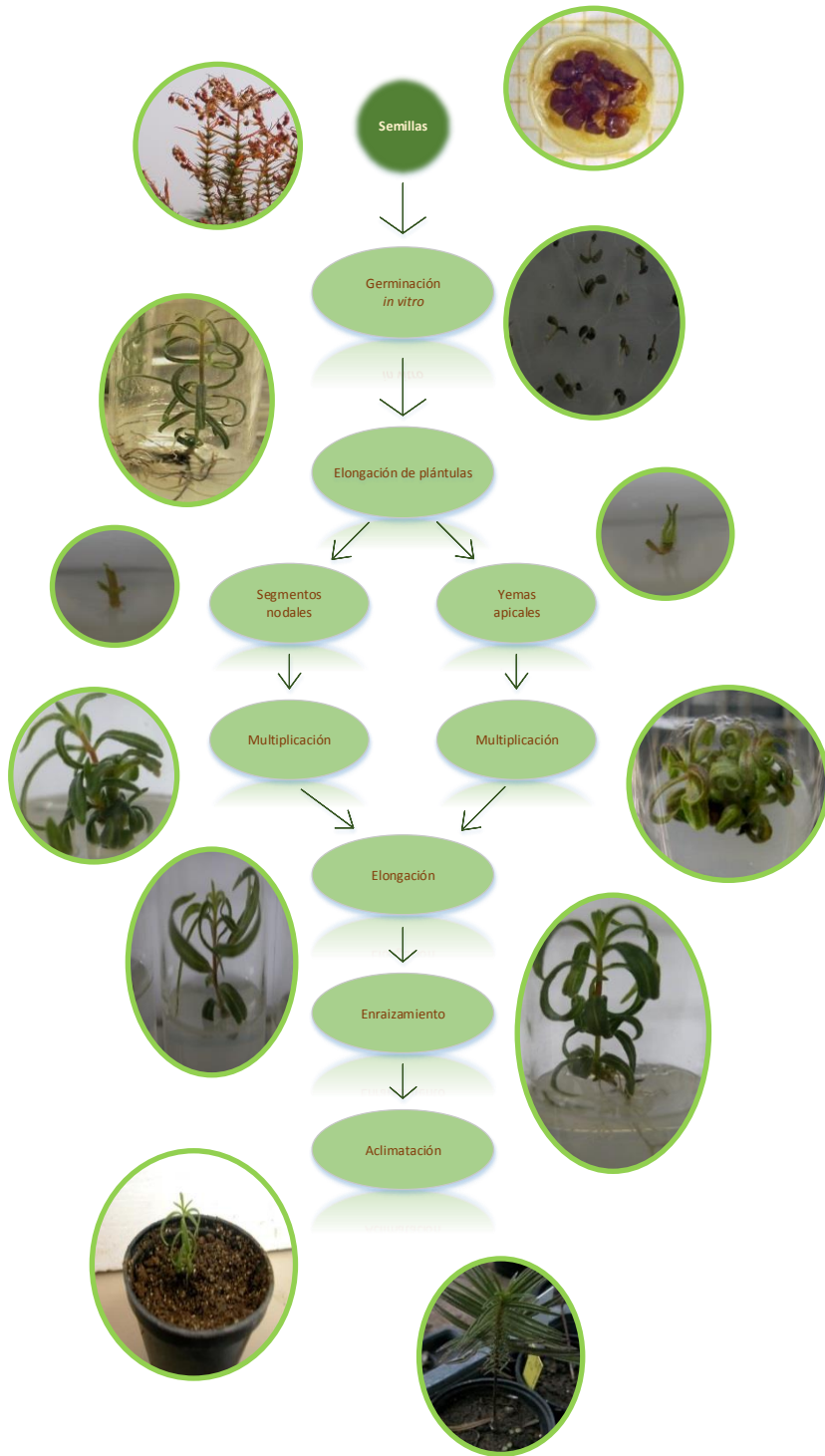


Figura 4.5. Esquema de la micropropagación de *H. inaguae*.

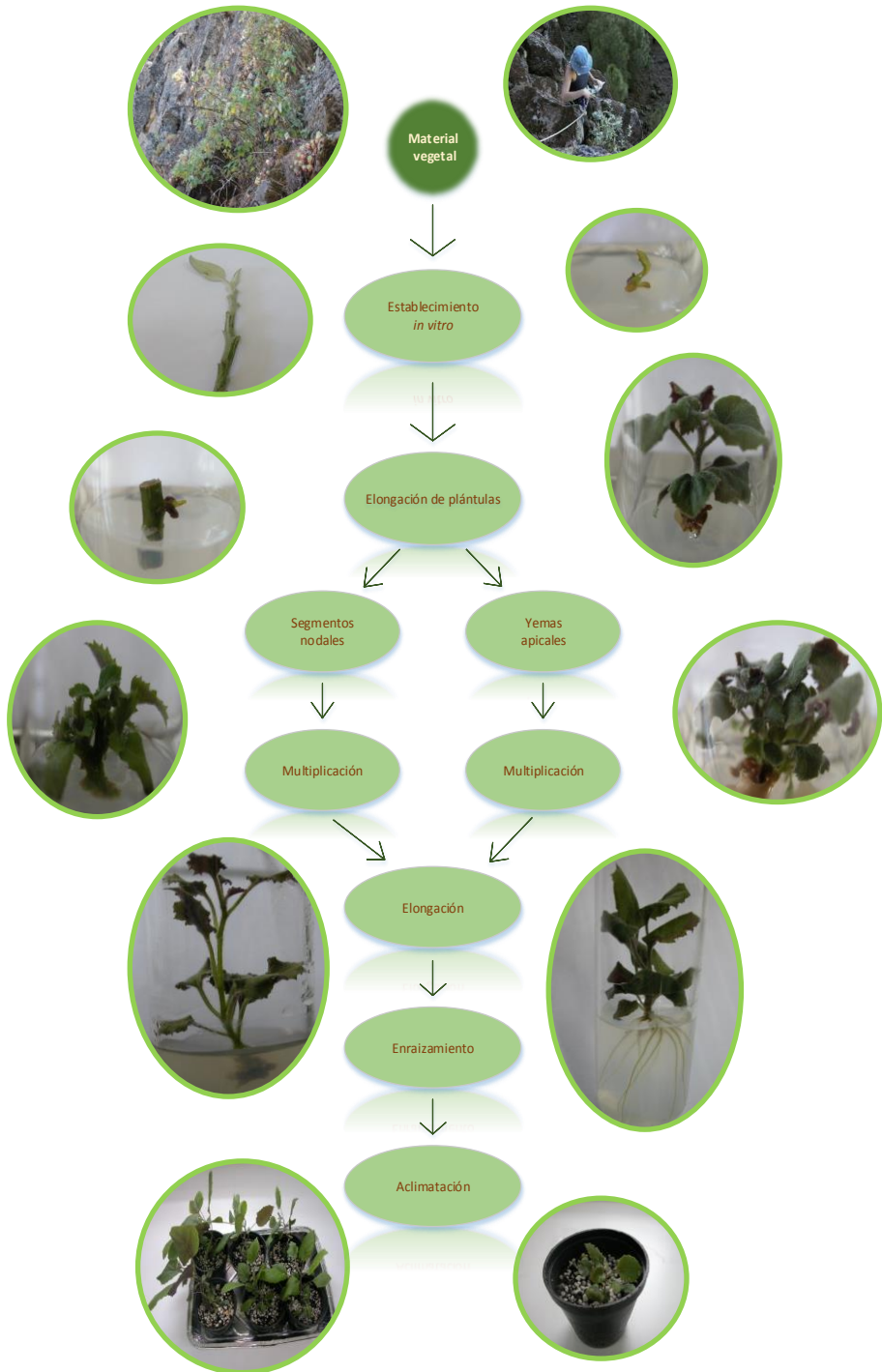


Figura 4.6. Esquema de la micropropagación de *P. hadrosoma*.

#### 4.2.10 Toma de datos y análisis

Dependiendo de cada fase se anotaron las siguientes observaciones:

- ✘ Esterilización del material vegetal: % y tipo de contaminación.
- ✘ Germinación de semillas: % de semillas germinadas.
- ✘ Multiplicación: nº yemas, longitud yemas, formación de tejidos hiperhídricos.
- ✘ Enraizamiento: nº raíces, longitud de raíces, formación de callo.
- ✘ Aclimatación: % supervivencia.

En el caso de la germinación de semillas se realizaron dos repeticiones para cada tratamiento ensayado, los cuales contenían cada uno un total de 400 semillas: 20 placas con 20 semillas cada una. El proceso germinativo fue registrado a diario, si bien, el porcentaje de germinación fue calculado por semanas.

Para cada ensayo de multiplicación y de enraizamiento se usó un mínimo de 18 réplicas, con al menos tres repeticiones de cada uno.

La toma de datos se realizó tras  $30 \pm 5$  días de cultivo. El tratamiento de los datos se realizó con el programa SPSS (versión 15, licencia de Campus de la ULL), a través de los siguientes análisis:

- 📊 Realización de tablas de contingencia.
- 📊 Estadísticos descriptivos.
- 📊 Pruebas de Normalidad. Kolmogorov-Smirnov.
- 📊 Prueba no paramétrica entre grupos. Prueba de Kruskal-Wallis.
- 📊 Prueba no paramétrica entre variables. U de Mann-Whitney.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Micropropagación de *Helianthemum inaguae*

#### 4.3.1.1 Germinación de semillas

La germinación *in vitro* de semillas de *H. inaguae* fue observada con éxito en todos los casos, incluido el tratamiento de control, aunque con diferentes resultados en función del tratamiento empleado.

El procedimiento de esterilización aplicado ofreció un 100% de efectividad, ya que no se observó ningún proceso de contaminación durante toda la etapa de germinación de semillas.

Como puede observarse en la Figura 4.7, los tres tratamientos aplicados incrementan el éxito germinativo frente al control. Los resultados más favorables son los obtenidos tras la imbibición de las semillas durante 24 horas en agua, combinada con la escarificación con ácido sulfúrico. No obstante, aunque los resultados observados para este tratamiento son bastante satisfactorios, hay que añadir, que este proceso, unido a la posterior esterilización de las semillas con lejía comercial impide, entre un 10 y 15%, el correcto desarrollo de las plántulas una vez germinadas.

Por otro lado, se observaron algunas semillas excesivamente decoloradas tras el proceso de esterilización y con cotiledones necrosados transcurridos unos pocos días tras su germinación. En la Figura 4.8 se muestra un ejemplo de germinación *in vitro* de las semillas de *H. inaguae*.

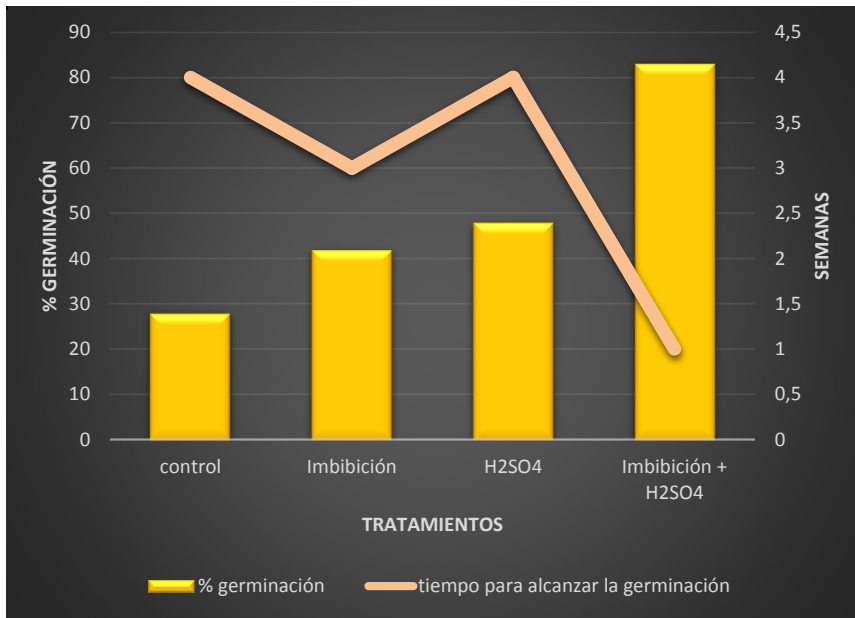


Figura 4.7. Porcentaje de germinación y tiempo (en semanas) transcurrido para alcanzar el máximo de la germinación para cada tratamiento.

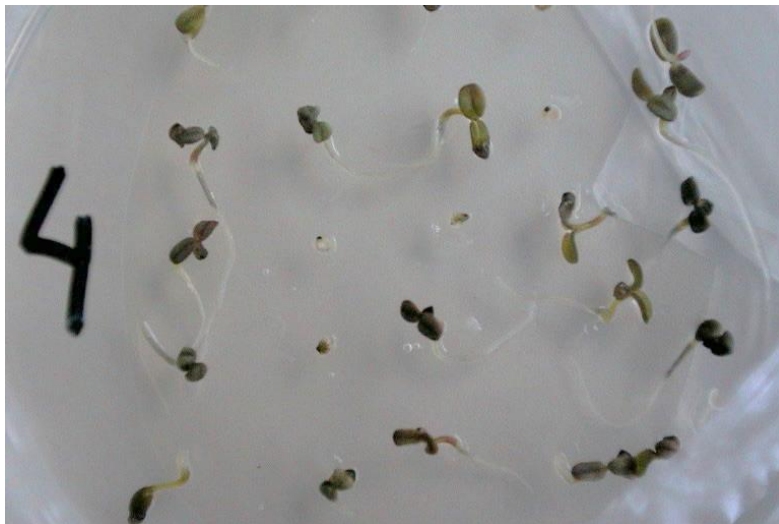


Figura 4.8. Detalle de la germinación de semillas *in vitro* de *H. inaguae*.



#### **4.3.1.2 Etapa de multiplicación**

Las plántulas germinadas fueron cultivadas en un medio MS con 0,05 mg/l de KIN para promover su desarrollo y disponer así del material necesario para los ensayos de multiplicación. En general, las plántulas se desarrollaron con rapidez, por lo que sólo fue necesario uno o dos subcultivos en este medio, lo que permitió tener una gran cantidad de material en unos 30 a 60 días.

Los ensayos se realizaron con dos tipos de explanto: yemas apicales y segmentos nodales. Se ensayaron dos medios de cultivo, MS y MS modificado, a los que se adicionó distintas concentraciones de dos citoquininas: benciladenina (BA) y quinentina (KIN). Se ensayó también un medio control, sin reguladores.

##### **4.3.1.2.1 Cultivo de yemas apicales en medios con quinentina**

El cultivo de yemas apicales en medios con KIN no mostró resultados satisfactorios de multiplicación (Tabla 4.5). Tanto para el medio MS como para el medio MS modificado la adición de KIN no promovió la multiplicación de las yemas con respecto al medio control, sin reguladores. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas, ya que en todos los casos se produjo solo el desarrollo del brote. Tan solo se observaron diferencias en la longitud de los brotes, ya que la presencia de KIN en el medio se tradujo en una menor longitud de los brotes, con diferencias significativas entre el medio control y las distintas concentraciones de KIN ensayadas.

Tabla 4.5. Multiplicación de yemas apicales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de KIN. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

KIN mg/l	KIN $\mu$ M	Medio MS		Medio MS mod.	
		Multiplicación	Longitud	Multiplicación	Longitud
0	0	1,15a $\pm$ 0,54	2,23a $\pm$ 1,53	1,12 $\pm$ 0,43a	1,38a $\pm$ 0,77
0,5	2,32	1,21a $\pm$ 0,83	1,02b $\pm$ 0,61	1,00 $\pm$ 0,00a	0,74b $\pm$ 0,32
1	4,65	1,25a $\pm$ 0,67	0,81b $\pm$ 0,32	1,06 $\pm$ 0,24a	0,75b $\pm$ 0,34
1,5	6,97	1,29a $\pm$ 0,64	1,07b $\pm$ 0,46	1,35 $\pm$ 0,80a	0,69b $\pm$ 0,07
2	9,30	1,29a $\pm$ 0,63	0,99b $\pm$ 0,11	1,24 $\pm$ 0,60a	0,64b $\pm$ 0,09

#### 4.3.1.2.2 Cultivo de segmentos nodales en medios con quinetina

El cultivo de segmentos nodales en medios con KIN mostró unos resultados muy similares a los observados en el cultivo de yemas apicales (Tabla 4.6). No se observó multiplicación con respecto al medio control para ninguna de las concentraciones de KIN ensayadas, tanto en el medio MS como en el medio MS modificado. Tan solo se produjo un aumento en el crecimiento de las yemas axilares de presentes en el segmento nodal, dos yemas por explanto.

Los valores de longitud siguieron también el mismo patrón al observado en el cultivo de yemas, con una mayor longitud de los brotes obtenidos en el medio control. Se observaron diferencias significativas entre éste y los medios con KIN. No se obtuvieron diferencias entre los medios MS y MS modificado, tanto para los valores de multiplicación, como de crecimiento de los brotes.

En la Figura 4.9 se representan los valores obtenidos en el cultivo en medios con KIN, mientras que en la Figura 4.10 y en la Figura 4.11 se observan algunas imágenes de ejemplos de multiplicación de esta especie en medios con KIN.

Tabla 4.6. Multiplicación de segmentos nodales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de KIN. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

KIN mg/l	KIN $\mu$ M	Medio MS		Medio MS mod.	
		Multiplicación	Longitud	Multiplicación	Longitud
0	0	2,83a $\pm$ 1,44	2,04a $\pm$ 1,02	2,48a $\pm$ 0,43	1,27a $\pm$ 0,54
0,5	2,32	2,70a $\pm$ 1,01	0,77b $\pm$ 0,56	2,57a $\pm$ 0,30	0,70b $\pm$ 0,40
1	4,65	2,70a $\pm$ 1,08	0,66b $\pm$ 0,26	2,13a $\pm$ 0,70	0,52b $\pm$ 0,31
1,5	6,97	2,13a $\pm$ 1,01	0,75b $\pm$ 0,09	1,90a $\pm$ 0,94	0,63b $\pm$ 0,08
2	9,30	2,21a $\pm$ 1,18	0,64b $\pm$ 0,34	2,15a $\pm$ 0,04	0,56b $\pm$ 0,08

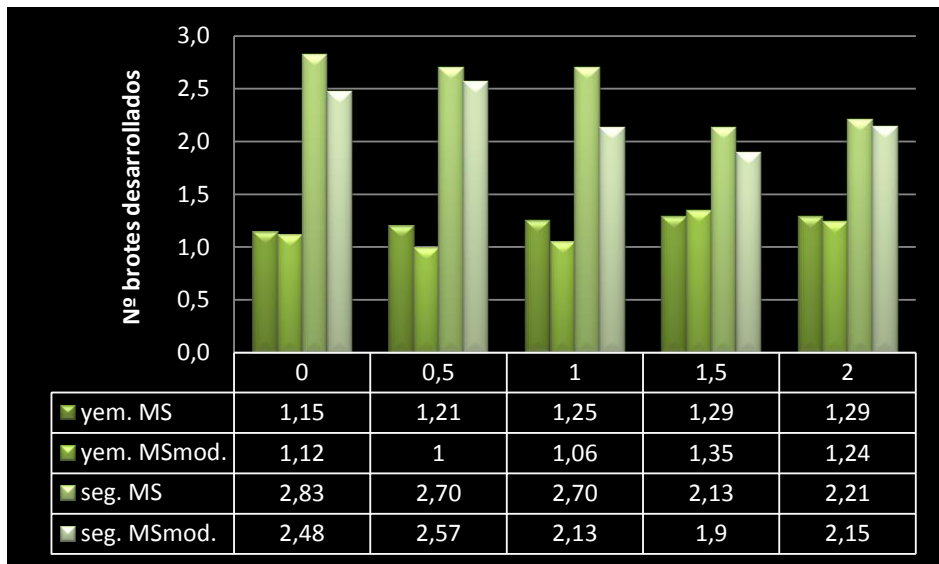


Figura 4.9. Representación de los valores de multiplicación para el cultivo en medios con KIN (concentración de KIN en mg/l)

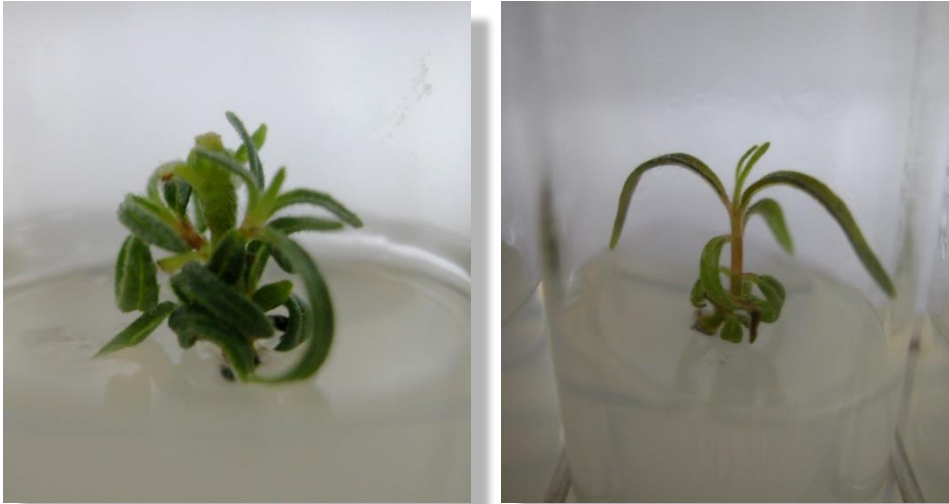


Figura 4.10. Multiplicación de segmentos nodales (izda.) y yemas apicales (dcha.) en medio MS con KIN.



Figura 4.11. Multiplicación de segmentos nodales en medio MS modificado con KIN.

#### **4.3.1.2.3 Cultivo de yemas apicales en medios con benciladenina**

Los resultados obtenidos para el cultivo de yemas apicales con BA mostraron valores muy diferentes a los observados en los medios con KIN. Así, tanto en el medio MS como en el medio MS modificado se produjo la multiplicación de los explantos en presencia de BA, con valores significativamente más elevados que en el medio control (Tabla 4.7). En el medio MS el número de brotes obtenido por explanto se incrementó al aumentar la concentración de BA hasta 1 mg/l, con un valor de multiplicación en torno a tres brotes por explanto. Se observaron diferencias significativas entre el medio control y las concentraciones de 0,5 y 1 mg/l de BA. Sin embargo, a partir de 1,5 mg/l los valores de multiplicación fueron muy similares a los obtenidos con 1 mg/l de este regulador.

En el medio MS modificado, la presencia de BA también promovió la multiplicación con respecto al medio control. En este caso, todas las concentraciones ofrecieron valores muy similares, también en torno a tres brotes por explanto, a excepción de la concentración de 1,5 mg/l de BA, para la que la multiplicación se redujo ligeramente. Entre ambos medios, sólo se observó la existencia de diferencias significativas entre los medios con 0,5 y 1,5 mg/l de BA. En el primer caso con un valor superior en el medio MS modificado, mientras que en el segundo con un valor mayor en el medio MS.

En cuanto a la longitud de los brotes, en ambos medios la adición de BA inhibió el crecimiento de los mismos, con diferencias significativas con respecto al medio control y sin que se observaran diferencias entre las distintas concentraciones ensayadas ni entre ambos medios.

Tabla 4.7. Multiplicación de yemas apicales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de BA. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

BA mg/l	BA $\mu$ M	Medio MS		Medio MS mod.	
		Multiplicación	Longitud	Multiplicación	Longitud
0	0	1,15a $\pm$ 0,54	2,12a $\pm$ 1,53	1,12a $\pm$ 0,43	1,33a $\pm$ 0,80
0,5	2,22	2,42b $\pm$ 0,24	0,81b $\pm$ 0,53	3,89b $\pm$ 1,13	0,54b $\pm$ 0,24
1	4,44	3,52c $\pm$ 2,14	0,67b $\pm$ 0,40	3,32b $\pm$ 1,64	0,57b $\pm$ 0,17
1,5	6,66	3,67c $\pm$ 2,52	0,46c $\pm$ 0,04	1,96c $\pm$ 0,93	0,52b $\pm$ 0,13
2	8,88	3,05c $\pm$ 1,68	0,55b $\pm$ 0,04	3,05bc $\pm$ 2,06	0,56b $\pm$ 0,16

#### 4.3.1.2.4 Cultivo de segmentos nodales en medios con benciladenina

Los resultados del cultivo de segmentos nodales en medios con BA mostraron valores de multiplicación muy similares a los obtenidos con el medio control (Tabla 4.8). Sólo se observó la multiplicación en el medio MS con una concentración de BA de 1 mg/l, con un resultado de 4,88 brotes obtenidos por explanto. El resto de concentraciones, tanto en el medio MS como en el medio MS modificado, no estimuló la formación de nuevos brotes.

La elongación de los brotes obtenidos fue también muy similar para todas las concentraciones ensayadas, sin que se observaran además diferencias entre ambos medios. Sí se obtuvieron valores significativamente más elevados en el medio control, para ambos medios.

En la Figura 4.12 se representan los valores obtenidos en el cultivo en medios con BA, mientras que en la Figura 4.13 y en la Figura 4.14 se observan algunas imágenes de ejemplos de multiplicación de esta especie en medios con BA.

Tabla 4.8. Multiplicación de segmentos nodales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de BA. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

BA mg/l	BA $\mu$ M	Medio MS		Medio MS mod.	
		Multiplicación	Longitud	Multiplicación	Longitud
0	0	2,83a $\pm$ 1,44	2,04a $\pm$ 1,01	2,48a $\pm$ 0,43	1,27a $\pm$ 0,54
0,5	2,22	3,83a $\pm$ 3,33	0,52b $\pm$ 0,16	2,67a $\pm$ 1,49	0,77b $\pm$ 0,38
1	4,44	4,88b $\pm$ 3,74	0,68b $\pm$ 0,34	3,23a $\pm$ 1,87	0,79b $\pm$ 0,35
1,5	6,66	3,56a $\pm$ 0,45	0,51b $\pm$ 0,06	2,20a $\pm$ 0,28	0,36c $\pm$ 0,14
2	8,88	3,34a $\pm$ 1,26	0,41b $\pm$ 0,04	3,11a $\pm$ 1,73	0,47c $\pm$ 0,20

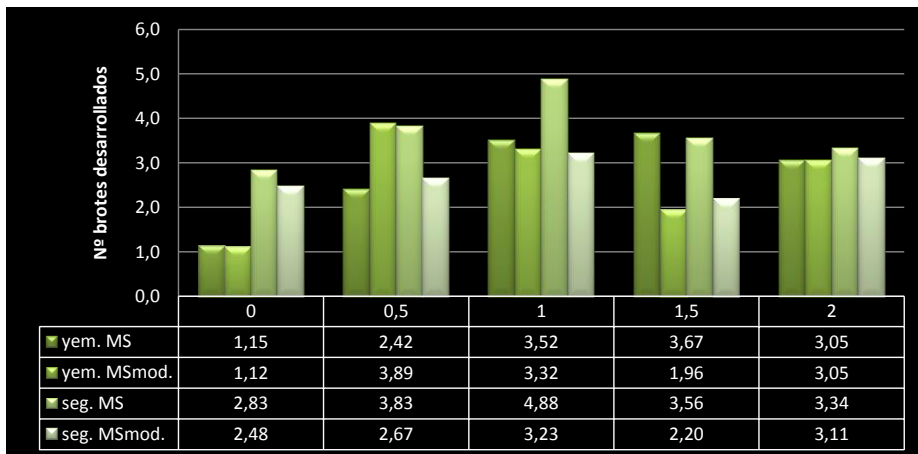


Figura 4.12. Representación de los valores de multiplicación para el cultivo en medios con BA (concentración de BA en mg/l)



Figura 4.13. Multiplicación de segmentos nodales (izda.) y yemas apicales (dcha.) en medio MS con BA.



Figura 4.14. Multiplicación de yemas apicales en medio MS modificado con BA.



### **4.3.1.3 Cuantificación de la hiperhidricidad**

Además de los resultados de multiplicación y de elongación de los brotes, en todos los ensayos se cuantificó el desarrollo de tejidos hiperhídricos.

En el cultivo a partir de yemas apicales se observó la formación de tejidos hiperhídricos en ambos medios, MS y MS modificado en presencia de KIN y de BA, mientras que en los medios sin reguladores solo se produjo este desarrollo, con valores muy reducidos en el medio MS modificado (Tabla 4.9).

La formación de tejidos hiperhídricos fue menor en los medios con KIN, con ligeras diferencias entre los resultados obtenidos para el medio MS y para el MS modificado. Los porcentajes de hiperhidricidad presentaron un rango de valores muy reducido para las distintas concentraciones de KIN en medio MS, con un intervalo de entre el 10,71 y el 18,18%, y sin que se observaran grandes diferencias entre las concentraciones ensayadas. La adición de BA promovió el desarrollo de este tipo de tejidos en un rango mayor, de entre el 41,30 y el 62,50%. Tampoco se observó ninguna concordancia clara entre la formación de este tipo de tejidos y la concentración de BA.

En el medio MS modificado los resultados muestran valores de hiperhidricidad para todas las concentraciones de KIN y de BA, a excepción de la concentración de 0,5 mg/l de KIN. Los valores de hiperhidricidad variaron entre el 12,00 y el 39,39% para el cultivo en medios con KIN y entre el 31,03 y el 75,86% para los medios con BA. Al igual que en el caso de los medios MS, no se observó un patrón de desarrollo que pueda relacionarse con la concentración del regulador ensayado.

Tabla 4.9. Porcentajes de formación de tejidos hiperhídricos observados en el cultivo de yemas apicales.

Regulador (mg/l)	Medio MS		Medio MS mod.	
	KIN	BA	KIN	BA
0	0	0	3,57	3,57
0,5	14,81	41,30	0	31,03
1	10,71	51,85	39,39	64,00
1,5	18,18	62,50	12,90	33,33
2	11,11	50,00	12,00	75,86

En el cultivo a partir de segmentos nodales en el medio MS con KIN se observó un porcentaje de hiperhidricidad reducido salvo para la concentración de 1 mg/l de KIN, que alcanzó un valor de 45,45%. La adición de BA mostró valores más elevados, superiores al 45,71%, incluso con concentraciones reducidas de este regulador. El medio control no indujo la formación de tejidos hiperhídricos.

En el medio MS modificado los porcentajes de hiperhidricidad fueron más elevados que los observados en el medio MS. En presencia de KIN se observó un incremento de la hiperhidricidad hasta alcanzar el 70,97% con la concentración de 1 mg/l; para después reducirse al aumentar la concentración de KIN, hasta el 28,00% obtenido con 2 mg/l. Los medios que contenían BA también mostraron valores de hiperhidricidad más elevados que los observados en presencia de KIN, a excepción de la concentración de 1 mg/l, con resultados muy semejantes (70,97 y 70,37%). El medio control indujo la formación de este tipo de tejidos en un 11,54%. Los valores de hiperhidricidad fueron más elevados en el medio MS modificado.

Los valores de hiperhidricidad para el cultivo de esta especie se representan en la figura Figura 4.15, mientras que en la Figura 4.16 puede observarse algunos ejemplos del desarrollo de este tipo de tejidos.

Tabla 4.10. Porcentajes de formación de tejidos hiperhídricos observados en el cultivo de segmentos nodales.

Regulador (mg/l)	Medio MS		Medio MS mod.	
	KIN	BA	KIN	BA
0	0	0	11,54	11,54
0,5	13,16	64,00	40,00	72,73
1	45,45	45,71	70,97	70,37
1,5	17,65	51,43	46,88	59,26
2	20,83	57,50	28,00	68,00

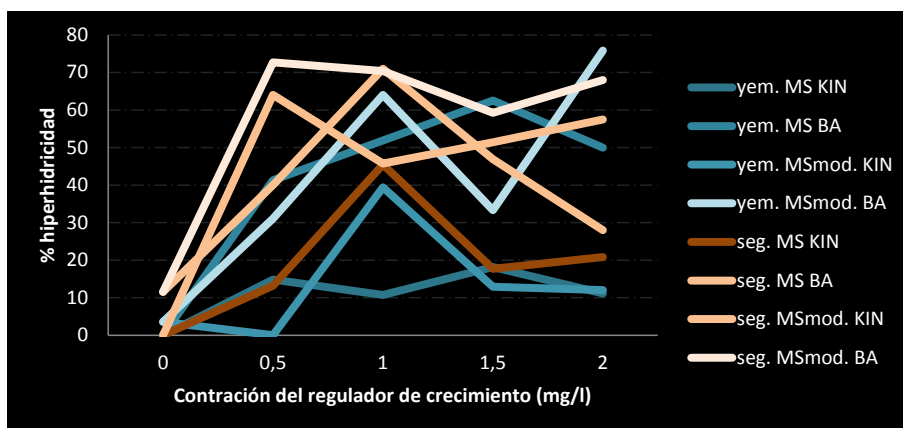


Figura 4.15. Representación de los porcentajes de hiperhidricidad para todos los medios ensayados en función de la concentración de cada regulador (KIN y BA).



Figura 4.16. Formación de tejidos hiperhídricos en el cultivo de segmentos nodales (arriba) y de yemas apicales (abajo).

#### **4.3.1.4 Etapa de elongación**

La etapa de elongación se llevó a cabo para aquellas yemas que no alcanzaban la elongación adecuada para pasar a la fase de enraizamiento (longitud menor a 1,5 cm).

En esta etapa no se tomaron los valores de elongación alcanzados, tan solo se cultivaron los brotes obtenidos en la fase de multiplicación en medios más favorables para promover su elongación. Se consideró una longitud a partir de 1,5 cm como medida favorable para pasar a la siguiente etapa, de enraizamiento.

#### **4.3.1.5 Etapa de enraizamiento**

Los brotes que superaron la longitud de 1,5 cm fueron transferidos a medios MS y MS modificado a los que se añadió distintas concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) para promover y valorar su enraizamiento.

En el medio MS se observó un incremento en el desarrollo de raíces acorde con el aumento de la concentración de IBA. Los valores mostraron diferencias significativas entre el medio control y los medios con IBA. La adición en concentraciones de entre 0,5 y 3 mg/l promovió el desarrollo de un número medio de entre 7 y 8 raíces por brote. Resultado que se incrementó significativamente con la concentración de 4 mg/l, que alcanzó un resultado de 8 raíces por brote.

La longitud de las raíces siguió un patrón irregular, sin aparente relación con la concentración de IBA. Sus valores se situaron entre 1,34 y 2,16 cm para las concentraciones de 3 y 2 mg/l respectivamente.

La formación de callo también mostró un patrón relacionado con la concentración. En el medio control y con 0,5 mg/l de IBA no se desarrolló callo,

mientras que a partir de 1 mg/l se observó este desarrollo en un 53,65 de los brotes hasta alcanzar un valor del 100% con la concentración de 4 mg/l de IBA.

En el medio MS modificado la formación de raíces tuvo un patrón más irregular, con ligeras diferencias entre las distintas concentraciones ensayadas pero sin que pueda relacionarse con las variaciones en la concentración de IBA. Los valores más altos se obtuvieron con el medio control y con los que llevaban concentraciones de 0,5, 2 y 4 mg/l, con un valor medio en torno a 9-10 raíces por brote.

La longitud de las raíces en este medio varió entre 1,13 y 3,37 cm. En este caso, se observó una reducción en la longitud al aumentar la concentración de IBA. Así, a medida que se incrementa la concentración de este regulador, el número de raíces aumenta, a la vez que se reduce su longitud.

El medio MS modificado no estimuló la formación de callo en el medio control. Si bien, la adición de IBA promovió su desarrollo en una proporción muy elevada (superior al 90%) en todas las concentraciones ensayadas.

Los resultados se muestran en la Tabla 4.11, así como en la Figura 4.17 y Figura 4.18.

Si comparamos en el enraizamiento entre ambos medios, puede observarse como el medio MS promueve la formación de raíces en un número ligeramente inferior al observado en el medio MS modificado, mientras que la longitud de las raíces no presenta valores significativamente diferenciados entre ellos. La formación de callo fue mucho más reducida en el medio MS.

Tabla 4.11. Resultados obtenidos en la etapa de enraizamiento de *H. inaguae*: nº de raíces y longitud (cm). Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

IBA mg/l	Medio MS			Medio MS mod.		
	Nº raíces	Longitud	% callo	Nº raíces	Longitud	% callo
0	3,71a $\pm$ 2,46	1,39ae $\pm$ 0,80	0	9,10ab $\pm$ 3,80	2,70a $\pm$ 1,02	0
0,5	7,13b $\pm$ 3,12	1,90b $\pm$ 0,87	0	10,83b $\pm$ 3,45	3,37b $\pm$ 1,00	95,8
1	7,04b $\pm$ 3,07	1,80bcd $\pm$ 0,85	53,6	8,16c $\pm$ 3,35	2,72a $\pm$ 0,95	96,7
2	7,66b $\pm$ 3,74	2,16d $\pm$ 1,05	87,3	10,44ab $\pm$ 4,45	1,84c $\pm$ 0,92	100
3	8,32b $\pm$ 5,87	1,34e $\pm$ 0,77	83,3	8,83ac $\pm$ 4,48	1,26d $\pm$ 0,67	100
4	10,20c $\pm$ 4,20	1,82abc $\pm$ 1,14	100	9,14abc $\pm$ 4,23	1,13d $\pm$ 0,73	100

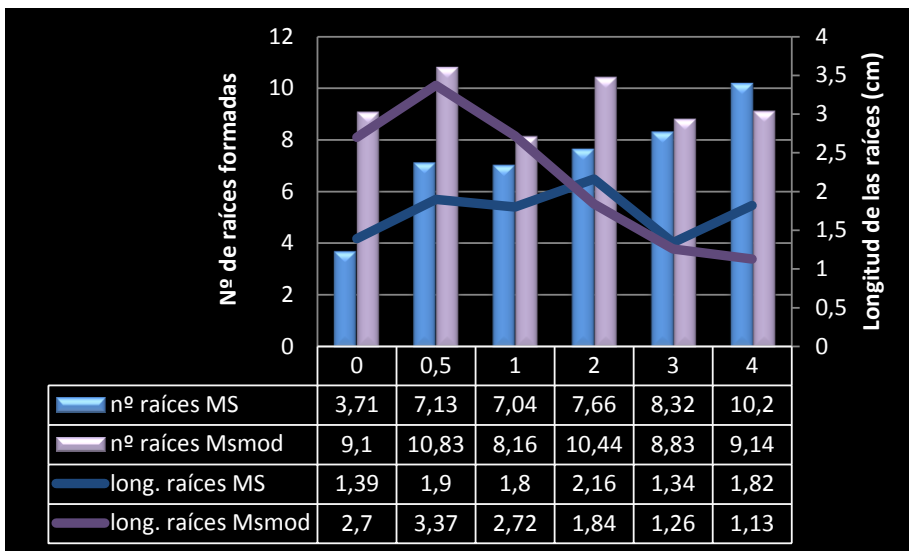


Figura 4.17. Valores obtenidos en el enraizamiento de *H. inaguae* para cada concentración de IBA ensayada (mg/l)



Figura 4.18. Plantas enraizadas en medio MS modificado (izda.) y en medio MS, sin IBA.



#### 4.3.1.6 Etapa de aclimatación

Las plantas obtenidas en la etapa de enraizamiento que fueron seleccionadas para su aclimatación a las condiciones *ex vitro*, se cultivaron de forma que pudiésemos llevar a cabo una disminución paulatina de la humedad ambiental.

Se obtuvo un 85% de efectividad con el tratamiento de aclimatación de las plántulas de *Helianthemum inaguae*.

En la Figura 4.19 se muestran algunos ejemplos de plantas de *H. inaguae* obtenidas *in vitro*.



Figura 4.19. Plantas de *H. inaguae* tras su aclimatación.

### 4.3.2 Discusión

El tratamiento más eficaz para la promover la germinación de semillas de *H. inaguae* consistió en la imbibición de las semillas en agua durante 24 horas, combinada con la escarificación con ácido sulfúrico. Estos resultados de germinación, en los que la escarificación mejora el éxito germinativo, se han observado con éxito en otras especies del género *Helianthemum*. Especies como *H. caput-felis*, *H. guerrae* (GENMEDOC 2006) o *H. polygonoides* (Iriundo et al. 1995) mejoran los porcentajes de germinación cuando se aplica algún tratamiento de escarificación, ya sea química (ácido sulfúrico) o mecánica (lijado de la cubierta seminal) o cuando se combina ésta con la imbibición en agua.

Dada la disponibilidad de semillas de esta especie, con los resultados obtenidos, fue posible obtener una gran cantidad de material para el inicio del cultivo *in vitro*. Las semillas son el material de partida ideal para iniciar el cultivo de una especie, ya que permiten el mantenimiento de una base genética más amplia (Fay, 1992; Benson et al., 2000; Gonçalves et al., 2010).

El cultivo *in vitro* de *H. inaguae* se llevó a cabo con éxito en todos los ensayos realizados, aunque con distintos grados de eficacia en función del tipo de explanto y del tipo de citoquinina empleada.

En general, se observó una mayor efectividad en los medios con BA frente a los que contenían KIN. En estos, el cultivo de segmentos nodales ofreció resultados más positivos que los obtenidos en el cultivo de yemas apicales.

El cultivo de yemas apicales en presencia de KIN mostró valores de multiplicación algo reducidos, en torno a la unidad, tanto para el medio MS como para el MS modificado. Esto significa que prácticamente sólo se produjo el desarrollo de las yemas sembradas como explanto. En el caso de los segmentos nodales, estos ofrecieron resultados algo más elevados, con valores cercanos a

tres, lo que puede estar relacionado con la presencia de dos yemas axilares en cada segmento nodal. Para ambos medios, MS y MS modificado, no se observaron diferencias significativas entre el medio control y ninguna de las concentraciones de KIN empleadas, por lo que la adición de KIN al medio no ha resultado eficaz para inducir la multiplicación en esta especie.

El cultivo en medios con BA mostró resultados de multiplicación más elevados, tanto en el cultivo de yemas apicales como en el de segmentos nodales. En todas las concentraciones de BA ensayadas se obtuvieron diferencias significativas con respecto al medio control. En cambio, no se observaron diferencias entre los dos tipos de explantos utilizados ni entre las dos formulaciones de medios empleadas, MS y MS modificado.

El cultivo de yemas apicales ofreció valores de multiplicación en torno a tres brotes por explanto, con algunos valores cercanos a cuatro. En el caso de los segmentos nodales, sólo se produjo un valor de multiplicación superior al resto (de 4,88 brotes por explanto) y significativamente diferente con la concentración de 1 mg/l de BA.

Existen diversos trabajos de micropropagación con especies del género *Helianthemum*. De acuerdo con los resultados publicados, especies como *H. almeriense* mostraron de multiplicación más efectivos con la adición de KIN (Morte y Honrubia, 1992), mientras que en *H. marminorense* y en *H. bystropogophyllum* se observó una mayor eficacia del cultivo en BA (Serrano Martínez *et al.*, 2012; Santana López *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos con *H. inaguae* se asemejan más a los observados en estas dos últimas especies. Asimismo, concuerdan con las experiencias preliminares publicadas en 2006, donde el cultivo en medios MS con BA mostraba valores de multiplicación más elevados con respecto a los que contenían KIN (Santana López *et al.*, 2006).

Aunque el cultivo de segmentos nodales mostró resultados más favorables en cuanto a multiplicación, en otras especies se han obtenidos valores semejantes para ambos tipos de explanto (Morte y Honrubia, 1992)

El desarrollo de hiperhidricidad fue más elevado en el medio MS modificado, tanto en los que contenían KIN como en los que llevaban BA. En general se observó un incremento en el porcentaje de hiperhidricidad al aumentar la concentración del regulador hasta 1 o 1,5 mg/l, para después disminuir con las concentraciones más elevadas.

En el medio MS, los valores de hiperhidricidad fueron reducidos en presencia de KIN (10-15%), mientras que la adición de BA promovió su desarrollo en valores cercanos al 50%. El medio control, sin reguladores, no estimuló la formación de este tipo de tejidos. El desarrollo de hiperhidricidad en el cultivo *in vitro* ha sido relacionado con el aporte exógeno de citoquininas (Lessem *et al.*, 1988; Ivanova *et al.*, 2006), donde la adición de BA suele promover valores más elevados de hiperhidricidad que con el uso de KIN.

En el medio MS modificado, el porcentaje de hiperhidricidad fue siempre más elevado, casi un tercio superior, al observado en el medio MS, con algunas excepciones. Los valores fueron también más elevados en los medios con adición de BA.

Aunque numerosos autores sugieren que elevadas concentraciones de iones amonio pueden estar relacionadas con el incremento en la hiperhidricidad en algunas especies (Vieitez *et al.*, 1985), en el caso de *H. inaguae*, el medio MS modificado promovió valores más elevados de hiperhidricidad. Estos resultados han sido observados también con otras especies, como es el caso de *Juglas nigra* (*Juglandaceae*), para la que la reducción de la concentración de sales (dilución a la mitad del medio DKW y uso del WPM) incrementó el porcentaje de hiperhidricidad (Bosela y Michles, 2008).

En cuanto al tipo de explanto, la formación de este tipo de tejidos fue, en general, más alta en el cultivo de segmentos nodales. Estas diferencias se incrementaron con el medio MS modificado. En algunos trabajos, los diferentes resultados obtenidos con segmentos nodales y apicales se han relacionado con el estado fisiológico de los brotes en distintas regiones del tallo o debido a la existencia de un gradiente de reguladores de crecimiento (Vieitez *et al.*, 1985; Label *et al.*, 1988).

Todos los brotes desarrollados en la etapa de multiplicación pasaron por una fase de elongación, ya que, a excepción de los cultivados en el medio control, en todos los casos la longitud era menor a 1,5 cm.

El enraizamiento se llevó a cabo con éxito en todos los casos. Los dos medios ensayados promovieron la formación de raíces en ausencia de reguladores, con una mayor efectividad en el medio MS modificado. En éste se obtuvo un número de raíces y una longitud de las mismas superior a la observada en el medios MS. Este enraizamiento espontáneo concuerda con lo reportado por Serrano Martínez y colaboradores (2012) para el cultivo de *H. marminorensis*, para la que no fue necesaria la realización de ensayos de enraizamiento al producirse de forma natural. En el caso de *H. almeriense* se observó también el enraizamiento espontáneo con concentraciones reducidas de citoquininas. La formación de raíces fue también efectiva cuando se redujo la concentración de macronutrientes (Morte y Honrubia, 1992), lo que cual se asemejaría a los resultados obtenidos para *H. inaguae*, donde el medio MS modificado fue más efectivo.

La adición de IBA promovió significativamente la formación de raíces en el medio MS. Si bien, no parece existir una relación entre la longitud de las raíces formadas y las distintas concentraciones de este regulador. En el medio MS modificado su adición no parece estimular el enraizamiento de una forma tan

clara como a la observada en el medio MS, con respecto al medio control. En cambio, sí se observó la reducción de la longitud de las raíces al aumentar la concentración de IBA.

Por otro lado, la adición de IBA promovió la formación de callo basal con diferencias entre ambos medios. Este desarrollo fue proporcional a la concentración de IBA y mucho más elevado en el medio MS modificado. El desarrollo de este tipo de tejido impide un correcto enraizamiento, ya que la formación de raíces suele producirse a partir del callo y no a partir de la planta, lo que hace que resulte un enraizamiento inviable para la posterior aclimatación de las plantas.

### 4.3.3 Micropropagación de *Pericallis hadrosoma*

#### 4.3.3.1 Establecimiento *in vitro*

##### 4.3.3.1.1 Esterilización del material vegetal

La esterilización de los explantos de *P. hadrosoma* se realizó mediante la aplicación de diferentes tratamientos basados en los protocolos habituales del laboratorio. Los agentes esterilizantes utilizados, así como los tiempos de exposición variaron en función del estado del material recolectado y de los resultados obtenidos en ensayos previos. Dada la escasez de material, no se pudo obtener datos con valor estadístico que permitieran avalar la identificación de un protocolo estándar para esta especie. Así, tras la aplicación de cinco tratamientos, los resultados mostraron una mejora en su efectividad a medida que se ensayaron nuevas combinaciones y tiempos de exposición (Tabla 4.12).

En los tratamientos con hipoclorito sódico, se observó una reducción de la contaminación al aumentar la concentración de este producto. Si bien, a esta mejora en los resultados de contaminación (39,29% frente al 70,84% inicial) le siguió el necrosamiento de los tejidos debido al daño producido por el agente esterilizante, lo que promovió su sustitución por hipoclorito cálcico, con menor capacidad de penetración en los tejidos. Además, dado que la contaminación observada fue mayoritariamente fúngica, se procedió también a añadir un fungicida de amplio espectro en un paso previo a la esterilización.

Los tratamientos con fungicida e hipoclorito cálcico también mostraron diferentes resultados, su efectividad aumentó progresivamente al variar las condiciones de la esterilización, es decir, las concentraciones de fungicida e hipoclorito cálcico y los tiempos de exposición. El tratamiento más efectivo fue, por tanto, el último ensayado (5), en el que se incrementó el tiempo de

exposición a ambos agentes esterilizantes. Se obtuvo un valor de contaminación del 30,00%, sin que se observara el necrosamiento de los tejidos.

**Tabla 4.12. Resultados obtenidos en la esterilización de los explantos de *P. hadrosoma*: porcentaje de contaminación; tipo de contaminación (cont.) y porcentaje de necrosamiento (necr.).**

Tratamiento	% cont.	Tipo de cont.	% necr.
1 NaCl-5 y 2,5 g/l Cl activo, 30 min	70,84	Fúngica	0
2 NaCl-10 y 5 g/l Cl activo, 30 min	39,29	Fúngica	20,59
3 Fung. 0,1%, 15 min; Ca(ClO) <sub>2</sub> -3 g/l Cl activo, 30 min	100	Fúngica	0
4 Fung. 0,1%, 1:30; Ca(ClO) <sub>2</sub> -4 g/l Cl activo, 30 min	56,25	Fúngica	0
5 Fung. 0,1%, 2:00; Ca(ClO) <sub>2</sub> -4 g/l Cl activo, 20 min	30	Fúngica	0

Tras el proceso de esterilización se sembraron yemas apicales y axilares aisladas, a las que se eliminó además la capa de pelos que las cubría con el fin de reducir la posible contaminación. Estos explantos fueron cultivados en un medio MS con 0,05 mg/l de KIN para promover su desarrollo y disponer de material suficiente para los siguientes ensayos. La elongación de los brotes requirió de uno o dos subcultivos en este medio, por lo que, tras 30 o 60 días, fue posible disponer del material necesario para las siguientes etapas.

#### 4.3.3.2 Etapa de multiplicación

Los ensayos de multiplicación de *P. hadrosoma* se realizaron con dos tipos de explanto: yemas apicales y segmentos nodales. Se ensayaron dos medios de cultivo, MS y MS modificado, a los que se adicionó distintas concentraciones de dos citoquininas: benciladenina (BA) y quinetina (KIN). Se ensayó también un medio control, sin reguladores.



#### **4.3.3.2.1 Cultivo de yemas apicales en medios con quinetina**

Los resultados obtenidos en el cultivo de yemas apicales mostraron la existencia de multiplicación en presencia de KIN para ambos medios. La adición de KIN con respecto al medio control, sin reguladores, promovió la formación de yemas en todas las concentraciones ensayadas, con diferencias significativas con respecto al medio control, tanto para el medio MS como para el medio MS modificado (Tabla 4.13).

Los valores de multiplicación en medio MS se situaron en un intervalo de entre 2,26 y 4,41 brotes por explanto. Se observó un ligero incremento en el número de yemas al aumentar la concentración de KIN. No obstante, sólo se obtuvieron diferencias significativas con la concentración de 2 mg/l de KIN. Los valores obtenidos con el resto de concentraciones fueron estadísticamente iguales.

Los resultados obtenidos en el medio MS modificado mostraron también una tendencia de incremento con la concentración, tal y como se observó en el medio MS. Se observaron diferencias significativas entre el medio control y el resto de concentraciones. Con la adición de KIN los valores variaron en un rango de entre 2,03 y 3,74 brotes por explanto, para las concentraciones de 0,5 y 2 mg/l respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre todas las concentraciones, a excepción de las obtenidas con 1 y 1,5 mg/l de KIN, que fueron estadísticamente iguales.

En cuanto a la semejanza entre ambos medios, los valores de multiplicación obtenidos entre el medio MS y el medio MS modificado fueron muy similares para cada concentración, sin que se observaran diferencias significativas entre ambos.

La longitud de los brotes obtenidos en los ensayos de multiplicación se vio incrementada con la adición de KIN con respecto al medio control para ambos

medios. Sólo se observaron diferencias significativas en los medios modificados, donde la elongación de los brotes disminuye al aumentar la concentración de KIN. Entre ambos medios no se aprecian diferencias significativas para la elongación de los brotes.

**Tabla 4.13. Multiplicación de yemas apicales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de KIN. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.**

KIN mg/l	KIN $\mu$ M	Medio MS		Medio MS mod.	
		Multiplicación	Longitud	Multiplicación	longitud
0	0	1,00a $\pm$ 0,00	0,50a $\pm$ 0,36	1,04a $\pm$ 0,19	0,46a $\pm$ 0,21
0,5	2,32	2,26b $\pm$ 1,24	1,00b $\pm$ 0,25	2,03b $\pm$ 1,50	0,90b $\pm$ 0,39
1	4,65	2,92b $\pm$ 1,89	0,89b $\pm$ 0,33	3,06c $\pm$ 1,39	0,80b $\pm$ 0,31
1,5	6,97	2,83b $\pm$ 1,43	0,88b $\pm$ 0,31	2,71c $\pm$ 1,04	0,61c $\pm$ 0,19
2	9,30	4,41c $\pm$ 1,80	0,79b $\pm$ 0,17	3,74d $\pm$ 1,24	0,62c $\pm$ 0,17

#### 4.3.3.2.2 Cultivo de segmentos nodales en medios con quinetina

Los resultados obtenidos a partir del cultivo de segmentos nodales siguen un patrón de multiplicación similar al observado en el cultivo de yemas apicales, para los que la adición de KIN promueve la multiplicación con respecto al medio control. Sin embargo, se observaron valores de multiplicación superiores a los obtenidos en el cultivo de yemas, relacionados con la presencia de más de un meristemo axilar en el segmento nodal (Tabla 4.14).

En los medios MS la adición de KIN promueve la multiplicación con respecto al medio control, con diferencias estadísticamente significativas. Con la inclusión de KIN en el medio se obtuvieron valores que variaron entre 3,52 y 4,41 brotes por cada explanto. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones ensayadas.

En el caso del medio MS modificado, la adición de reducidas concentraciones de KIN (0,5 mg/l) no promueve valores de multiplicación significativamente

diferentes con respecto al medio control. El incremento en la concentración de KIN sí ofrece un aumento en la tasa de multiplicación, aunque con diferencias menos pronunciadas. Los valores obtenidos en presencia de KIN se sitúan en un rango de entre 3,03 y 4,48 brotes obtenidos por explanto, pero no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas. En cuanto a las diferencias entre ambos medios, se obtuvieron valores estadísticamente similares para cada concentración de KIN.

Sólo se observaron diferencias significativas entre el tipo de explanto utilizado para el medio control y para las concentraciones de 0,5, 1 y 1,5 mg/l de KIN en el medio MS y para el medio control y las concentraciones de 0,5 y 1,5 mg/l de KIN en el medio MS modificado. En estos casos los valores de multiplicación obtenidos fueron más altos cuando se utilizaban segmentos nodales como explantos.

Por otro lado, la longitud de los brotes obtenidos se incrementó con la adición de KIN, con ligeras diferencias entre cada una de sus concentraciones y con valores muy similares entre ambos medios, a excepción de las concentraciones de 1,5 y 2 mg/l de KIN, para las que sí se observaron diferencias significativas entre los dos medios ensayados, para los que la elongación fue algo mayor en los medios MS. No se observaron diferencias estadísticas con respecto a los valores de elongación obtenidos para los brotes desarrollados a partir de yemas apicales.

Los valores de multiplicación en medios con KIN están representados en la Figura 4.20, mientras que en la Figura 4.22 y Figura 4.21 se muestran algunos ejemplos de multiplicación en medios con KIN.

Tabla 4.14. Multiplicación de segmentos nodales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de KIN. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

KIN mg/l	KIN $\mu$ M	Medio MS		Medio MS mod.	
		Multiplicación	Longitud	Multiplicación	Longitud
0	0	2,32a $\pm$ 0,83	0,48a $\pm$ 0,27	2,56a $\pm$ 1,01	0,35a $\pm$ 0,19
0,5	2,32	3,52b $\pm$ 1,96	0,67b $\pm$ 0,23	3,03ab $\pm$ 1,47	0,67b $\pm$ 0,38
1	4,65	4,33b $\pm$ 2,27	0,74bc $\pm$ 0,26	3,63bc $\pm$ 1,62	0,67b $\pm$ 0,31
1,5	6,97	4,00b $\pm$ 1,89	1,06c $\pm$ 0,66	4,33c $\pm$ 1,42	0,51c $\pm$ 0,16
2	9,30	4,41b $\pm$ 2,10	0,74b $\pm$ 0,21	4,48 c $\pm$ 1,78	0,44c $\pm$ 0,13

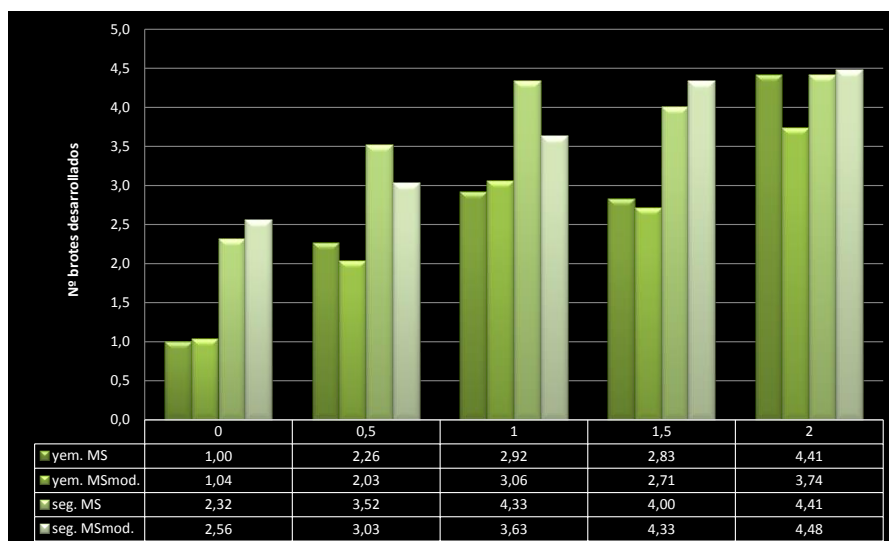


Figura 4.20. Representación de los valores de multiplicación para el cultivo en medios con KIN. Concentración de KIN en mg/l.

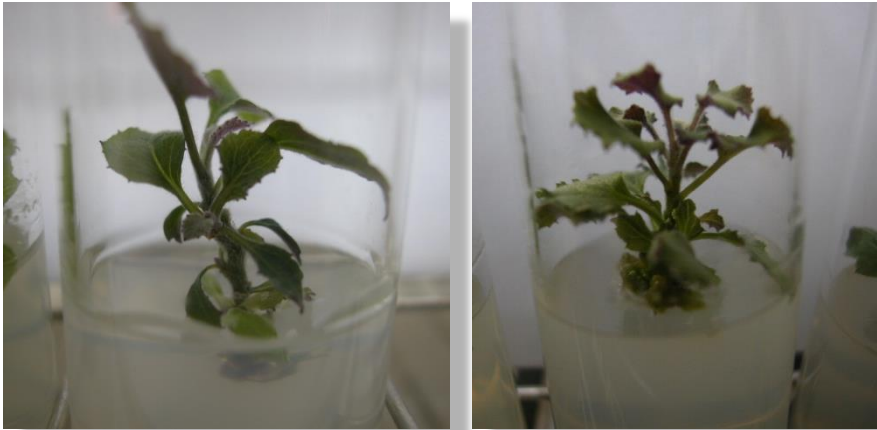


Figura 4.22. Multiplicación de segmentos nodales (izda.) y de yemas apicales (dcha.) en medio MS con KIN.

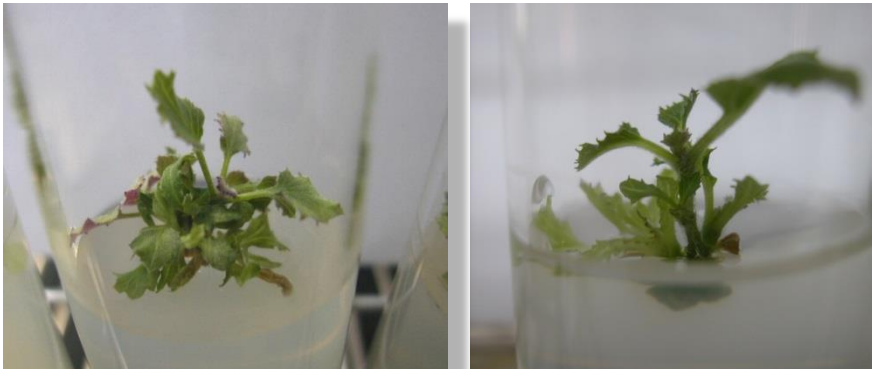


Figura 4.21. Multiplicación de segmentos nodales (izda.) y de yemas apicales (dcha.) en medio MS mod. con KIN

#### 4.3.3.2.3 Cultivo de yemas apicales en medios con benciladenina

El cultivo de yemas apicales en medios MS con adición de BA ofreció unos resultados bastante diferentes a los observados con KIN (Tabla 4.15). La presencia de BA en el medio promueve la multiplicación con respecto al medio control, con un valor de 4,17 brotes obtenidos por explanto. No obstante, con concentraciones de BA iguales o superiores a 1 mg/l, no se produce el desarrollo ni la multiplicación de los brotes. En el medio MS modificado sí se observa el crecimiento y la multiplicación con todas las concentraciones ensayadas de BA. La adición de BA promueve la multiplicación con respecto al medio control. Se obtuvieron valores de entre 3,88 y 5,15 brotes por explanto, sin que se observe un patrón de multiplicación que pueda relacionarse con las concentraciones utilizadas, ni la existencia de diferencias significativas entre estas concentraciones.

En cuanto a la longitud de los brotes, la adición de BA en el medio MS promueve su crecimiento con respecto al medio control, mostrando diferencias significativas, mientras que el medio MS modificado no muestra valores muy diferenciados entre las concentraciones ensayadas.

**Tabla 4.15. Multiplicación de yemas apicales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de BA. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.**

BA mg/l	BA $\mu$ M	Medio MS		Medio MS mod.	
		Multiplicación	Longitud	Multiplicación	Longitud
0	0	1,00a $\pm$ 0,00	0,50a $\pm$ 0,36	1,04a $\pm$ 0,04	0,47ac $\pm$ 0,19
0,5	2,22	4,17b $\pm$ 0,26	1,07b $\pm$ 0,44	4,51bc $\pm$ 0,24	0,70b $\pm$ 0,33
1	4,44	0,00	-	5,15b $\pm$ 0,22	0,54c $\pm$ 0,19
1,5	6,66	0,00	-	4,03c $\pm$ 0,38	0,42a $\pm$ 0,12
2	8,88	0,00	-	3,88c $\pm$ 0,26	0,42a $\pm$ 0,16

#### **4.3.3.2.4 Cultivo de segmentos nodales en medios con benciladenina**

La presencia de BA en el medio de cultivo promovió la multiplicación de los segmentos nodales con respecto al medio control tanto para el medio MS como para el medio MS modificado (Tabla 4.16). Al igual que en el cultivo de yemas, a partir de 1 mg/l de BA en el medio MS no se produjo el desarrollo ni la multiplicación. Con la adición de BA se produjo un valor de multiplicación de 3,94 brotes por explanto, frente a los 2,32 obtenidos con el medio control.

En el medio MS modificado sí se obtuvo resultados para todas las concentraciones de BA ensayadas, con valores muy similares entre sí, en torno a cuatro brotes por explanto. No se observaron diferencias significativas entre las combinaciones de BA utilizadas.

Asimismo, la utilización de segmentos nodales como explantos produjo valores de multiplicación significativamente más elevados con respecto al uso de yemas apicales en el medio control, tanto para el medio MS como para el medio MS modificado y en la concentración de 2 mg/l de BA en el medio MS modificado. En el resto de concentraciones ensayadas no se observaron diferencias significativas entre yemas apicales y segmentos nodales.

En la longitud de los brotes obtenidos en el medio MS sí se observaron diferencias significativas con la adición de BA, mientras que en el medio MS modificado estas diferencias no fueron tan patentes y solo se produjeron entre las concentraciones más reducidas.

Los valores de multiplicación en medios con BA están representados en la Figura 4.23, mientras que en la Figura 4.24 y Figura 4.25 se muestran algunos ejemplos de multiplicación en medios con BA.

Tabla 4.16. Multiplicación de segmentos nodales y longitud de los brotes obtenidos (cm) en presencia de BA. Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

BA mg/l	BA $\mu$ M	Medio MS		Medio MS mod.	
		Multiplicación	Longitud	Multiplicación	Longitud
0	0	2,32a $\pm$ 0,15	0,48a $\pm$ 0,27	2,56a $\pm$ 0,20	0,36a $\pm$ 0,18
0,5	2,22	3,94b $\pm$ 0,41	0,89b $\pm$ 0,41	4,44b $\pm$ 0,37	0,73b $\pm$ 0,32
1	4,44	0,00	-	4,53b $\pm$ 0,40	0,58c $\pm$ 0,31
1,5	6,66	0,00	-	4,35b $\pm$ 0,50	0,38a $\pm$ 0,10
2	8,88	0,00	-	4,89b $\pm$ 0,35	0,46ac $\pm$ 0,21

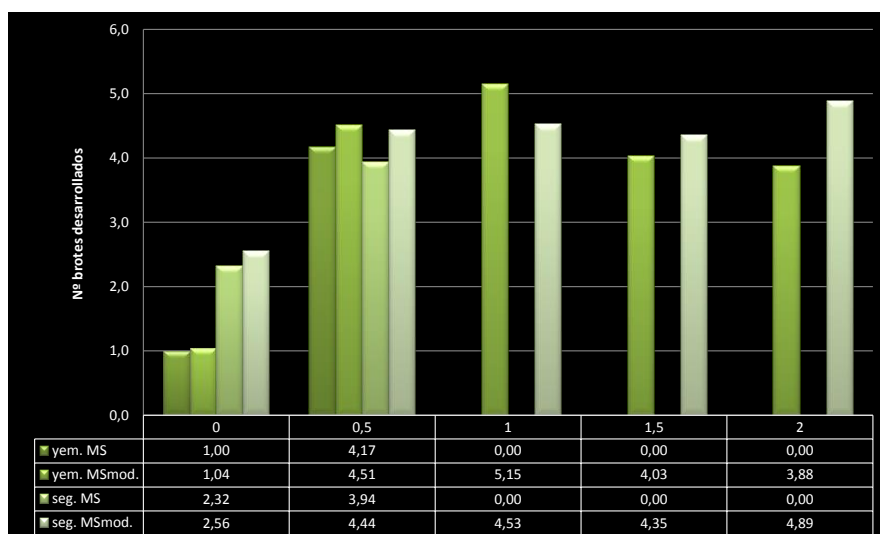


Figura 4.23. Representación de los valores de multiplicación para el cultivo en medios con BA. Concentración de BA en mg/l.





Figura 4.24. Multiplicación en medio MS con BA.

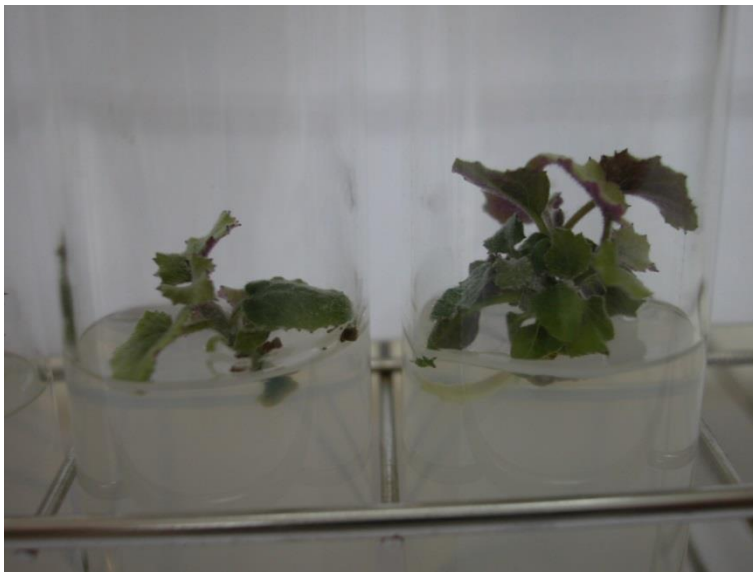


Figura 4.25. Multiplicación en medio MS modificado con BA.

#### **4.3.3.3 Cuantificación de la hiperhidricidad**

Además de los resultados de multiplicación y de elongación de los brotes, en todos los ensayos se cuantificó el desarrollo de tejidos hiperhídricos. Este tipo de tejidos llegó a alcanzar valores muy elevados en algunos medios, interfiriendo incluso en la formación y en el crecimiento de brotes sanos (Tabla 4.17 y Tabla 4.18).

En el cultivo de yemas apicales se observó la formación de tejidos hiperhídricos en ambos medios, MS y MS modificado en presencia de KIN y de BA, mientras que los medios sin reguladores de crecimiento no mostraron estos síntomas.

En los medios con KIN los resultados en la formación de tejidos hiperhídricos son muy similares para ambos medios, con un porcentaje en torno al 30% a partir de 0,5 mg/l de KIN, que se incrementó al aumentar la concentración a 1 mg/l para después disminuir ligeramente.

En los medios con adición de BA, sí se observan mayores diferencias, ya que en presencia de una concentración igual o superior a 1 mg/l la formación de estos tejidos fue del 100% en el medio MS, lo que impidió el desarrollo de brotes sanos con estas concentraciones. En cambio, en el medio MS modificado sí se produjo el desarrollo de brotes sanos con todas las concentraciones de BA ensayadas, con unos porcentajes de formación de tejidos hiperhídricos muy similares a los obtenidos en presencia de KIN. Estos porcentajes siguieron además el mismo patrón, ya que se observaron valores más altos con la concentración de 1 mg/l de BA, para disminuir levemente con las concentraciones más elevadas.

Tabla 4.17. Porcentajes de formación de tejidos hiperhídricos observados en el cultivo de yemas apicales.

Regulador (mg/l)	Medio MS		Medio MS mod.	
	KIN	BA	KIN	BA
0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	30,58	47,83	30,56	33,33
1	42,11	100	37,14	35,29
1,5	25,00	100	22,58	19,35
2	29,63	100	22,57	24,24

La formación de tejidos hiperhídricos se acentuó con la utilización de segmentos nodales como explantos (Tabla 4.18). En este caso se observó el desarrollo de estos tejidos incluso en los medios sin reguladores, con valores más reducidos para el medio MS modificado.

En presencia de KIN el porcentaje de hiperhidricidad fue siempre superior al 46%. En el medio MS se observó una tendencia en el incremento de la hiperhidricidad al aumentar la concentración de KIN. Sin embargo, en el medio MS modificado esta tendencia no fue tan patente, y siguió un patrón similar al observado en el cultivo de yemas apicales pero con valores más elevados. [Escriba una cita del documento o el resumen de un punto interesante. Puede situar el cuadro de texto en cualquier lugar del documento. Use la ficha Herramientas de dibujo para cambiar el formato del cuadro de texto de la cita.]

En los medios con BA se observaron también porcentajes de hiperhidricidad del 100% en medios con concentraciones iguales y superiores a 1 mg/l en medios MS, lo que impidió el desarrollo de brotes sanos. En el medio MS modificado sí los porcentajes a esas concentraciones fueron algo más reducidos, lo que permitió el desarrollo y la cuantificación de los brotes. En este medio, la formación de tejidos hiperhídricos se incrementa hasta la concentración de 1 mg/l de BA, con un 76,40%, para disminuir considerablemente al aumentar la

concentración del regulador. Así, al doblar la concentración de BA (2 mg/l), se produjo sólo un 24,24% de hiperhidricidad.

Todos los valores de hiperhidricidad se representan en la Figura 4.26, mientras que en la Figura 4.27 se observan algunos ejemplos de la formación de estos tejidos.

Tabla 4.18. Porcentajes de formación de tejidos hiperhídricos observados en el cultivo de segmentos nodales.

Regulador (mg/l)	Medio MS		Medio MS mod.	
	KIN	BA	KIN	BA
0	19,35	19,35	7,14	7,14
0,5	46,67	69,57	73,33	75,00
1	53,85	100	81,48	76,40
1,5	66,67	100	71,88	46,15
2	88,89	100	77,42	24,24

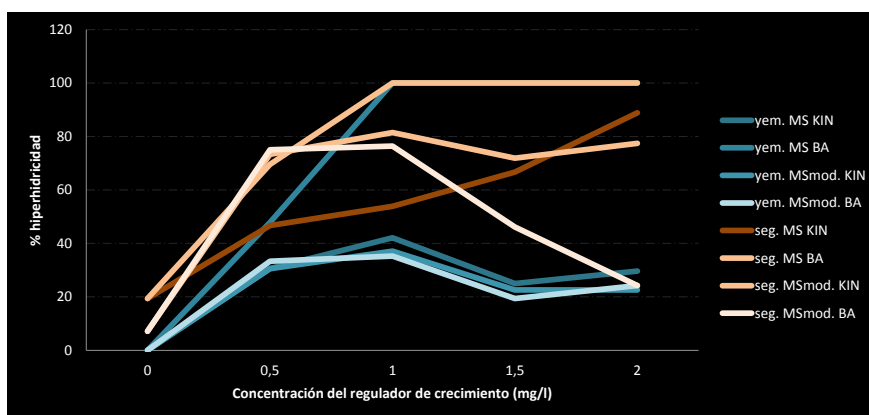


Figura 4.26. Representación de los porcentajes de hiperhidricidad para todos los medios ensayados en función de la concentración del regulador de crecimiento.



Figura 4.27. Formación de tejidos hiperhídricos en el cultivo de segmentos nodales (arriba) y de yemas apicales (abajo).

#### 4.3.3.4 Etapa de elongación

Tal y como se ha explicado en el apartado de *Materiales y métodos*, la etapa de elongación se llevó a cabo para aquellas yemas que no alcanzaron una longitud adecuada durante la etapa de multiplicación y cuyo tamaño no era idóneo para promover su enraizamiento. Teniendo en cuenta los valores de longitud de los brotes observados para los distintos medios y las diferentes concentraciones, esta etapa fue necesaria para todos los brotes desarrollados durante la etapa de multiplicación.

En este caso no se tomaron los valores de elongación alcanzados, tan solo se cultivaron los brotes obtenidos en la fase de multiplicación en medios más favorables, hasta alcanzar una longitud igual o superior a 1,5 cm y ser utilizadas para la siguiente etapa de enraizamiento.

#### 4.3.3.5 Etapa de enraizamiento

Una vez los brotes alcanzaron un tamaño idóneo, se transfirieron a los medios MS y MS modificado a los que se añadieron diferentes concentraciones de ácido indol-butírico (IBA) con el fin de estimular la formación de raíces. Los resultados se muestran en la Tabla 4.19 y se representan en la Figura 4.28.

En los medios MS se observó un incremento en la producción de raíces con una tendencia proporcional al aumento de la concentración de IBA. Se encontraron diferencias significativas entre el medio control y los medios con adición de IBA. Entre las distintas concentraciones se observaron también diferencias significativas entre los resultados obtenidos con las concentraciones más reducidas de IBA (0,5, 1, y 2 mg/l), con un número medio de raíces en torno a cinco, y los obtenidos con concentraciones más elevadas (3 y 4 mg/l), con valores medios de formación de raíces en torno a ocho. No obstante, las

concentraciones de 2 y 4 mg/l de IBA no ofrecen diferencias significativas entre ambas.

La longitud de las raíces inducidas en medios MS disminuyó al aumentar la concentración de IBA, con diferencias significativas entre el medio control y los medios con adición de IBA. Así, el valor más alto de longitud se observó en el medio control, con una media de 4,40 cm. El resto de datos varía entre 0,90 y 2,20 cm, obtenidos con 1 y 0,5 mg/l de IBA respectivamente.

La formación de tejido de callo se observó sólo en presencia de IBA y siempre en el 100% de los casos para todas las concentraciones ensayadas. En el medio control, sin regulador, no hubo desarrollo de callo basal.

Para los medios MS modificado, se observaron también diferencias significativas entre el medio control y el resto de medios ensayados. El número de raíces formadas se incrementó con la concentración de IBA, si bien, los medios de cultivo ensayados con las concentraciones de 1, 3 y 4 mg/l no mostraron diferencias significativas entre ellos.

En el caso de los medios MS modificado, la adición de IBA ofreció también los valores más reducidos en cuanto a longitud de las raíces. Sin embargo, la concentración de 0,5 mg/l no mostró diferencias significativas con el medio control, promoviendo también la elongación de las raíces. El resto de concentraciones ofrece valores mucho más reducidos, con longitudes que varían entre 1,51 y 2,04, pero sin que se observen diferencias significativas entre las mismas.

La formación de tejido de callo tiene lugar sólo en medios a los que se adiciona IBA, pero en diferentes proporciones. Las concentraciones que evidencian valores más elevados son las de 0,5, 3 y 4 mg/l con porcentajes que van desde el

83,8 al 100% de los casos. El resto de valores varía entre el 56,4% obtenido con 1 mg/l de IBA y el 68,8% observado en concentraciones de 2 mg/l.

Los resultados obtenidos fueron muy similares entre ambos medios, salvo para la formación de callo, que se vio reducida en el medio MS modificado.

En la Figura 4.29 se ofrecen algunos ejemplos de plantas enraizadas de *P. hadrosoma*.

Tabla 4.19. Resultados obtenidos en la etapa de enraizamiento de *P. hadrosoma*: nº de raíces y longitud (cm). Para cada medio, distintas letras muestran la existencia de diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar.

IBA (mg/l)	Medio MS			Medio MS mod.		
	Nº raíces	Longitud	% callo	Nº raíces	Longitud	% callo
0	3,02a $\pm$ 1,62	4,40a $\pm$ 0,18	0	3,29a $\pm$ 1,18	6,01a $\pm$ 1,71	0
0,5	5,52b $\pm$ 2,54	2,20b $\pm$ 0,99	100	6,17b $\pm$ 3,15	5,68a $\pm$ 2,34	94,29
1	5,00b $\pm$ 2,51	0,90c $\pm$ 0,42	100	7,08bd $\pm$ 4,50	2,04b $\pm$ 1,85	56,41
2	5,71bd $\pm$ 2,88	1,19cd $\pm$ 0,65	100	9,50c $\pm$ 3,20	1,75b $\pm$ 1,06	68,75
3	8,12c $\pm$ 4,09	1,16c $\pm$ 0,68	100	7,08b $\pm$ 4,65	1,51b $\pm$ 0,77	83,78
4	8,56cd $\pm$ 5,45	1,56d $\pm$ 0,87	100	9,05cd $\pm$ 3,69	1,78b $\pm$ 0,85	100

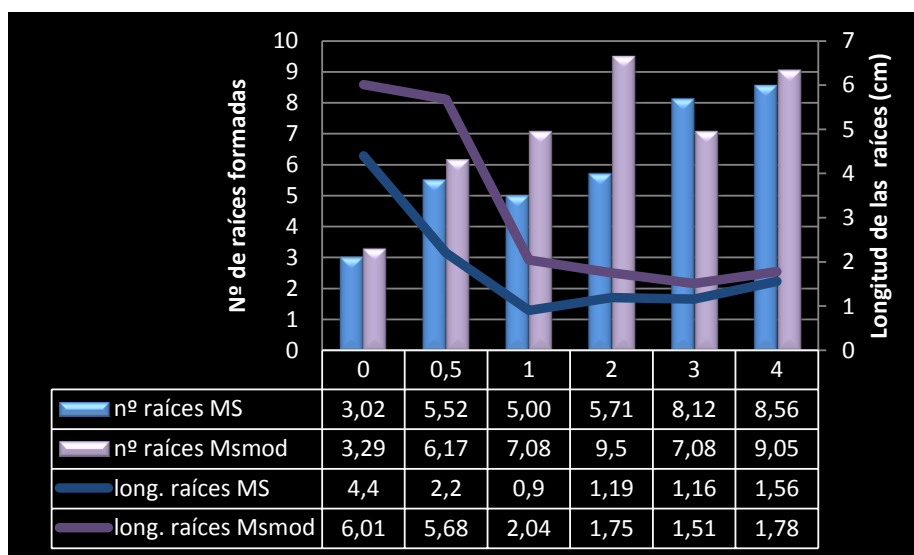


Figura 4.28. Valores obtenidos en el enraizamiento de *P. hadrosoma* para cada concentración de IBA ensayada (mg/l)





Figura 4.29. Enraizamiento de *P. hadrosoma*. Arriba MS modificado + 0,5 IBA (izda) y MS modificado sin reguladores. Abajo medio MS sin reguladores.

#### 4.3.3.6 Etapa de aclimatación

Las plantas obtenidas en la etapa de enraizamiento que fueron seleccionadas para su aclimatación a las condiciones *ex vitro*, se cultivaron de forma que pudiésemos llevar a cabo una disminución paulatina de la humedad ambiental.

Se obtuvo un 100% de efectividad con el tratamiento de aclimatación de las plántulas de *Pericallis hadrosoma* (Figura 4.30).



Figura 4.30. Plantas aclimatadas de *P. hadrosoma*.

#### 4.3.4 Discusión

La esterilización del material vegetal constituye una de las etapas más críticas a la hora de comenzar el cultivo in vitro de una planta. El hecho de que no sea posible cultivarla con anterioridad al establecimiento in vitro en un entorno controlado, hace que la obtención de un material totalmente estéril sea aún más difícil y requiera de tratamientos más complejos. Los resultados obtenidos en la esterilización del material recolectado en el campo de *P. hadrosoma* mostraron una progresión en la efectividad con cada tratamiento porque se realizaron cambios destinados a mejorar los resultados. El tratamiento más efectivo fue, por tanto, el aplicado en último lugar, para el que se había incrementado el tiempo de exposición al agente antifúngico y se había previamente sustituido el hipoclorito sódico por hipoclorito cálcico, con una menor capacidad de penetración en los tejidos para obtener una mayor proporción de tejido viable.

El cultivo de yemas apicales en medios con KIN mostró bastante efectividad a la hora de inducir la multiplicación. Tanto en el medio MS como en el medio MS modificado el valor máximo de multiplicación se obtuvo con la concentración de 2 mg/l de KIN, con la que se alcanzó una media de cuatro brotes por explanto. El porcentaje de hiperhidricidad observado en estos medios fue reducido, alrededor del 22-29%. No se observaron diferencias entre la utilización de uno u otro medio, tanto para la multiplicación como para la elongación de los brotes o para la proporción en el desarrollo de tejidos hiperhídricos.

El cultivo de segmentos nodales en medios con KIN también mostró resultados positivos y muy similares a los obtenidos a partir del cultivo de yemas apicales. En este caso, para ambos medios (MS y MS modificado) se obtuvo también una tasa de multiplicación en torno a cuatro. Si bien, la principal diferencia con el cultivo de yemas fue que esta multiplicación se alcanzó con concentraciones de KIN inferiores. A partir de 1 mg/l de KIN ya se había observado este valor en el

cultivo de segmentos nodales. Estos valores más elevados están relacionados con la presencia de dos meristemas en los segmentos nodales que, prácticamente en todos los casos, se sembraron con dos nudos o axilas. Considerando este hecho, se habría esperado que las tasas de multiplicación con estos explantos hubiesen sido más elevadas, el doble que las obtenidas a partir de yemas, cuando en realidad los resultados fueron muy similares. Esto podría estar relacionado con la formación de tejidos hiperhídricos, ya que el cultivo de segmentos nodales promovió la formación de este tipo de tejidos en un porcentaje mucho más elevado: 88,89% para el medio MS y 77,42% para el MS modificado. Aunque el número de brotes obtenido por explanto se refiere siempre a material sano, sin tejidos hiperhídricos, su formación puede haber interferido en la obtención de brotes sanos.

Este hecho también se ha observado en el cultivo de *Salvia valentina* y *Salvia blancoana* (*Lamiaceae*), para las que se obtuvo una mayor multiplicación a partir de segmentos nodales frente al cultivo de yemas apicales (Cuenca y Amo Blanco, 2000). Para estas especies se obtuvo mejores resultados de multiplicación con la adición de KIN, mientras que los resultados obtenidos con BA fueron más reducidos. En algunos trabajos, los diferentes resultados obtenidos con segmentos nodales y apicales se han relacionado con el estado fisiológico de los brotes en distintas regiones del tallo o debido a la existencia de un gradiente de reguladores de crecimiento (Vieitez *et al.*, 1985; Label *et al.*, 1988).

El cultivo en medios con BA sí produjo resultados muy diferenciados para cada medio ensayado. Así, la adición al medio MS de concentraciones iguales o superiores a 1 mg/l de BA promovió la formación de tejidos hiperhídricos en el 100% de los casos. Además, esta hiperhidricidad afectó a la multiplicación, ya que todos los tejidos desarrollados presentaban hiperhidricidad, sin que llegasen a formarse en ningún caso brotes sanos. Concentraciones inferiores (0,5 mg/l) sí promovieron la multiplicación, con una media de 4,17 brotes obtenidos

por explanto y un porcentaje en la formación de tejidos hiperhídricos del 47,83% para el cultivo de yemas apicales. En el caso de los segmentos nodales, se obtuvo una media de 3,94 brotes por explanto con 0,5 mg/l de BA, así como un porcentaje de hiperhidricidad del 69,57. Al igual que en lo observado para el cultivo con KIN, el cultivo de segmentos nodales exhibió porcentajes más elevados de formación de tejidos hiperhídricos.

Estos resultados concuerdan con los observados para otras especies cultivadas *in vitro*, como *Thymus lotocephalus* (*Lamiaceae*) para la que se reportó una mayor multiplicación en medios MS con BA frente a KIN. Además, se observó también un porcentaje de hiperhidricidad superior al obtenido en el medio sin citoquininas (Coedlho *et al.*, 2012). Diferentes autores han señalado una elevada ocurrencia de hiperhidricidad cuando se adicionaba BA al medio (Cuenca y Amo Marco, 2000; Paek y Hahn, 2000; Gonçalves y Romano, 2005).

En el medio MS modificado sí se produjo la multiplicación, tanto a partir de yemas apicales como de segmentos nodales, para todas las concentraciones de BA. Para ambos tipos de explanto, el valor máximo de multiplicación se situó en 4 brotes por explanto, con pequeñas diferencias entre las distintas concentraciones. El desarrollo de hiperhidricidad siguió el mismo patrón que el observado en el resto de ensayos, con valores mucho más elevados para el cultivo de segmentos nodales. No obstante, en este caso se observó la reducción de estos valores al incrementar la concentración de BA.

Algunos autores sugieren que la hiperhidricidad puede verse inducida por el aporte exógeno de citoquininas, siendo además dependiente de su concentración (Leshem *et al.*, 1988; Ivanova *et al.*, 2006). Asimismo, elevadas concentraciones de iones amonio han sido también relacionadas con el incremento de la hiperhidricidad en diversas especies (Vieitez *et al.*, 1985).

Si bien, algunos sugieren que estos factores podrían inducir la hiperhidricidad cuando otras condiciones en el cultivo no están optimizadas (Debergh *et al.* 1992). Así, en el cultivo de *Aloe polyphylla* (*Asphodelaceae*) se observó como la presencia en el medio de BA inducía la formación de tejidos hiperhídricos en función de la concentración de amonio y se incrementaba al aumentar la concentración de este ion (Ivanova & van Staden, 2008).

No obstante, también se han observado resultados contrarios, como los reportados por Bosela y Michles (2008) con *Juglans nigra* (*Juglandaceae*), para la que la reducción de la concentración de sales (dilución a la mitad del medio DKW y uso del WPM) incrementó el porcentaje de hiperhidricidad.

El enraizamiento se llevó a cabo con éxito para todos los medios ensayados. En el medio MS se observó un patrón de desarrollo de raíces que parece estar relacionado con la concentración de IBA. Así, el incremento en la concentración de este regulador se traduce en la formación de un número mayor de raíces, si bien, la longitud de las mismas es inversamente proporcional a este incremento. El porcentaje de callo basal fue siempre del 100% en presencia de IBA. En el medio MS modificado la relación entre la concentración de IBA y el número de raíces no fue tan clara, aunque sí se incrementó con las concentraciones más elevadas. La longitud se redujo siguiendo el mismo patrón que el observado en el medio MS, mientras que la formación de callo fue ligeramente inferior.

Aunque las concentraciones más altas de IBA parecen promover un mejor sistema radicular, la presencia de callo basal puede interferir en la formación de raíces funcionales. En los medios que promovían la formación de un mayor número de raíces se observó que éstas se desarrollaban frecuentemente a partir del callo y no a partir de la planta. Estas raíces se desprendían fácilmente, lo que resultaba inconveniente para realizar un proceso de aclimatación a las condiciones *ex vitro* exitoso.

En *Crepis novoana* (*Compositae*) fue necesaria la adición de auxinas para el enraizamiento (Corral *et al.*, 2011), al contrario de lo observado para *P. hadrosoma*.

El proceso de aclimatación fue culminado con éxito, sin que se obtuvieran pérdidas en las plantas destinadas a la aclimatación.





## Capítulo 5

# Análisis genético



## 5. Análisis genético

### 5.1 Introducción

El importante papel de la genética en la conservación de especies amenazadas ha sido ya señalado por numerosos autores (Hamrick 1983; Falk and Holsinger 1991; Ellstrand and Elam 1993). Aunque algunos autores han sugerido que en el caso de las especies con poblaciones de gran tamaño los estudios moleculares poseen una importancia relativa, debido al esfuerzo que conlleva realizarlos (Holsinger y Gottlieb, 1991; Lande, 1998), su importancia en las últimas décadas viene marcada por la necesidad de establecer estrategias de manejo de la flora amenazada que integren diversas disciplinas y que aseguren el éxito de los programas de conservación.

Aunque hay excepciones, en general el mantenimiento de la diversidad genética contribuye a la supervivencia de las especies, a la vez que permite fenómenos de adaptación y/o de especiación ante contingencias ambientales. La variabilidad genética confiere eficacia biológica a la especie y permite actuar a la selección natural, por lo que puede considerarse como la materia prima a partir de la cual se producen los procesos evolutivos (Sosa *et al.*, 2002). En suma, la diversidad genética es la base de la supervivencia y de la adaptación de los organismos vivos, lo que hace posible la continuación y el avance de los procesos adaptativos (Ramanatha y Hodgkin, 2002).

Los programas de conservación y manejo de las especies amenazadas que impliquen el incremento de su variabilidad a través de su reforzamiento (introducción de nuevas plantas), así como las diferentes estrategias de conservación *ex situ*, requieren del conocimiento de los niveles de la diversidad y de la estructura genética de las poblaciones (Sosa, 2001; Frankham *et al.*, 2002; Frankham 2010; Sosa *et al.*, 2010).

En general, los estudios de diversidad genética realizados con especies endémicas canarias raras o amenazadas tienden a recomendar la protección de cada una de sus poblaciones, de acuerdo con los resultados obtenidos. Este es el caso de *Helianthemum gonzalez-ferreri* (González-Pérez *et al.*, 2013), *Sideritis discolor* (Batista *et al.* 2004) o *Helianthemum juliae* (González-Pérez *et al.* 2014), en las que se observaron diferencias genéticas entre las diferentes poblaciones analizadas.

Sin embargo, en algunos trabajos se ha llegado a considerar la posibilidad de incluir el traslado de material de una población a otra de material vegetal dentro de las estrategias de conservación, al no haberse detectado características únicas en sus poblaciones (*Kunkeliella subsucculenta*, González Pérez *et al.*, 2013).

Así mismo, los estudios genéticos de especies en islas pueden ayudar a comprender mejor los procesos de ecológicos y la evolución, a la vez que son una fuente de información de especies raras y amenazadas (Sosa, 2001; González Pérez *et al.* 2009a, 2009b; Franks, 2010).

El conocimiento de la diversidad genética de las especies ha sido posible gracias al progresivo desarrollo de marcadores moleculares, que ha permitido conocer de una forma más detallada la estructura genética de las especies.

Sosa y colaboradores, en 2002, sintetizaron los requisitos de idoneidad que debían cumplir los marcadores moleculares para establecer estudios de genética de poblaciones: polimórficos, codominantes, estar distribuidos ampliamente por todo el genoma del organismo, así como una rápida y eficaz detección y aplicación.

Aunque todos estos requisitos no se cumplen por igual en ninguno de los marcadores moleculares desarrollados hasta el momento, existe un gran

número de especies raras y amenazadas en Canarias cuya diversidad genética ha sido analizada mediante diferentes marcadores moleculares, principalmente con técnicas de RAPD, isoenzimas y, en menor medida, con microsatélites (ver Caujapé-Castells 2011 para una revisión completa).

En esta tesis, se analiza la diversidad genética de *H. inaguae* y de *P. hadrosoma*, así como la fidelidad genética de las plantas obtenidas *in vitro*, mediante la aplicación de marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), resultantes de la amplificación al azar de ADN polimórfico. Nuestro objetivo es evaluar la variabilidad genética que poseen estas dos especies en peligro crítico de extinción para compararla con la detectada mediante la misma técnica en otros endemismos vegetales canarios con características de amenaza similares, y utilizar estos datos para derivar posibles implicaciones para su mejor conservación

Los marcadores RAPD están basados en la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) y fueron descritos por primera vez por Williams y colaboradores, en 1990. Esta metodología emplea cebadores cortos (generalmente de 10 pb) para generar fragmentos de tamaño variable que podrán ser separados mediante electroforesis en gel de agarosa. Tales cebadores son arbitrarios, es decir, no obedecen a un conocimiento previo de un gen o región del ADN, sino que su secuencia es aleatoria y amplifican cualquier región del genoma flanqueada por secuencias complementarias al cebador y de una longitud determinada.

Los polimorfismos que se observan son debidos a la diferente longitud de las secuencias de ADN que quedan entre dos puntos correlativos de homología con el cebador, y se hacen visibles por la presencia o ausencia de una banda. Se trata, por tanto, de marcadores dominantes. Estos marcadores se pueden

utilizar en estudios de variabilidad, así como en la construcción de mapas de ligamiento (Boscherini *et al.*, 1994, Moreno *et al.*, 1997).

La técnica RAPD es sencilla (de fácil manejo), los cebadores se pueden adquirir fácilmente y no necesita de información inicial sobre el genoma a estudiar. Su coste es relativamente bajo, en comparación con otras técnicas, y no es imprescindible disponer de una gran cantidad de ADN para su aplicación. Han sido designados como apropiados para estudios de especies con poblaciones reducidas por su gran capacidad para generar un gran número de fragmentos polimórficos (Mucciarelli *et al.*, 2014).

Sin embargo, uno de los grandes problemas o desventajas radica en su carácter dominante, que no permite distinguir los alelos de cada gen (solamente detecta diferencias de longitud de los fragmentos amplificados), lo cual limita la información genética obtenida. Además, tienen asociados problemas de reproducibilidad, relacionados con las variaciones de calidad en el ADN y en las condiciones de la PCR, si bien es posible obtener resultados reproducibles cuando se estandarizan cuidadosamente las condiciones de los experimentos (Munthali *et al.*, 1992; Lowe *et al.* 1996), como ha sido el caso en esta tesis.

Se han propuesto diversos estadísticos desarrollados para cuantificar e interpretar la variabilidad genética detectada mediante marcadores moleculares. En Caujapé-Castells 2006, se ofrece una amplia relación de descriptores de la diversidad y de la estructura genética. A continuación se ofrece un resumen de los descriptores utilizados durante el desarrollo de esta tesis.

### 5.1.1 Medida de la diversidad genética intrapoblacional

#### 5.1.1.1 Número promedio de alelos por locus

Es la media del número total de alelos detectados en cada locus analizado. Viene definido por la siguiente fórmula:

$$\bar{A} = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L a_i \quad 1 \leq \bar{A} \leq \max a_i$$

Donde  $L$  es el número total de loci analizados en la población.

#### 5.1.1.2 Número efectivo de alelos por locus

Es el número de alelos presentes en un locus después de efectuar un factor de corrección de sesgo. Se define por la siguiente expresión:

$$Ae = 1/(1 - h) = 1/\sum p_i^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo en un locus y  $h = 1 - \sum p_i^2 =$  heterocigosidad en un locus.

#### 5.1.1.3 Polimorfismo

Una de las medidas para determinar si un gen presenta variación es la proporción de loci polimórficos (o tasa de polimorfismo). Esta medida se calcula principalmente para marcadores codominantes, si bien puede ser calculada también con marcadores dominantes (con restricciones), teniendo en cuenta que esta estimación presentaría una tendencia al sesgo inferior al número real (De Vicente *et al.*, 2004.).

Así, un locus puede definirse como polimórfico si la frecuencia de su alelo más frecuente es menor o igual a 0,95 (criterio del 95%) o 0,99 (criterio del 99%).

$$P_j = q \leq 0,95 \quad \text{o} \quad P_j = q \leq 0,99$$

Donde  $P_j$  = tasa de polimorfismo y  $q$  = frecuencia alélica

#### 5.1.1.4 Heterocigosidad esperada o índice de diversidad genética de Nei (1973)

Este parámetro expresa la heterocigosidad esperada para un locus promedio si el apareamiento fuera totalmente al azar. Es decir, estima la probabilidad de que dos alelos extraídos al azar del conjunto de genes de la población sean diferentes y se expresa mediante la siguiente fórmula (Caujapé-Castells, 2006):

$$H_e = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \left( 1 - \sum_{j=1}^n p_{lj}^2 \right) \quad (0 \leq H_e \leq 1)$$

Donde  $P_{lj}$  es la frecuencia del alelo  $j$  en el locus  $l$  y  $L$  es el número total de loci analizados.

Para tamaños poblacionales  $< 50$ , el estimador no sesgado de la heterocigosidad esperada sería:

$$\hat{H}_e = \frac{1}{L} \left[ \frac{2N}{2N-1} \sum_{l=1}^L \left( 1 - \sum_{j=1}^n p_{lj}^2 \right) \right] \quad (0 \leq H_e \leq 1)$$

Donde  $N$  es el tamaño de la población (Hedrick 2000).

#### 5.1.1.5 Índice de Shannon

El índice de Shannon, también conocido como índice de Shannon-Weaver, fue desarrollado para medir la cantidad de información que se puede transmitir en un código (Shannon y Weaver, 1949). Además de su aplicación en ecología, es



utilizado también para el cálculo de la diversidad genética. Viene expresado por la fórmula:

$$I_j = - \sum_{i=1}^m p_{ij} \ln p_{ij}$$

Donde  $m$  es el número de caracteres (bandas) considerado,  $p_{ij}$  es la frecuencia del carácter  $i$  (banda  $i$ ) en la población  $j$ . Su valor mínimo es cero y aumenta cuando se incrementa la diversidad (Moreno Vázquez, 2001).

#### 5.1.1.6 El test de neutralidad de Ewens-Watterson

El test de neutralidad de Ewens-Watterson calcula, para cada locus, el valor de homocigosidad esperada bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg y la compara con el valor de la homocigosidad esperada bajo la hipótesis de neutralidad para el mismo tamaño muestral y el mismo número de alelos (Caujapé-Castells, 2006).

### 5.1.2 Medida de la diversidad genética interpoblacional

#### 5.1.2.1 Los estadísticos de estructura poblacional de Nei

La identidad genética de Nei podría definirse como la probabilidad de que dos alelos (uno de cada población) sean idénticos (Nei, 1972). Este parámetro puede adquirir valores entre 0 y 1, siendo las poblaciones más idénticas cuando más se aproxime el índice a 1 y viene definido por la siguiente expresión:

$$I_{NEI} = \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X J_Y}} \quad 0 \leq I_{NEI} \leq 1$$

Donde

$$J_X = \frac{n}{\sum_{i=1}^n x_i^2}; \quad J_Y = \frac{n}{\sum_{i=1}^n y_i^2}; \quad J_{XY} = \frac{n}{\sum_{i=1}^n x_i y_i}$$

$Y_i = 1, \dots, n$  es el número de alelos detectado en el locus considerado.

De acuerdo con lo descrito en Caujapé-Castells, 2006, la identidad de Nei (1972) se puede interpretar como la probabilidad de que, al extraer un alelo al azar de la población X y otro alelo al azar de la población Y, estos alelos sean iguales.

Además, en caso de que se disponga de datos con un número de loci mayor a uno ( $L \gg 1$ ), la identidad de Nei (1972) puede ser calculada mediante la siguiente formulación:

$$I_{NEI} = \frac{1}{L} \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i y_j}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2 \sum_{j=1}^n y_j^2}}$$

A partir de este valor de identidad genética de Nei ( $I$ ), se puede obtener la distancia genética ( $D$ ), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$D = -\ln I \quad 0 \leq D \leq \infty$$

En 1978, Nei propone otra estimación de la distancia genética, diferente a la calculada inicialmente en 1972, en la que interviene valores de tamaño poblacional.

### 5.1.2.2 Flujo genético ( $Nm$ ) y Coeficiente de diferenciación genética ( $F_{ST}$ )

El flujo genético puede definirse como el movimiento de genes existente entre las poblaciones de una especie mediante el movimiento de migrantes, ya sean propágulos, semillas, polen o por los propios individuos. Para que exista flujo genético no sólo tiene que darse un fenómeno de dispersión eficaz pero también debe producirse el cruzamiento entre individuos y la generación de una nueva progenie (Sosa *et al.*, 2002; Caujapé-Castells, 2006).

El flujo génico puede ser inferido mediante el Coeficiente de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) y el número de migrantes ( $Nm$ ) (Wright, 1931), mediante la fórmula:

$$F_{ST} = \frac{1}{(1 + 4Nm)}$$

Donde  $N$  es el tamaño efectivo de la población y  $m$  es la proporción de individuos que son inmigrantes, es decir la tasa media de inmigración en un modelo de estructura poblacional de isla (en Caujapé-Castells, 2006).

En general, valores de  $Nm > 1$  son característicos de especies con elevado flujo génico (Caujapé-Castells, 2006). Un flujo génico elevado tiende a homogeneizar las poblaciones, disminuyendo la variación genética entre poblaciones.

### 5.1.2.3 Análisis de la varianza molecular

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) es un método estadístico para estimar la variación de una especie a partir de datos moleculares (Excoffier *et al.*, 1992). A través de este análisis es posible estimar la variación genética dentro de las poblaciones, entre las poblaciones y entre grupos de poblaciones.

#### **5.1.2.4 Análisis de coordenadas principales**

El análisis de coordenadas principales (ACoP) es un procedimiento geométrico que permite encontrar una configuración  $Y$  en un espacio euclídeo  $R^k$  de baja dimensión, de manera que la distancia inter-puntos de la matriz estimada sea lo más cercana posible a la matriz observada. La aproximación  $k$ -dimensional se encontrará en las primeras  $k$  columnas de  $Y$ , que son las llamadas coordenadas principales (Gower, 1966).

Su aplicación a la genética de poblaciones se centra en el cálculo de una matriz de distancia con la que se genera una configuración gráfica en un espacio eucladiano de pocas dimensiones (dos o tres) de manera que puedan determinarse las relaciones genéticas de los individuos y/o poblaciones con la menor pérdida de información posible (González González, 2011).

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 Recolección del material vegetal

La recolección de muestras vegetales de *H. inaguae* y de *P. hadrosoma* se realizó en 2006, siguiendo, en la medida de lo posible, las pautas para la recolección y conservación de muestras que se establece en Caujapé-Castells (2006) y en Caujapé-Castells *et al.* (2011), descargable en <http://www.bioclimac.com/mbdna/index.php/dna-bank/documentation/dna-bank-lab-manual>.

Dado que en ambos casos se trata de especies con un número muy reducido de ejemplares, se decidió recolectar muestras de la totalidad de las poblaciones y del mayor número de ejemplares al que se tuviera acceso (en el caso de que existieran problemas para acceder a toda la población).

Las muestras se recolectaron introduciendo el material vegetal de cada individuo en una bolsa de plástico con cierre hermético y debidamente etiquetada en cuyo interior se dispuso, de manera inmediata, una determinada cantidad de gel de sílice con el fin de favorecer su desecación. Este gel de sílice fue sustituido en cuanto se observó el cambio de color característico de la presencia de humedad (de rojo a amarillo, en este caso). Se recogieron siempre hojas adultas, no senescentes.

No se recolectaron pliegos de herbario de estas especies. En parte por la exigüidad de las poblaciones, y también porque en ninguno de los dos casos existió margen de duda en cuanto a la identificación taxonómica de las mismas.

#### 5.2.1.1 Recolección del material de *Helianthemum inaguae*

La recolección de muestras vegetales en la población natural se desarrolló el día 6 de junio de 2006. Se contabilizó en esta población un total de 35 ejemplares

(Tabla 5.1), todos adultos, que se encontraban en fase de fructificación inicial (sin disponibilidad de semillas). De estos, tres ejemplares se situaban en el andén de Cho Cabral y 32 en las repisas casi inaccesibles que se hallan por encima de este andén. Se recolectaron tres muestras de los ejemplares del andén y 21 muestras de los que se situaban en las repisas (24 muestras en total). La población se encontraba en fase de fructificación.

Para la recolección de este material fue necesario el uso de técnicas de escalada, de manera que pudo accederse al mayor número de muestras posible sin comprometer nuestra seguridad. Aun así, no fue posible la recolección de muestras de 11 ejemplares que se situaban en repisas y grietas completamente inaccesibles y fuera de nuestro alcance.

**Tabla 5.1. Número de ejemplares de la población de *H. inaguae* y número de muestras recolectadas (junio de 2006).**

Población	Núcleo	Ejemplares	Muestras recolectadas
Andenes de Tasarte	Repisas	32	21
	Andén de Cho Cabral	3	3
	<b>Total</b>	35	24

### 5.2.1.2 Recolección del material de *Pericallis hadrosoma*

En este caso, la recolección del material vegetal se realizó durante el mes de mayo de 2006 (días 16 y 19). La especie se encontraba en fase vegetativa.

Tal y como hemos descrito anteriormente, existe algo de controversia a la hora de identificar los ejemplares de *P. hadrosoma*, ya que su crecimiento vegetativo puede inducir a errores cuando se trata de establecer un tamaño poblacional o de identificar ejemplares aislados para la recolección de material vegetal, tanto de semillas como de material para análisis genético, cultivo in vitro, etc.

Tras visitar todas las poblaciones, se estimó un tamaño poblacional total de 15 ejemplares. A excepción de la población de Roque Sardina, se identificó cada individuo por su situación en repisas completamente diferenciadas y separadas entre sí. En Roque Sardina, se identificaron tres ejemplares en la misma repisa y uno a pie de risco. Los individuos de la repisa habían sido identificados como ejemplares genotípicamente diferenciados de acuerdo con el análisis de componentes principales realizado en 2005 (Batista Hernández *et al.*, 2005) y con las visitas previas realizadas en años anteriores por técnicos del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-Unidad Asociada al CSIC (J. Naranjo, com. per.).

Se recolectó un total de 15 muestras individualizadas de cada uno de los ejemplares que forman las poblaciones naturales, tal y como se detalla en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Número de ejemplares de las poblaciones de *P. hadrosoma* y número de muestras recolectadas (mayo de 2006).

Población	Ejemplares	Muestras recolectadas
Tenteniguada	2	2
Roque Sardina	4	4
Roque Cayo	1	1
El Salado	2	2
La Portillada	6	6
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

### 5.2.1.3 Material procedente del cultivo *in vitro*

Se seleccionaron 20 muestras de plantas obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de *H. inaguae* y 10 muestras de *P. hadrosoma*. El cultivo de *H. inaguae* se inició a partir de semillas procedentes de la colección de planta viva del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-Unidad Asociada al CSIC (en adelante JBCVCSIC), mientras que en el caso de *P. hadrosoma*, las plantas seleccionadas procedían del cultivo *in vitro* de todas sus poblaciones. La recolección del material vegetal para su introducción *in vitro* se realizó de manera conjunta para cada población, es decir, no se llevó a cabo la introducción de cada individuo por separado.

Para ambas especies, las plantas elegidas para el análisis genético habían pasado por las siguientes etapas de cultivo *in vitro*: establecimiento, multiplicación, elongación y enraizamiento. Tras su enraizamiento, se seleccionaron las de aspecto más sano, que no presentaban formación de tejidos hiperhídricos, y se procedió a eliminar las raíces y cualquier tejido que hubiera necrosado. Este material se sometió a un proceso de secado similar al del material recolectado en las poblaciones naturales: las plántulas se introdujeron, individualmente, en bolsas de plástico herméticas, debidamente etiquetadas, a las que se añadió gel de sílice para su desecación, el cual fue sustituido periódicamente cuando así lo indicaba el cambio de color del gel de sílice.



### 5.2.2 Análisis genético

El análisis genético de *H. inaguae* y *P. hadrosoma* fue realizado en las instalaciones del Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN del JBCVCSIC.

La numeración de las muestras en el laboratorio se realizó de acuerdo con los códigos establecidos durante la recolección del material vegetal. A continuación se ofrecen las correspondencias entre la numeración de las muestras y su población de origen (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Códigos y numeración de las muestras de ADN para cada población/núcleo de *H. inaguae* y *P. hadrosoma*.

Especie	Población/núcleo	Código	Numeración
<i>H. inaguae</i>	Repisas	NAT	21-23
	Andén de Cho Cabral	NAT	24-44
	Cultivo	CULT	1-10 y 60-69
<i>P. hadrosoma</i>	Tenteniguada	TENT	45-46
	Roque Sardina	RQSA	54-57
	Roque Cayo	RQCA	53
	El Salado	SALD	58-59
	La Portillada	PORT	47-52
	Cultivo	CULT	11-20

La numeración de cada muestra en las fotografías realizadas a los patrones de bandas obtenidos en la electroforesis corresponde a lo descrito en la tabla Tabla 5.3.

Todo el material de laboratorio utilizado en cada etapa del proceso de análisis genético, desde la extracción del ADN hasta la elaboración de los geles de

agarosa, fue debidamente esterilizado antes de su uso. Esta esterilización se realizó mediante el autoclavado del material a 120° C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

### 5.2.3 Extracción de ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo de micropreparaciones de ADN con el método CTAB 2X (Doyle y Doyle, 1987 y Palmer *et al.*, 1988), con algunas modificaciones menores que han sido posteriormente publicadas en Caujapé-Castells *et al.* (2011), descargable en <http://www.bioclimac.com/mbdna/index.php/dna-bank/documentation/dna-bank-lab-manual>. El procedimiento seguido tanto para las muestras de *H. inaguae* como de *P. hadrosoma* fue idéntico y se explica a continuación.

En primer lugar, se realizó una revisión del material vegetal con el fin de comprobar que no existían impurezas que pudieran contaminar el material genético durante el proceso de extracción. Seguidamente, este material fue introducido en un microtubo (1,5 ml) y triturado con un homogeneizador automático o “Mixer Mill” (Restch).

Tras el proceso de “rotura mecánica” del material vegetal, se llevó a cabo una lisis química de las membranas celulares que protegen el ADN dentro de la célula y de los orgánulos (núcleo, mitocondrias y cloroplastos) mediante la adición de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) y EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) a 65° C. El CTAB es una sal de amonio cuaternario que actúa como detergente, mientras que el mercaptoetanol es un agente reductor que inhibe la acción enzimática sobre el ADN mediante la desnaturalización de peroxidasas y polifenoxidasas.

En concreto, se añadió a las muestras 500 µl de CTAB y 2 µl de mercaptoetanol a 65° C y se procedió a su homogeneización con la ayuda de un vórtex. Esta

mezcla fue incubada en el baño termostático a 65° C durante 15 minutos, con agitación suave a intervalos.

Tras este paso, se añadieron 500 µl de SEVAG (solución de alcohol isoamílico y cloroformo en proporción 1:24) a cada muestra, mezclando bien por inversión varias veces durante aproximadamente 15 minutos, a temperatura ambiente. Durante este proceso se abrieron además los tubos una o dos veces para dejar escapar el gas procedente del SEVAG. Después de este tiempo, las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante de cada muestra se transfirió a nuevos tubos, debidamente etiquetados.

Posteriormente se procedió a precipitar el ADN mediante la adición a cada tubo de 500 µl de isopropanol (2-propanol), previamente almacenado a -20° C. La mezcla se realizó por inversión de los tubos hasta la precipitación del ADN. Tras este paso, las muestras se mantuvieron a -20° C durante 24 horas para ser nuevamente centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos.

Estos dos últimos pasos permiten la eliminación de proteínas y otros componentes secundarios, como es el caso de los fenoles.

Tras la retirada del sobrenadante del tubo, nos quedamos con el pellet que contenía el ADN, al cual se añadieron 500 µl de etanol al 70% (previamente almacenado a -20° C) con el fin de lavar el ADN. Esta mezcla fue centrifugada a 13000 rpm durante 3 minutos; transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante. El etanol que pudiera quedar en los tubos se secó con papel, con cuidado de no tocar el ADN ya extraído. Los tubos se dispusieron destapados en una estufa a unos 37-40° C, durante 1 hora para favorecer la evaporación de los restos de etanol. Tras este paso, se añadieron 100 µl de TE (Tris-EDTA) por tubo antes de cerrarlos, y se mantuvieron en la estufa a la misma temperatura hasta que se observó una correcta resuspensión del ADN.

Finalmente, el contenido de los tubos se traspasó a tubos de rosca, previamente esterilizados y etiquetados y se procedió a su almacenamiento a  $-20^{\circ}$  C.

#### **5.2.4 Evaluación cualitativa y cuantitativa del ADN**

Una vez realizada la extracción de ADN, es necesario realizar una valoración del mismo con el fin de comprobar si esta extracción se ha llevado a cabo con éxito y si el ADN resultante es adecuado para la amplificación mediante PCR. Se realizaron dos tipos de valoraciones, cuantitativa y cualitativa.

##### **5.2.4.1 Valoración cuantitativa**

Esta valoración tiene por objeto conocer la concentración del ADN extraído. Se realizó con un espectrofotómetro, que hace incidir un haz de luz monocromática a través de una muestra y mide la cantidad de luz que ésta absorbe. Dado que los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm y, teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  en el caso del ADN bicatenario, el espectrofotómetro puede calcular de forma fiable la concentración del ADN de la muestra midiendo la absorbancia a 260 nm. Así, al realizar mediciones de absorbancia a 280 nm y a 230 nm, es posible determinar la concentración de otros componentes que hayan podido permanecer tras la extracción del ADN. Las relaciones  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  indican la proporción de ADN presente en la muestra con respecto a la proporción de otros componentes o impurezas. Esto determinará el grado de pureza de las muestras extraídas.

Estas mediciones se realizaron para todas las muestras extraídas, utilizando un Biofotómetro Eppendorff®. Las mediciones efectuadas mostraron un rango de concentración de entre 0,98 y 1,80 para la relación  $A_{260}/A_{280}$  y de entre 0,93 y 2,83 para la relación  $A_{260}/A_{230}$ .

#### **5.2.4.2 Valoración cualitativa**

En este caso, esta valoración se realiza con el fin de conocer la calidad del ADN extraído. Para ello se realiza una electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica permite separar fragmentos de ADN en función de su tamaño, mediante la combinación de fuerzas eléctricas y de fricción. Dado que la molécula de ADN posee una carga negativa, si ésta se somete a un campo eléctrico, las moléculas migrarán hacia el ánodo. Esto permite visualizar, tras su tinción, las moléculas de ADN como bandas en el gel, lo que da una idea de la calidad y de la concentración del mismo.

La valoración cualitativa del ADN extraído se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% durante 1 hora y 30 minutos, a una intensidad de corriente de 90 mA, en un tampón TBE 1X.

Se utilizó una cubeta Ecogen (39,5 x23 cm) con uno o dos peines para 20 pocillos, dependiendo del número de muestras a valorar (20 o 40 muestras), con un volumen de tampón de 1500 ml y de 125 ml de gel de agarosa. Cada pocillo se cargó con 5 µl de ADN, mezclado con un tampón de carga.

Una vez transcurrida la electroforesis, se procedió a la tinción de los geles en bromuro de etidio. Para ello, el gel se dispone en una bandeja que contiene la disolución de bromuro de etidio (BrEt; 0,5 mg/ml) y se somete a suave agitación en un agitador orbital. Se mantiene durante unos 30 minutos y se traslada el gel a una bandeja con agua destilada en la que se mantiene durante unos 10-15 minutos. Trascurrido este tiempo, el gel se coloca sobre el iluminador de luz ultravioleta, para proceder a su fotografiado. Se utilizó una cámara digital SONY XC-ST50CE. Las fotos se guardaron en un archivo informático hasta el momento de su visualización.

La presencia de una única banda de gran intensidad y próxima al carril de migración es considerada como una evidencia de que la extracción del ADN se ha realizado con éxito, ya que implica la existencia de un ADN poco fragmentado y de calidad (sin degradar). Sin embargo, también es posible observar la presencia de diferentes bandas a lo largo del carril de migración, o bien la visualización de un banda degradada y difusa (smear), lo que implicaría la presencia de un ADN fragmentado y de poca calidad. En la Figura 5.1 se ofrece un ejemplo de la valoración de algunas muestras de estas especies.

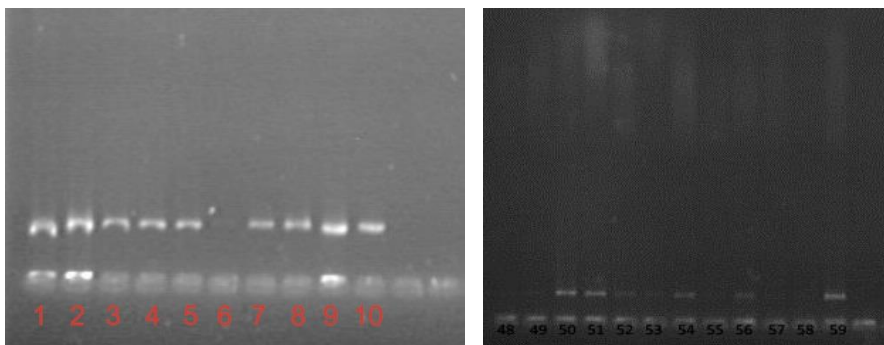


Figura 5.1. Ejemplos de geles de agarosa correspondientes a la electroforesis realizada para la valoración de las muestras. La numeración corresponde a la detallada en la Tabla 5.3.

### 5.2.5 Purificación del ADN

La mayor parte de las muestras extraídas ofrecían un valor de relación de absorbancia 260/280 por debajo de 1,65 – 1,90, lo que indicaba la presencia de fenoles u otros compuestos que pueden interferir negativamente en el proceso de amplificación. Por ello, el ADN de todas las muestras fue purificado con las columnas GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham-Pharmacia 27-9602-01). Tras este proceso, se volvió a realizar la cuantificación de ADN mediante el biofotómetro, comprobando el incremento en los valores de la relación A260/280. Las muestras de ADN resultantes se diluyeron a una concentración aproximada de 20 ng/μl para (i) llevar a cabo las reacciones de

amplificación con 1 µl de ADN, y (ii) no observar en los geles de agarosa diferencias muy ostensibles de intensidad entre las bandas resultantes de la amplificación.

### 5.2.6 Amplificación del ADN

Se ensayó un total de 28 cebadores (OPERON) para cada una de las especies: OPA-1, OPA-2, OPA-4, OPA-9, OPA-10, OPA-13, OPA-15, OPA-18, OPA-20, OPK1, OPK3, OPK15, OPK16, OPK20, OPT3, OPT6, OPT9, OPT12, OPT15, OPN2, OPN3, OPN4, OPN5, OPN6, OPN13, OPN14, OPN16 y OPN18. Las secuencias se muestran en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Secuencia y nombre de los cebadores utilizados en las amplificaciones de las dos especies objeto de esta tesis doctoral.

CEBADOR	Secuencia (5'→3')
OPA-1	CAGGCCCTTC
OPA-2	TGCCGAGCTG
OPA-4	AATCGGGCTG
OPA-9	GGGTAACGCC
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-18	AGGTGACCGT
OPA-20	GTTGCGATCC
OPK-1	CATTGAGCC
OPK-3	CCAGCTTAGG
OPK-15	CTCCTGCCAA
OPK-16	GAGCGTCGAA
OPK-20	GTGTCGCGAG
OPN-2	ACCAGGGGCA
OPN-3	GGTACTCCCC
OPN-4	GACCGACCCA
OPN-5	ACTGAACGCC
OPN-6	GAGACGCACA
OPN-13	AGCGTCACTC
OPN-14	TCGTGCGGGT
OPN-16	AAGCGACCTG
OPN-18	GGTGAGGTCA
OPT-3	TCCACTCCTG
OPT-6	CAAGGGCAGA

<b>OPT-9</b>	CACCCCTGAG
<b>OPT-12</b>	GGGTGTGTAG
<b>OPT-15</b>	GGATGCCACT

Las pruebas de amplificación de estos cebadores se realizaron con aquellas muestras para las que se obtuvo una mayor cantidad de ADN extraído. Se utilizó el kit comercial REDDYMIX PCR MASTER MIX de ABGENE® (AB0619/LD/b) con una concentración de 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. En cada pocillo de amplificación se dispuso 1 µl ADN, 1 µl de cebador, 2,5 µl de BSA (albúmina de suero bovino) y 20,5 µl de MASTER MIX. El BSA actúa deshaciendo los posibles bucles o nudos que se pueden formar en el ADN, lo que facilita el acceso a la DNA polimerasa, de forma que la amplificación se desarrolla óptimamente. El BSA actúa absorbiendo los polifenoles, lo que evita la acción de estos compuestos que oxidan el ADN e impiden la acción de enzimas de restricción.

Las diluciones o “mezclas de amplificación” se dispusieron en placas de 96 pocillos estériles, que fueron selladas con una fina capa de aluminio. La amplificación se llevó a cabo mediante 45 ciclos consistentes cada uno en: una fase de desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, una fase de anillamiento a 36° C durante 30 segundos y una fase de elongación a 72° C durante 1 minuto.

Antes del primer ciclo, las muestras se sometieron a un arranque en caliente (hotstart) a 94° C durante 1,5 minutos y, al finalizar los 45 ciclos, permanecieron en una fase de elongación (72° C) durante 10 minutos, con el fin de garantizar una correcta finalización de todas las amplificaciones en curso durante el último ciclo.

Tras este proceso, se programó el termociclador para que la temperatura bajara a 21°C y luego a 4° C, en la cual permanecía hasta que se abortaba el programa y se quitaba la placa para el posterior procesamiento de los productos de amplificación.



La amplificación se realizó en los termocicladores del Laboratorio de Biodiversidad Molecular del JBCVCSIC (Eppendorff Mastercycler gradient y Eppendorff Mastercycler ep-gradient).

Algunas muestras seleccionadas aleatoriamente fueron sometidas de nuevo a amplificación bajo las mismas condiciones con el fin de comprobar la reproducibilidad de las bandas obtenidas y garantizar la consistencia de su posterior interpretación. Además, se incluyó un control negativo en la mayoría de las amplificaciones, con los mismos componentes de todas las amplificaciones pero sin la presencia de ADN.

Este protocolo de amplificación ya había sido probado con éxito en el laboratorio de biología molecular del JBCVCSIC y durante la ejecución del proyecto BIOTA-GENES, ejecutado por el JBCVCSIC y por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Cabrera García *et al.*, 2005 y Batista Hernández *et al.*, 2005).

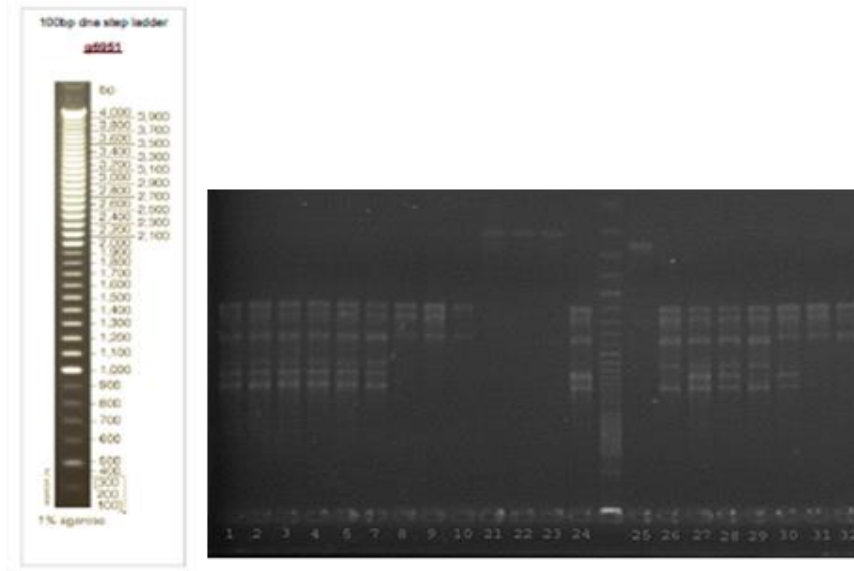
### **5.2.7 Visualización de los patrones de polimorfismo RAPD**

Tras el proceso de amplificación del ADN, los productos resultantes se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica permite separar fragmentos de ADN en función de su tamaño, mediante la combinación de fuerzas eléctricas y de fricción. Las moléculas de ADN sometidas a un campo eléctrico migran hacia el ánodo, dada su carga negativa. Como la carga total es función directa del tamaño de la molécula, los fragmentos de mayor tamaño migran con mayor lentitud, mientras que los de menor tamaño avanzan con más rapidez, con la consiguiente separación en el gel (Fierro Fierro, 2014).

En este caso, la electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% durante un tiempo que osciló entre 1h y 30 minutos y 2 horas, a una intensidad de corriente 150 V, en un tampón TBE 1X. Se utilizó también una cubeta Ecogen (39,5 x23 cm)

con dos peines de 20 pocillos cada uno y un volumen de tampón de 1500 ml y de 150 ml de gel de agarosa. Todos los procedimientos de elaboración de los geles de agarosa y de la realización de electroforesis fueron realizados de acuerdo con lo descrito en Caujapé-Castells *et al.* (2011).

Cada pocillo se cargó con 12  $\mu$ l del producto de amplificación correspondiente, mezclado con un tampón de carga que actúa como colorante para visualizar el avance del frente del gel en la matriz de agarosa y favorece a su vez que las muestras se depositen en el fondo de los pocillos. En cada fila se reservó un pocillo para una escalera de ADN de 100 pares de bases como marcador molecular para estimar el tamaño de las bandas obtenidas (Promega G-6951). Este marcador posee un conjunto de fragmentos de ADN de tamaños que van entre los 100 y los 4000 pares de base, con un incremento de tamaño de 100 pares de bases entre cada fragmento y su sucesivo, lo que equivale a 40 fragmentos de ADN. Esto permite la determinación, en los geles de agarosa, de bandas en un intervalo amplio de tamaños, de 100 a 4000 pares de bases. En la práctica, sólo se consideraron para la interpretación de los patrones de polimorfismo RAPD los fragmentos comprendidos en un rango de tamaño desde 650 a 2400 pares de bases. En la Figura 5.2 se muestra un ejemplo de visualización de los patrones de polimorfismo RAPD, en gel de agarosa, junto a una imagen del marcador utilizado (Promega G-6951).



**Figura 5.2. Ejemplo de gel de agarosa correspondiente a la electroforesis de los productos de amplificación de *H. inaguae* con el cebador OPA-4.**

La tinción de los geles se realizó en bromuro de etidio (0,5 mg/ml), siguiendo el mismo procedimiento empleado para la valoración cualitativa del ADN. Las fotos se guardaron en un archivo informático hasta el momento de su interpretación.

### 5.2.8 Interpretación de bandas

La interpretación de las imágenes de los geles se realizó de manera manual, tanto por el escaso número de muestras como por el hecho de que los programas informáticos al uso siempre requieren de comprobaciones visuales. Los diferentes productos de amplificación o “bandas” fueron codificados como caracteres binarios (1: presencia, 0: ausencia). En caso de duda se asignó un “?”. Se asume que las bandas de idéntico tamaño representan el mismo locus genético, y que las bandas de diferente tamaño representan diferentes loci.

Se construyó una matriz de datos que fue introducida en el programa Transformer 4 (Caujapé-Castells *et al.*, 2013) y será depositada en el compendio de diversidad genética del sistema de información Demiurge.

### 5.2.9 Análisis de datos

El análisis de datos se realizó a partir de la matriz de datos introducida en el programa Transformer-4. Mediante este programa, se generaron archivos de entrada para la obtención de los parámetros de genética necesarios para los programas Arlequin ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), PopGene ver. 3.2 (Yeh *et al.*, 1999), y GenAlEx ver. 6.4 (Peakall y Smouse, 2006).

Para ambas especies, el cálculo de los siguientes parámetros se realizó con el programa PopGene 3.2: número de alelos observados ( $na$ ), número efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964), diversidad genética de Nei (1973) ( $h$ ) e índice de Shannon ( $I$ ). Se realizó además el test de neutralidad de Ewens-Watterson para las muestras provenientes de las poblaciones naturales. En el caso de *P. hadrosoma*, sólo se evaluaron las poblaciones con 3 o más ejemplares (Roque Sardina y La Portillada). Este programa también fue utilizado para obtener los valores de identidad y distancia de Nei (Nei, 1978), así como para el cálculo del coeficiente de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) y el flujo genético ( $Nm$ ), realizados para las poblaciones de *P. hadrosoma*.

El programa Arlequin 3.1 se utilizó para llevar a cabo el análisis molecular de la varianza (AMOVA) realizado entre las poblaciones de *P. hadrosoma*.

Los análisis de coordenadas principales (ACoP), generados para ambas especies, con la inclusión de los grupos procedentes de cultivo, fueron realizados con el programa GenAlEx 6.4.

### 5.3 Resultados del análisis genético de *Helianthemum inaguae*

#### 5.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN de *H. inaguae* fue llevada a cabo con éxito para todas las muestras a excepción de una (nº 6), correspondiente a una de las plantas cultivadas *in vitro*. En este caso, el análisis cuantitativo corroboró la improductividad de la extracción de ADN, con un valor de 0,000 para la relación A260/A280.

#### 5.3.2 Cebadores y amplificación

Se observaron resultados positivos en 15 de los 28 cebadores ensayados para *H. inaguae*: OPA-3, OPA-4, OPA-7, OPA-13, OPK-4, OPK-7, OPN-2, OPN-3, OPN-4, OPN-5, OPN-13, OPN-14, OPN-16, OPN-18 y OPT-1. Estos cebadores mostraron resultados exitosos de amplificación para todas las muestras ensayadas.

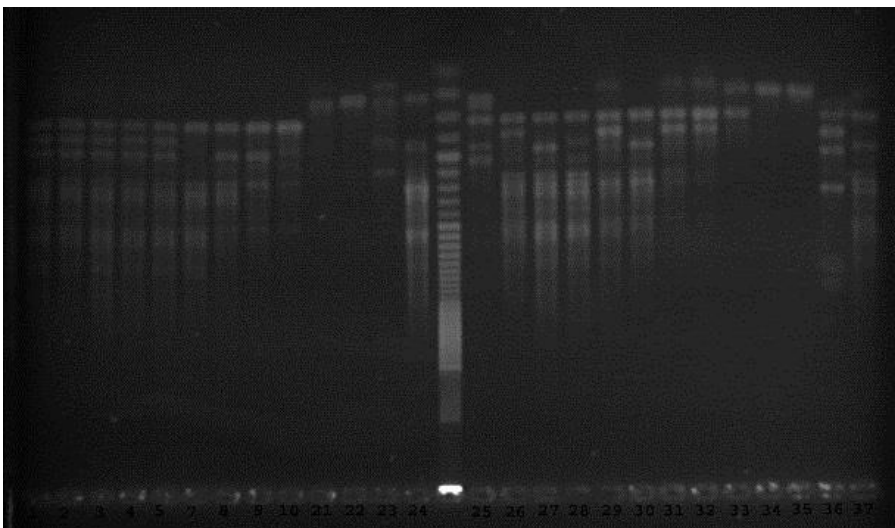


Figura 5.3. Gel de agarosa correspondiente a la electroforesis de los productos de amplificación con el cebador OPK-7 para todas las muestras de *H. inaguae*..

En la Figura 5.3 se muestra un ejemplo de visualización de los productos de amplificación con uno de los cebadores ensayados que ofrecieron resultados positivos (OPK-7).

### 5.3.3 Diversidad genética de la población natural de *Helianthemum inaguae*

#### 5.3.3.1 Descriptores de la estructura genética

Los parámetros utilizados para describir la estructura genética de *H. inaguae* se muestran en la Tabla 5.5.

Tanto el número de alelos observados como el número efectivo de alelos fueron siempre mayores que uno, con valores promedio de 1,9200 y de 1,4650 respectivamente.

Los índices de diversidad genética muestran valores considerablemente elevados. Así, el índice de diversidad genética de Nei (1973) fue de 0,2755, mientras que el índice de Shannon (Lewontin, 1972) dio un valor de 0,4198.

Además, se observó un total de 92 loci polimórficos, lo que ofrece un porcentaje de polimorfismo del 92%.

**Tabla 5.5. Parámetros descriptores de la estructura genética de *H. inaguae*; *n*: nº muestras; *na*: nº de alelos observado; *ne*: nº efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964); *h*: diversidad genética de Nei (1973); *I*: índice de Shannon (Lewontin, 1972); *P*: % de polimorfismo.**

Población	<i>n</i>	<i>na</i>	<i>ne</i>	<i>h</i>	<i>I</i>	Loci polimórficos	<i>P</i>
NAT	24	1,9200	1,4650	0,2755	0,4198	92	92

### 5.3.3.1.1 El test de neutralidad de Ewens-Watterson

El test de neutralidad de Ewens-Watterson para la población natural de *H. inaguae* muestra que el valor promedio de la homocigosidad esperada según la hipótesis de la neutralidad se sitúa dentro del intervalo de confianza calculado para cada locus (Tabla 5.6). Así, se puede asumir que el test no es significativo y que cada uno de los loci analizados puede ser considerado como neutral.

Tabla 5.6. Valores del test de neutralidad para los 90 loci polimórficos obtenidos en la población natural de *H. inaguae*.

PORT	Test de neutralidad de Ewens-Watterson			
Locus	Promedio	SE	L95	U95
A3-1350	0,6982	0,0171	0,5000	0,8472
A3-1400	0,7168	0,0192	0,5022	0,8756
A3-1500	0,7007	0,0183	0,5030	0,8580
A3-ca2600	0,7138	0,0199	0,5022	0,8756
A4-700	0,7494	0,0231	0,5035	0,9201
A4-750	0,7427	0,0236	0,5035	0,9201
A4-1100	0,7423	0,0232	0,5000	0,9201
A4-1150	0,7392	0,0232	0,5035	0,9201
A4-1350	0,7431	0,0243	0,5035	0,9201
A4-1650	0,7334	0,0241	0,5000	0,9201
A4-1700	0,7409	0,0224	0,5000	0,9201
A4-1950	0,7439	0,0242	0,5000	0,9201
A7-1250	0,7276	0,0220	0,5000	0,9050
A7-1600	0,7367	0,0213	0,5050	0,950
A7-ca1900	0,7229	0,0205	0,5000	0,8951
A13-950	0,7198	0,0210	0,5017	0,8893
A13-1050	0,7115	0,0185	0,5000	0,8673
A13-1150	0,7278	0,0199	0,5017	0,8893
A13-1300	0,7224	0,0216	0,5017	0,8893
A13-1400	0,7196	0,0201	0,5017	0,8893
A13-1500	0,7138	0,0207	0,5000	0,8828
A13-1600	0,7227	0,0204	0,5017	0,8893

## Capítulo 5. Análisis genético

<b>A13-1650</b>	0,7185	0,0213	0,5017	0,8893
<b>A13-1750</b>	0,7224	0,0208	0,5017	0,8893
<b>A13-1900</b>	0,7147	0,0201	0,5017	0,8893
<b>A13-2000</b>	0,7236	0,0211	0,5017	0,8893
<b>K4-1250</b>	0,7439	0,0234	0,5035	0,9201
<b>K7-650</b>	0,7414	0,0233	0,5035	0,9201
<b>K7-700</b>	0,7462	0,0231	0,5000	0,9201
<b>K7-750</b>	0,7423	0,0233	0,5035	0,9201
<b>K7-800</b>	0,7416	0,0235	0,5000	0,9201
<b>K7-900</b>	0,7391	0,0234	0,5000	0,9201
<b>K7-925</b>	0,7424	0,0237	0,5035	0,9201
<b>K7-950</b>	0,7395	0,0226	0,5009	0,9168
<b>K7-1050</b>	0,7459	0,0221	0,5009	0,9168
<b>K7-1100</b>	0,7297	0,0228	0,5041	0,9132
<b>K7-1200</b>	0,7486	0,0230	0,5035	0,9201
<b>K7-1250</b>	0,7451	0,0226	0,5035	0,9201
<b>N2-800</b>	0,7413	0,0233	0,5035	0,9201
<b>N2-1050</b>	0,7487	0,0229	0,5035	0,9201
<b>N2-1100</b>	0,7409	0,0235	0,5035	0,9201
<b>N2-1300</b>	0,7373	0,0232	0,5011	0,9093
<b>N2-1325</b>	0,7377	0,0233	0,5035	0,9201
<b>N3-1100</b>	0,7350	0,0215	0,5014	0,9003
<b>N3-1200</b>	0,7338	0,0209	0,5000	0,9050
<b>N3-1300</b>	0,7249	0,0210	0,5062	0,8951
<b>N3-1400</b>	0,7396	0,0224	0,5011	0,9093
<b>N4-750</b>	0,7500	0,0271	0,5000	0,9201
<b>N4-900</b>	0,7424	0,0231	0,5035	0,9201
<b>N4-1000</b>	0,7414	0,0231	0,5035	0,9201
<b>N4-1050</b>	0,7388	0,0227	0,5035	0,9201
<b>N4-1225</b>	0,7339	0,0239	0,5035	0,9201
<b>N4-1300</b>	0,7511	0,0230	0,5035	0,9201
<b>N4-1350</b>	0,7396	0,0235	0,5000	0,9201
<b>N4-1500</b>	0,7446	0,0230	0,5035	0,9201
<b>N4-1650</b>	0,7463	0,0235	0,5035	0,9201
<b>N4-2000</b>	0,7383	0,0230	0,5009	0,9168
<b>N5-950</b>	0,7237	0,0227	0,5000	0,9050
<b>N5-1000</b>	0,7246	0,0216	0,5014	0,9003



## Capítulo 5. Análisis genético

<b>N5-1050</b>	0,7239	0,0212	0,5000	0,8951
<b>N5-1125</b>	0,7226	0,0214	0,5017	0,8893
<b>N5-1200</b>	0,7292	0,0205	0,5000	0,8951
<b>N5-1250</b>	0,7237	0,0218	0,5000	0,8951
<b>N5-1300</b>	0,7264	0,0211	0,5050	0,9050
<b>N5-1550</b>	0,7196	0,0207	0,5017	0,8893
<b>N5-1600</b>	0,7302	0,0222	0,5000	0,8951
<b>N5-1650</b>	0,7193	0,0214	0,5000	0,8951
<b>N5-1750</b>	0,7303	0,0214	0,5000	0,8951
<b>N13-1075</b>	0,7191	0,0202	0,5017	0,8893
<b>N13-1100</b>	0,7192	0,0210	0,5000	0,8951
<b>N13-1350</b>	0,7143	0,0201	0,5000	0,8828
<b>N13-1475</b>	0,7192	0,0202	0,5017	0,8893
<b>N13-1550</b>	0,7237	0,0205	0,5000	0,8828
<b>N14-825</b>	0,7356	0,0233	0,5009	0,9168
<b>N14-875</b>	0,7414	0,0237	0,5009	0,9168
<b>N14-1050</b>	0,7387	0,0234	0,5009	0,9168
<b>N14-1300</b>	0,7470	0,0228	0,5009	0,9168
<b>N14-1500</b>	0,7471	0,0231	0,5009	0,9168
<b>N14-1700</b>	0,7358	0,0222	0,5011	0,9093
<b>N16-700</b>	0,7432	0,0237	0,5000	0,9201
<b>N16-900</b>	0,7441	0,0226	0,5035	0,9201
<b>N16-950</b>	0,7371	0,0231	0,5035	0,9201
<b>N16-1000</b>	0,7443	0,0238	0,5035	0,9201
<b>N16-1150</b>	0,7459	0,0234	0,5035	0,9201
<b>N16-1300</b>	0,7537	0,0225	0,5000	0,9201
<b>N16-1450</b>	0,7476	0,0225	0,5035	0,9201
<b>N16-1700</b>	0,7481	0,0233	0,5035	0,9201
<b>N16-1975</b>	0,7406	0,0243	0,5000	0,9201
<b>N16-Ca2000</b>	0,7419	0,0232	0,5009	0,9168
<b>N18-1500</b>	0,7204	0,0208	0,5017	0,8893
<b>T1-1000</b>	0,7201	0,0212	0,5017	0,8893
<b>T1-1250</b>	0,7211	0,0195	0,5022	0,8756

### 5.3.3.1.2 Análisis de coordenadas principales

El análisis de coordenadas principales (ACoP) (Figura 5.4) realizado muestra la diferenciación de los ejemplares de la población natural de *H. inaguae*. Los resultados revelan la existencia de tres agrupaciones de individuos, aunque sin una clara diferenciación entre ellas.

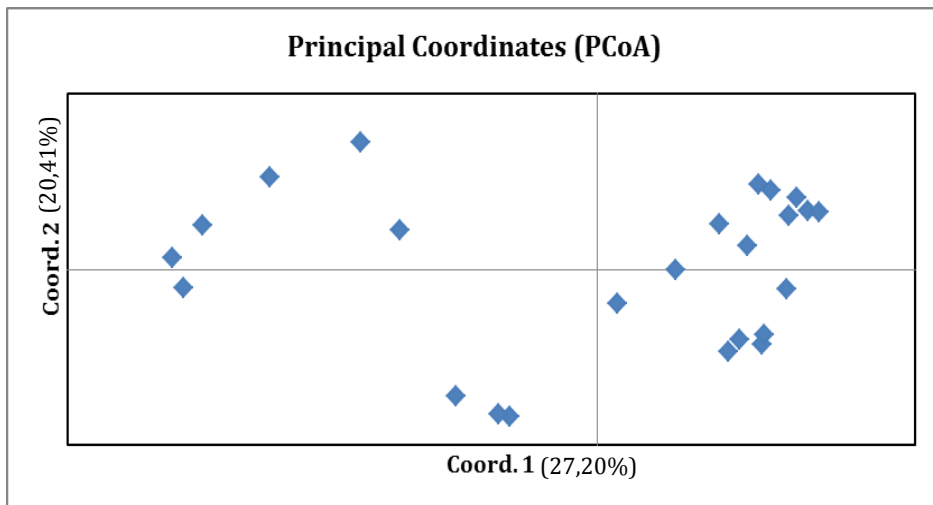


Figura 5.4. Análisis de coordenadas principales para los ejemplares analizados de *H. inaguae*.

### 5.3.4 Fidelidad genética de las plantas obtenidas *in vitro*

Para evaluar las posibles diferencias existentes entre los ejemplares de la población natural de *H. inaguae* y de las plantas obtenidas *in vitro*, se compararon los parámetros descriptores de la estructura genética de los ejemplares naturales con los obtenidos *in vitro*.

Como se observa en la Tabla 5.7, los valores observados en el grupo de plantas obtenidas en cultivo son ligeramente inferiores a los observados para la población natural. El porcentaje de loci polimórficos asciende al 65%, lo que puede ser considerado también como un valor elevado.

Tabla 5.7. Comparación de los parámetros descriptores de la estructura genética de *H. inaguae* con el grupo de plantas obtenidas *in vitro*; *n*: nº muestras; *na*: nº de alelos observado; *ne*: nº efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964); *h*: diversidad genética de Nei; *I*: índice de Shannon (Lewotin, 1972); *P*: % de polimorfismo.

Población	<i>n</i>	<i>na</i>	<i>ne</i>	<i>h</i>	<i>I</i>	Loci polimórficos	<i>P</i>
NAT	24	1,9200	1,4650	0,2755	0,4198	92	92
CULT	19	1,6500	1,4063	0,2311	0,3422	65	65
Todas poblaciones	43	1,9300	1,4620	0,2704	0,4112	93	93
Promedio	-	1,775	1,4358	0,2530	0,3802	77,5	77,5

El análisis de coordenadas principales realizado para todos los ejemplares de *H. inaguae* analizados (Figura 5.5), muestra un claro y estrecho agrupamiento entre los ejemplares obtenidos *in vitro* y los procedentes de la población natural.

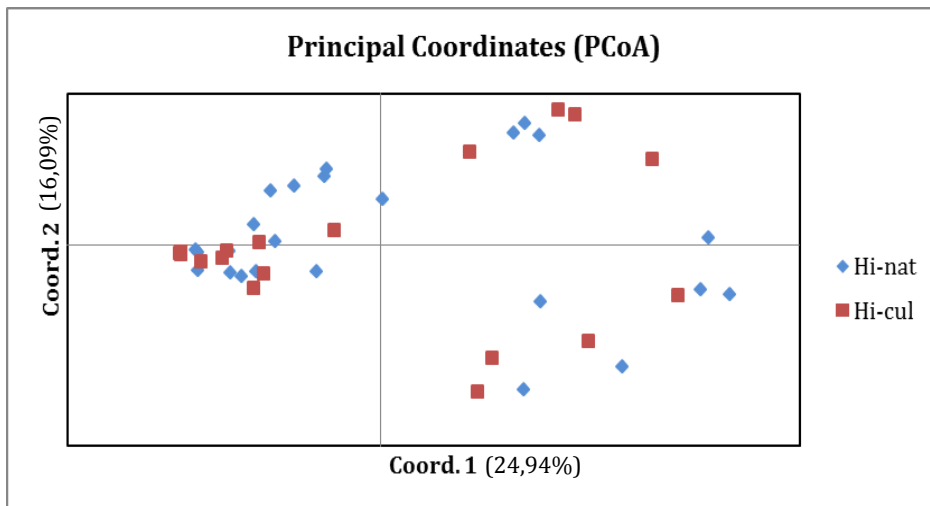


Figura 5.5. Análisis de coordenadas principales para los ejemplares analizados de *H. inaguae*, incluyendo las muestras de las plantas obtenidas *in vitro*.

No se observa la presencia de bandas exclusivas en el grupo de plantas obtenidas *in vitro*. Es decir, los diferentes loci polimórficos observados en los ejemplares cultivados fueron observados también en la población natural de *H. inaguae*. De los 100 loci detectados en la población natural de *H. inaguae*, 81 son

compartidos también por el grupo de plantas cultivadas, mientras que 19 se encontraron exclusivamente en la población natural (Tabla 5.8). En la Figura 5.6 se muestra un ejemplo de visualización de los productos de amplificación con el cebador OPN-6.

Tabla 5.8. Bandas exclusivas presentes en los ejemplares de *H. inaguae* analizados.

Población	Nº bandas exclusivas	Bandas exclusivas
NAT	19	OPA3-1400, OPA7-1600, OPA13-1400, OPA13-1750, OPA13-1900, OPN16-1975, OPK7-700, OPK7-750, OPN2-800, OPN2-1050, OPN2-1325, OPN3-1100, OPN4-1300, OPN5-1000, OPN5-1250, OPN14-825, OPN14-875, OPN14-1700, OPT1-1000
CULT	0	-

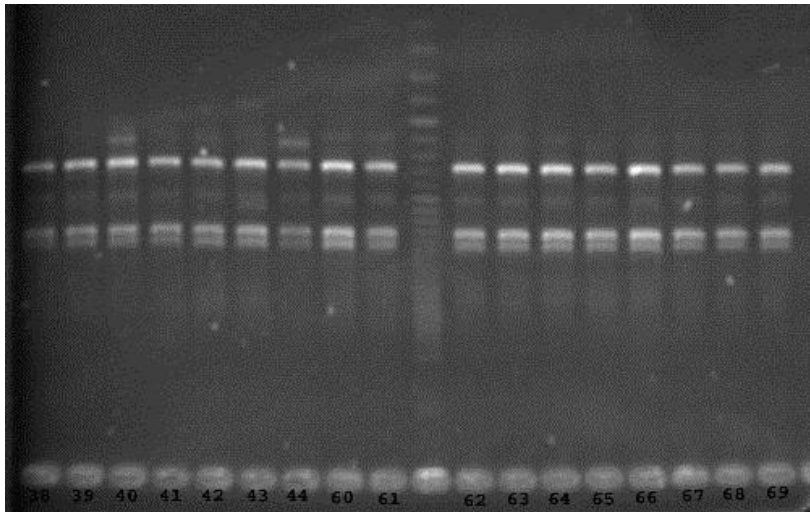


Figura 5.6. Gel de agarosa correspondiente a la electroforesis de los productos de amplificación con el cebador OPN-6 para algunas de las muestras de *H. inaguae*.

## 5.4 Discusión

Los resultados del análisis genético realizado mediante RAPD a *H. inaguae* ofrecen unos valores de diversidad genética cercanos a los observados en otras especies del mismo género. Así, el dato de diversidad genética de Nei ( $h = 0,2755$ ) y el porcentaje de polimorfismo ( $P = 92$ ) calculados en *H. inaguae* alcanzan valores muy similares a los calculados para *H. juliae* ( $h = 0,2755$  y  $P = 98,96$ ) (González Pérez *et al.*, 2015).

El análisis genético realizado a *H. gonzalezferreri* estima también su diversidad genética en  $h = 0,198$ ;  $I = 0,315$  y  $P = 89,55$  (González Pérez *et al.*, 2012). Estos valores son ligeramente más reducidos que los obtenidos para *H. inaguae* ( $I = 0,4198$ ), que alberga valores intermedios a los observados en estas dos otras especies.

En la Tabla 5.9 se ofrecen otros datos de diversidad genética obtenidos mediante RAPD, de especies endémicas de Canarias que presentan poblaciones reducidas y amenazadas. Los valores de diversidad genética detectados en *Isoplexis chalcantha* (Batista *et al.*, 2004) y en *Sideritis discolor* (Bouza *et al.*, 2004) son algo más elevados a los observados para *H. inaguae*, mientras que *Gnaphalium teydeum* (González-Pérez *et al.*, 2008) y *Kunkeliella subsucculenta* (González-Pérez *et al.*, 2013) presentan rangos algo más reducidos en cuanto al porcentaje de polimorfismo, pero con valores también altos de índices de diversidad.

Tabla 5.9. Valores de diversidad genética observados en *H. inaguae* y su comparación con otras especies amenazadas, obtenidos mediante RAPD.

Especie	<i>h</i>	<i>I</i>	<i>P</i>
<i>Helianthemum inaguae</i>	0,275	0,420	92,00
<i>Helianthemum gonzalezferreri</i>	0,198	0,315	89,55
<i>Helianthemum juliae</i>	0,286	-	98,96
<i>Sideritis discolor</i>	-	1,752	98,50
<i>Isoplexis chalcantha</i>	-	1,960	-
<i>Dorycnium spectabile</i>	-	0,960	-
<i>Cnaphalium teydeum</i>	0,173	-	75,49
<i>Kunkeliella subsucculenta</i>	0,216	0,331	76,92

En el análisis realizado para determinar la fidelidad genética de las plantas obtenidas *in vitro* no se ha detectado la presencia de bandas exclusivas en las muestras analizadas, por lo que no se han observado variaciones entre estos ejemplares.

Todas las bandas presentes en las plantas de cultivo se encuentran también en las de la población natural. De un total de 100 bandas detectadas en esta población, 81 se encuentran también en las plantas obtenidas *in vitro*, en las que se observó una tasa menor de polimorfismo.

Esto implicaría que el protocolo de micropropagación empleado es seguro y no genera variación. Sin embargo, ninguna técnica puede garantizar la fidelidad genética de las plantas regeneradas (Mallón y Rodríguez-Oubiña, 2010). Incluso si el análisis mediante RAPD muestra la inexistencia de variación, esto no quiere decir que no exista. Por ello, muchos autores recomiendan la aplicación de varias técnicas para detectar la variación genética cuando se quiera garantizar la estabilidad genética (Palombi y Damiano, 2002).

En otras especies amenazadas cultivadas *in vitro*, los estudios de fidelidad genética han obtenido con bastante frecuencia valores positivos, incluso con la

aplicación de dos técnicas diferentes de análisis genético (Moringa peregrina, Al Khateeb *et al.*, 2012; Centaurea ulreiae, Mallón y Rodríguez-Oubiña, 2010; Celastrus paniculatus, Senapati *et al.*, 2013). Esto puede estar relacionado con las técnicas de cultivo utilizadas. El uso de tejidos meristemáticos como materiales de partida para el cultivo de tejidos reduce la posibilidad de variación genética (Sahijram *et al.*, 2003; Howell *et al.*, 2003), mientras que las técnicas que requieren la formación de un tejido desdiferenciado (tejido de callo) antes de inducir la organogénesis generan una mayor tasa de variación (Sharma *et al.*, 2007). La elección del regulador de crecimiento es, a su vez, esencial, ya que las elevadas concentraciones de estos, así como el uso de determinados reguladores sintéticos, como el 2,4-D, se han relacionado con tasas elevadas de variación genética (Nehra *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 2006). El cultivo de yemas, tanto axilares como apicales, así como la adición de concentraciones reducidas de reguladores de crecimiento, son las principales particularidades a tener en cuenta cuando el objetivo es asegurar la fidelidad genética de las plantas obtenidas *in vitro*.

## 5.5 Resultados del análisis genético de *Pericallis hadrosoma*

### 5.5.1 Extracción de ADN

La extracción de las muestras de ADN de *P. hadrosoma* fue llevada a cabo con éxito en todos los casos.

### 5.5.2 Cebadores y amplificación

Se observaron resultados positivos en 9 de los 28 cebadores ensayados para *P. hadrosoma* (OPA-4, OPK-7, OPN-2, OPN-6, OPN-13, OPN-15, OPN-16, OPN-18 y OPT-1), que mostraron resultados exitosos de amplificación para todas las muestras ensayadas (Figura 5.7).

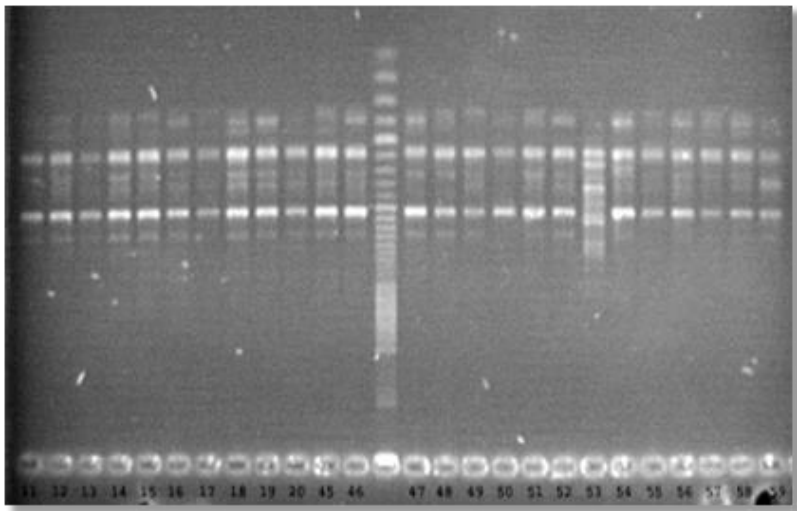


Figura 5.7. Gel de agarosa correspondiente a la electroforesis de los productos de amplificación con el cebador OPN-16 para todas las muestras de *P. hadrosoma*.



### 5.5.3 Diversidad genética de las poblaciones naturales de *Pericallis hadrosoma*

#### 5.5.3.1 Descriptores de la estructura genética

Los parámetros utilizados para describir la estructura genética de *P. hadrosoma* se muestran en la Tabla 5.10.

Tanto el número de alelos observados ( $na$ ) como el número efectivo de alelos ( $ne$ ) fueron siempre mayores que uno, salvo para la población de Roque Cayo (ya que posee un único individuo). El rango de valores obtenidos varió entre 1,00 y 1,41, mientras  $ne$  se situó entre 1,00 y 1,24. Los valores máximos siempre correspondieron a las poblaciones con mayor número de ejemplares.

Los índices de diversidad genética calculados mostraron siempre valores inferiores a 0,2. En el caso de  $h$  (diversidad genética de Nei), se observaron valores entre 0,00 y 0,131, mientras que  $I$  (índice de Shannon) mostró valores en un intervalo de entre 0,00 y 0,192. Para ambos índices, los valores más elevados de diversidad genética correspondieron a las poblaciones con un mayor número de ejemplares. No obstante, las poblaciones de Tenteniguada y El Salado, ambas con dos ejemplares, difieren en los valores de diversidad detectados, siendo éstos más altos en Tenteniguada.

La variabilidad genética medida mediante el porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ) coincide con los datos obtenidos a partir de los índices anteriores. Las poblaciones con un mayor número de loci polimórficos fueron Roque Sardina y La Portillada, con 28 y 24 loci polimórficos respectivamente. Esto corresponde a un porcentaje de polimorfismo de  $P = 40,58$  y de  $P = 34,78$  respectivamente.

Al igual que se observó en los valores de  $I$ , las poblaciones de Tenteniguada y de El Salado (con idéntico número de ejemplares censados), presentan diferentes

valores de polimorfismo, que es más elevado en Tenteniguada, con 16 loci polimórficos (23,19%), frente a los nueve observados en El Salado (13,04%).

**Tabla 5.10.** Parámetros descriptores de la estructura genética de *P. hadrosoma*; *n*: nº muestras; *na*: nº de alelos observado; *ne*: nº efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964); *h*: diversidad genética de Nei (1973); *I*: índice de Shannon (Lewontin, 1972); *P*: % loci polimórficos.

Población	<i>n</i>	<i>na</i>	<i>ne</i>	<i>h</i>	<i>I</i>	Loci polimórficos	<i>P</i>
TENT	2	1,2353	1,1664	0,0975	0,1423	16	23,19
RQSA	4	1,4058	1,1996	0,1259	0,1960	28	40,58
RQCA	1	1,0000	1,0000	0,000	0,0000	0	0
SALD	2	1,1304	1,0922	0,0540	0,0789	9	13,04
PORT	6	1,3478	1,2385	0,1313	0,1924	24	34,78
Todas las poblaciones	15	1,9275	1,4687	0,2814	0,4333	64	92,75
Promedio	-	1,2239	1,1393	0,0817	0,1219	15,40	22,32

### 5.5.3.2 El test de neutralidad de Ewens-Watterson

El test de neutralidad de Ewens-Watterson fue realizado para las poblaciones con más de dos ejemplares; es decir, las poblaciones de Roque Sardina y La Portillada, con cuatro y seis ejemplares respectivamente.

Los resultados obtenidos para la población de Roque Sardina (Tabla 5.11), mostraron que el valor promedio de la homocigosidad esperada según la hipótesis de la neutralidad se situó dentro del intervalo de confianza calculado para cada locus. Se considera, por tanto, que el test no es significativo y que cada uno de los locus puede ser considerado como neutral.

Tabla 5.11. Valores del test de neutralidad para 28 loci polimórficos en la población Roque Sardina.

RQSA	Test de neutralidad de Ewens-Watterson			
	Locus	Promedio	SE	L95
A4-1500	0,5914	0,0031	0,5000	0,6250
A4-1650	0,5907	0,0031	0,5000	0,6250
K7-800	0,5934	0,0030	0,5000	0,6250
K7-850	0,5556	0,0000	0,5556	0,5556
K7-875	0,5901	0,0031	0,5000	0,6250
K7-950	0,5879	0,0033	0,5000	0,6250
K7-1075	0,5904	0,5904	0,5000	0,6250
K7-1250	0,5939	0,5939	0,5000	0,6250
K7-1375	0,5911	0,5911	0,5000	0,6250
K7-1500	0,5909	0,5909	0,5000	0,6250
N2-1150	0,5556	0,0000	0,5556	0,5556
N2-1250	0,5556	0,0000	0,5556	0,5556
N15-1500	0,5000	0,0000	0,5000	0,5000
N16-850	0,5917	0,0031	0,5000	0,6250
N16-950	0,5913	0,0031	0,5000	0,6250
N16-1000	0,5877	0,0033	0,5000	0,6250
N16-1100	0,5924	0,0030	0,5000	0,6250
N16-1225	0,5930	0,0030	0,5000	0,6250
N18-950	0,5927	0,0030	0,5000	0,6250
N18-1150	0,5899	0,0032	0,5000	0,6250
N18-1700	0,5903	0,0031	0,5000	0,6250
T1-750	0,5946	0,0029	0,5000	0,6250
T1-900	0,5883	0,0032	0,5000	0,6250
T1-1000	0,5889	0,0032	0,5000	0,6250
T1-1125	0,5919	0,0030	0,5000	0,6250
T1-1350	0,5923	0,0030	0,5000	0,6250
T1-1500	0,5887	0,0032	0,5000	0,6250
T1-1800	0,5906	0,0031	0,5000	0,6250

En la población de La Portillada, se obtuvieron también valores promedio de homocigosidad esperada que se sitúan dentro del intervalo de confianza calculado para cada locus (Tabla 5.12). Al igual que para la población de Roque Sardina, el test resultó no significativo, y los loci pueden ser considerados como neutrales.

**Tabla 5.12.** Valores del test de neutralidad para 24 loci polimórficos en la población de La Portillada.

PORT	Test de neutralidad de Ewens-Watterson			
	Locus	Promedio	SE	L95
A4-1100	0,6386	0,0087	0,5000	0,7222
A4-1500	0,6361	0,0088	0,5000	0,7222
A4-1650	0,6157	0,0062	0,5200	0,6800
K7-875	0,6357	0,0088	0,5000	0,7222
K7-1500	0,5904	0,0031	0,5000	0,6250
N2-1100	0,6341	0,0087	0,5000	0,7222
N2-1325	0,6374	0,0088	0,5000	0,7222
N6-1800	0,6371	0,0086	0,5000	0,7222
N15-850	0,6334	0,0089	0,5000	0,7222
N15-1150	0,6380	0,0088	0,5000	0,7222
N15-1575	0,6321	0,0088	0,5000	0,7222
N15-2000	0,6339	0,0088	0,5000	0,7222
N18-950	0,6392	0,0088	0,5000	0,7222
N18-1150	0,6319	0,0087	0,5000	0,7222
N18-1450	0,6388	0,0089	0,5000	0,7222
T1-750	0,6319	0,0088	0,5000	0,7222
T1-875	0,6311	0,0089	0,5000	0,7222
T1-900	0,6322	0,0085	0,5000	0,7222
T1-1000	0,6322	0,0088	0,5000	0,7222
T1-1125	0,6313	0,0089	0,5000	0,7222
T1-1350	0,6355	0,0085	0,5000	0,7222
T1-1500	0,6340	0,0087	0,5000	0,7222
T1-1550	0,6350	0,0087	0,5000	0,7222
T1-1800	0,6317	0,0088	0,5000	0,7222

### 5.5.3.3 Descriptores de la variabilidad genética entre poblaciones

#### 5.5.3.3.1 Identidad y distancia genética entre poblaciones

La Tabla 5.13 muestra los valores de identidad y de distancias genéticas (Nei, 1978) obtenidos para las poblaciones de *P. hadrosoma*. Los valores de identidad genética variaron en un rango de entre 0,320 y 0,928. El valor mínimo de este rango se obtuvo entre las poblaciones de Roque Cayo y El Salado, mientras que el valor máximo se obtuvo entre El Salado y La Portillada.

En cuanto a los valores de distancia genética, estos variaron en un rango de entre 0,075 y 1,138. Los valores más elevados de distancias genéticas se observaron en las comparaciones de cada población con la población de Roque Cayo, con valores que variaron entre 0,759 y 1,138. Los valores máximos de distancia genética observados (1,138 y 0,952) son los obtenidos para Roque Cayo y El Salado y para Roque Cayo y la Portillada respectivamente. Por el contrario, los valores más reducidos de distancia genética son los observados entre El Salado y La Portillada (0,075).

**Tabla 5.13. Valores de Identidad genética de Nei (encima de la diagonal) y distancia genética de Nei (1978) (debajo de la diagonal) entre las poblaciones de *P. hadrosoma* muestreadas.**

	TENT	RQSA	RQCA	SALD	PORT
TENT	-	0,8822	0,4255	0,7769	0,8033
RQSA	0,1254	-	0,4683	0,7826	0,8152
RQCA	0,8545	0,7587	-	0,3203	0,3860
SALD	0,2524	0,2452	1,1384	-	0,9280
PORT	0,2190	0,2043	0,9518	0,0748	-

### 5.5.3.3.2 Coeficiente de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) y flujo génico ( $Nm$ )

Los resultados obtenidos para el cálculo del coeficiente de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) entre poblaciones y los valores de flujo génico ( $Nm$ ) estimado a partir de  $G_{ST}(Nm = 0,5 (1 - G_{ST})/G_{ST})$  se muestran en la Tabla 5.14.

El rango de valores de  $F_{ST}$  obtenidos fue de entre 0,0436 y 0,7775. El mínimo valor se obtuvo entre las poblaciones de Tenteniguada y Roque Sardina, mientras que el máximo corresponde a Roque Cayo y La Portillada.

El rango de variación de  $Nm$  fue más amplio, con un valor mínimo de 0,0460 entre las poblaciones de El Salado y Roque Cayo y un valor máximo de 2,7199 entre Tenteniguada y Roque Sardina.

Tabla 5.14. Valores de  $F_{ST}$  (encima de la diagonal) y de  $Nm$  (debajo de la diagonal) obtenidos para las poblaciones de *P. hadrosoma*.

	TENT	RQSA	RQCA	SALD	PORT
TENT	-	0,0621	0,4815	0,0436	0,2101
RQSA	2,7199	-	0,5346	0,3143	0,4677
RQCA	0,1027	0,1249	-	0,7576	0,7775
SALD	0,5393	0,4217	0,0407	-	0,1652
PORT	1,0799	0,7379	0,1137	1,1557	-

### 5.5.3.3.3 Análisis de la varianza

El análisis de la varianza (AMOVA) para las cinco poblaciones naturales de *P. hadrosoma* (Tabla 5.15) muestra que existe una diferenciación genética elevada y significativa ( $F_{ST} = 0,425$ ). La mayor parte de la varianza se observó dentro de las poblaciones (57,54%), mientras que entre las poblaciones el resultado fue algo menor (42,46%).

Tabla 5.15. Análisis de la varianza para las poblaciones naturales de *P. hadrosoma*. GL: grados de libertad; *F<sub>ST</sub>*: coeficiente de diferenciación genética entre todas las poblaciones (\**p*<0,005).

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Varianza	% del total
Entre poblaciones	4	53,300	3,259	42,46
Dentro de poblaciones	10	44,167	4,417	57,54
<i>F<sub>ST</sub></i> = 0,425*				
Total	14	97,467	7,676	

### 5.5.3.3.4 Análisis de coordenadas principales

El análisis de coordenadas principales (ACoP) (Figura 5.8) realizado muestra la diferenciación de los ejemplares de *P. hadrosoma*. Las poblaciones de Roque Sardina y La Portillada parecen ser las más alejadas genéticamente, mientras que el resto se sitúa en una posición intermedia entre éstas. No se observa una distinción clara entre grupos de poblaciones.

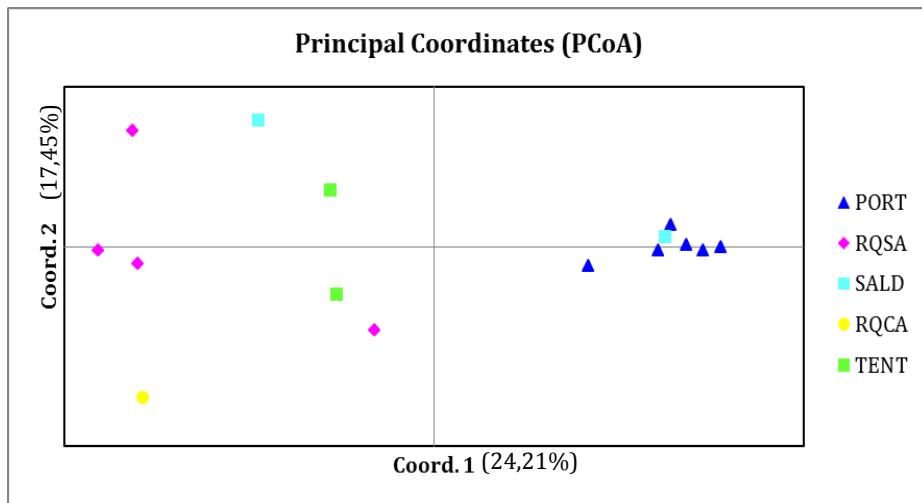


Figura 5.8. Análisis de coordenadas principales para los ejemplares analizados de las poblaciones naturales de *P. hadrosoma*.

### 5.5.4 Fidelidad genética de las plantas obtenidas *in vitro*

Para evaluar las posibles diferencias o similitudes existentes entre los ejemplares de las poblaciones naturales de *P. hadrosoma* y de las plantas obtenidas *in vitro*, se compararon los parámetros descriptores de la estructura genética de los ejemplares naturales con los obtenidos *in vitro*.

Como se observa en la Tabla 5.16, los valores observados en el grupo de plantas obtenido en cultivo fueron algo mayores que los calculados para cada una de sus poblaciones naturales. El número de loci polimórficos fue de 41, lo que equivale al 59,42% y supone un valor bastante superior a los observados en las poblaciones naturales de esta especie.

**Tabla 5.16.** Comparación de los parámetros descriptores de la estructura genética de *P. hadrosoma* con el grupo de plantas obtenidas *in vitro*; *n*: nº muestras; *na*: nº de alelos observado; *ne*: nº efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964); *h*: diversidad genética de Nei.; *I*: índice de Shannon (Lewontin, 1972); *P*: % polimorfismo.

Población	<i>n</i>	<i>na</i>	<i>ne</i>	<i>h</i>	<i>I</i>	Loci polimórficos	<i>P</i>
TENT	2	1,2353	1,1664	0,0975	0,1423	16	23,19
RQSA	4	1,4058	1,1996	0,1259	0,1960	28	40,58
RQCA	1	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0	0
SALD	2	1,1304	1,0922	0,0540	0,0789	9	13,04
PORT	6	1,3478	1,2385	0,1313	0,1924	24	34,78
CULT	10	1,5942	1,4066	0,2263	0,3311	41	59,42
<b>Todas poblaciones</b>	15	1,9420	1,4653	0,2775	0,4263	65	94,20
<b>Promedio</b>	-	1,2856	1,1839	0,1058	0,1568	19,67	28,50



El análisis de coordenadas principales realizado para todos los ejemplares de *P. hadrosoma* analizados, incluyendo las muestras procedentes de cultivo mostró una clara asociación entre ambos tipos de muestras y especialmente con las poblaciones de La Portillada y de El Salado. Se observan también algunos ejemplares más cercanos a los individuos de otras poblaciones, concretamente a un ejemplar de Roque Sardina, a otro de Tenteniguada y a la población de Roque Cayo.

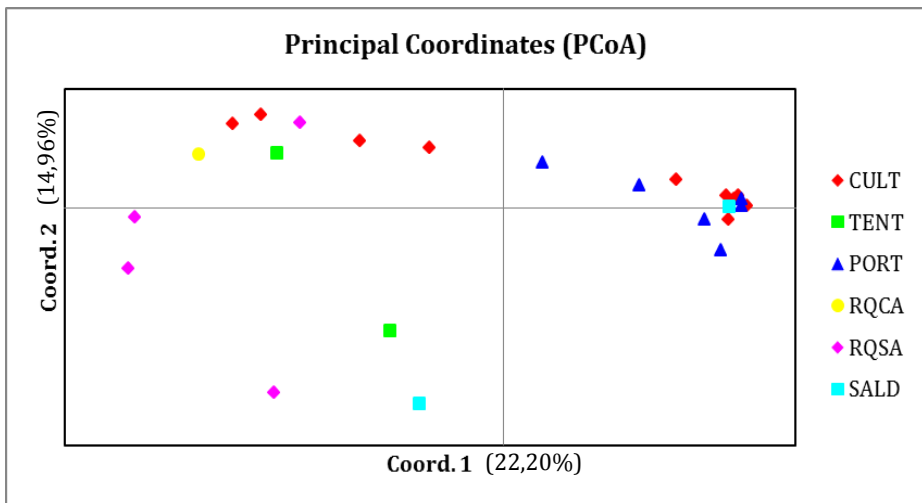


Figura 5.9. Análisis de coordenadas principales para los ejemplares analizados de *P. hadrosoma*, incluyendo las muestras de las plantas obtenidas *in vitro*.

En el análisis detallado de los loci polimórficos observados en el conjunto de todos los individuos analizados, naturales o cultivados, no se observa la presencia de bandas exclusivas en el grupo de plantas obtenidas *in vitro*. Es decir, los diferentes loci polimórficos observados en los ejemplares cultivados fueron observados también en las poblaciones naturales de *P. hadrosoma*. Tan solo se observaron bandas exclusivas en las poblaciones de La Portillada y de Roque Cayo, tal y como se muestra en la Tabla 5.17.

Tabla 5.17. Poblaciones de *P. hadrosoma* en las que se observó la presencia de bandas exclusivas.

Población	Nº de bandas exclusivas	Bandas exclusivas
PORT	1	N2-1100
RQCA	10	K7-750, N2-1050, N6-1650, N2-2300, N15-1325, N2-2000, A4-950, N6-1150, A4-1150, N18-1100

Se observó también la presencia de algunas bandas compartidas exclusivamente entre algunos pares de poblaciones, incluyendo el grupo de ejemplares de cultivo (Tabla 5.18). Estos datos concuerdan con el análisis de coordenadas principales realizado para todas las poblaciones de esta especie y para los ejemplares cultivados. La cercanía de algunos ejemplares de cultivo a las poblaciones de Tenteniguada, Roque Sardina, Roque Cayo, El Salado y La Portillada viene confirmada por la presencia de estas bandas.

Tabla 5.18. Bandas compartidas entre pares de poblaciones de *P. hadrosoma* y el grupo de plantas procedentes de cultivo.

	TENT	RQSA	RQCA	SALD	PORT	CULT
TENT	-	-	-	-	-	N2-900
RQSA		-	N16-1100 K7-850 N16-950	-	-	N16-1000
RQCA			-	-	-	N15-1400 A4-1325 A4-875
SALD				-	-	K7-1850
PORT					-	A4-1100
CULT						-

En la Figura 5.10 se muestra un ejemplo de electroforesis en gel de agarosa para todas las muestras analizadas de *P. hadrosoma*, donde las muestras 11 a 20 corresponden a las plantas obtenidas in vitro. Puede observarse con claridad cómo las muestras 11 a 16 mostraron un patrón de bandas idéntico a las

correspondientes a la población de La Portillada. Sin embargo, las muestras 17 a 20 ofrecen un patrón más cercano al resto de las poblaciones de esta especie.

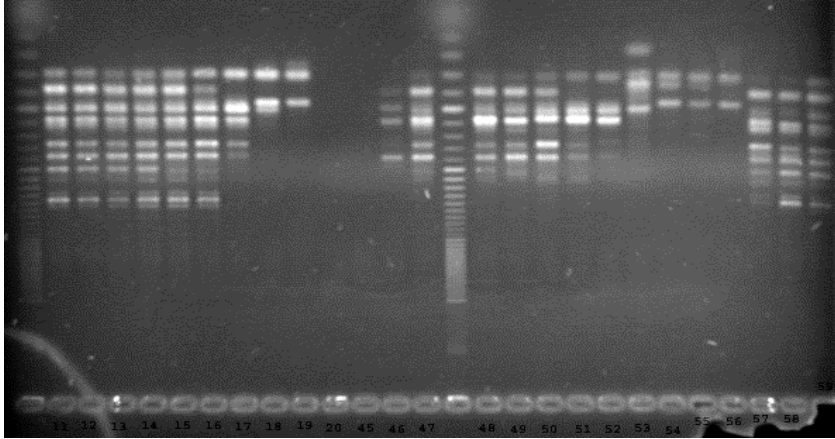


Figura 5.10. Gel de agarosa correspondiente a la electroforesis de los productos de amplificación con el cebador OPK-7 para todas las muestras de *P. hadrosoma*.

## 5.6 Discusión

El análisis de genético realizado de las poblaciones de *P. hadrosoma* muestra niveles de diversidad que pueden considerarse como elevados según los descriptores calculados para la totalidad de las poblaciones: diversidad genética de Nei ( $h = 0,2814$ ), índice de Shannon ( $I = 0,4333$ ) y porcentaje de polimorfismo ( $P = 92,75\%$ ).

Los valores observados para cada población coinciden con el tamaño poblacional de cada una de las poblaciones de esta especie y, salvo para las poblaciones de Tenteniguada y El Salado (dos ejemplares cada una), estos valores se incrementan al aumentar el número de individuos en la población. En el caso de Tenteniguada y El Salado, a pesar de tener el mismo número de ejemplares, los valores de diversidad genética son considerablemente más elevados en Tenteniguada. El valor del índice de Shannon obtenido para la población de Roque Sardina ( $I = 0,1960$ ) es similar al obtenido en el análisis de esta misma especie realizado por Batista y colaboradores (2005) ( $I = 0,1731$ ).

El tamaño poblacional de *P. hadrosoma*, con tan solo 15 ejemplares repartidos en cinco poblaciones, hacía prever unos valores de diversidad genética más reducidos que los obtenidos. Sin embargo, nuestros datos concuerdan con los resultados de otros trabajos de diversidad genética que han utilizado marcadores RAPD en especies canarias endémicas con una distribución restringida y un tamaño poblacional reducido, como es el caso de *Sideritis discolor* (*Labiatae*, Batista et al., 2004), *Isoplexis chalcantha* (*Scrophulariaceae*) y *Dorycnium spectabile* (*Fabaceae*, Bouza et al. 2002) o *Gnaphalium teydeum* (*Asteraceae*, González-Pérez et al., 2008). Estas especies exhibieron porcentajes de polimorfismo superiores al 60%, mientras que para *P. hadrosoma* se alcanzó un valor de 92,75% para todos los ejemplares. No obstante, los valores de cada población analizada por separado son más reducidos, en un rango de 0,00% para

la población de Roque Cayo, con un único ejemplar hasta 40,58% para la población de Roque Sardina, con cuatro ejemplares.

Sin embargo, los índices de diversidad genética estimados para *P. hadrosoma* ofrecen unos resultados algo reducidos en comparación con el grado de polimorfismo mostrado ( $I = 0,4333$ ;  $h = 0,2814$ ). Estos valores son menores que los obtenidos para *Sideritis discolor* ( $I = 1,752$ ), *Isoplexis chalcantha* ( $I = 1,96$ ) y *Dorycnium spectabile* ( $I = 0,96$ ) (Batista *et al.*, 2004; Bouza *et al.*, 2004). Estas diferencias son más notables al comparar los índices obtenidos para cada población por separado, con valores para *P. hadrosoma* en el intervalo de  $I = [0,000 - 0,1924]$ .

En cambio, en el análisis de *Gnaphalium teydeum* sí se observó un porcentaje de polimorfismo elevado ( $P = 75,49$ ), con un valor de diversidad genética reducido ( $h = 0,173$ ) y valores aún menores para cada población ( $h = 0,143$  y  $h = 0,140$ ) (González-Pérez *et al.*, 2008), al igual que para *Kunkeliella subsucculenta* (*Santalaceae*) ( $h = 0,216$ ;  $I = 0,331$ ;  $P = 76,92$ ) (González-Pérez *et al.*, 2013). Estos resultados son muy similares a los observados en *P. hadrosoma*. En la Tabla 5.19 se muestran los valores de diversidad genética obtenidos para *P. hadrosoma* y su comparación con otras especies amenazadas.

**Tabla 5.19. Valores de diversidad genética observados en *P. hadrosoma* y comparación con otras especies amenazadas, obtenidos mediante RAPD. \*Valores para Gran Canaria.**

Especie	<i>h</i>	<i>I</i>	<i>P</i>
<i>Pericallis hadrosoma</i>	0,281	0,433	92,75
<i>Sideritis discolor</i>	-	1,752	98,50
<i>Isoplexis chalcantha</i>	-	1,960	-
<i>Dorycnium spectabile</i>	-	0,960	-
<i>Gnaphalium teydeum</i>	0,173	-	75,49
<i>Atractylis arbuscula</i> *	-	0,169	30,61
<i>Atractylis preauxiana</i> *	-	0,252	52,28
<i>Kunkeliella subsucculenta</i>	0,216	0,331	76,92

El reducido número de ejemplares de *P. hadrosoma* podría estar relacionado con los bajos valores obtenidos de  $h$  y de  $I$ , dado que las poblaciones de mayor tamaño alcanzaron valores algo más elevados:  $h = 0,1259$  para Roque Sardina, con cuatro ejemplares y  $h = 0,1313$  para La Portillada, con seis ejemplares. Las especies endémicas canarias con tamaños poblacionales elevados parecen tener una mayor diversidad genética que las de menor tamaño. No obstante, también se han observado elevados niveles de polimorfismo en especies con poblaciones reducidas (<50), y un reciente meta-análisis ha mostrado que el tamaño poblacional no parece estar relacionado directamente con los niveles de diversidad genética observados en la flora canaria (Pérez de Paz y Caujapé-Castells, 2013). Este resultado coincide con Francisco-Ortega y colaboradores (2000), que compararon los índices de diversidad genética obtenidos mediante análisis isoenzimáticos para diferentes especies canarias (cálculo de  $h$ ), con distintos rangos de tamaño poblacional sin encontrar ninguna relación entre un tamaño poblacional reducido y niveles bajos de diversidad genética. Este fenómeno también ha sido observado más recientemente por otros autores al analizar los niveles de diversidad genética de especies de reducido tamaño poblacional, como es el caso de *Sambucus palmensis* (*Sambucaceae*, Sosa *et al.*, 2010) o *Silene nocteolens* (*Caryophyllaceae*, González González, 2011), entre otras.

Otras especies analizadas muestran valores algo más reducidos, es el caso de *Atractylis arbuscula* (*Asteraceae*) y *Atractylis preauxiana*, con valores promedio de  $P = 30,61$  y de  $I = 0,169$  para Gran Canaria y de  $P = 49,92$  e  $I = 0,265$  para Lanzarote en el caso de *A. arbuscula* (Caujapé-Castells *et al.*, 2008a) y de  $P = 52,28$  e  $I = 0,252$  en Gran Canaria y  $P = 48,12$  e  $I = 0,246$  en Tenerife para *A. preauxiana* (Caujapé-Castells *et al.*, 2008b).

Diferentes autores se han referido a múltiples hipótesis para explicar este grado de diversidad observado en especies canarias. Así, Francisco-Ortega y

colaboradores (2000) plantean la posibilidad de que algunas especies provengan de antiguos linajes que lograron sobrevivir en Canarias a los periodos de glaciaciones y de sequías durante el Mioceno. Además, estos autores señalan como un factor importante a tener en cuenta, la cercanía al continente africano, que incrementaría la probabilidad de que se sucedieran múltiples eventos de introducción de material desde el continente. Este incremento podría aliviar la posibilidad de cuellos de botellas asociados al efecto fundador y traducirse en un aumento en la variabilidad genética (Crawford *et al.*, 2001).

Más recientemente, Caujapé-Castells (2011) propone la teoría del “surfing syngameon”, para explicar cómo ha podido generarse la elevada diversidad observada en Canarias mediante la colonización desde el continente, en dirección este-oeste. Según este modelo, que en ningún caso pretende ser una explicación general de los patrones de diversidad genética en el archipiélago, en muchos linajes vegetales la variabilidad genética estaría determinada (entre otros factores importantes) por la antigüedad de las islas y por la orografía insular, de forma que las poblaciones vegetales endémicas de las islas más antiguas y menos abruptas suelen tener mayor diversidad genética. Así, las islas de Fuerteventura, Lanzarote y Gran Canaria destacarían por sus valores de diversidad elevados.

Panero y colaboradores (1999), no establecen una asociación del género *Pericallis* con los bosques de lauráceas presentes en la flora boerotropical típica del Terciario, lo cual justifican con los siguientes argumentos: la datación de los fósiles de *Asteraceae* (Graham, 1996), las evidencias de que la tribu *Senecioneae* procede del Mioceno temprano desde el pacífico sur (Bremer, 1987) y las filogenias, tanto morfológicas como moleculares, que sugieren un reciente origen para esta tribu (Couper, 1960; Kim *et al.*, 1995). Además, Panero *et al.* 1999 establecen, a partir de estudios filogenéticos basados en secuencias ITS (internal transcribed spacers), el origen monofilético del género *Pericallis*, a la

vez que defienden el origen relativamente reciente de este género. No obstante, de acuerdo con el árbol filogenético presentado por estos autores, el grupo donde se sitúa *P. hadrosoma* ocupa una posición basal, lo que implicaría que, dentro de la filogenia establecida para este género, sería de las especies más antiguas. Así, en este caso, una antigüedad moderada se asociaría a niveles medio-altos de diversidad genética.

Otro factor que podría estar implicado en el grado de diversidad genética de *P. hadrosoma* es el sistema de cruzamiento. En general, se suele admitir que los sistemas de fecundación cruzada promueven el mantenimiento y el incremento en la variabilidad genética, frente a los sistemas de autofecundación. Así, los taxones que son autocompatibles exhiben unos valores de diversidad genética menores, con un mayor aislamiento, que los observados para taxones autoincompatibles o predominantemente xenógamos (Pérez de Paz y Caujapé-Castells, 2013).

Las características bióticas que más significativamente contribuyen a generar los altos índices de diversidad genética detectados en especies canarias están relacionadas con el tipo de cruzamiento (autoincompatibilidad parcial o total) y con un alto número de cromosomas, según un reciente meta-análisis (Pérez de Paz y Caujapé-Castells, 2013). Se ha observado que poblaciones de taxones canarios con un gran número de cromosomas exhiben valores de diversidad genética más elevados (Pérez de Paz y Caujapé-Castells 2013; Pérez de Paz *et al.*, 2007). En consecuencia, el número de cromosomas de *P. hadrosoma* ( $2n = 60$ ) (Ortega, 1980) podría haber contribuido a la diversidad detectada.

Aunque muchas especies de la familia *Asteraceae* son autoincompatibles, no existen estudios de biología reproductiva realizados a *P. hadrosoma* que puedan confirmar este hecho. Además, casi no disponemos de evidencias de que esta especie se haya reproducido de manera sexual en las últimas décadas.



Es muy arriesgado, por tanto, establecer una razón hipótesis para explicar el elevado grado de diversidad genética observado en *P. hadrosoma* en relación a su tamaño poblacional. Tal vez, el hecho de tratarse de una especie rizomatosa, que sobrevive gracias a su reproducción asexual, con la renovación de varas, haya contribuido a mantener los niveles de diversidad genética que pudo albergar en el pasado.

La hibridación entre especies del género *Pericallis* ha sido constatada por Hengstum y colaboradores (2012) tanto por caracteres morfológicos como moleculares. Por ello, es factible pensar que *P. hadrosoma* pueda haberse originado por la hibridación de dos especies parentales.

Las diferencias genéticas observadas entre las poblaciones de *P. hadrosoma* mediante el cálculo de la identidad genética y de la distancia genética de Nei (1978), así como por los valores de  $F_{ST}$  muestran una clara diferenciación entre la población de Roque Cayo y el resto de poblaciones, con valores mucho más elevados a los observados para los pares de otras poblaciones.

Asimismo, el cálculo del flujo génico entre poblaciones ( $Nm$ ) (Tabla 5) resulta en valores superiores a uno sólo para Tenteniguada-Roque Sardina, Tenteniguada-La Portillada y El Salado-La Portillada, lo que significa que hay más de un migrante por generación y se traduce en una baja diferenciación genética. Los valores de la población de Roque Cayo muestran una gran coherencia con los obtenidos de identidad y distancia genética y con los  $F_{ST}$ , ya que se obtuvieron los valores más reducidos de flujo genético, indicativos de la existencia de un cierto aislamiento con respecto a las otras poblaciones.

Algunas relaciones entre pares de poblaciones son coincidentes con la distribución geográfica de éstas, como es el caso de Tenteniguada-Roque Sardina o El Salado-La Portillada, poblaciones muy próximas entre sí. Si bien, todas las poblaciones se sitúan en un rango de distancias inferior a 3500 m, donde la

población de Roque Cayo se encontraría justo en medio, con una distancia además a la población de Roque Sardina de 220 m aproximadamente. En la Tabla 5.20 se ofrecen las distancias geográficas y genéticas entre todas las poblaciones de *P. hadrosoma*.

Tabla 5.20. Distancia geográfica (m) (encima de la diagonal) y distancia genética de Nei (1978) (debajo de la diagonal) entre las poblaciones naturales de *P. hadrosoma*.

	TENT	RQSA	RQCA	SALD	PORT
TENT	-	1343	1560	3280	2500
RQSA	0,1254	-	220	1220	1920
RQCA	0,8545	0,7587	-	1000	980
SALD	0,2524	0,2452	1,1384	-	834
PORT	0,2190	0,2043	0,9518	0,0748	-

En general, el flujo génico entre plantas se hace efectivo mediante la dispersión de semillas y/o de polen por lo que a mayor dispersión, mayor flujo génico. *Pericallis hadrosoma* es una especie de polinización entomófila, con una dispersión de semillas mediante anemocoria. Este hecho, unido a la inexistencia de grandes barreras geográficas entre sus poblaciones, contribuiría a apoyar la hipótesis de la existencia de flujo génico entre las distintas poblaciones, aunque no explicaría el valor de identidad genética observado en la población de Roque Cayo.

En cuanto a la distribución de la variabilidad genética calculada mediante el análisis de la varianza (AMOVA) la existencia de una mayor variación dentro de las poblaciones que entre ellas (69,76% frente al 30,33%, respectivamente), concuerda con los valores observados en otras especies endémicas canarias analizadas: *Myrica rivas-martinezii*, *Sideritis discolor* (Batista *et al.*, 2004), *Dorycnium spectabile*, *Isoplexis chalcantha* (Bouza *et al.*, 2004), *Atractylis arbuscula* (Caujapé-Castells *et al.*, 2008a), entre otras.

La poca diferenciación entre poblaciones es coherente con los resultados del test de neutralidad realizado para las poblaciones de Roque Sardina y La Portillada, ya que todos los loci podían ser considerados como neutrales, lo que implicaría que no están actuando fuerzas selectivas que contribuyan a una divergencia de estas poblaciones.

El análisis de coordenadas principales no separa con claridad las cinco poblaciones consideradas tradicionalmente para *P. hadrosoma*. Sí se observa una relación más estrecha entre determinados grupos de individuos, como la cercanía de los ejemplares de La Portillada con uno de los ejemplares de El Salado. Destaca también la diferenciación de Roque Cayo, que cuenta con un único ejemplar. La población de Roque Sardina ofrece unos resultados similares a los obtenidos por Batista y colaboradores (2005), que consideraron todos los ejemplares de esta población como genotípicamente diferentes.

En cuanto a la fidelidad de las muestras obtenidas a partir del cultivo *in vitro*, no se ha observado la presencia de bandas exclusivas en las muestras analizadas, lo que implicaría que no se han detectado variaciones destacables en estos ejemplares.

La aplicación de este tipo de marcadores (RAPD) a la verificación de la fidelidad genética de las plantas obtenidas *in vitro* ha sido llevada a cabo para múltiples especies en las últimas décadas. En la bibliografía es posible encontrar numerosos ejemplos, tanto de especies en las que se ha concluido la ausencia de variación somaclonal (*Dendrocalamus membranaceus*, Brar *et al.*, 2012; *Pinus thunbergii*, Goto *et al.*, 1998), como de otras en la que se apreciaban cambios en la estructura genética de las plantas obtenidas *in vitro* con respecto al material inicial (*Robinia pseudoacacia*, Bindiya y Kanwar 2008; *Actinidia deliciosa*, Palombi y Damiano 2002).

En general, la mayoría de estos trabajos mide la presencia de bandas exclusivas que aparecen solamente en los ejemplares obtenidos *in vitro*. Dado que en el caso de *P. hadrosoma* no se ha observado la presencia de bandas exclusivas, podría decirse que, se ha mantenido la fidelidad genética de las plantas obtenidas *in vitro* de *P. hadrosoma* con respecto a las poblaciones naturales.

Aunque algunos autores sugieren que el uso de un único marcador podría ser contraproducente a la hora de verificar la existencia de variaciones (Palombi y Damiano 2002), la combinación de técnicas de RAPD con microsatélites (ISSR) ha mostrado resultados diferentes cuando se aplica a distintas especies. Así, Lakshmanan y colaboradores (2007) no encontraron variación en el análisis realizado a *Musa acuminata* var. *nanjanagudu* con la combinación de estos marcadores (RAPD e ISSR), mientras que Palombi y Damiano (2002) detectaron cierta variación (presencia de un fragmento exclusivo en plantas *in vitro*) mediante ISSR, lo cual no fue posible de detectar con RAPD.

### 5.7 Implicaciones para la conservación de *Helianthemum inaguae* y *Pericallis hadrosoma*

La situación actual de *P. hadrosoma* y de *H. inaguae* hace que sea prioritaria la conservación de su hábitat y la ejecución de medidas de conservación. En lo que se refiere a su hábitat, ambas especies se sitúan en espacios protegidos, tanto de la Red Canaria de Espacios Naturales Protegidos como de la Red Natura 2000. Sin embargo, las medidas de protección de su entorno no parecen ser suficientes para promover su recuperación, por lo que se deben centrar también todos los esfuerzos en la adopción de medidas activas de conservación in situ y ex situ.

Los datos de diversidad genética obtenidos para *P. hadrosoma* mediante RAPD, muestran una especie que posee un nivel de diversidad genética relativamente alto en comparación con otras especies, teniendo en cuenta su extremadamente reducido tamaño poblacional.

Se ha observado la diferenciación genética de sus ejemplares, principalmente en la población de Roque Cayo, para cuyo único individuo se identificaron algunos fragmentos de ADN que no parecen estar presentes en las demás poblaciones. Este ejemplar debe ser siempre tenido en cuenta en los trabajos de recolección de material seminal. Dado el reducido número de ejemplares, se recomienda que la recolección de material, ya sea de semillas o de material vegetal, se realice de cada uno de los ejemplares por separado.

Algunos autores sugieren que la translocación de ejemplares entre poblaciones de una misma especie debe ser considerada con mucha precaución debido a la posibilidad de inducir un fenómeno de depresión por endogamia, al cruzar plantas con diferentes adaptaciones a condiciones particulares (Sosa, 2001; Sosa *et al.*, 2010; González Pérez *et al.*, 2013, 2014). En el caso de *P. hadrosoma*, se

recomienda mantener la identidad de cada población por separado. Las labores de reforzamiento deben estar orientadas a incrementar el tamaño poblacional sin que exista mezcla de material entre las mismas.

El plan de recuperación de *P. hadrosoma*, aprobado según el Decreto 329/2011, de 22 de diciembre, plantea la obligación de reforzar todas las poblaciones de esta especie sin que exista mezcla de material entre las mismas. Los resultados de esta tesis concuerdan con las medidas propuestas en este plan de recuperación, basadas principalmente en el reforzamiento de sus poblaciones.

Dada la reducida información disponible sobre su biología, cualquier estrategia de conservación que se desarrolle debe llevar implicada la realización de un estudio de biología reproductiva.

De acuerdo con los resultados obtenidos para las plantas cultivadas *in vitro*, donde parece no existir variación con respecto a las poblaciones naturales, se recomienda la aplicación de estas técnicas para la producción de ejemplares. La fidelidad genética de las plantas obtenidas mediante estas técnicas debe ser siempre asegurada, para lo que se recomienda la aplicación de al menos dos técnicas de análisis genético.

*Helianthemum inague* posee una única población conocida, para la que también se han detectado índices altos de diversidad genética. Esta especie cuenta también con un plan de recuperación que ha sido aprobado mediante el Decreto 330/2011, de 22 de diciembre, cuyas medidas se basan en el reforzamiento de la población y en la protección frente a las amenazas que limitan su recuperación. La ejecución de este plan de recuperación, con el cumplimiento de todos sus objetivos es esencial para la conservación a largo plazo de esta especie.

## Capítulo 6

# Conclusiones





## 6. Conclusiones

### 6.1 Micropropagación de *Helianthemum inaguae* y *Pericallis hadrosoma*

1. La esterilización de las semillas de *H. inaguae* fue efectiva con la aplicación de hipoclorito sódico.
2. La germinación de las semillas mostró resultados más exitosos cuando se combinó la imbibición en agua de las semillas con la escarificación con ácido sulfúrico.
3. Para *P. hadrosoma*, la esterilización de los explantos fue efectiva cuando se aplicó de forma combinada un fungicida de amplio espectro e hipoclorito cálcico. La utilización de hipoclorito sódico se mostró también eficaz, pero provocó el necrosamiento de los tejidos.
4. Tanto el medio MS como el medio MS modificado resultaron adecuados en las etapas de establecimiento, elongación y enraizamiento de ambas especies. Los resultados en la etapa de multiplicación se diferenciaron en función de los reguladores aplicados.
5. Para *H. inaguae*, la utilización de KIN no promovió su multiplicación en los medios ensayados, mientras que la utilización de BA sí promovió la multiplicación, con resultados similares para ambos medios.
6. El medio MS modificado con la adición de BA promovió los valores más elevados de hiperhidricidad, siendo estos más elevados con el cultivo de segmentos nodales.

7. Los mejores valores de multiplicación para *H. inaguae* se obtuvieron en el medio MS modificado con 0,5 mg/l de BA para el cultivo de yemas apicales y con el medio MS con 1 mg/l de BA para el cultivo de segmentos nodales.
8. Para *P. hadrosoma*, la adición de KIN en bajas concentraciones promovió la multiplicación de yemas apicales y de segmentos nodales en ambos medios (MS y MS modificado), siendo más efectivo el cultivo de segmentos nodales.
9. La adición de BA mostró también su eficacia en la multiplicación, tanto de yemas apicales como de segmentos nodales. Si bien, en el medio MS el desarrollo de tejidos hiperhídricos interfiere en el crecimiento y desarrollo de brotes sanos.
10. El medio MS modificado, en combinación con BA, redujo la formación de tejidos con hiperhidricidad. La presencia de KIN en el medio de cultivo promovió el aumento de este fenómeno, principalmente en el cultivo de segmentos nodales.
11. Los mejores valores de multiplicación para esta especie se obtuvieron con el medio MS modificado con concentraciones reducidas de BA (0,5 y 1 mg/l), a partir del cultivo de yemas apicales.
12. Para ambas especie fue necesario realizar una etapa de elongación en un medio sin citoquininas o con una concentración muy reducida de éstas.
13. Para *H. inaguae*, la adición de IBA estimuló la formación de un gran número de raíces sin interferir en su longitud, pero promovió la formación de callo.
14. Los mejores resultados para el enraizamiento de esta especie se obtuvieron en el medio MS modificado sin la adición de reguladores de crecimiento.

15. Para *P. hadrosoma*, la adición de IBA estimuló también la formación de un gran número de raíces, pero redujo además su longitud, a la vez que promovió la formación de callo.
16. Los mejores resultados de enraizamiento se obtuvieron en los medios sin reguladores, tanto MS como MS modificado.
17. La transferencia a las condiciones *ex vitro* fue realizada con éxito, para ambas especies, en condiciones de reducción paulatina de humedad, en una mezcla de tierra, turba y vermiculita en proporción 2:1:1.

## **6.2 Análisis genético de *Helianthemum inaguae* y *Pericallis hadrosoma***

1. Los marcadores moleculares obtenidos para *P. hadrosoma* y *H. inaguae* han permitido evaluar con éxito la diversidad genética de ambas especies.
2. Los descriptores de la diversidad genética para *P. hadrosoma* como taxón muestran valores de variabilidad genética relativamente elevados para tratarse de una especie con un tamaño poblacional extremadamente reducido, de tan solo 15 ejemplares. Sin embargo, la diversidad genética para cada población es más reducida. Este contraste delata que *P. hadrosoma* ha podido mantener niveles de moderados-altos de diversidad genética a pesar de los factores que podrían haber actuado para reducirla, especialmente su relativa antigüedad y la exigüidad y confinamiento de sus poblaciones.
3. Todas las poblaciones de *P. hadrosoma* están formadas por individuos genéticamente diferenciados, por lo que las estrategias de conservación que se diseñen deben orientarse a facilitar la conservación de los núcleos poblacionales existentes.

4. Los índices de diferenciación genética entre las poblaciones de *P. hadrosoma* exhiben valores que indican la existencia de flujo génico entre las mismas, a excepción de la población de Roque Cayo. Por lo tanto, cualquier estrategia de conservación debería facilitar el flujo genético entre ellos mediante la actuación de sus vectores naturales de polinización y de dispersión.
5. Los descriptores de la diversidad genética para *H. inaguae* muestran también una diversidad genética relativamente elevada para tratarse de una especie rara. Aunque en este caso no podemos hipotetizar la antigüedad relativa dentro de su linaje por carecer de datos filogenéticos. Se han obtenido valores de diversidad genética muy similares a los reportados para otras especies endémicas de Canarias del género *Helianthemum*.
6. Se ha observado una alta tasa de fidelidad genética entre las plantas obtenidas *in vitro* y las procedentes de las poblaciones naturales tanto para *P. hadrosoma* como para *H. inaguae*. Estas técnicas pueden ser empleadas en la multiplicación de esta especie, siempre que se verifique la inexistencia de variación en las plantas multiplicadas.

## Bibliografía



## **7. Bibliografía**

- Al Khateeb W, Bahar E, Lahham J, Schroeder D and Hussein E. 2013. Regeneration and assessment of genetic fidelity of the endangered tree *Moringa peregrina* (Forsk.) Fiori using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19 (1): 157–164.
- Almeida Pérez RS, Marrero A, Navarro B y López González R. 2003. Aportaciones a la corología de varias especies relicticas de Gran Canaria, Islas Canarias. *Botánica Macaronésica* 24: 183-205.
- Bajaj YPS, Furmanova M, Olszowska O. 1988. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj YPS (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 4. Medicinal and Aromatic Plants 1*. Springer, Berlin Heidelberg, New York. pp. 60-103.
- Baldi A and Dixit VK. 2008. Enhanced artemisinin production by cell cultures of *Artemisia annua*. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, Vol. 2*: 341-348.
- Batista F, Bouza N, González-Pérez MA, Sosa PA. 2004. High levels of genetic variation detected within and between populations of two endangered endemic species of the laurel forest from the Canary Islands, *Myrica rivasmartinezii* (*Myricaceae*) and *Sideritis discolor* (*Lamiaceae*) *Australian Journal of Botany* 52: 471–480.
- Batista Hernández FJ, González Pérez MA, Polifrone M, Redondo Prat A, Rivero Santana E y Sosa Henríquez P. 2005. Estudio genético del estatus taxonómico o poblacional de diversos taxones de plantas vasculares del archipiélago canario (BIOTA-GENES). Departamento de Biología. ULPGC. Memoria final no publicada. 110 pp.

- Batista Hernández FJ, González Pérez MA, Polifrone M, Redondo Prat A, Rivero Santana E, y Sosa Henríquez P. 2005. Estudio genético del estatus taxonómico o poblacional de diversos taxones de plantas vasculares del archipiélago canario (BIOTA-GENES). Departamento de Biología. ULPGC. Memoria final no publicada. 110 pp.
- Beauchesne G. 1981. Les milieux minéraux utilisés en culture et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique. Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France 67: 1389-1397.
- Benson EE, Danaher JE, Pimbley IM, Anderson CT, Wake JE, Daley S and Adams LK. 2000. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. Biodiversity & Conservation 9: 711-726.
- Bindiya K and Kanwar K. 2003. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Robinia pseudoacacia* L. Euphytica, 135, 41-47.
- Bonilla Perdomo C y Santana López I. 2005. *Helianthemum inaguae* Marrero Rodr., González-Martín & González-Artiles. Gran Canaria. Seguimiento de poblaciones de Especies Amenazadas 2005. Gobierno de Canarias. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial. Documento interno inédito.
- Boscherini G, Morgante M, Rossi P and Vendramin GG. 1994. Allozyme and chloroplast DNA variation in Italian and Greek populations of *Pinus leucodermis*. Heredity 73: 284-290.
- Bosela MJ and Michler CH. 2008. Media effects on black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth in vitro: evaluation of multiple nutrient and cytokinin types. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 44: 316-329.



- Bouza N, Caujapé-Castells J, González Pérez MA, Batista F and Sosa P. 2002. Population structure and genetic diversity of two endangered endemic species of the Canarian laurel forest: *Dorycnium spectabile* (Fabaceae) and *Isoplexis chalcantha* (Scrophulariaceae). *International Journal of Plant Science* 163, 619–630.
- Bremer K. 1987. Tribal interrelationships of the *Asteraceae*. *Cladistics* 3: 210-253.
- Cabrera García N, Caccarani Rosas M, Oliva-Tejera F, Navarro Déniz J y Caujapé-Castells J. 2005. Memoria Final para Biota-Genes. Laboratorio de Biodiversidad Molecular. Jardín Botánico “Viera & Clavijo”. Informe Técnico, pp. 82-88 (documento interno).
- Cabrera Pérez MA. 1995. Explant establishment in the micropropagation of *Globularia ascanii*, a threatened species from Gran Canaria. *Botanical Garden Micropropagation News* 1 (8): 111-113.
- Caujapé-Castells J 2006. *Brújula para Bótanicos Desorientados en la Genética de Poblaciones*. Exegen Ediciones. Gran Canaria, España.
- Caujapé-Castells J, Castellano JJ, Ramos R, Henríquez V, Sabbagh I, Quintana-Trujillo FM and Rodríguez JF. 2013. Transformer-4 version 2.0.1, a free multi-platform software to quickly reformat genotype matrices of any marker type, and archive them in the Demiurge information system. *Molecular Ecology Resources* 13: 484-493
- Caujapé-Castells J, Jaén Molina R y Cabrera-García N. 2006. El Banco de ADN de La Flora Canaria: Creación, Progresos y Líneas Futuras de Desarrollo. *Botánica Macaronésica* 26, 3–16.

- Caujapé-Castells J, Jaén-Molina R y Cabrera N. 2011. Manual del Banco de ADN de la Flora Canaria. Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN, Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-Unidad Asociada- CSIC, Cabildo de Gran Canaria.
- Caujapé-Castells J, Marrero-Rodríguez Á, Baccarani-Rosas M, Cabrera-García N and Vilches-Navarrete B. 2008a. Population genetics of the endangered Canarian endemic *Atractylis arbuscula* (Asteraceae): implications for taxonomy and conservation. *Plant Systematics and Evolution* 274: 99–109.
- Caujapé-Castells J, Naranjo Suárez J, Santana I, Baccarani Rosas M, Cabrera García N, Marrero M, Carqué E and Mesa R. 2008b. Population genetic suggestions to offset the extinction ratchet in the endangered Canarian endemic *Atractylis preauxiana* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 273: 191-199.
- Caujapé-Castells J. 2011. Jesters, red queens, boomerangs and surfers: a molecular outlook on the Canarian endemic flora. In: *The Biology of Islands Floras*, Chap.12. Bramwell D & Caujapé-Castells J (eds.) Cambridge University Press, UK, pp. 284-324.
- Clemente M, Contreras P, Susín J and Pliego-Alfaro F. 1991. Micropropagation of *Artemisia granatesnsis*. *Hort Science* 26: 420.
- Coelho N, Gonçalves S, González Benito ME, and Romano A. 2012. Establishment of an in vitro propagation protocol for *Thymus lotocephalus*, a rare aromatic species of the Algarve (Portugal). *Plant Growth Regulation* 66: 69-74.
- Conger BV. 1987. Cloning agriculture plants via in vitro techniques. CRC Press. Florida USA.

Convenio de Berna para la protección de la fauna silvestre y los hábitats naturales en Europa de 1979, tratado negociado en el marco del Consejo de Europa. Firmado por la Comunidad el 19 de septiembre, aprobado por Decisión del Consejo 82/72, de 3 de diciembre de 1981, y entró en vigor el 1 de septiembre del año 82. DOCE L número 38, de 10 de febrero de 1982.

Convenio de Bonn de 1979 relativo a la conservación de las especies migratorias de fauna silvestre. Celebrado por medio de Decisión del Consejo 82/461, de 24 de junio de 1982 y entró en vigor en la UE el 1 de noviembre de 1983. DOCE L número 38, de 10 de febrero de 1982.

Convenio de Río de Janeiro sobre Diversidad Biológica de 1992. Celebrado por medio de Decisión del Consejo 93/626/CEE, de 25 de octubre de 1993 y entró en vigor en la Comunidad el 21 de marzo de 1994. DOCE L número 309, de 13 de diciembre de 1993.

Corral P, Mallón R, Rodríguez Oubiniña J, González ML. 2011. Multiple shoot induction and plant regeneration of the endangered species *Crepis novoana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 211–217.

Couper RA. 1960. New Zealand Mesozoic and Cainozoic plant microfossils. *New Zealand Geological Survey Palaeontological Bulletin* 32: 1-87.

Crawford DJ, Ruiz E, Stuessy TF, Tepe E, Aqueveque P, González F, Jensen RJ, Anderson GJ, Bernardello G, Baeza CM, Swenson U and Silva M. 2001. Allozyme Diversity in Endemic Flowering Plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: Ecological and Historical Factors with Implications for Conservation. *American Journal of Botany* 88(12): 2195–2203.

- Cuenca S, Amo Marco JB and Parra R. 1999. Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk. (*Compositae*). *Plant Cell Reports* 18: 674–679.
- De Fossard RA. 1976. Tissue culture for plant propagation. Armidale: University of New England; 1976.
- De Proft MP, van den Broek G, de Greef JA. 1987. Involvement of ethylene on senescence and vitrification of in vitro cultured miniroses. *Acta Horticulturae* 212: 217-222.
- De Vicente MC, López C y Fulton T. (eds.). 2004. Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares: Módulo de Aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia.
- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M. 1992. Reconsideration of the term “vitrification” as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 135-140.
- Debergh PC and Maene L. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture, *Scientia Horticulturae* 14: 335-345.
- Debergh PC and Read PE. 1991. Micropropagation in *Micropropagation: Technology and Application*. Debergh P.C. y Zimmerman R.H. (Eds.) Dordrecht: Kluwer Academic. Pp. 31-44.
- Debergh PC, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, von Arnold S, Zimmerman R and Ziv M. 1992. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 165-140.

- Debergh PC, Harbaoui Y and Lemeur R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiologia Plantarum* 53: 181-187.
- Debergh PC. 1983. Effect of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum* 59: 270-276.
- Decreto 151/2001, de 23 de julio, por el que se crea el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias. BOC nº 97, de 1 de agosto de 2001.
- Dillen W and Buysens SA. 1989. Simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 181-188.
- Directiva 2009/147/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 relativa a la conservación de las aves silvestres. DO L20/7 de 26.1.2010.
- Directiva 92/43/CEE del Consejo de 21 de mayo de 1992 relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres. DO L 206 de 22.7.1992, p.7.
- Directiva del Consejo de 2 de abril de 1979 relativa a la conservación de las aves silvestres (79/409/CEE). DO L 103 de 25.4.1971, p. 1.
- Dixon RA (ed.) 1985. *Plant cell culture: A practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Doyle JJ, and Doyle JL. 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America* 19: 11-15.

- Dracaena Consultoría Ambiental. 2014. Informe Post-Life del seguimiento de especies vegetales amenazadas de la Reserva Natural Integral de Inagua 2014. Informe LIFE07 NAT/E/000759; Cabildo de Gran Canaria.
- Ellstrand NC and Elam DR. 1993. Population genetic consequences of small population size. Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 24: 217–242.
- Excoffier L, Laval G and Schneider S. 2005. ARLEQUIN. Ver. 3.0. An integrated software package for population genetic data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Excoffier, L, Smouse, PE and Quattro JM. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491. Gower, 1966
- Falk DA and Holsinger K. 1991. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York.
- Fay M. 1992. Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 28: 1-4.
- Ferrero García, J. 2012. Contribución de Graells a la posición de España en el primer convenio internacional para la protección de ciertas especies de la fauna silvestre (1902). *Graellsia*, 68 (2): 347-352.
- Fierro Fierro F. 2014. Electroforesis de ADN. En Cornejo Romero A, Serrato Díaz A, Rendón B, Aguilar y Rocha Munive MG (coords.). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 27-52). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapapapa (UAM-I).

- Frankham R, Ballou JD and Briscoe DA. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge: Cambridge University Press.
- Frankham, R. 2010. Where are we in conservation genetics and where do we need to go? *Conservation Genetic* 11: 661–663.
- Franks, SJ. 2010. Population genetics of island and coastal dune plants. *Journal of Plant Biology*. 2: 481-488.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Gamborg OL. 1970. The effects of amino acids and ammonium on growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiology* 45: 598-600.
- Gaspar Th, Kevers C, Debergh P, Maene L, Pâques M, Boxus PH. 1987. Vitrification : morphological, physiological and ecological aspects. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol. 1. General Principles and Biotechnology. Eds. J.M. Bonga, D.J. Durzan, Martinus Nijhoff, Dordrecht, 152-166.
- Gaspar Th, Kevers C, Hausman JF 1997. Indissociable chief factors in the inductive phase adventitious rooting. In: Altman A, Waisel Y ed. *Biology of root formation and development*. New York, Plenum Press. Pp. 55-63.
- GENMEDOC 2006. Prácticas de germinación en los bancos de semillas de la red GENMEDOC. Memoria julio 2004-mayo 2006. [www.genmedoc.org](http://www.genmedoc.org).
- George EF and De Klerk GJ. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients in George EFE, Hall MA and De Klerk GJ. 2008. *Plant Propagation by Tissue Cultures* (edn 3) pp 65-114.

George EF and Debergh PC. 2008. Micropropagation: uses and methods in George EFE, Hall MA and De Klerk GJ. 2008. Plant Propagation by Tissue Cultures (edn 3) pp 29-64.

George EF. 1993. Plant propagation and micropropagation. In Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The technology. Ed. Exegenetics Ltd., Edington, Wilts. England. pp. 37-66.

Gesplán. 2011. Informe del seguimiento de especies vegetales amenazadas de la Reserva Natural Integral de Inagua 2009-2011. Informe LIFE07 NAT/E/000759; Cabildo de Gran Canaria.

Gonçalves S and Romano A. 2005. Micropropagation of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link. an endangered West Mediterranean endemic insectivorous plant. Biodiversity & Conservation 14: 1071-1081.

Gonçalves S, Fernandez L and Romano A. 2010. High-frequency in vitro propagation of the endangered species *Tuberaria major*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 101: 359-363.

Gonzalez Alemán C, Ortega González C y Rubio Hernández AM. 1986. et al. 1988. Propagación in vitro de endemismos canarios en peligro de extinción: *Euphorbia handiense* Burchd. Botánica Macaronésica 16: 15-28.

González Benito ME and Martín C. 2011. In vitro preservation of Spanish biodiversity. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 47: 46-54.

González González EA. 2011. Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* (*Aquifoliaceae*), *Silene nocteolens* (*Caryophyllaceae*) y *Sorbus aria* (*Rosaceae*). Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.



- González MA, Batista F and Sosa P. 2013. Conservation genetics in two endangered endemics from the Canary Islands, *Helianthemum gonzalezferreri* Marrero (*Cistaceae*) and *Kunkeliella subsucculenta* Kämmer (*Santalaceae*): different life histories that involve different management strategies. *Plant Systematics and Evolution* Vol. 299, 10: 1981-1990.
- González Pérez MA, Lledó MD, Lexer C, Fay M, Marrero M, Bañares-Baudet A, Carqué E. and Sosa P. 2009. Genetic diversity and differentiation in natural and reintroduced populations of *Bencomia exstipulata* and comparisons with *B. caudata* (*Rosaceae*) in the Canary Islands: an analysis using microsatellites. *Botanical Journal of the Linnean Society* 150: 429–441.
- González Pérez MA, Polifrone M, Marrero-Gómez M, Bañares A and Sosa P. 2015. Are genetic data relevant in the conservation of species in imminent danger? The case of a critically endangered endemism from Canary Islands *Helianthemum juliae* Wildpret (*Cistaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 301: 1807-1818.
- González Pérez MA, Sosa P, González González EA, Bañares A, Marrero M, Carqué E and Polifrone M. 2008 *Gnaphalium teydeum* and *Gnaphalium luteoalbum*: two taxa of the Canary Islands with different genetic histories. *Plant Systematics and Evolution* 276: 39-49.
- González Pérez MA, Sosa PA and Batista F. 2009b. Genetic Variation and Conservation of Endangered Endemic *Anagyris latifolia* Brouss. Ex Willd. (*Leguminosae*) from the Canary Islands. *Plant Systematics and Evolution* 279: 59-68.
- Graham A. 1996. In *Compositae: Systematics*, Proceedings of the International Compositae Conference, eds. Hind DJN and Beentje HJ. Royal Botanic Gardens Kew, UK. 1: 123-140.

- Hakkaart FA and Versluijs JM (1983). Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 89: 7-53.
- Hamrick JL. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. *In*: Schonewald-Cox CM, Chambers SM, MacBryde B and Thomas WL (eds) *Genetics and conservation*. Benjamin-Cummings, Menlo Park, pp 335–348.
- Hedrick P and Ritland K. 1990. Gamete disequilibrium and multilocus estimation of selfing rates. *Heredity* 65: 343-347.
- Heller R. 1954. Les besoins minéraux des tissus en culture. *L'Année Biologique*. 30: 260-281.
- Heller R. 1955. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Thèse, Paris et *Annales des Sciences Naturelles (Bot. Biol. Veg.)* Paris 14, 1-223.
- Hengstum T, Lachmuth S, Oostermeijer JGB, Den Nijs JCM, Meirmans PG and Tienderen PH. 2012. Human-induced hybridization among congeneric endemic plants on Tenerife, Canary Islands. *Plant Systematics and Evolution* 298: 1119-1131.
- Hernández García M. 2011. *Pericallis hadrosoma* (Svent.) B. Nord. Gran Canaria. Seguimiento de poblaciones de Especies Amenazadas 20011. Gobierno de Canarias. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial. Documento interno inédito.
- Holsinger KE and Gottlieb LD. 1991. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. *In*: *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Falk DA, Holsinger KE (eds), Oxford University Press: New York, pp 195–208.

- Howell SH, Lall S and Che P. 2003. Cytokinins and shoot development. Trends in Plant Science 8: 453-459.
- Instrumento de ratificación del Convenio relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural en Europa, hecho en Berna el 19 de septiembre de 1979 (BOE nº 235, de 1 de octubre de 1986).
- Iriondo JM, Prieto C and Pérez García F. 1995 In vitro regeneration of *Helianthemum polygonoides* Peinado *et al.*, an endangered salt meadow species. Botanical Gardens Micropropagation News, Vol 2 Part 1.
- Ivanova M, and van Staden J. 2008. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of in vitro regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 92: 227-231.
- Ivanova M, Novák O, Strnad M, van Staden J. 2006. Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured in vitro in relation of hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. Plant Growth Regulation 50: 219-230.
- Jain S. M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118 (2): 153-166.
- Kim KJ and RK Jansen. 1995. ndhF sequence evolution and the major clades in the sunflower family. Proceedings of the National Academy of Science USA 92: 10379-10383.
- Kimura M and Crow JF. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics 49: 725-738.
- Kozai T, Kubota C and Jeong BR. (1997), Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51, 49-56.

- Krikorian AD. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. p. 65
- Kunkel G. 1977. Inventario de las plantas vasculares endémicas de la provincia de Las Palmas. Ministerio de Agricultura, ICONA. Monografías 15. 436 pp. Madrid.
- Label P, Maldiney R, Sossountzov L, Cornu D and Migianic E. 1988. Endogenous levels of abscisic acid, indole-3-acetic acid and benzyladenine during in vitro bud growth induction of wild cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Growth Regulation* 7:171–180.
- Lakshmanan V, Venkataramareddy SR and Neelwarne B. 2007. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 10: 106-113.
- Lande R. 1998. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241: 1455-1460.
- Leshem B, Shaley DP and Izhar S. 1988. Cytokinin as an inducer of vitrification in melón. *Annals of Botany* 61: 225-260.
- Ley 33/2015, de 21 de septiembre, por la que se modifica la Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad. BOE nº 227, de 22 de septiembre de 2015.
- Ley 4/1989, de 27 de marzo, de Conservación de los Espacios Naturales y de la Flora y Fauna Silvestres. BOE nº 74, de 28 de marzo de 1989.

Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad.  
BOE nº 229, de 14 de diciembre de 2007.

Lowe AJ, Hanotte O and Guarini L. 1996. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resource Newsletter* 107: 50-54.

Mallón Moure R. 2008. Aplicación de técnicas biotecnológicas a la conservación de germoplasma de especies de interés conservacionista: *Splachnum ampullaceum* Hedw. y *Centaurea ultreiae* Silva Pando. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela.

Mallón R and Rodríguez Oubiña J. 2010. In vitro propagation of the endangered plant *Centaurea ultreiae*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 101: 31-39.

Marrero A, González A y Vilches B. 2004. *Helianthemum inaguae* Marrero Rodr., González-Martín & González-Artiles. In: Bañares A, Blanca G, Güemes J, Moreno JC y Ortiz S, eds. 2004. *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid.

Marrero Gómez M, Gerard B, Oostermeijer J, Carqué Álamo E and Bañares Baudet Á. 2007. Population viability of the narrow endemic *Helianthemum juliae* (Cistaceae) in relation to climate variability. *Biological Conservation* 1 (36): 552-562.

- Marrero Rodríguez A, González Martín M y González Artiles F. 1995. Descripción de una nueva especie de *Helianthemum* Miller para Gran Canaria, Islas Canarias. *Botánica Macaronásica* 22: 3 – 12.
- Martin KP, Pachathundikandi SK, Zhang CL, Slater A and Madassery J. 2006. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande Naine and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 42: 188–192.
- Mederos Molina S. 2002. In vitro propagation of *Maytenus canariensis* (Loesl.) Kunk. & Sund from apical meristem culture. *Plant Tissue Culture* 12: 99-108.
- Mederos Molina S. 2006. Micropropagation of *Salvia broussonetti* Benth., a medicinal plant species. *Plant Tissue Culture & Biothenology* 16: 19-23.
- Mederos Molina S. 2008. Micropropagation of *Isoplexis chalcantha* Svent. O'Shanahan from mature plants. *Plant Tissue Culture & Biothenology* 18: 131-137.
- Mohammad F, Alatar AA, Ahmad N, Anis M and Hegazy AK. 2012. An Efficient and Reproducible Method for in vitro Clonal Multiplication of *Rauvolfia tetraphylla* L. and Evaluation of Genetic Stability using DNA-Based Markers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168:1739–1752.
- MORENO JC. 2011. Lista Roja de la Flora Vasculare Española 2008. Actualización con los datos del Adenda 2010 al Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada. Dirección General de Conservación de la Naturaleza y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. Madrid. 46 pp.
- Moreno S, Gorgoncena Y and Ortiz JM. 1997. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae* 62: 237-243.

- Moreno Vázquez S. 2001. Análisis de resultados en la caracterización molecular. In: Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. González Andrés F y Pita Villamil. Publicaciones I.N.E.A. 279 pp.
- Morte MA and Honrubia M. 1992. In vitro propagation of *Helianthemum almeriense* Pau (Cistaceae). *Agronomie* 12: 807-809.
- Mucciarelli M, Ferrazzini D and Belletti P. 2014. Genetic variability and population divergence in the rare *Fritillaria tubiformis* ssp. *moggridgei* Rix (Liliaceae) as revealed by RAPD analysis. *PLOS ONE* 9: 1-8.
- Munthali M, Ford-Lloyd BV and Newbury HJ. 1992, The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR Methods and Applications* 1 (4): 274-276.
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166.
- Nehra NS, Chibber RN, Kartha KK, Datla RSS, Crosby WL and Stushnoff C. 1990. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system *Plant Cell Reports* 9: 293–298.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583–590.
- Nei, M. 1972. Genetic Distance between Populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nordenstam B. 1978. Taxonomic studies in the tribe Senecioneae (*Compositae*) *Opera Botanica* 44: 1-84.

- Noro Y, Takano-Shimizu T, Syono S, Kishima Y and Sano Y. 2007. Genetic variations in rice in vitro cultures at the EPSPs-PS20 region. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 705–711.
- Orden de 20 de febrero de 1991, de la Consejería de Política Territorial, sobre protección de especies de la flora vascular silvestre de la Comunidad Autónoma de Canarias. BOC nº 35, de 18 de marzo de 1991.
- Ortega C y González C. 1990. *Senecio hadrosomus*: cultivos *in vitro* y reintroducción en su hábitat natural. In Hernández-Bermejo J. E.; Clemente M.; Heywood V. (eds) *Conservation techniques in botanic gardens*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, pp 161– 162.
- Ortega González C y González Alemán C. 1985. Contribución a la conservación *ex situ* de especies canarias en peligro: propagación *in vitro* de *Senecio hermosae* Pitard. *Botánica Macaronésica* 14: 59-72.
- Ortega González C. 1982. Micropropagación de *Lotus berthelotii* Masf. (*Leguminosae*), un endemismo canario en peligro de extinción. *Botánica Macaronesia* 10: 19–25
- Ortega J. 1980. Estudios en la flora Macaronésica: algunos números de cromosomas IV. *Botánica Macaronésica* 7: 43-51.
- Ozias-Akins P and Vasil IK. (1983). Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* L. (wheat). *Protoplasma* 117: 40-44.
- Paek K-Y and Hahn EJ. 2000. Cytokinins, auxins and activated charcoal affected organogenesis and anatomical characteristics of shoottip cultures of *Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (raf.) Shinn]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 36: 128–132



- Palmer JD, Jansen RK, Michaels H and Chase WW. 1988. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation. *Annals of Missouri Botanical Garden* 75: 1180-1218.
- Palombi MA and Damiano C. 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) *Plant Cell Reports*. 20: 1061-1066.
- Panero JL, Francisco-Ortega J, Jansen RK and Santos-Guerra A. 1999. Molecular evidence for multiple origins of woodiness and a New World biogeographic connection of the Macaronesian Island endemic *Pericallis* (*Asteraceae*: Senecioneae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(24): 13886–13891.
- Patiño Torres, C. 2010. Producción in vitro de pectinasas por *Colletotrichum acutatum*. *Acta Agronómica* 59: 80-90
- Peakall R and Smouse PE. 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pérez de Paz J and Caujapé-Castells J. 2013. A review of the allozyme data set for the Canarian endemic flora: causes of the high genetic diversity levels and implications for conservation. *Annals of Botany* 1-15.
- Pérez de Paz J, Fernández-Palacios O, Caujapé-Castells J, Olangua-Corral M y Febles R. 2007. Biología reproductiva, filogenia, diversidad genética y poblaciones naturales en las islas Canarias y situaciones continentales. Tenerife: III Congreso de Biología de la Conservación de Plantas, 88–90.
- Perez francés JF, Santana López I, Suárez Toste E, Martín Pérez R, Cabrera Pérez MA, Luis Jorge JC y Valdés González F. 2009. Aplicación del cultivo *in vitro* a la

- conservación de plantas canarias en peligro. In Monografías LXXVIII: Homenaje al Prof. Dr. Wildpret de la Torre. Instituto de Estudios Canarios. Ed. E. Beltrán Tejera, J. Alfonso Carrillo, A. García Gallo y O. Rodríguez Delgado. La Laguna. Tenerife, Islas Canarias.
- Pierik RLM. 1997. In vitro culture of higher plants. Dordrecht, Kluwer. 364 p.
- Pollard JW and Walker JM. 1990. Plant Cell and Tissue Culture. The Humana Press Inc. (Eds). Clifton, New Jersey.
- Rao VR and Hodgkin T. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68: 1-19.
- Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. BOE nº 46, de 23 de febrero de 2011.
- Real Decreto 1997/1995, de 7 de diciembre, por el que se establece medidas para contribuir a garantizar la biodiversidad mediante la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres (BOE nº 310, de 28 de diciembre de 1995,
- Riera Cillanueva R. 2005. *Pericallis hadrosoma* (Svent.) B. Nord. Gran Canaria. Seguimiento de poblaciones de Especies Amenazadas 2005. Gobierno de Canarias. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial. Documento interno inédito.
- Riera Cillanueva R. 2007. *Pericallis hadrosoma* (Svent.) B. Nord. Gran Canaria. Seguimiento de poblaciones de Especies Amenazadas 2007. Gobierno de Canarias. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial. Documento interno inédito.

- Roca MW y Mroginski LA. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. p. 542 -575.
- Sahijram L, Soneyi JR, Bollamma KT. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa spp.*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 39: 551–556.
- Sánchez-Teyer LF, Quiróz-Figueroa F, Loyola-Vargas V and Infante D. 2003. Culture-induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. *Molecular Biotechnology* 23: 107–115.
- Santana López I y Hernández García M. 2008. Seguimiento de poblaciones vegetales catalogadas en la zona de afección. Gobierno de Canarias. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial y Cabildo de Gran Canaria. Documento interno inédito.
- Santana López I y Naranjo Suárez J. 2007. *Helianthemum inaguae* Marrero Rodr., González-Martín & González-Artiles. Gran Canaria. Seguimiento de poblaciones de Especies Amenazadas 2007. Gobierno de Canarias. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial. Documento interno inédito.
- Santana López I, Luis JC, Ravelo Arma M and Valdés González. 2004. In vitro propagation of *Helianthemum bystropogophyllum* Svent., a rare and endangered species from Gran Canaria (Canary Islands). *Botánica Macaronésica* 25: 71-77.
- Santana López I, Valdés González F and Luis JC. 2006. Micropropagation of *Helianthemum inaguae*, a rare and endangered species from the Canary Islands. *Botánica Macaronésica* 26: 55-64.

- Saturno Hernández O. (2009) Redacción del proyecto de restauración y recuperación y toma de datos de especies endémicas en peligro crítico (CR) afectadas por el incendio de julio de 2007. Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”, informe interno. Cabildo de Gran Canaria.
- Schenk RU and Hildebrandt AC. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- Senapati S, Aparajita S, Rout GR. 2013. Micropropagation and assessment of genetic stability in *Celastrus paniculatus*: an endangered medicinal plant. *Biologia*. 68(4): 627–632.
- Serrano Martínez F, Cano Castillo M and Casas JL. 2012. In vitro propagation of *Helianthemum marminorense*. *Journal of Plant Biochemistry. Biotechnology* 21 (2): 300-304.
- Shannon CE and Weaver W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, London and New York.
- Sharma SK, Bryan GJ, WinWeld MO and Millam S. 2007. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta* 226: 1449–1458.
- Sosa P, Batista F, González MA y Bouza N. 2002. La Conservación Genética de las Especies Amenazadas. En: Bañares, Á. (ed.). *Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de diagnóstico del estado de conservación*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. España, pp. 133-160.

- Sosa PA, González-Pérez MA, Moreno C and Clarke JB. 2010. Conservation of the Endangered Endemic *Sambucus palmensis* Link (*Sambucaceae*) from the Canary Islands. *Conservation Genetics* 11: 2357-2368.
- Sosa PA. 2001. Genes, Poblaciones y Especies. En: Martín-Esquivel J and Fernández-Palacios JM (eds.). *Naturaleza de Canarias*. Publicaciones Turquesa. Tenerife, España, pp. 151-155.
- Suarez Rodríguez C. 1982. Aportaciones a la distribución y ecología de *Senecio appendiculatus* (L. fil) var. *preauxiana* Sch. Bip. y *Senecio hadrosomus* Svent. en Gran Canaria. *Botánica Macaronésica* 10: 85-92.
- Sventenius ERS. 1950. *Specilegium Canariense I*. Boletín del Instituto Nacional de Investigación Agronómica, Madrid. 22: 1-8.
- Swenson U and Manns U. 2003. Phylogeny of *Pericallis* (Asteraceae): a total evidence approach reappraising the double origin of woodiness. *Taxon* 52: 533-546.
- Tacoronte Z, Pérez-Francés JF, Suárez E y Valdés F. 2008. Establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Bencomia extipulata*, planta endémica de las Islas Canarias en peligro de extinción (Magnoliopsidad, Rosaceae). *Vieraea* 36: 73-79.
- Vidalie H. 1986. Cultivo *in vitro*. Ed. Científica, S.A de C.V. México, D.F. pp:1-138.
- Vieitez AM, San José MC and Vieitez E. 1985. In vitro plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. *J. Horticultural Science* 60: 99-106; 1985.

- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.
- Wright S. 1951. The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH and Mao JX. 1999. POPGENE 3.2, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta. Alberta, Canadá.
- Ziv M, 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: *Micropropagation Technology and Applications*. Eds. Debergh PC and Zimmerman RH. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 45-69.
- Ziv M, Meir G and Halevy AH. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2: 55-65.

Anexo

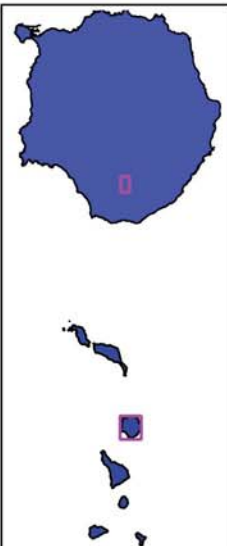
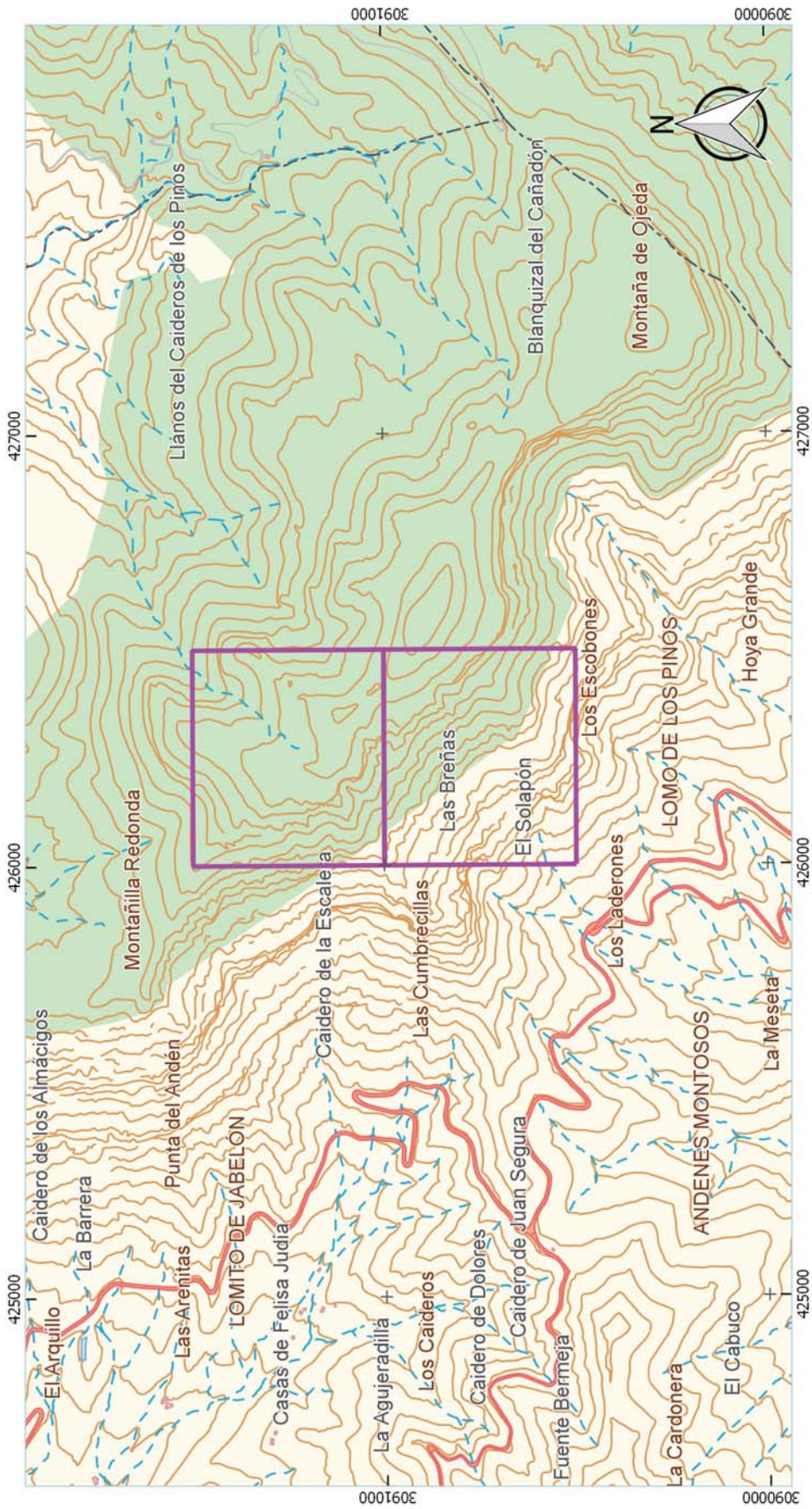




## **8. Anexo**

Distribución de *H. inaguae* y *P. hadrosoma* en celdas de 500 x 500 m.





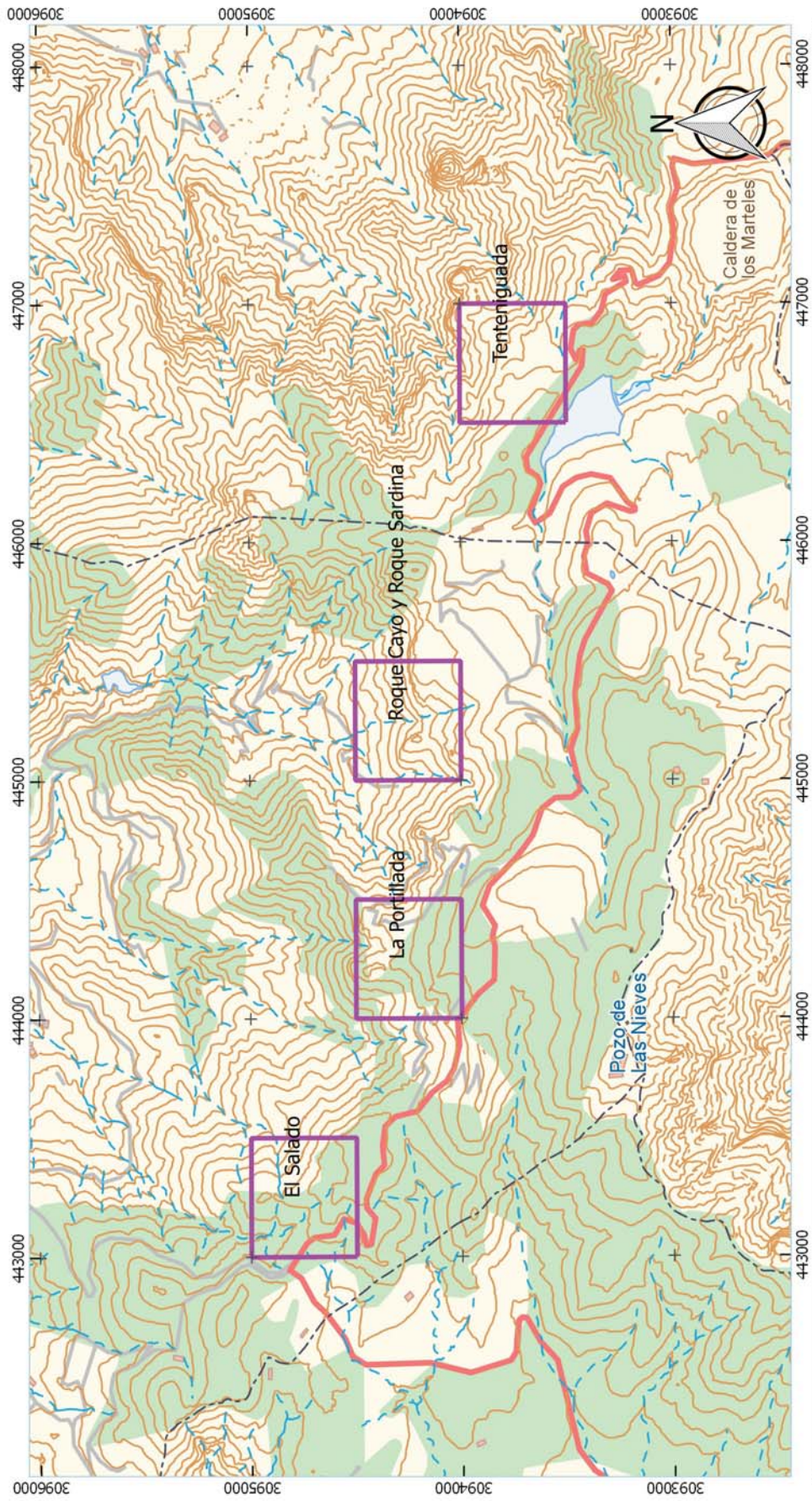
 Distribución de *Helianthemum inaguae*


IDE Canarias Mapa Topográfico Integrado 1:5.000/1:1.000 Años 2011-2012-2013

1:10.000







 Distribución de Pericallis hadrosoma

IDE Canarias Mapa Topográfico Integrado 1:5.000/1:1.000 Años 2011-2012-2013

1:18.000

