

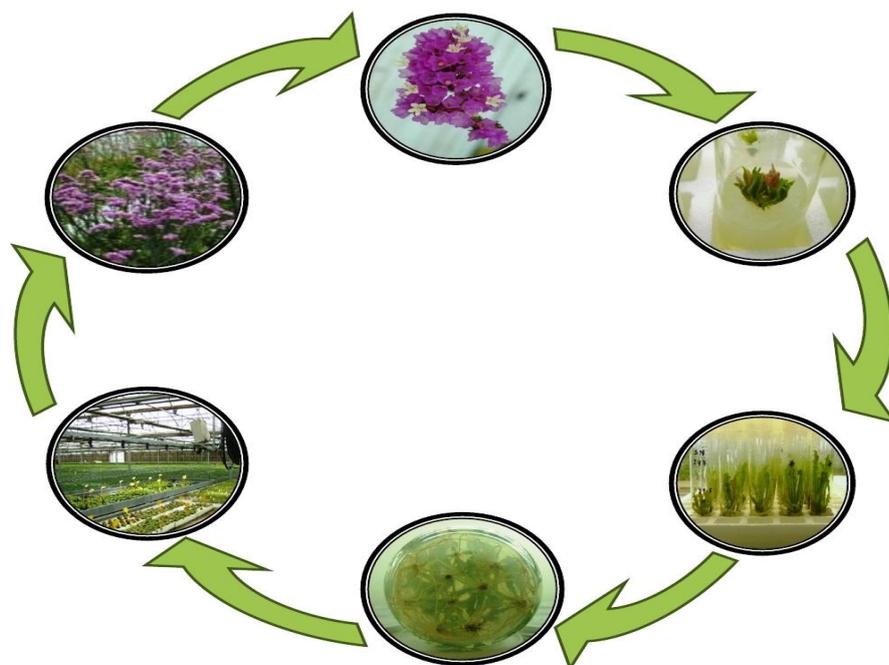


Universidad
Politécnica
de Cartagena

Campus
de Excelencia
Internacional

ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PROPAGACIÓN IN VITRO DE LIMONIUM SINUATUM

*Técnicas Avanzadas en Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario*



Autor: Jesús Sánchez Sánchez

Director/es: Antonio A. Calderón García

Cartagena 2018

**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE
TESIS DOCTORAL POR EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS**

D/D^a. Antonio A. Calderón García Director/a de la Tesis doctoral “Estudio y optimización del proceso de propagación *in vitro* de *Limonium sinuatum*”.

INFORMA:

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por D/D^a. Jesús Sánchez Sánchez, dentro del Programa de Doctorado Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, dando mi conformidad para que sea presentada ante el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado para ser autorizado su depósito.

La rama de conocimiento en la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- × Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 23 de julio de 2018

EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS

ANTONIO
ASENSIO|
CALDERON|
GARCIA

Firmado digitalmente por ANTONIO
ASENSIO|CALDERON|GARCIA
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=ANTONIO ASENSIO|CALDERON|
GARCIA, serialNumber=██████████
givenName=ANTONIO ASENSIO,
sn=ANTONIO ASENSIO|CALDERON|GARCIA, ou=Ciudadanos,
o=ACCV, c=ES
Fecha: 2018.07.23 13:26:23 +02'00'

Fdo.: Antonio A. Calderón García

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

D. Francisco Artés Hernández, Presidente de la Comisión Académica del Programa “Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario”.

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, “Estudio y optimización del proceso de propagación *in vitro* de *Limonium sinuatum*”, ha sido realizada, dentro del mencionado Programa de Doctorado, por D. Jesús Sánchez Sánchez, bajo la dirección y supervisión del Dr. Antonio A. Calderón García.

En reunión de la Comisión Académica, visto que en la misma se acreditan los indicios de calidad correspondientes y la autorización del Director/a de la misma, se acordó dar la conformidad, con la finalidad de que sea autorizado su depósito por el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- × Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 23 de julio de 2018

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA

 FRANCISCO DE ASIS|
ARTES|HERNANDEZ
2018.07.23 14:20:26
+02'00'

Fdo: Francisco Artés Hernández

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

AGRADECIMIENTOS

En estas páginas quiero reflejar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han ayudado durante este periodo de tiempo, de una forma u otra, en la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, dar las gracias al Dr. Antonio A. Calderón García, director de la tesis y la persona que me ha guiado, aconsejado y ayudado en todo este proceso. También a la Dr. M^a Ángeles Ferrer por sus consejos y consideraciones para la mejora del trabajo que he estado realizando.

A mi compañero de departamento/laboratorio Antonio López-Orenes, quien estaba realizando simultáneamente su tesis doctoral, y que no ha reparado ni un momento en prestarme su ayuda y aportar su experiencia, además de los ratos buenos de conversación y risas que hemos pasado en el laboratorio.

Especial consideración merece la empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümmer Orange, darle las gracias a la compañía y a las personas que desde el principio apoyaron este proyecto: Pepe Sosa (D.E.P.), Antonio Sola, Emilio Cano y Ana Belén Rodríguez. A todos los componentes del Departamento de I+D: Cristina, Juana Teresa, Ana, Juani, Antonia, Carmen, Manoli, Antonia “de las naranjas”, Encarna y Milagros. Dentro de esta empresa quiero destacar a cuatro personas a las que debo dar las gracias por su apoyo y amistad, la primera Germán Garrido, quien fue el que me dio el primer impulso a la hora de realizar la tesis sobre *Limonium sinuatum*; a Paqui Gázquez, la persona quien me acogió a mi llegada a esta empresa como si fuera una “madre”; a M^a Carmen Gómez y a Rosa Gázquez, mi mano derecha dentro del laboratorio *in vitro*. También quiero agradecer a todos mis compañeros que he tenido durante mi etapa laboral en la compañía, y que me enseñaron a entender el valor del trabajo y el esfuerzo.

En esta última etapa quiero dar las gracias a Antonio Sánchez Valero y Ernesto Coy Gómez por su labor de corrección, y así ayudarme a retocar este documento. A Joseph McLoughlin por la revisión en el trabajo de traducción de todo lo que debía estar escrito en inglés. A mis compañeras de la especialidad

de Inglés del instituto donde trabajo, Inma Pernías y Ana Isabel Moreno, que me han corregido las traducciones.

A mi familia, sobre todo a Belén, mi esposa, por su presencia, paciencia y apoyo incondicional durante estos años. Ha sido imprescindible su aliento, sobre todo al final, para poder conseguir el objetivo marcado. También a mi madre, Manola, y a mi suegra, Sebi, por ayudarme a cuidar a mi hija en los momentos donde el trabajo se agolpaba, y la distribución del tiempo entre las tareas de dirección de un centro de secundaria y la realización de esta tesis era complicada y resultaba agobiante.

A mi padre, Juan, en su memoria, por quién he realizado todo este trabajo para que se sienta orgulloso, y por Leonor, mi hija, por el futuro que se le presenta, y donde quiero que todo el esfuerzo realizado para hacer esta tesis sea una referencia para plantearse metas y objetivos que quedan por llegar y lograr.

A mi familia

INDICE

0. RESUMEN/ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. La empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümmer Orange	7
1.2. El género <i>Limonium</i>	11
1.2.1. Morfología y taxonomía	11
1.2.2. Especies de valor agronómico	12
1.2.3. Requerimientos edafoclimáticos	19
1.2.4. Multiplicación y propagación	20
1.3. El cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	22
1.4. El cultivo <i>in vitro</i> de <i>Limonium sinuatum</i>	30
1.5. La importancia comercial de <i>Limonium sinuatum</i>	35
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1. Variedades estudiadas de <i>Limonium sinuatum</i>	45
3.2. Efecto de la distancia de la planta al foco emisor de luz durante la fase de multiplicación	47
3.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	47
3.2.2. Tratamientos y diseño experimental	48
3.2.3. Parámetros de producción <i>in vitro</i> : multiplicación	51

3.3. Efecto de las bajas temperaturas durante la fase de multiplicación	53
3.3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	53
3.3.2. Tratamientos y diseño experimental	54
3.3.3. Parámetros de producción <i>in vitro</i> : multiplicación	54
3.4. Efecto del tipo y concentración de auxinas durante la fase de enraizamiento	55
3.4.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	55
3.4.2. Tratamientos y diseño experimental	56
3.4.3. Parámetros de producción <i>in vitro</i> : enraizamiento y aclimatación	56
3.5. Inducción de brotes y regeneración de plantas a partir de explantes de hojas jóvenes	57
3.5.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	57
3.5.2. Tratamientos y diseño experimental	58
3.5.3. Parámetros de producción <i>in vitro</i> : establecimiento	59
3.5.4. Parámetros de producción <i>in vitro</i> : multiplicación	59
3.6. Determinación de metabolitos y de la capacidad antioxidante en los extractos metanólicos	60
3.6.1. Obtención de los extractos metanólicos	60
3.6.2. Determinación de pigmentos fotosintéticos	60
3.6.3. Determinación de fenoles solubles totales	60
3.6.4. Determinación de flavonoides solubles totales	61
3.6.5. Determinación del contenido de almidón	61
3.6.6. Determinación de la capacidad antioxidante total	62
3.6.7. Determinación del poder reductor/antioxidante férrico (FRAP)	62
3.7. Análisis cromatográficos	63
3.7.1. Análisis del patrón de compuestos fenólicos por HPLC	63
3.7.2. Análisis de metabolitos primarios por GC-MS	64

3.8. Condiciones de cultivo en invernadero	65
3.9. Parámetros de producción y de calidad comercial	68
3.10. Análisis estadístico	70
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
4.1. Efecto de la distancia de la planta al foco emisor de luz durante la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	73
4.1.1. Crecimiento, tasa de multiplicación, peso fresco y peso seco	73
4.1.2. Concentración de clorofilas a, b y totales	80
4.1.3. Niveles de fenoles solubles totales, flavonoides solubles y almidón	84
4.1.4. Capacidad antioxidante: ABTS y FRAP	90
4.1.5. Producción y parámetros de calidad comercial	94
4.1.6. Análisis multivariable de los parámetros estudiados (PCA)	99
4.2. Efecto de la temperatura durante la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	102
4.2.1. Crecimiento, tasa de multiplicación, peso fresco y peso seco	102
4.2.2. Concentración de clorofilas a, b y totales	120
4.2.3. Niveles de fenoles solubles totales, flavonoides solubles y almidón	122
4.2.4. Capacidad antioxidante: ABTS y FRAP	127
4.2.5. Producción y parámetros de calidad comercial	132
4.2.6. Análisis multivariable de los parámetros estudiados (PCA)	135
4.3. Efecto de diferentes tipos de auxinas y concentraciones durante la fase de enraizamiento <i>in vitro</i>	139
4.3.1. Enraizamiento, aclimatación, peso fresco y peso seco	139
4.3.2. Concentración de clorofilas a, b y totales	151
4.3.3. Niveles de fenoles solubles totales, flavonoides solubles y almidón	153
4.3.4. Capacidad antioxidante: ABTS y FRAP	160
4.3.5. Producción y parámetros de calidad comercial	163

4.3.6. Análisis multivariable de los parámetros estudiados (PCA)	167
4.4. Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Limonium sinuatum</i> a partir de hojas jóvenes	171
4.4.1. Contaminaciones y establecimiento	171
4.4.2. Crecimiento, tasa de multiplicación, peso fresco y peso seco	179
4.4.3. Concentración de clorofilas a, b y totales	181
4.4.4. Niveles de fenoles solubles totales, flavonoides solubles y almidón	181
4.4.5. Capacidad antioxidante: ABTS y FRAP	182
4.4.6. Producción y parámetros de calidad comercial	184
4.4.7. Análisis multivariable de los parámetros estudiados (PCA)	189
5. CONCLUSIONES	193
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	199
7. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	227
7.1. Índice de Tablas	227
7.2. Índice de Figuras	230
ANEXO: ESTUDIO ECONÓMICO Y VALORACIÓN DE LA PUESTA EN MARCHA DEL NUEVO SISTEMA DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	247

RESUMEN

Limonium sinuatum es una especie de la familia de las plumbagináceas. Esta especie es muy apreciada porque tiene buen mercado tanto para flor seca como para flor en fresco.

Unos de los problemas que presenta esta especie es la obtención masiva de plantas. La propagación convencional de muchos cultivares de *Limonium* se hace por semilla o por esquejes, de manera que la obtención de la planta lleva entre 6 y 8 meses, con un rendimiento limitado (20-30 %) y en muchos casos las plantas obtenidas no son homogéneas. Como alternativa se suele utilizar la propagación *in vitro* o micropropagación, que se realiza en laboratorio bajo condiciones controladas. A pesar de las indudables ventajas que ofrece este método, es necesario solventar una serie de problemas que pueden aparecer y que limitarían el rendimiento del proceso. Además, la explotación comercial de estas técnicas requiere la optimización de una serie de parámetros que, en la mayor parte de los casos, debe hacerse cultivar por cultivar. Entre los factores que se deben tener en cuenta destacan la elección del método de multiplicación, el ajuste de los medios de cultivo (macro- y micronutrientes), reguladores del crecimiento o fitohormonas, la aparición de hiperhidricidad, etc.

La empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümmer Orange está situada en Puerto Lumbreras (Murcia) y se dedica, entre otras actividades, a la mejora genética y obtención de nuevas variedades de *Limonium sinuatum*. Como se ha comentado anteriormente, es necesario depurar la técnica de cultivo *in vitro* en todas las fases que comprende el proceso con el fin de conseguir plantas de calidad, y por tanto una mejor rentabilidad. Por otra parte, desde un punto de vista estratégico, la realización de este trabajo es muy importante para dicha empresa, ya que añade a su labor de investigación y mejora, la colaboración con de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), canalizada a través del Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) de esta institución.

En este trabajo se describen los resultados de una serie de ensayos planteados para conseguir una mejora del cultivo *in vitro* de cuatro variedades comerciales de *L. sinuatum* de distintos colores. SN8946 (violeta), SN9013 (blanca), SN9000 (amarilla) y SN9001 (rosa). Se realizó una selección de material vegetal para estudiar las cuatro etapas clásicas del proceso de micropropagación: establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación, intentado optimizar las condiciones de ciertos parámetros que afectaban a cada una de ellas. Así, se estableció un protocolo de establecimiento alternativo para la variedad de color amarillo a partir de explantes conseguidos de hojas jóvenes; también se vio que en la fase de multiplicación la reducción de la distancia entre de las baldas de las estanterías dentro de la cámara de cultivo *in vitro* producía un ligero cambio en la intensidad luminosa que no provocaba cambios en ninguno de los parámetros productivos. Además, en esta misma etapa, se pudo observar que con la reducción de la temperatura durante la multiplicación, se conseguía alargar los periodos de subcultivo sin que esto tampoco afectara a los parámetros contemplados en la micropropagación. En la fase de enraizamiento el cambio del regulador de crecimiento utilizado no tuvo consecuencias en el proceso productivo, aunque sí mejoró los porcentajes de plantas con raíces y de supervivencia en aclimatación. En todos los ensayos realizados se evaluó la calidad del material vegetal obtenido tanto a nivel bioquímico, donde se analizaron las concentraciones de diferentes compuestos (pigmentos fotosintéticos, flavonoides, fenoles, etc.), como a nivel agronómico, comparando los valores de producción, longitud, número de espigas y cantidad de ramificaciones de los ensayos, con los que se obtenían de las producciones comerciales de la empresa.

Por último, los resultados y conclusiones se completaron con un pequeño estudio económico que se presentó a la empresa, exponiendo los cambios que deberían realizarse en cada una de las fases de la micropropagación de *Limonium sinuatum* para conseguir una mejor rentabilidad, tanto en el aprovechamiento de instalaciones (cámara de cultivo) como en el ahorro de mano de obra, todo ello con la correspondiente estimación del impacto presupuestario que conlleva la optimización de las etapas del proceso.

ABSTRACT

Limonium sinuatum is a species of the Plumbaginaceae family. This species is greatly appreciated because it has a good market both for dry and for fresh flowers.

One of the problems presented by this species is the massive production of plants. The conventional propagation of many cultures of *Limonium* is done by seed or by cuttings, so that the production of the plant takes between 6 and 8 months, with a limited yield (20-30 %) and in many cases the plants obtained are not homogeneous. Alternatively, in vitro propagation or micropropagation is used, which is carried out in the laboratory under controlled conditions. Despite the undoubted advantages of this method, it is necessary to solve a series of problems that may appear and that would limit the performance of the process. In addition, the commercial exploitation of these techniques requires the optimization of a series of parameters that, in most cases, must be cultivated for cultivation. Among the factors that must be taken into account are the choice of the multiplication methods, the adjustment of the culture media (macro- and micronutrients), growth regulators or phytohormones, the appearance of hyperhydricity, etc.

The company Barberet & Blanc, S.A. By Dümme Orange is located in Puerto Lumbreras (Murcia) and is dedicated, among other activities, to breeding new varieties of *Limonium sinuatum*. Because of this, it is necessary to purify the technique of in vitro culture in all the phases that the process comprises in order to obtain quality plants, and therefore profitability. For this reason, from a strategic point of view, the accomplishment of this work is very important for this company, since it adds to its work of research and improvement that realizes the collaboration with the Polytechnic University of Cartagena, channeled through the Institute of Plant Biotechnology of this institution.

This work consists of a series of trials aimed at improving the in vitro culture of four commercial varieties of *L. sinuatum* of different colours, SN8946

(violet), SN9013 (white), SN9000 (yellow) and SN9001 (pink). A selection of plant material was made to study the four phases of the micropropagation process: establishment, multiplication, rooting and acclimatization, trying to optimize the conditions of some of the parameters that affected each one. Thus, an alternative establishment protocol was established for the yellow variety from explants obtained from young leaves; It was also observed that in the multiplication phase the reduction of the distance between the shelves within the in vitro culture chamber produced a small change in light intensity that did not cause changes in any of the productive parameters. In addition, this phase could be observed that if the temperature during the multiplication is reduced, it was possible to lengthen the subculture periods without this also affecting the parameters contemplated in the micropropagation. In the rooting phase the growth regulator used was changed without this having consequences in the productive process, improving the percentages of plants with roots and survival in acclimatization. Finally, the quality of the plant material obtained at the biochemical level, where the concentrations of different compounds (photosynthetic pigments, flavonoids, phenols, etc.) and agronomic values were analysed, comparing the values of production, length, number of spikes and number of branches with which they were obtained from commercial productions of the company.

Finally, the results and conclusions were completed with a small economic study that was presented to the company, explaining the changes that should be made in each of the phases of the micropropagation of *Limonium sinuatum* to achieve a better profitability, both in the use of facilities (cultivation chamber) as in saving labor, all with the corresponding estimation of the budgetary impact that entails the optimization of the stages of the process.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümmen Orange

La empresa Barberet & Blanc S.A. by Dümmen Orange (Fig. 1.1.) está presente en el sector de la floricultura desde hace más de 60 años, y se dedica, entre otras actividades, a la mejora genética y obtención de nuevas variedades de clavel, miniclavel, clavel de maceta, gerbera y limonium. Esta compañía está situada en Puerto Lumbreras (Murcia) y opera en más de sesenta países en los cinco continentes, a través de una red de agentes cualificados, en las principales zonas productivas, mostrando su compromiso a cada cliente, a través de una asistencia técnica a pie de invernadero.

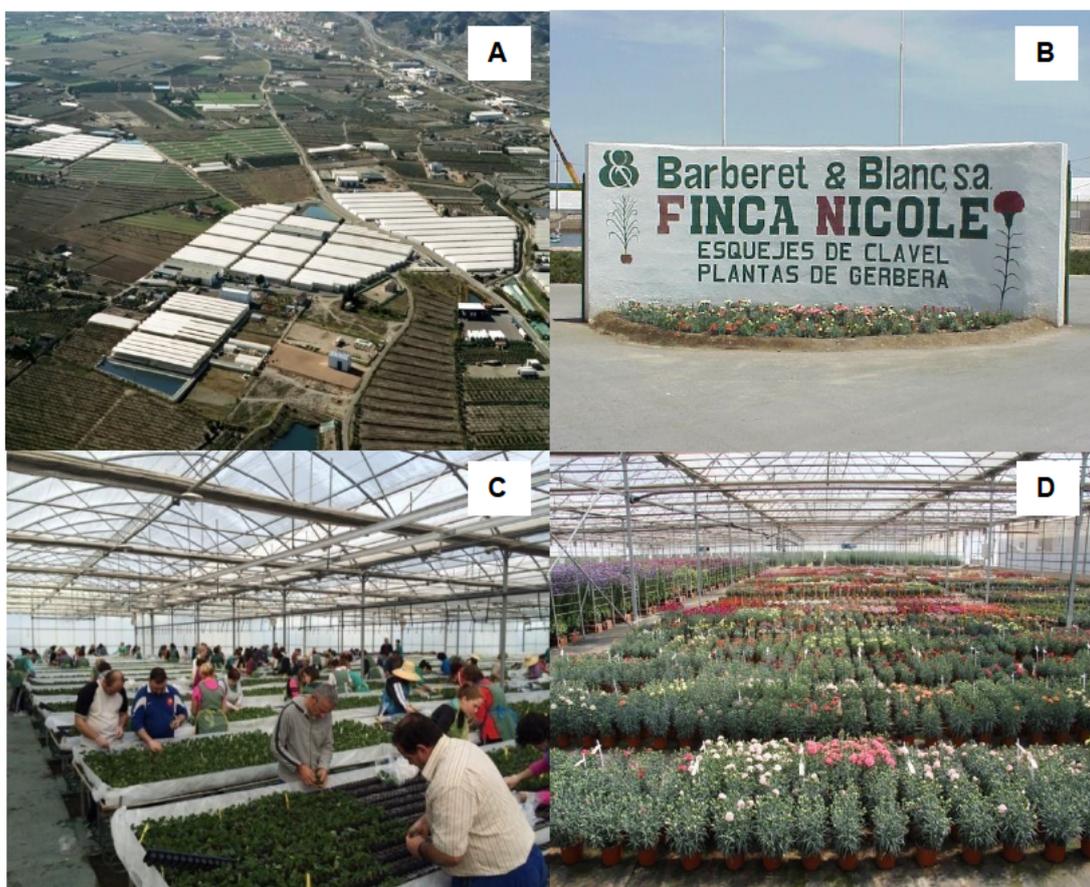


Figura 1.1. Empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümmen Orange. **(A)** Panorámica aérea de la empresa. **(B)** Entrada a la Finca Nicole. **(C)** Invernaderos de recolección de esquejes. **(D)** Estación experimental.

Esta empresa es creadora de sus propias variedades. Se estima que de cada cuatro claveles producidos a nivel mundial, uno es de origen suyo.

La empresa ofrece hoy a sus clientes más de 150 variedades, todas ellas con certificado de obtención vegetal. Así, cada año sacan al mercado unas diez nuevas variedades, cuyas características son diferentes en función del mercado a que van dirigidas, abarcando desde el mercado mediterráneo hasta el japonés.

Barberet & Blanc, S.A. by Dümme Orange es líder indiscutible en el sector de la floricultura. La venta de esquejes o planta de sus variedades representa la cuarta parte a nivel mundial, subiendo el porcentaje hasta un 60-70 % cuando se habla de España y Portugal. También se debe destacar que en el mercado japonés tienen un 35 % de cuota de mercado, siendo esta proporción bastante alta para un mercado tan lejano.

Las variedades comercializadas son exclusivas del grupo Dümme Orange, del que forma parte esta empresa. Se estima que para obtener una nueva variedad de cada una de las especies con las que se trabaja, se necesitan de cinco a seis años, a lo que se le debe añadir entre tres y cinco años para establecerse en el mercado, y debido a que la vida de una variedad suele estar entre diez y doce años, muchas veces el proceso de obtención y venta de una variedad es tan largo como la vida de la misma.

Debido a que la producción de esquejes para flor cortada es estacional, la empresa ha debido diversificar los productos con los que trabaja, de manera que hoy por hoy puede mantener las instalaciones a pleno rendimiento casi todo el año. Además, también distribuyen otras especies procedentes de empresas del grupo. De hecho, el 50 % de la poinsettia que se vende en mercado español se produce en Puerto Lumbreras, pues en esta empresa se lleva a cabo el enraizamiento gracias a que la climatología es idónea para esta planta.

Todo esto repercute directamente en el número de trabajadores que puede emplear. Así, llegan a trabajar en la empresa durante la campaña un número de aproximadamente 300 personas, de las que casi el 90 % son del

municipio, llegando a trabajar en la empresa trabajadores de la tercera generación de una familia.

Un aspecto importante en Barberet & Blanc by Dümmer Orange es el aprovechamiento del agua. Esta empresa usa riegos localizados, cultivo hidropónico..., lo último en tecnología al servicio de la floricultura.

En la empresa, dentro del Departamento I+D+i de la empresa y en lo que al cultivo *in vitro* de material vegetal respecta, estimaron como posibles objetivos para la realización de una investigación los siguientes problemas que tienen por resolver:

- Conservación del material vegetal *in vitro*, procedente de clavel, gerbera y *Limonium* a baja temperatura, incluyendo su encapsulación en geles de alginato.
- Alargamiento del periodo de tiempo entre subcultivos, ya fuera esto conseguido a través de bajas temperaturas en las cámaras de cultivo o mediante un cambio en la composición del medio de cultivo (uso de retardantes de crecimiento), o con ambas cosas a la vez.
- Búsqueda de nuevas variedades:
 - Variación somaclonal (a partir de callo).
 - Fusión de protoplastos.
- Mejora del protocolo de introducción del material vegetal al cultivo *in vitro* (algunas variedades presentan un porcentaje muy bajo de éxito):
 - Mejora en el proceso de esterilización.
 - Selección del explante a introducir (discos de hoja jóvenes o trozos de tallo).
 - Tratamiento previo a la introducción para aumentar el número de brotes laterales en las planta (en gerbera las plantas son tratadas con hormona tres o cuatro meses antes de la introducción).
- Mejora del medio de cultivo de la fase de enraizamiento de ciertas variedades que son importantes comercialmente. Hay un porcentaje bajo de enraizamiento en las variedades violeta de *Limonium sinuatum*.
- Utilización de medio de cultivo líquido en bandejas y tratamiento de CO₂ durante la fase de multiplicación.

- Uso de nuevos contenedores o recipientes, teniendo en cuenta aspectos prácticos en lo referido a su manipulación previa a la multiplicación.
- Puesta a punto de medios para el rescate de embriones.
- Búsqueda de especies silvestres que puedan aportar alguna característica en el proceso de mejora de las variedades mediante fusión de protoplastos.
- Búsqueda de bibliografía referente a la temática referida.

En este departamento existe un laboratorio (Fig. 1.2.) donde se dispone de tres cámaras cultivo que se encuentran a 4 °C, a 12 °C y a 22 °C, con fotoperiodo de 16 horas de luz y con una intensidad de luz variable según las necesidades. Además, dispone de 6000 m² de invernaderos con sistema de climatización con cooling system a disposición del mismo para realizar los cruzamientos y ensayar las variedades en las primeras fases.



Figura 1.2. Departamento de I+D de Barberet & Blanc, S.A. by Dümmen Orange. **(A)** Edificio I+D. **(B)** Operación en cabina de flujo. **(C)** Preparación de medios. **(D)** Realización del test de virus en clavel.

1.2. El género *Limonium*

1.2.1. Taxonomía y morfología

La familia de angiospermas Plumbaginaceae está formada por aproximadamente 27 géneros, de los cuales el mayor es el género *Limonium* (Kubitzki, 1993). Este género comprende un número aproximado de 400 especies distribuidas por todo el mundo (Bailey, 1978), pero es en el Mediterráneo occidental donde se encuentran el mayor número de endemismos (Erben, 1993). Presenta halotipos que suelen estar distribuidos por hábitats salinos costeros (Adam, 1990; Ungar, 1995). Este género tiene gran complejidad taxonómica, lo que plantea serios problemas para su identificación. A lo que se le debe añadir la elevada tasa de hibridación que se produce entre los individuos, llegando a tener hibridaciones entre los híbridos y sus progenitores (Palacios et al., 2000).

La mayoría de las especies son plantas perennes y forman rosetas basales cortamente diferenciadas (hem criptófitos rosulados). Solamente en ocasiones presentan tallos robustos portadores de hojas esparcidas helicoidalmente que pueden elevarse unos decímetros (caméfitos), y a veces pueden llegar a alcanzar los tres metros (fanerófitos). Además, pueden hallarse plantas anuales de ciclo estacional como *L. echioides* y *L. lobatum*. Destacar también que la forma de las hojas puede variar entre las lobuladas y las enteras.

En general son plantas totalmente glabras, carentes de indumento en todas sus partes. A pesar de esto, algunas especies como *Limonium furfuraceum* y *Limonium dufourii* sí presentan cierta pilosidad (Lledó, 1996).

La forma de la inflorescencia es un aspecto a destacar, aunque en muy pocas ocasiones es un factor determinante para poder identificar la especie. Las flores están agrupadas en forma de espigas, formadas por la reunión de dos o más flores. Las espiguillas están rodeadas de tres brácteas: externa, media e interna. Entre especies las flores se parecen bastante y el color de

sus pétalos no suele ser significativo, pues la gran mayoría son de color violáceo y en pocas ocasiones blancas o rosadas.

En la actualidad se complementa la sistemática tradicional del género, que estaba basada en ciertos rasgos morfológicos, con un enfoque molecular y citogenético. Así, se han realizado estudios filogenéticos en la familia Plumbaginaceae que se basaban en secuencias de ADN plastidial (Lledó et al., 2001). Lo que confirman estos estudios es que existen dos subfamilias bien diferenciadas por caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares, que son *Plumbaginoideae* y *Staticoideae*. La primera de ellas comprende cuatro géneros, de los cuales *Plumbago* es el que tiene más especies con 20. Los géneros de la otra familia, *Staticoideae* son morfológicamente más diversos, y más del 85 % de las especies se reparten en tres géneros: *Limonium*, *Armeria* y *Acantholimon*.

1.2.2. Especies de valor agronómico

Existen entre 15-20 especies cultivadas de *Limonium*, en las que se incluyen *L. sinuatum*, *L. bonduelli*, *L. degreanum*, *L. sinense*, *L. latifolium*, *L. psylliostrachum*, *L. bellidifolium*, *L. gmelinni*, *L. perezzi*, *L. dumosum* y *L. altaica* (Sato, 1989).

Dentro de este género cabe destacar algunas especies de gran valor ornamental (Tabla 1.1.), pues se pueden utilizar tanto para flor cortada, como para flor seca o para cultivo en maceta (Harazy et al., 1985; Harada, 1992; Martín y Pérez, 1995). También es un cultivo apropiado para la cobertura de paisaje urbano (Alarcón et al., 1999; Rizzotto, 1999; Mercuri et al., 2003; Rodríguez et al., 2003; Burchi et al., 2006).

Tabla 1.1. Características agronómicas de diversas especies de *Limonium* cultivadas en invernadero de plástico (Masvidal y Ruíz, 1992).

Especie	Periodo de floración	Producción (tallos/planta)	Longitud tallo (cm)	Color de la flor	Posibilidades de cultivo		
					Flor cortada	Flor seca	Maceta
<i>L. catalaunicum</i>	Jun-Ago	26,7	60-110	Azul claro	*	*	
<i>L. cossonianum</i>	Jun-Ago	3,5	100-130	Blanco	*		
<i>L. dichotomum</i>	May-Ago	10	40-50	Azul-violeta	*	*	
<i>L. ebusitanum</i>	May-Jul	16,75	50-60	Lila	*		*
<i>L. gougetianum</i>	May-Jul	15,83	20-60	Violeta	*		*
<i>L. grossii</i>	Jun-Ago	26,3	80-100	Violeta	*		
<i>L. insigne</i>	May-Jul	12,5	50-80	Rojo/Fucsia	*	*	
<i>L. serotinum</i>	May-Oct	21,5	40-70	Azul/Lila	*	*	*
<i>L. sinuatum</i>	Feb-Jul	33,7	70-90	Azul/Blanco	*	*	
<i>L. carthaginense</i>	May-Jul	7,5	15-40	Lila			*
<i>L. binervosum</i>	Abr-Jun	11,3	20-30	Azul-lila			*
<i>L. pectinatum</i>	May-Jul	35,5	35-50	Rosado		*	*
<i>L. imbricatum</i>	May-Jul	30	40-55	Rosado		*	*
<i>L. fruticans</i>	May-Jul	15	50-65	Morado/ Blanco	*		*
<i>L. pereziii</i>	May-Jul	4,5	50-80	Azul/Blanco	*		*
<i>L. rumesifolium</i>	May-Jul	13,5	50-65	Azul/Blanco	*		*
<i>L. sinense</i>	Abr-Jul	16	60-80	Amarillo/ Blanco	*		*

Se diferencian dos grupos de especies de *Limonium* en función de su ciclo biológico:

➤ **Especies de ciclo anual:**

- ***Limonium bonduelli* (Fig. 1.3.).** Especie bianual pero que se cultiva de forma anual con fines ornamentales para flor seca y cortada. Las hojas son de color verde pálido, ovaladas y profundamente lobuladas. Crece en forma de roseta, con tallos de porte erecto y solitario en algunas variedades. Sus flores amarillas se agrupan en espigas de 8 cm de diámetro. Suele utilizarse como especie mejoradora de variedades de otras especies, como *L. sinuatum*.



Figura 1.3. Plantas en floración de *Limonium bonduelli*.

- ***Limonium fruticans* (Fig. 1.4.)** Nativa de las Islas Canarias. Planta arbustiva de tallo corto con hojas ovadas de 4-5 cm de longitud, mucronadas. Panículas de unos 15 cm de altura y aladas. Flores con el cáliz azul y la corola amarilla.



Figura 1.4. Planta en floración de *Limonium fruticans*.

- ***Limonium sinuatum* (Fig. 1.5.)**. Natural de la región mediterránea. Planta de porte erguido y de lento desarrollo. Forma una roseta de hojas profundamente lanceoladas, lobuladas y a menudo de bordes ondulados, de color verde oscuro. Del centro emerge un penacho de tallos alados que alcanzan 55-90 cm de altura cuando florecen (Zhao Hang, 2010). Cada uno de ellos está coronado por un denso racimo de 3-10 cm de longitud, de flores tubulares, escarosas y de variopintos colores, que van de color

crema al azul. Se emplea para la obtención de flores secas, flor cortada y en maceta. Existen numerosos cultivares.



Figura 1.5. Flores de *Limonium sinuatum* de la variedad Aqua Blue.

- ***Limonium insigne* (Fig. 1.6.).** Nativa del sureste de España. Planta perenne de hasta 60 cm de altura con hojas obovadas. Inflorescencia con ramificación dicotómica y numerosas ramas estériles. Espigas con 1-2 flores de corola rosa oscuro.



Figura 1.6. Planta en floración de *Limonium insigne*.

- ***Limonium suworowii* (Fig. 1.7.).** Natural del oeste de Turquía. Se cultiva como anual, es semi-rústica y llega a alcanzar 40 cm de altura. Empleada para flor cortada y como ornamental en maceta. Sus hojas son lanceoladas de color verde claro y con bordes ondulados dispuestas en forma de roseta. Las flores son de color rosa pálido, muy apretadas en panículas recubiertas de plumas, de 40 cm de largo.



Figura 1.7. Planta en floración de *Limonium suworowii*.

➤ **Especies de ciclo vivaz:**

- ***Limonium incanum* (Fig. 1.8.).** Originaria de Siberia, puede alcanzar alturas de 30-40 cm. Es muy rústica de hojas lanceoladas, las flores son pequeñas de cáliz blanco y corola roja.



Figura 1.8. Planta en floración de *Limonium incanum*.

- ***Limonium latifolium* (Fig. 1.9.).** Procede de los países del este de Europa y el sureste de Rusia. Está disponible todo el año. Es una planta perenne de floración otoñal y estival, pero se cultiva como anual. Su tronco leñoso alcanza una altura máxima de 60 cm. Forma una roseta de hojas elípticas, con pubescencia esparcida, de 20-60 cm de longitud. Flores de color azul lavanda que aparecen en racimos sueltos de 25 cm de largo. Su apariencia ligera y delicada, además de su larga vida en jarrón, la hace perfecta para trabajos de decoración.



Figura 1.9. Planta en floración de *Limonium latifolium*.

- ***Limonium caspium* (Fig. 1.10).** Planta bianual que durante el primer año produce pequeños brotes florales, durante el segundo año y mediante la protección del penacho apical desarrolla de nuevo flores muy demandadas en el mercado. Se recolecta en racimo.



Figura 1.10. Planta en floración de *Limonium caspium*.

- ***Limonium perezii* (Fig. 1.11).** Subarbusto de porte redondeado, con hojas muy pecioladas, de forma entre oval y de diamante, de color verde oscuro. En otoño produce compactos ramilletes de flores diminutas de color azul. Requiere protección en zonas de heladas.



Figura 1.11. Planta en floración de *Limonium perezii*.

- ***Limonium pectinatum* (Fig. 1.12.)**. Nativa de las Islas Canarias. Planta subarborescente, glabra, con hojas obovado-espátuladas de 4 cm de longitud, dispuestas en roseta basal. Tallo floral de hasta 70 cm de altura. Espigas de 3 flores con el cáliz lavanda o violeta pálido y la corola rosada.



Figura 1.12. Planta en floración de *Limonium pectinatum*.

- ***Limonium peregrinum* (Fig. 1.13.)**. Es una planta perenne que produce inflorescencias de color rosa con excelentes atributos como flor cortada (Seelye et al., 1994).



Figura 1.13. Inflorescencia de *Limonium peregrinum*.

1.2.3. Requerimientos edafoclimáticos

La temperatura óptima de crecimiento y floración durante el día es de 22 a 27 °C (25 °C) y de 12 a 16 °C (15 °C) por la noche. La planta deja de crecer por debajo de 8 °C y por encima de 30 °C. Los hábitats de desarrollo de este género abarcan desde los saladares continentales y costeros (con altas concentraciones de cloruros y sulfatos) (Heywood, 1978), hasta las zonas peninsulares del interior con climatología más fría, por lo que se ha considerado a la mayoría de especies como halófitos estrictos. Sin embargo, debido a que crecen con la misma vitalidad en suelos ricos en nutrientes que no son salinos, se podría decir que han desarrollado la capacidad de ser resistentes a ambientes secos con halotolerancia.

Se cultiva preferentemente en suelos arenosos, pero en principio se puede cultivar en todo tipo de suelos, siempre que sean permeables y con buen drenaje. El pH adecuado para un buen desarrollo del cultivo está alrededor de 6,5.

Para la inducción floral es necesaria una diferencia como mínimo de 10 °C entre el día y la noche. Si esta diferencia es mayor de 25 °C la planta tampoco inducirá a flor, permaneciendo en estado vegetativo. Además, la humedad relativa debe controlarse durante este periodo para evitar enfermedades producidas por hongos, por lo que se necesita una buena ventilación en el invernadero.

En Europa occidental es común plantar desde diciembre hasta abril, para obtener flor en verano. Sin embargo, en la zona Mediterránea la plantación se realiza a finales de verano o principios de otoño, para favorecer la cosecha de invierno. Así, en España, se planta a finales de agosto para comenzar a tener producción a finales de octubre o primeros de noviembre para vender en el día de "Todos los Santos". Por otro lado, en la zona de Sudamérica se plantaría desde junio hasta octubre para obtener flor en verano, o bien entre febrero y marzo para comenzar a recoger la producción en invierno.

1.2.4. Multiplicación y propagación

El género *Limonium* comprende principalmente plantas con un amplio rango de poliploidia (generalmente di-, tri, y tetraploide) y sistemas reproductivos (sexual y asexual a través de apomixis) (Palop et al., 2000).

La propagación comercial de *Limonium* se realizaba mediante semillas, aplicando dos técnicas:

- Sembrado directo del fruto, surgiendo de uno a siete plantones.
- Semillas individuales escarificadas, para una germinación más rápida y homogénea.

Normalmente la obtención de la planta se realizaba en viveros especializados. La mayor parte de las semillas se comercializaban limpias y debidamente envasadas. Para favorecer la germinación, las semillas se debían sumergir en una disolución con algún fungicida, durante media hora con agua a unos 30 °C durante un primer momento y procurando mantener la temperatura del agua en unos 20 °C durante otra media hora.

El sustrato para la siembra se preparaba a base de una mezcla de 1/3 de turba de gran calidad, 1/3 de arena silíceas limpia y 1/3 de tierra vegetal (estiércol, tierra fina, turba y sílice). Las semillas se depositaban en pequeños surcos y se cubrían con turba muy fina, arena o vermiculita.

Las condiciones óptimas para la obtención de las plántulas están establecidas, necesitan una humedad relativa del 70-80 % y una temperatura de 15-25 °C. El sustrato debía mantenerse con un adecuado grado de humedad, pero sin encharcamientos. Cuando las plantitas se habían desarrollado, se trasplantaban a tiestos de 7,5 a 10 cm de diámetro hasta el momento del trasplante definitivo.

Las semillas de plantas adultas han sido usadas como fuente de material para la conservación de especies amenazadas de *Limonium* (Martín y Pérez, 1992; 1995; Fay, 1993; 1994; Lledó, 1996). Pero no permite obtener plantas

genéticamente iguales (Bienkowska y Norwa, 1994; Wicki, 1992). Además, la temperatura interactúa con la salinidad afectando a la germinación (Khan et al., 2001).

Posteriormente, la propagación convencional de muchos cultivares se realizaba por el corte de brotes con o sin raíces, lo cual llevaba entre 6-8 meses para tener una planta completa, a lo se le añadía sólo un 20-30 % de éxito del proceso (Fujita, 1993).

Actualmente, la técnica que se utiliza para el proceso de producción de *Limonium* es el cultivo *in vitro*, a través de procesos de micropropagación, pues la propagación vegetativa convencional produce un rendimiento limitado, necesita más tiempo y, a veces, da como resultado plantas no homogéneas.

Existen muchos los protocolos descritos para la producción *in vitro* de especies e híbridos de *Limonium*, pudiendo encontrarse entre la bibliografía reciente diversas investigaciones sobre este tema. Esto hace conveniente que además del proceso de propagación *in vitro* que se realice rutinariamente, se disponga de la capacidad para poder investigar en la mejora del proceso.

A pesar de las indudables ventajas que ofrecen las técnicas de micropropagación, su realización también conlleva la realización de una serie de trabajo extra, como el control de la cantidad y calidad de las inflorescencias. Esto se debe a la posible variabilidad que este proceso puede generar en el comportamiento del material vegetal sometido al tratamiento *in vitro*. De hecho, gran parte del proceso de mejora para la obtención de variedades comerciales está encaminado a seleccionar el clon que presente el comportamiento mejor y más estable durante todo el proceso de multiplicación y enraizamiento.

1.3. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Las plantas se pueden multiplicar de dos maneras, vegetativamente (forma asexual, también llamado clonación) y de forma generativa (sexualmente, por semillas).

La multiplicación vegetativa *in vivo* ha jugado durante muchos años un importante papel en la agricultura, como en la producción de bulbos y también en la mejora vegetal, ya que las líneas parentales eran mantenidas y propagadas de esta forma. Pero estos métodos de reproducción resultan insuficientes, por ser demasiado lentos, difíciles, caros o a veces completamente inviables. Así que, con la propagación vegetativa *in vitro* o micropropagación, se salvaban muchos de estos problemas, por ello, se planteó como una nueva herramienta para la multiplicación vegetativa.

Existen diferentes métodos de propagación vegetativa *in vitro*: esquejes de segmentos nodales, ramas axilares, regeneración de órganos adventicios (raíces o vástagos) sobre explantes, formación de órganos adventicios y embriogénesis somática sobre callo, y regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares y protoplastos.

Mediante éstas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas. También se lo conoce como “cultivo *in vitro* de plantas” por realizarse en recipientes de vidrio, aunque en la actualidad también se utilizan otros materiales como el polipropileno.

Para poder llevar a cabo la multiplicación *in vitro* por formación de órganos o embriones adventicios es necesario que la especie tenga capacidad de regeneración, la cual viene determinada por el genotipo, las condiciones ambientales (nutrientes, reguladores de crecimiento y condiciones físicas del medio de cultivo) y el estado de desarrollo de la planta. Esta capacidad se denomina “totipotencia celular” y es característica de las células

meristemáticas que están presentes en distintos órganos de la planta (Haberlandt, 1902).

La regeneración de órganos que no estuvieran presentes en el momento del aislamiento supone un proceso complejo que puede dividirse en dos tipos de respuestas:

1. Una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos (llamados así porque son estructuras similares a un embrión, pero que no se originaron por unión de gametos).
2. Una respuesta morfogenética por la cual se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos).

La primera respuesta se conoce como organogénesis o embriogénesis indirecta (mediada por un estado de callo) mientras que la segunda respuesta se considera organogénesis o embriogénesis directa. Las plantas producidas siguiendo el segundo camino presentan mayor estabilidad genética que las que son obtenidas a partir de callo (D'Amato, 1975, 1977; Lee y Phillips, 1998).

Por tanto, el éxito en la propagación de una planta dependerá de la posibilidad de expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática. A tal fin, debe inducirse primero la desdiferenciación y luego la rediferenciación celular.

La micropropagación presenta una serie de limitaciones debido al gran número de factores que intervienen durante todo el proceso: el material vegetal, condiciones de crecimiento, posición del explante, época del año, nivel endógeno de hormona, tamaño del explante, método de siembra, nutrientes y reguladores de crecimiento en el medio, condiciones ambientales y presencia de otras sustancias en el medio.

Generalmente los explantes obtenidos a partir de los brotes de las plantas en roseta presentan un riesgo muy alto de contaminación. Por tanto, se deben elegir otros explantes que estén más alejados de esta zona. Así, se sabe que se han producido establecimientos exitosos a partir de explantes tomados de inflorescencias que han sufrido reversión a su función vegetativa en *Allium cepa* L. (Dunstan y Short, 1979), *Cybidium goeringii* (Shimasaki y Uemoto, 1991), *Gerbera jamesonii* (Topoonyanont y Dillen, 1988) y *Solanum lycopersicum* Mill. (Compton y Veilleux, 1991).

En las plantas están presentes ciertas sustancias químicas naturales que juegan un papel importante en su crecimiento y desarrollo. Estos compuestos suelen ser activos a concentraciones muy bajas, y se conocen como fitohormonas. Pueden controlar la forma de la planta e intervenir en el crecimiento como respuesta a los factores externos como luz y temperatura. Por otro lado, existen sustancias químicas sintéticas que pueden actuar fisiológicamente de forma similar a estas hormonas, o compuestos que tienen la capacidad de modificar el crecimiento de la planta, estos son denominados reguladores del crecimiento. Hasta hace relativamente poco tiempo se reconocían cinco grupos de este tipo de compuestos: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (George et al., 2008).

Las auxinas y las citoquininas son de lejos los reguladores del crecimiento más importantes usados en el cultivo de tejidos y órganos por su influencia en la morfogénesis (Zhao Hang, 2010).

Las auxinas son muy utilizadas en el cultivo de tejidos, siendo necesarias para la división celular, la elongación de las células y la iniciación de las raíces (de Klerk, 2009). De manera que, a un nivel celular, controlan procesos básicos de división y elongación. Son capaces de provocar el inicio de la división celular por lo que desarrollan la formación de meristemas (Barz et al., 1977).

Las más usadas son el AIA (ácido indol-3-acético), IBA (ácido índol-3-butírico), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y el ANA (ácido 1-

naftalenacético) (George et al., 2008); y son utilizadas con diferentes propósitos, de manera que el 2,4-D se combina con citoquininas para inducir la formación de callos, mientras que el AIA, IBA y ANA son usadas para provocar la rizogénesis sin citoquininas (Davies, 1995).

Las citoquininas provocan la división celular, son muy importantes en la morfogénesis de las plantas, con una gran influencia en los meristemos apicales, actuando concretamente sobre el crecimiento de los brotes y la tasa de multiplicación sobre todo cuando se usan a concentraciones bajas (Margara, 1988; Cline, 1994; Debi et al., 2005). Además, juegan un papel muy importante contra la senescencia y en la reversión de los efectos que producen las auxinas. Normalmente, una concentración elevada de citoquininas bloquea el desarrollo de raíces (Blakesley y Lenton, 1978). Este regulador se transporta acropétalmente (Ongaro y Leyser, 2008).

Las más utilizadas son BA (N⁶-beciladenina), Kinetina, 2-iP (2-isopentetiladenina), ZT (Zeatina) y TDZ (Thidiazuron) (Skoog y Miller, 1957). Pero debido a los altos costes, las citoquininas naturales como el 2-iP y la ZT no se suelen utilizar.

Cuando se han utilizado citoquininas, independientemente del tipo usado, se ha observado hiperhidratación en muchos de los brotes debido al elevado nivel de estas (Igawa et al., 2002; Slater, 2003; George et al., 2008), Además, se sabe que esta hiperhidratación tiene que ver con la rigidez (concentración de agar) del medio de cultivo donde se encuentran estos reguladores (Debergh, 1983). Por otro lado, cuando sube excesivamente la concentración del agente gelificante, baja la respuesta a las citoquininas del medio (Borman y Vogelmann, 1984).

El balance entre las dos clases de reguladores (auxinas y citoquininas) es el desencadenante de la formación de brotes adventicios y de la rizogénesis (Negrutiu et al., 1978). La ratio de hormonas requerida varía considerablemente en función de la respuesta morfogénica que se quiera

obtener del tejido con el que se trabaja (Razdan, 2003). Así se puede observar en la Figura 1.14.

L

Figura 1.14. Concentraciones relativas requeridas de auxinas y citoquininas para el crecimiento y la morfogénesis en cultivos de tejidos de plantas (George et al., 2008).

Las concentraciones requeridas de cada tipo de los reguladores dependerán de la especie, la condiciones de cultivo y de otros compuestos usados, e incluso de la variedad (George et al., 2008); la interacción entre las dos clases de reguladores es bastante compleja, y más de una combinación de estas sustancias puede producir óptimos resultados (Skoog y Miller, 1957).

El uso extendido de la clonación *in vitro* se debe a una serie de ventajas que se indican a continuación (Pierik, 1975; Van Assche, 1983; Gebhard et al., 1983; Kunneman-Kooij, 1984):

1. La multiplicación *in vitro* es más rápida que la propagación *in vivo*.
2. Existen especies que solamente pueden ser propagadas *in vitro*.
3. El crecimiento de las plantas propagadas *in vitro* es más vigoroso.
4. La multiplicación *in vitro* consigue plantas libres de enfermedades.

5. Se necesita una cantidad pequeña de material para iniciar el cultivo *in vitro*.
6. La propagación *in vitro* supone un ahorro en espacio, concretamente de invernaderos.
7. Control de las condiciones de cultivo, lo que permite diseñar el calendario de producción de esquejes, eliminando el efecto estacional y tener una producción homogénea todo el año.
8. Las plantas son cultivadas con su propio sistema radical, por tanto, no es necesario el injertado, ahorrando mano de obra.

Por otro lado, el clonado *in vitro* también presenta desventajas:

1. La estabilidad genética es débil. Es la llamada variación somaclonal.
2. Algunas características que presentan las plantas obtenidas *in vitro* pueden ser poco convenientes *in vivo*, como el exceso de ramas laterales o fases juveniles de la planta.
3. Dificultad para la transferencia de las plantas de los tubos de ensayo al suelo.
4. Control intensivo sobre patógenos cuando se realiza la transferencia al suelo, por excesiva sensibilidad.
5. Pérdida de capacidad de regeneración de las plantas *in vitro* por la repetición de subcultivos reiterados.
6. Dificultad para poder realizar el aislamiento de un explante estéril.
7. Gastos elevados por uso de gran cantidad de mano de obra (Takayama et al., 1986), que redonda sobre el precio del esqueje.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, las características deseables para conseguir un cultivo *in vitro* de éxito son:

1. Estabilidad genética, con ausencia de mutaciones.
2. Material libre de enfermedades para producir plantas libres de patógenos.
3. Transferencia relativamente fácil del tubo de ensayo al suelo.

4. Mantenimiento de la capacidad de regeneración a lo largo de los subcultivos.
5. Metodología para la propagación *in vitro* no demasiado complicada.
6. Debe ser económicamente viable.

Por otro lado se deben remarcar las ventajas que tiene usar la propagación *in vitro* desde el punto de vista del mejorador vegetal:

1. Se puede lanzar comercialmente una variedad mucho más rápido.
2. Con el cultivo *in vitro* se pueden obtener más rápido pequeños clones que pueden usarse como parentales para la producción de híbridos (F1).
3. Se pueden obtener con facilidad mutantes durante el proceso de inducción de vástagos adventicios.
4. Es útil para tener un banco de genes (material almacenado libre de enfermedades).
5. Se puede usar en la manipulación genética con regeneración de plantas a partir de protoplastos y células.
6. Existen plantas que deben ser mantenidas y multiplicadas vegetativamente para no perder sus características específicas.

El cultivo de tejidos de plantas se puede definir como el cultivo de tejido de plantas extraídos del cuerpo de un parental (planta madre) en condiciones estériles en un medio de cultivo que contiene los nutrientes orgánicos e inorgánicos usuales, reguladores de crecimiento y vitaminas (de Klerk, 2009).

Tradicionalmente el cultivo de tejidos de plantas es un proceso que se desarrolla siguiendo 5 pasos (George et al., 2008):

1. Selección y preparación de la planta madre.
2. Iniciación: establecimiento del cultivo en condiciones asépticas.
3. Multiplicación: producción de los posibles propágulos.
4. Enraizamiento: preparación para el crecimiento en su ambiente natural.
5. Transferencia al ambiente *ex vitro*.

En los últimos 50 años, el cultivo de tejidos ha llegado a ser una importante herramienta usada en agricultura, siendo las aplicaciones en las que puede usarse la micropogación las siguientes (Ingels, 2001):

- Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción.
- Propagación masiva de clones específicos, especialmente desarrollados por mejoradores que buscaban plantas para introducir en los mercados.
- Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año evitando ciclos de producción estacional.
- Mantenimiento de stock de plantas libres de virus y enfermedades.
- Producción de semillas sintéticas.
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal).
- Obtención de metabolitos secundarios.
- Preparación de plantas madre para producir las semillas de nuevos híbridos.
- Mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas).
- Germinación de semillas.
- Producción de haploides.
- Estudios fisiológicos diversos.

La propagación clonal por cultivo *in vitro* constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura (Paek y Ma, 1996), usándose en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales (Hildebrandt y Harney, 1983; Einset y Alexander, 1985; Gabryszewska, 1989; Gabryszewska y Warabieda, 1992; Waldenmaier y Bünemann, 1991; Skrzypczak, 1992; Refouvelet et al., 1998; Refouvelet y Daguin, 2000; Scholten, 1998; Popowich y Filipenya, 2000; Charlebois y Richter, 2004; Jacobsone et al., 2006; Nestorowicz et al., 2006; Oprea y Duta, 2008; Cui et al., 2009). Además, abre nuevas áreas de investigación, permitiendo resolver los problemas de los métodos convencionales y

establecer protocolos rápidos de multiplicación para plantas a escala comercial (Pacheco, 2001; Gabryszewska, 2011).

El uso de las técnicas de cultivo *in vitro* ha sido en algunos casos controvertido, debido a lo que se refiere a los posibles cambios genéticos (variación somaclonal) producidos a partir de estos procesos (González-Benito y Martín, 2011), lo que contradice la opinión de otros autores que indican que la inducción de una alta mutación puede contribuir a recuperar la diversidad genética (Bramwell, 1990) obteniendo nuevas variedades.

El cultivo de órganos y tejidos ha conseguido que muchas plantas ornamentales hayan encontrado un lugar en el mercado, pues su producción es rápida, con gran uniformidad y eliminando enfermedades. Además, permite el almacenamiento durante grandes periodos de tiempo. (Wilson et al., 2000). Así, han surgido en el mundo laboratorios de cultivo de tejidos vegetales desde 1996, que están ya cerca de cultivar dos mil géneros, especies o cultivares de plantas, ya sea en laboratorios de estamentos oficiales (312) o de empresas comerciales (193) (López y Perán, 2000; Laimer y Rucker., 2003).

Estas técnicas han sido testadas como un método bueno y eficiente para la conservación de especies amenazadas, porque muchas de las plantas pueden ser obtenidas a partir de un mínimo de material original y conseguir un bajo o ningún impacto sobre las poblaciones salvajes establecidas (Wochok, 1981; Iriondo y Pérez, 1990; Fay, 1992, 1994; Martín y Pérez, 1995; Amo-Marco e Ibañez, 1998; Mercuri et al., 1999; Francisco-Ortega et al., 2000; Savona et al., 2009; Kaninski, et al., 2012).

1.4. El cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum*: antecedentes y situación actual

En el cultivo de tejidos de *L. sinuatum* se han utilizado para su micropropagación como material de partida yemas axilares e inflorescencias inmaduras (Miyamoto, 1993). También se han utilizado como explantes

segmentos nodales en medio suplementado con BA tanto para *L. sinuatum* (Harazy et al, 1985) como para *L. estevei* (Martín y Pérez, 1992). Por otro lado, para *L. perezii* se ha conseguido la multiplicación *in vitro* a partir de brotes obtenidos en medios con ZT que provenían de protoplastos derivados de cultivos celulares (Kunitake y Mii, 1990).

Los segmentos nodales se describieron como el explante más adecuado para el establecimiento *in vitro* de *L. parvibracteam* (Lledo et al., 1996); las yemas de la parte basal de los escapos flores se utilizó con *L. insigne*, *L. santapolense* o *L. virgatum* (Lledó et al., 1995). También se han utilizado las semillas como material de partida en *L. duforii*, *L. carthagenense*, *L. catalaunicum*, *L. dichotomum*, *L. gibertii* (Martín y Pérez, 1995), y *L. thiniense* (Lledó et al., 1996).

En *Limonium sinuatum* altas concentraciones de BA y ANA producían callos en las plantas cultivadas *in vitro*, mientras que bajas concentraciones de BA daban lugar a brotes y altas tasas de multiplicación (Takahashi et al., 1997). En ocasiones llegaron a aparecer síntomas anormales como oxidación y vitrificación que fueron controlados con la concentración adecuada de regulador y con el tipo y concentración del agente gelificante (Wetzstein et al., 1994).

En algunas ocasiones los meristemas de inflorescencia de algunas especies pueden ser forzados a volver temporal o permanentemente a su función vegetativa debido a algún fenómeno fisiológico (Bernier, 1992). Esta posibilidad también ha sido explorada en caso de inflorescencias maduras de híbridos de *Limonium*, encontrándose que, incluso en etapas avanzadas del desarrollo de la inflorescencia, los segmentos nodales derivados de la misma pueden ser un material idóneo para iniciar el proceso de miopropagación (Topoonyanont et al, 2000).

Además, también se ha usado en la mejora de variedades de esta especie la realización de cruces, aunque no todos los llevados a cabo han tenido

éxito, y entre ellos cabría destacar el híbrido producido entre *L. sinuatum* y *L. perezzi* realizado con rescate de embriones (Morgan et al., 1998).

Diferentes protocolos de micropropagación se conocen para diferentes especies de *Limonium* (Butcher et al., 1986; Ovideo y Guevara, 1988; Ruíz, 1990; Lledó et al., 1994; Morgan et al., 1998), que tienen importancia comercial como *L. sinuatum* o “Estáctico” (Harazy, 1985). O para especies en peligro de extinción en la Península Ibérica con el objetivo adicional de conservar la biodiversidad (Martín y Pérez, 1995; Amo-Marco e Ibañez, 1998), como *Limonium carvanillessi*, que es otra especie endémica y amenazada de pequeñas áreas costeras levantinas (Aguilera et al., 1994). Siguiendo esta línea también se evaluó la propagación vegetativa *in vitro* de híbridos de *Limonium* (Mercuri et al., 1999).

En la micropropagación convencional en *Limonium sinuatum* se producían pérdidas de plantas debido a la contaminación microbiana y al pobre crecimiento de las plantas *in vitro* (Kozai, 1990; Lees, 1994), al igual que un bajo porcentaje de supervivencia durante la fase de aclimatación *ex vitro* en invernadero (Desjardins et al., 1995; Kozai y Zobayed, 2000).

Con el uso de estas metodologías, un alto porcentaje de vitrificación (hiperhidricidad) trae consigo una disminución en la cantidad de material micropropagado como consecuencia de la deficiente diferenciación celular que acompaña a esta anomalía (Gaspar, 1995). La vitrificación fue observada por varios autores como una anomalía fisiológica en procesos de cultivo de tejidos, caracterizada por una apariencia vidriosa en brotes hiperhidratados con hojas translúcidas que mostraron una reducción de las tasas de multiplicación y, eventualmente, podían dar lugar a la muerte del material vegetal (Bhojwani y Razdan, 1996; Zimmerman, 1984). Esto era ocasionado por los bajos niveles de cera depositada en la cutícula, bien sea por una humedad alta en el ambiente del explante o por inhibición de su biosíntesis, inducida por los regímenes de reguladores del crecimiento (elevadas concentraciones de citoquininas) y bajas concentraciones del agente gelificante o fuente de carbono (sacarosa) necesarias en la

regeneración vegetal (Strafford y Warren, 1991; Wetzstein et al., 1994). La sacarosa reduce, probablemente por un proceso físico, el potencial osmótico en el medio de cultivo, lo que trae como consecuencia una disminución del potencial hídrico, y por consiguiente menor disponibilidad de agua para el tejido vegetal, o promueve un metabolismo anormal de los azúcares (Gaspar, 1995).



Figura 1.15. Fases del cultivo in vitro de *Limonium sinuatum*. **(A)** Preacondicionamiento. **(B)** Establecimiento. **(C)** Multiplicación. **(D)** Enraizamiento. **(E)** Aclimatación. **(F)** Invernadero en producción.

En la actualidad, la propagación *in vitro* de *Limonium* es un proceso establecido en diferentes fases (Fig. 1.15.), donde cada una de ellas se ve influenciada por distintos factores:

➤ Fase 0: Selección y preacondicionamiento vegetal:

En esta fase es donde se seleccionarán las variedades que servirán de material de partida para el resto de etapas. Las plantas madre seleccionadas han recibido los tratamientos adecuados (riegos, fertilizantes y productos fitosanitarios) para asegurar el vigor de las mismas, ya que éste es un aspecto clave en el éxito posterior del proceso de propagación *in vitro*.

➤ Fase 1: Establecimiento *in vitro*:

En esta fase se deben considerar diferentes factores que determinarán el éxito del establecimiento como son: explante de partida, posición en la planta, método de desinfección, época de recolección, medio de cultivo y reguladores de crecimiento. Lo que se busca en esta fase es un buen crecimiento y desarrollo sin contaminaciones.

➤ Fase 2: Multiplicación:

Se busca conseguir una alta tasa de propagación sin perder estabilidad genética. El material que se ha obtenido en la fase establecimiento se somete a diferentes métodos de multiplicación: cultivo de yemas axilares, proliferación de vástagos adventicios o embriogénesis somática. Los factores que se deben tener en cuenta en esta fase son: el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento y las condiciones ambientales (temperatura, iluminación, concentración de CO₂ y humedad relativa).

➤ Fase 3: Enraizamiento:

En esta fase se preparan los vástagos o plantas para transferirlos al suelo, lo que implica la inducción de la formación de raíces. Durante este periodo,

para conseguir las condiciones óptimas de enraizamiento, se deben considerar estos factores: concentración de nutrientes en el medio de cultivo, tipo y concentración de auxinas (IBA y ANA), propiedades físicas del medio (agar, carbón activo, vermiculita y otras) y condiciones ambientales (temperatura, iluminación, concentración de CO₂ y humedad relativa).

➤ Fase 4: Adaptación-aclimatación:

Esta última fase comprende la transferencia de las plantas desde el tubo de ensayo a los sustratos (turba, perlita y vermiculita) para el establecimiento de las mismas. Además, en esta fase las plántulas deberán estar protegidas con una cubierta de plástico para evitar su deshidratación. Dicha cubierta se retirará progresivamente hasta aclimatarlas a las condiciones medioambientales que se encuentran en el invernadero.

1.5. La importancia comercial de *Limonium sinuatum*

Limonium sinuatum es una especie muy apreciada por tener buen mercado tanto para flor seca como para flor en fresco (Wilfret y Raulston., 1975), por su atractivo cáliz de larga duración y diversidad en coloración (Salinger, 1991).

En la mejora de *L. sinuatum* se ha buscado la producción de híbridos interespecíficos con otras especies de *Limonium* para mejorar las características del cultivo, sobre todo en lo referente a variedades que sean resistentes a enfermedades (Igawa et al., 2002).

Cada año, por distintas compañías, se venden varios millones de plantas jóvenes de *Limonium sinuatum* a productores de todo el mundo, siendo los principales mercados Holanda, Japón, Colombia, Israel, España e Italia.

En el año 2007 en la empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümmer Orange se pone en marcha un programa de mejora y obtención de variedades de *Limonium sinuatum*, cuyos principales objetivos serían el mercado japonés,

el colombiano y el europeo, sobre todo la zona mediterránea con Italia y, principalmente, España (Figura 1.16.).

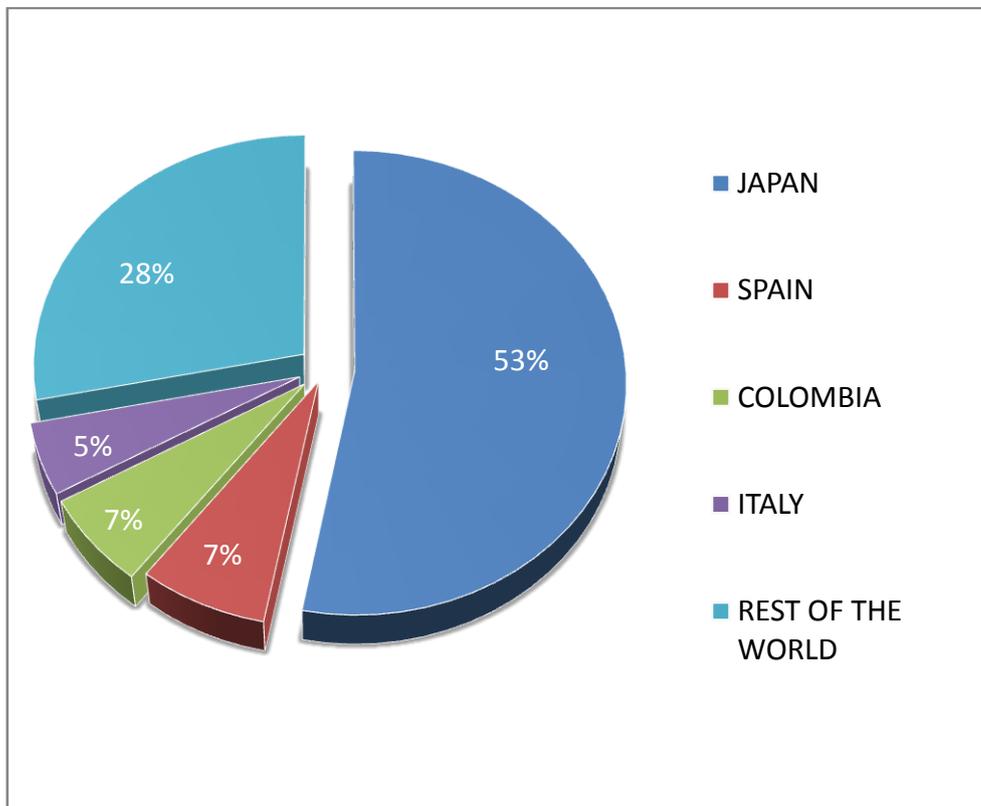


Figura 1.16. Mercado mundial de *Limonium sinuatum* 2015. Fuente: Dpto. Comercial de Barberet & Blanc, S.A.

Simultáneamente, también se añadieron a este programa de mejora *Limonium Hybrid* y *Limonium New Hybrid*, de manera que se ponen en funcionamiento para las tres especies todos los medios disponibles para la obtención de nuevos cultivares. Sin embargo, esto no resulta tarea sencilla y a la hora de ver la rentabilidad, primero se debieron evaluar los problemas que presentaba llevar a cabo esta apuesta.

En el año 2009 se paró el proceso de mejora de variedades de *L. Hybrid* y *L. New Hybrid* debido a las ventajas e inconvenientes referidos (Tabla 1.2.) y al porcentaje tan pequeño que suponía la venta de plantas con relación a *Limonium sinuatum* (Tabla 1.3.). De manera que a partir de este momento todo el esfuerzo se centró en esta última especie.

Tabla 1.2. Ventajas e inconvenientes de la realización del plan de mejora en *Limonium spp*

Fuente: Dpto. Comercial de Barberet & Blanc, S.A.

Cultivo	Ventajas	Inconvenientes
<i>Limonium sinuatum</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. El mercado de <i>L. sinuatum</i> es 10 veces mayor que el <i>L. Hybrid</i>. 2. Se produce en zonas donde la protección de las variedades es muy buena. 3. El 75% del mercado es de un color, concretamente azul oscuro o violeta. 4. Su periodo productivo está entre 9-18 meses y las plantaciones se renuevan cada año. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Necesita reintroducirse cada año, puesto que las plantas pierden capacidad de propagación 2. Inestabilidad genética de las plantas <i>in vitro</i>. 3. Costes de multiplicación altos, alta tecnificación y cualificación de la mano de obra. Encarece el precio de las plantas. 4. Dos tipos de mercado: producción de verano y de invierno. Dos criterios de selección.
<i>Limonum Hybrid</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. La variedad número uno pertenece al grupo: Misty. 2. Mercado pequeño. No se ha hecho mucha mejora de variedades. 3. Plantas muy estables. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Solamente hay dos colores: blanco y azul. 2. Despide mal olor. 3. Plantas muy fuertes, duran casi tres años. Baja renovación de plantaciones.
<i>Limonium New Hybrid</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Amplio abanico de colores. 2. Dificil mantener anualmente el suministro de plantas 3. Alta tasa de renovación de plantaciones. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mercado pequeño. Solamente en Japón, Holanda e Italia. 2. Requerimientos altos de tratamiento de frio.

Tabla 1.3. Estimación del posible mercado de *Limonium* realizada para el año 2010. Fuente: Dpto. Comercial de Barberet & Blanc, S.A.

Cultivo	Hectáreas plantadas al año	Número de plantas al año	Importancia (%)
<i>Limonium sinuatum</i>	190	6.600.000	83
<i>Limonum Hybrid</i>	25	400.000	5
<i>Limonium New Hybrid</i>	25	880.000	12

Con las decisiones adoptadas se buscaba mantener el liderazgo en el mercado español, ya que se contaba con la ventaja del clima tan idóneo para esta especie en el sureste de España, permitiendo obtener variedades para la producción invernal con pocas o ningunas necesidades de tratamiento de frío para favorecer la inducción floral. Además, se marcó el objetivo de aumentar las ventas en Colombia, puesto que las condiciones de cultivo allí eran similares a las de aquí, de forma que las variedades seleccionadas también eran aptas para Sudamérica.

Paralelamente, se buscaba mantener y aumentar la posición en el mercado japonés. Y esto fue posible gracias a que en 2010 comienza la colaboración de otra empresa del grupo, Fukukaen, también mejoradora de esta especie. El objetivo era tener la red de distribución mundial más importante de *Limonium sinuatum*.

Para lograr todos los objetivos planteados se debía mejorar el proceso de propagación *in vitro*. Por tanto, era tan importante realizar buenas selecciones *in vivo* en el invernadero como mantener la estabilidad de las variedades durante el proceso de micropropagación. Esto era posible gracias, por un lado a la alta tecnificación *in vitro* y personal cualificado de la empresa, y por otro a que las dos actividades se realizaban de manera simultánea y cercana, de forma que el flujo de información era constante para poder retroalimentar ambos procesos.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es desarrollar protocolos de micropropagación y conservación de material vegetal *in vitro* de *Limonium sinuatum* que puedan ser directamente aplicados en las actividades productivas de la empresa donde se realizan los ensayos y que supongan una mejora sustancial sobre los métodos ya implementados en ella.

La oportunidad de esta acción se basa en el alto valor añadido de la especie objeto de estudio, en la buena adaptación de esta a las condiciones ambientales de la zona y en las dificultades que se encuentran en su propagación por métodos convencionales y en las posibilidades que ofrece el cultivo *in vitro*.

Para este trabajo se proponen los siguientes objetivos parciales:

- Establecer un método alternativo de establecimiento *in vitro* a partir de explantes diferentes a la inflorescencia inmadura.
- Analizar el efecto que tiene la temperatura en la fase de multiplicación en el alargamiento de los periodos entre subcultivos.
- Analizar el efecto de la iluminación durante la fase de multiplicación.
- Establecer la concentración y tipo de auxina óptimos durante la fase de enraizamiento.
- Evaluar el comportamiento del material cultivado *in vitro*, y sometido a los tratamientos enumerados en los puntos anteriores, mediante la determinación de una serie de parámetros bioquímicos seleccionados por su carácter de marcadores de estrés.
- Determinar la calidad agronómica y comercial de la producción en invernadero de las plantas obtenidas *in vitro* a través de cada uno de los tratamientos aplicados.
- Analizar la mejora de los rendimientos y el impacto económico que las propuestas derivadas del presente trabajo puedan suponer, haciendo especial hincapié en la reducción de los costes de producción por la puesta en marcha de procesos más eficaces y la optimización del uso de los recursos materiales y humanos de la empresa.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Variedades estudiadas de *Limonium sinuatum*

En la realización de este trabajo se ensayaron cuatro variedades de *Limonium sinuatum* que presentaban características susceptibles de ser mejoradas en el proceso de propagación *in vitro* (Tabla 3.1.). Las variedades se eligieron por ser las más representativas de los diferentes colores que formaban parte de la gama del catálogo de la empresa. Así, estas variedades fueron: SN8946 de color violeta, SN9013 color blanco, SN9000 de color amarillo y SN9001 de color rosado (Fig. 3.1.).

Una vez seleccionado el material vegetal de partida en el invernadero, se estudiaron todas las fases del proceso de micropropagación (establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación), intentando optimizar los parámetros estudiados de forma concreta para cada una de las variedades.

Tabla 3.1. Características *in vitro* de las variedades seleccionadas de *Limonium sinuatum*. Fuente: Dpto. I+D+i de Barberet & Blanc, S.A.

Variedad	Inducción y establecimiento	Tasa de propagación	Enraizamiento	Aclimatación
SN8946	Muy bueno	Muy buena	Malo	Buena
SN9013	Malo	Mala	Bueno	Buena
SN9000	Malo	Buena	Malo	Buena
SN9001	Bueno	Buena	Bueno	Muy buena

Por último, se evaluó la calidad del material vegetal obtenido, tanto del punto de vista bioquímico (a nivel de compuestos: pigmentos, antioxidantes, etc.), como en su aspecto comercial, analizando los requerimientos de cada uno de los mercados a los que podían destinar estas plantas. De ahí, que fuera importante conocer las características comerciales de las variedades estudiadas (Tabla 3.2.).

Tabla 3.2. Características comerciales de las variedades de *Limonium sinuatum*. Fuente: Catálogo 2016 de Barberet & Blanc, S.A.

Variedad	Color	Producción	Precocidad	Tamaño de flor	Altura
SN8946	Violeta	Buena	Buena	M	Buena
SN9013	Blanco	Buena	Buena	L	Muy buena
SN9000	Amarillo	Buena	Buena	L	Regular
SN9001	Rosa	Buena	Regular	L	Regular

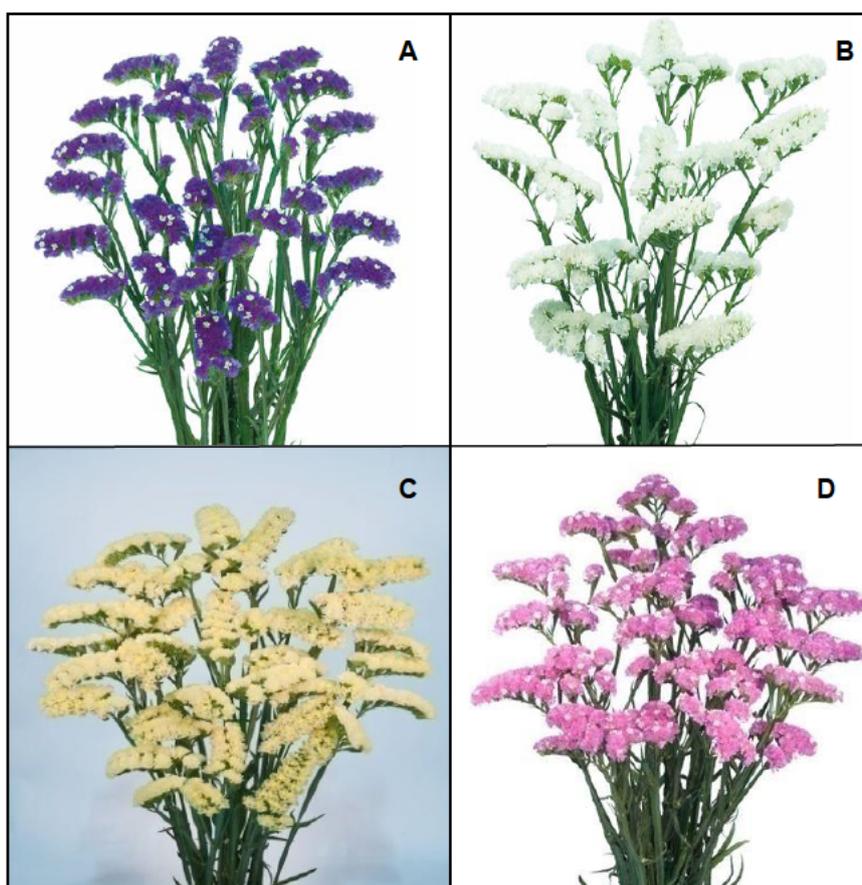


Figura 3.1. Variedades estudiadas de *Limonium sinuatum*. (A) SN8946. (B) SN9013. (C) SN9000. (D) SN9001.

3.2. Efecto de la distancia de la planta al foco emisor de luz durante la fase de multiplicación

3.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Para realizar este ensayo se utilizó como material de partida brotes adventicios de plantas ya establecidas *in vitro* de las cuatro variedades descritas en apartados anteriores. Las plantas habían pasado como mínimo por tres periodos de subcultivo en la fase de multiplicación.

Para la fase de multiplicación se usó un medio de cultivo con la concentración de macro- y micronutrientes descrita por Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementado con un 4 % (p/v) de sacarosa, y N⁶-benciladenina (BA) a una concentración de 0,2 mg/L. Posteriormente, el pH de los medios se ajustó a 5,8 y se añadió agar a una concentración del 0,9 % (p/v). El medio se distribuyó en tubos de ensayo de vidrio de 145 mm de alto y 25 mm de diámetro (10 ml/tubo), los cuales se autoclavaron a 104 kPa y a 121 °C durante 20 min.

Todos los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 22 °C (21,4 °C), con una humedad relativa del 45-50 % (46,1 %), con una concentración de 700-800 ppm (780 ppm) de CO₂ y un fotoperiodo de 16 horas de iluminación y 8 horas de oscuridad con una intensidad lumínica, flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF), que varió según el tratamiento.

Al finalizar el periodo de multiplicación las plantas pasaron a la fase de enraizamiento en la misma cámara de cultivo, es decir, estaban en las mismas condiciones de temperatura, humedad relativa, fotoperiodo e iluminación que el tratamiento control. Aquí la diferencia radicaba en el medio de cultivo. Este medio también era un MS modificado, pero que contenía como regulador de crecimiento ácido 1-naftalenacético (ANA) a una concentración de 1,25 mg/L para favorecer la rizogénesis. En estas condiciones permanecieron 40 días. Transcurrido este tiempo, las plantas se trasplantaron en jiffies de fibra de coco de 3 cm de diámetro, pasando a la

fase de aclimatación, a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 70 %. La humedad relativa fue disminuyendo a medida que la cutícula de la planta se endurecía. Esta fase tuvo una duración de 30 días. A continuación se le dio un tratamiento de frío, que consiste en que las plantas están totalmente en oscuridad a una temperatura de 4 °C durante dos semanas, para favorecer la precocidad. Posteriormente, estas plantas se trasplantaron a macetas de 22 cm de diámetro de polietileno negro, rellenas con fibra de coco, para proceder a su cultivo en invernadero durante un periodo que comprendió entre 5-6 meses.

3.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Para estudiar el efecto de la distancia de la fuente emisora de la luz se establecieron tres tratamientos dispuestos escalonadamente (Fig. 3.2.1.). En el T-1 (control, por ser la distancia habitualmente utilizada) las plantas estaban situadas a 20 cm de distancia, en el T-2 y T-3 estaban a 16 cm y 11 cm, respectivamente. Esta distancia se midió desde el medio de cultivo de los tubos de ensayo hasta el tubo fluorescente. Se hizo una correlación entre la distancia al foco emisor y el flujo de fotones fotosintéticos (FFF) (Tabla 3.2.1.), utilizando un luxómetro ECO LX1010B (Fig. 3.2.2.), donde además se tomaron datos para otra tres distancias al foco emisor, concretamente a 2, 8 y 18 cm. A continuación, se usó el coeficiente obtenido de la empresa OSRAM para los tubos fluorescentes utilizados en este estudio, modelo L36W/865 LUMILUX Cool Daylight, con el fin de realizar la conversión de lux a flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF). Estas luminarias presentan una distribución espectral de radiación (Figura 3.2.4.) considerada apta para el cultivo *in vitro*. Además, las características técnicas de las fuentes de luz utilizadas pueden consultarse en la tabla 3.2.2., donde se observa que no difieren mucho de otras usadas en ensayos similares (Pacheco, 2001).

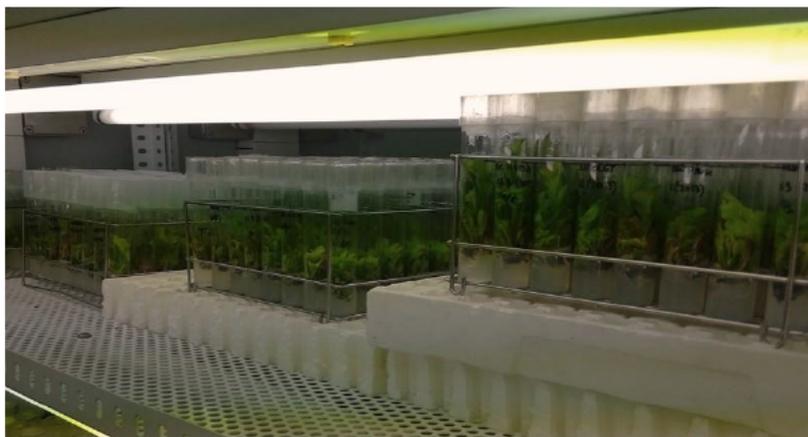


Figura 3.2.1. Disposición de los tratamientos durante el ensayo de iluminación.



Figura 3.2.2. Luxómetro Eco LX1010B.

En este ensayo se cultivaron 25 plantas por variedad, tratamiento y subcultivo. Se realizaron tres subcultivos, es decir, tres repeticiones independientes. Cada subcultivo tuvo una duración de 35 días.

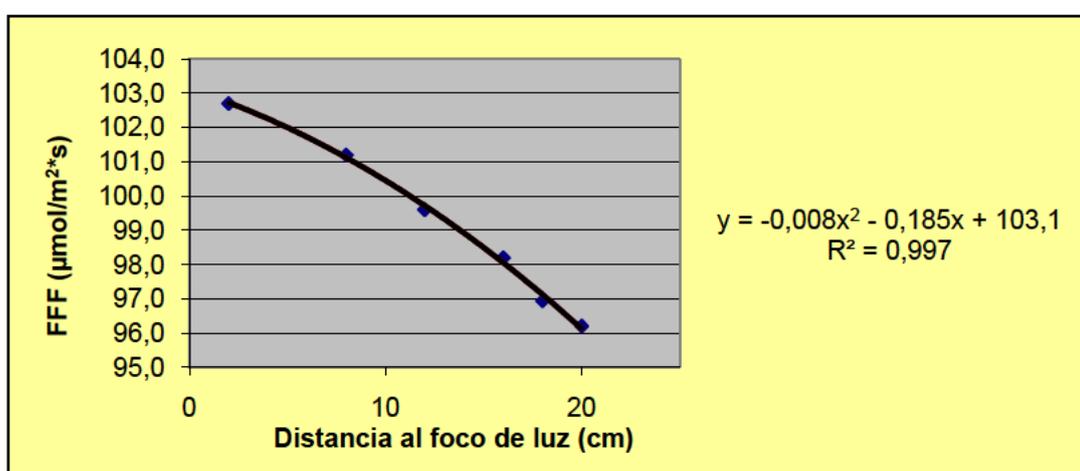


Figura 3.2.3. Correlación entre la distancia de la planta al foco emisor de luz y el flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF).

Tabla 3.2.1. Iluminación recibida por el material vegetal en los distintos tratamientos.

Tratamiento	Distancia (cm)	FFF ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)
T-1	20,0	96,2
T-2	16,0	98,2
T-3	11,0	100,2

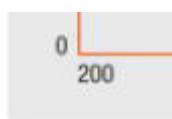


Figura 3.2.4. Distribución espectral de la radiación de las lámparas utilizadas en las cámaras de cultivo *in vitro*. Fuente: Osram.

Tabla 3.2.2. Datos técnicos de los tubos fluorescentes OSRAM L36/865 LUMILUX. Fuente: Osram.

Flujo luminoso (lm)	Temperatura de color (K)	Tono de luz	Vida útil (h)
3250	6500	865	20000

Con el fin de comprobar si la reducción de la distancia entre los tubos de cultivo y la fuente de luz alteraba significativamente la temperatura en el interior de los primeros, se procedió a registrar la temperatura de la cámara de aire de los tubos situados a cuatro distancias de las luminarias durante 24 h (Fig. 3.2.5.). Para ello se insertaron termopares (sondas tipo K, modelo TP-

K01, TES Electrical Electronic Corp.) en los tubos de cultivo a través de orificios practicados en los tapones. Las sondas de temperatura se acoplaron a un registrador 4KDATLOG (TC Direct) que fue programado para adquirir tres medidas de temperatura por hora (Sánchez-Sánchez et al., 2018).

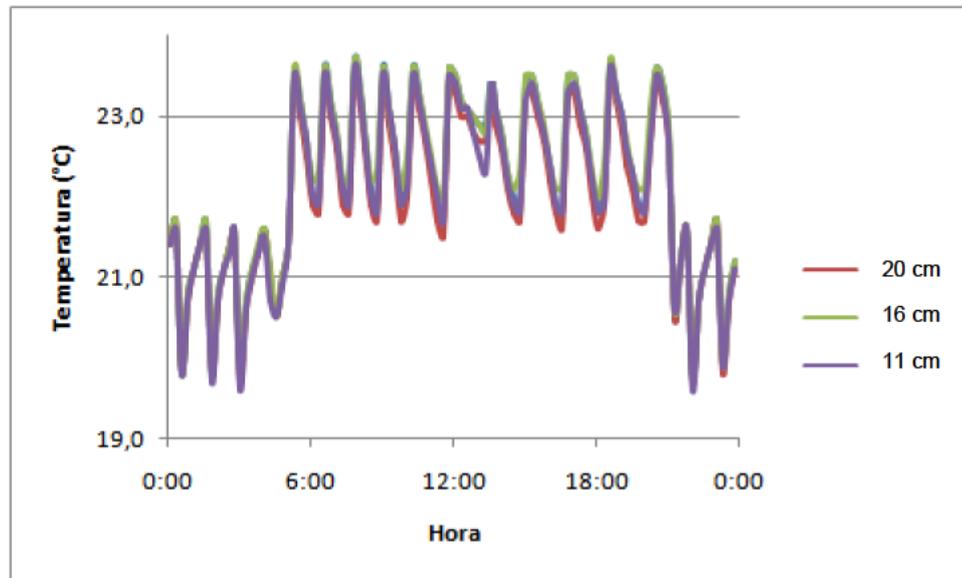


Figura 3.2.5. Variación diurna de la temperatura en la cámara aérea de los tubos de cultivo en función de su distancia a la fuente de luz. Las distancias indicadas se establecen tomando como referencia la superficie superior de los tapones de los tubos.

Otros autores usaron diseños similares en su ensayos, utilizando una exposición a luz directa bajo una intensidad de 2000 lux con fluorescentes de la marca Sylvania Growlux de 40 vatios (vida 20.000 horas, flujo luminoso 1650 lúmenes) que irradiaban energía adicional en las regiones de rojo-lejano (700-800 nm), roja (600-700 nm) y azul (400-500 nm) (Pacheco, 2001).

3.2.3. Parámetros de producción *in vitro*: multiplicación

Al final de cada periodo de subcultivo (35 días) se tomaron medidas del crecimiento de las plántulas, de la tasa de propagación de los cultivos, del peso fresco (PF) y del peso seco (PS).

Para medir el crecimiento de las plantas se tomó como referencia el medio de cultivo, y se midió la longitud hasta la hoja que más sobresalía dentro del tubo de ensayo, a esta medida se le restó la inicial que tenía el brote al comienzo del subcultivo. Las medidas se tomaron en centímetros.



Figura 3.2.6. Medición del crecimiento de las plantas durante la fase de multiplicación.

El método para conocer la tasa de propagación consistió en contar los brotes adventicios que podían dar lugar a nuevas plantas, es decir, el número de plantas o brotes obtenidos por tubo de ensayo.

A la hora de calcular el peso fresco (PF) la planta se sacaba del tubo de ensayo y se limpiaba el callo, y se eliminaban de restos no deseados como hojas secas. Se pesaba en la báscula de precisión el contenedor, se taraba de nuevo y se pesaba la planta otra vez. A continuación la planta permaneció dentro de una estufa a 60 °C durante 72 horas. Pasado este tiempo se volvía a pesar el contenedor y planta juntos, de manera, que si a esta cantidad se le restaba el peso del contenedor medido anteriormente, se obtenía el peso seco (PS).

3.3. Efecto de las bajas temperatura durante la fase de multiplicación

3.3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Para realizar este ensayo se utilizaron plantas establecidas en cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum* de las variedades SN8946, SN9013, SN9000 y SN9001 que se encontraban en la fase de multiplicación. Las plantas habían pasado previamente por tres periodos de subcultivo.

En esta fase de multiplicación se utilizó un medio de cultivo con la concentración de macro y micronutrientes descrita por Murashige y Skoog (1962) y suplementado con un 4 % (p/v) de sacarosa, y N⁶-benciladenina (BA) a una concentración de 0,2 mg/L. Posteriormente, el pH de los medios se ajustó a 5,8 y se añadió agar a una concentración del 0,9% (p/v). El medio se distribuyó en tubos de ensayo (10 ml/tubo) y éstos se autoclavaron a 104 kPa y a 121 °C durante 20 min.

Se utilizaron en esta etapa tres cámaras de cultivo con las que contaba la empresa, y que se mantuvieron a diferentes temperaturas. La cámara de cultivo N^o 1 estuvo a 4^o C, la cámara N^o 2 a 12 °C y la cámara N^o 3 a 22 °C.

Al finalizar el periodo de multiplicación las plantas pasaron a la fase de enraizamiento dentro de la cámara de cultivo N^o 3. Aquí la diferencia radicaba en que el medio, también un MS modificado, contenía como regulador de crecimiento ANA (1,25 mg/L) que favorecía la rizogénesis. En este medio de cultivo permanecían durante 40 días. Al pasar este tiempo, las plantas se aclimataron en un invernadero colocándolas en jiffies de fibra de coco a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa de 70 %, la cual se iba disminuyendo a medida que la planta se iba endureciendo. Esta fase de aclimatación tenía una duración de 30 días. Posteriormente, estas plantas se trasplantaron a macetas de 22 cm de diámetro de polietileno negro llenadas con fibra de coco para proceder a su cultivo en invernadero durante un periodo de 5-6 meses.

3.3.2. Tratamientos y diseño experimental

Para estudiar el efecto de la temperatura se establecieron cinco tratamientos para cada una de las variedades. En el tratamiento 1 (T-1) las plantas se mantuvieron a 4 °C durante tres meses, en el tratamiento 2 (T-2) las plantas estuvieron a 12 °C durante tres meses, y en el tratamiento 3 (T-3) las plantas se subcultivaron a 22 °C por un periodo de un mes (control). Se cultivaron 20 plantas por variedad y tratamiento con tres repeticiones, es decir, se realizaron tres subcultivos. Una vez que las plantas pasaron esta fase de bajas temperaturas, se evaluó la vuelta a condiciones estándar de multiplicación en la cámara de cultivo de 22 °C con el objetivo de compararlas con las plantas que no habían sufrido ningún tratamiento de frío. Se realizaron otros dos tratamientos, el tratamiento 4 (T-4) se refiere a las plantas que estuvieron previamente a 4 °C (T-1) y pasaron a ser subcultivadas a una temperatura de 22 °C, y el tratamiento 5 (T-5) hace referencia a las plantas que primero estuvieron en la cámara de 12 °C y después pasaron a la de 22 °C. La realización de este ensayo permite comparar por un lado las plantas subcultivadas a baja temperatura con respecto a las condiciones control o estándar, y por otro ver si hay diferencias entre los brotes que han pasado por los tratamientos de frío y el control, una vez que vuelven a las condiciones de multiplicación a 22 °C.

3.3.3. Parámetros de producción *in vitro*: multiplicación

En la fase de multiplicación se tomaron medidas del crecimiento a los 40 y 90 días, para T-1 y T-2, y a los 35 días para T-3, T-4 y T-5; y de la tasa de propagación al finalizar cada periodo de subcultivo. También se midieron el peso fresco (PF) y el peso seco (PS).

Para medir el crecimiento de las plantas se tomó como referencia el medio de cultivo y se midió la longitud hasta la hoja que más sobresalió dentro del tubo de ensayo, a esta medida se le restó la longitud inicial que tenía el brote. Las medidas se tomaron en centímetros.

El método para conocer la tasa de propagación consistió en contar los brotes adventicios que podían dar lugar a nuevas plantas, es decir, el número de plantas o brotes por tubo de ensayo.

A la hora de calcular el peso fresco (PF) la planta se sacaba del tubo de ensayo y se limpiaba el callo y se eliminaban de restos no deseados como hojas secas. Se pesaba en la báscula de precisión el contenedor, se taraba de nuevo y se pesaba la planta. A continuación la planta permanecía en una estufa a 60 °C durante 72 horas. Pasado este tiempo se volvía a pesar contenedor y planta juntos, y si a esta cantidad se le restaba el peso del contenedor determinado anteriormente, se obtenía el peso seco (PS).

3.4. Efecto de la concentración y tipo de auxina durante la fase de enraizamiento

3.4.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Para realizar este ensayo se utilizaron plantas multiplicadas en cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum* de las variedades SN8946, SN9013, SN9000 y SN9001 que estaban preparadas para pasar a la fase de enraizamiento.

En esta fase de enraizamiento se utilizó un medio de cultivo con la concentración de macro- y micronutrientes descrita por Murashige y Skoog (1962) y suplementado con un 3 % (p/v) de sacarosa, y diferentes concentraciones de ácido indol-3-butírico (IBA) y de ácido 1-naftalenacético (ANA). Posteriormente, el pH de los medios se ajustó a 5,8 y se añadió agar a una concentración del 0,9 % (p/v). El medio se distribuyó en tarros de vidrio (7,5 cm de diámetro por 12 cm de alto) y en recipientes de polipropileno (10,7 cm de largo por 9,4 cm ancho y por 5,5 cm de alto), aportando 90 ml/tarro o recipiente, y éstos se autoclavaron a 104 kPa y a 121 °C durante 20 min. Todos los cultivos se mantuvieron a 22 °C, con una humedad relativa entre 40-50 % (46,1 %), un FFF de 96,2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, una concentración de CO₂ entre 700-800 ppm (780 ppm) y un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Las plantas permanecieron en este medio de cultivo permanecieron durante 40 días. Al pasar este tiempo, las plantas se aclimataron en un invernadero colocándolas en jiffies de fibra de coco de 3 cm de diámetro a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa de 70 %, la cual se iba disminuyendo a medida que la planta se iba endureciendo. Esta fase de aclimatación tenía una duración de 30 días. Posteriormente, estas plantas se trasplantaron a macetas de 22 cm de diámetro de polietileno negro rellenas con fibra de coco como sustrato, para proceder a su cultivo durante 5-6 meses en condiciones *ex vitro* en los invernaderos de la empresa.

3.4.2. Tratamientos y diseño experimental

Para estudiar el efecto de la concentración y tipo de auxina (IBA y ANA) se establecieron cuatro tratamientos para cada una de las variedades. En el tratamiento 1 (T-1) el medio de cultivo tenía una concentración de 1 mg/L de IBA (control), el tratamiento 2 (T-2) tenía 3 mg/L de IBA en el medio de cultivo, el tratamiento 3 (T-3) llevaba 5 mg/L de IBA y el tratamiento 4 (T-4) contenía una concentración de 1,25 mg/L de ANA.

En este ensayo se cultivaron 20 plantas por variedad y tratamiento. Se realizaron tres repeticiones. La duración de las fases de enraizamiento, de aclimatación y de cultivo fue de 35 días, de 30-45 días y de 5-6 meses, respectivamente.

3.4.3. Parámetros de producción *in vitro*: enraizamiento y aclimatación

En la fase de enraizamiento se tomaron medidas del porcentaje de esquejes enraizados a los 20 y 35 días. También se midió el peso fresco (PF) y el peso seco (PS) de la parte aérea de la planta de cada uno de los tratamientos.

Se consideraba que una planta tenía raíces cuando se observaban los primordios radiculares (2-3 raicillas por planta).

A la hora de calcular el peso fresco (PF) la planta se sacaba del tubo de ensayo y se limpiaba el callo y se eliminaban de restos no deseados como hojas secas. Se pesaba en la báscula de precisión el contenedor, se taraba de nuevo y se pesaba la planta. A continuación la planta permanecía en una estufa a 60 °C durante 72 horas. Pasado este tiempo se volvía a pesar contenedor y planta juntos, y a esta cantidad se le restaba el peso del contenedor medido anteriormente, para obtener el peso seco (PS) del material vegetal.

En fase de aclimatación se anotaron datos del porcentaje de plantas supervivientes, plantas que superaron esta fase en relación al número de plantas iniciales, cuando finalizó el periodo de 30 días.

3.5. Inducción de brotes y regeneración de plantas a partir de explantes de hojas jóvenes

3.5.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

El material de partida se tomó de plantas adultas de las cuatro variedades descritas y cultivadas en invernadero, de las que se seleccionaron hojas jóvenes de 2 cm de longitud. Estas hojas se esterilizaron siguiendo un protocolo que comprendió un lavado con agua y jabón, seguido con una inmersión durante 15 minutos en una disolución de hipoclorito sódico al 1 %. A continuación se pusieron durante un 1 minuto en alcohol de 70° y por último, se enjuagaron tres veces con agua destilada y estéril. De estas hojas se tomaron explantes de 5 x 5 mm incluido el peciolo. Estos explantes se pusieron en un medio de cultivo MS modificado conteniendo diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento, BA y TDZ, solos o combinados con auxinas (ANA). El pH del medio se ajustó a 5,8 y la concentración de agar fue del 4% (p/v). El medio se repartió en tubos de ensayo, donde se echaban unos 10 mL/tubo, tras autoclavarse a 121 °C y 104 kPa. Estas plantas se matuvieron durante 60 días en unas condiciones de 22 °C, una humedad relativa de 45-50 %, con una intensidad luminosa de

96,2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, una concentración de CO_2 entre 700-800 ppm y un fotoperiodo de 16 horas de luz.

Al finalizar el periodo de establecimiento, las plantas de *Limonium sinuatum* pasaron a la fase de multiplicación. Los nuevos brotes adventicios se subcultivaron a una temperatura de 22 °C, la humedad relativa era del 55 %, y el fotoperiodo fue de 16 horas de iluminación y 8 horas de oscuridad. El medio de cultivo era un medio MS modificado con una concentración determinada de BA (0,2 mg/L) y el periodo de subcultivo duró unos 35 días.

Cuando finalizó el periodo de multiplicación las plantas continuaron el proceso de propagación, pasando entonces a la fase de enraizamiento dentro de la misma cámara de cultivo. Aquí la diferencia radicaba en que el medio, también un MS modificado, contenía como regulador de crecimiento ANA (1,25 mg/L) que favoreció la rizogénesis. En este medio de cultivo permanecieron durante 40 días. Al pasar este tiempo, las plantas se aclimataron en un invernadero colocándolas en jiffies de fibra de coco a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa de 70 %, la cual se iba disminuyendo a medida que la planta se iba endureciendo. Esta fase de aclimatación tenía una duración de 30 días. Posteriormente, estas plantas se trasplantaron a macetas de 22 cm de diámetro de polietileno negro con fibra de coco como sustrato, para proceder a su cultivo en invernadero por un periodo que abarcó entre 5-6 meses.

3.5.2. Tratamientos y diseño experimental

Cada experimento se repitió tres veces de forma independiente, se pusieron 25 explantes por tratamiento y variedad. El ensayo constaba del tratamiento 1 (T-1) que contenía una concentración de N⁶-benciladenina (BA) de 0,25 mg/L como citoquinina (control, es el que se usa normalmente como medio de establecimiento), el tratamiento (T-2) que tenía 0,25 mg/L de BA más 0,5 mg/L de ácido indol-3-acético (AIA), el tratamiento 3 (T-3) que llevaba Thidiazuron (TDZ) a una concentración de 0,25 mg/L, y el tratamiento 4 (T-4) que llevaba 0,25 mg/L de TDZ más 0,5 mg/L de AIA.

3.5.3. Parámetros de producción *in vitro*: establecimiento.

Durante la realización del ensayo se realizó un seguimiento de los explantes que presentaron contaminación por microorganismos (hongos y bacterias). Al final del mismo, se contaron aquellos que habían dado lugar a callo, a los cuales se les volvió a dar una descarga de hormona. Se prepararon de nuevo los medios de cultivo, y se subcultivaron esos callos. Cuando finalizó el segundo periodo, a los 60 días, se contó el número de callos donde se habían formado plantas, las cuales pasaron a la fase de multiplicación.

3.5.4. Parámetros de producción *in vitro*: multiplicación

Al final de cada periodo de subcultivo se tomaron medidas del crecimiento de las plántulas, de la tasa de propagación de los cultivos, del peso fresco (PF) y del peso seco (PS).

Para medir el crecimiento de las plantas se tomó como referencia el medio de cultivo y se midió la longitud hasta la hoja que más sobresalió dentro del tubo de ensayo, a esta medida se le restó la inicial que tenía el brote. Las medidas se tomaron en centímetros.

El método para conocer la tasa de propagación consistía en contar los brotes adventicios que podían dar lugar a nueva plantas, es decir, el número de plantas o brotes por tubo de ensayo.

A la hora de calcular el peso fresco (PF) la planta se sacaba del tubo de ensayo y se limpiaba el callo, y se eliminaban de restos no deseados como hojas secas. Se pesaba en la báscula de precisión el contenedor, se taraba de nuevo y se pesaba la planta. A continuación la planta permaneció dentro de una estufa a 60 °C durante 72 horas. Pasado este tiempo se volvía a pesar el contenedor y planta juntos, de manera, que si a esta cantidad se le restaba el peso del contenedor medido anteriormente, se obtenía el peso seco (PS).

3.6. Determinación de metabolitos y de la capacidad antioxidante en los extractos metanólicos

Las muestras obtenidas al finalizar cada uno de los subcultivos fueron congeladas y homogeneizadas con nitrógeno líquido y almacenadas en el congelador de -80 °C. Posteriormente se llevó a cabo la determinación de la concentración de diferentes compuestos y de la capacidad antioxidante presentes en el material vegetal a partir de extractos metanólicos usando los protocolos que se describen a continuación. Todas las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo utilizando un lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific).

3.6.1. Obtención de los extractos metanólicos

Las muestras (alrededor de 100 mg) se incubaron en 1 mL de metanol. La extracción se realizó a una temperatura de 70 °C durante 15 min, en la oscuridad y con agitación ocasional. Tras esto se realizó una centrifugación a 15000 x g_{max} durante 10 min. Los sobrenadantes obtenidos fueron almacenados a -80 °C hasta la realización de los análisis correspondientes.

3.6.2. Determinación de pigmentos fotosintéticos

La determinación de clorofilas a y b se realizó midiendo la absorbancia de los extractos metanólicos, por cuadruplicado, a 653 y 666 nm. Las concentraciones de pigmentos fotosintéticos se calcularon aplicando las ecuaciones descritas por Lichtenthaler y Wellburn (1983).

3.6.3. Determinación de fenoles solubles totales

La determinación de fenoles solubles totales se llevó a cabo según el método descrito por Everette et al. (2010). Para ello se preparó una mezcla de 25 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu y 380 μ L de agua MilliQ, a la que se le añadió 20 μ L de muestra y tras mezclar e incubar 5 min en la oscuridad, a temperatura ambiente, 75 μ L de Na₂CO₃ al 20 %. Después de 2 horas de

incubación a 25 °C, en la oscuridad, se midió la absorbancia de los medios de reacción a 750 nm, por cuadruplicado.

Para la estimación de las concentraciones de compuestos fenólicos solubles se realizó una recta de calibrado utilizando ácido gálico en un rango de concentraciones entre 0 y 3000 µM.

3.6.4. Determinación de flavonoides solubles totales

La determinación de flavonoides solubles totales se llevó a cabo mediante el ensayo del cloruro de aluminio (Kim et al., 2003a). Para ello, se emplearon 37,5 µL del extracto a los que se le añadieron 37,5 µL de MeOH, 75 µL de Na₂NO₂ al 5 % y 75 µL de AlCl₃ al 10 %. Tras la adición de cada uno de estos reactivos a la mezcla, ésta fue agitada mediante un vórtex. Los medios de reacción se incubaron durante 6 min en la oscuridad, a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 125 µL de NaOH 1 N, se agitó utilizando el vórtex y se midió la absorbancia de los medios de reacción a 415 nm. A efectos de cuantificación se construyó una recta de calibrado utilizando quercetin-3-rutinósido (rutina), en un rango de concentraciones comprendido entre 0 y 2000 µM.

3.6.5. Determinación del contenido de almidón

El precipitado obtenido de la extracción metanólica del material vegetal se lavó tres veces con metanol y se incubó a 80 °C en 1 mL de tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0 durante 30 min. Después de enfriar en hielo, se añadieron a los tubos 3 unidades de α-amilasa y 17,8 unidades de pululanasa y se incubó la mezcla a 37 °C durante 16 h. A continuación los medios de digestión se incubaron a 100 °C en un bloque calefactor (Thermoblock, Falc.) durante 5 min y, después de enfriar a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12000 x g_{max} durante 10 min. Finalmente, el contenido de azúcares en el sobrenadante se determinó mediante el método de la antrona. Para esto último, 50 µL de los sobrenadantes, diluidos convenientemente, se mezclaron con 250 µL de reactivo de antrona (0,2 %

de antrona en ácido sulfúrico concentrado) preparado el mismo día de las determinaciones. La mezcla se incubó en un bloque calefactor a 80 °C, durante 30 min y con agitación ocasional. A continuación, los tubos se enfriaron y se determinó la absorbancia a 625 nm de los medios de reacción. La concentración de azúcares solubles se calculó por comparación con una curva patrón realizada con glucosa en un rango de concentraciones de 25-500 µg/mL.

3.6.6. Determinación de la capacidad antioxidante total

Para la determinación de la capacidad antioxidante total de los extractos metanólicos se empleó el método del ABTS. El radical catión ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico); (ABTS^{•+}) fue generado por la oxidación de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM) durante 16 h, de acuerdo con lo descrito por Katalinic et al. (2006). La disolución de trabajo de ABTS^{•+} fue preparada a diario por dilución de la disolución inicial con etanol absoluto hasta alcanzar un valor de absorbancia a 734 nm de 0,7 (Katalinic et al., 2006). A continuación, 20 µL de las muestras o estándares se mezclaron con 250 µL de la disolución de trabajo de ABTS^{•+} en microtubos Eppendorf tubes y éstos se incubaron en la oscuridad, a temperatura ambiente durante 1 h. Tras este periodo de incubación se determinó la absorbancia de la mezcla de reacción a 734 nm. Los resultados se expresaron como µmol equivalentes de ácido gálico por g de peso fresco y como µmol equivalentes de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) por g de peso fresco, para lo cual se construyeron las correspondientes curvas de los estándares.

3.6.7. Determinación del poder reductor/antioxidante férrico (FRAP)

Este método, desarrollado inicialmente para medir la capacidad antioxidante en muestras de plasma (Benzie y Strain, 1996), se emplea para disponer de una medida simple y directa de la capacidad reductora/antioxidante de extractos vegetales. El ensayo FRAP mide el cambio de absorbancia a 593

nm debido a la formación de un complejo Fe(II)-tripiridiltriazina de color azul a partir de una sal incolora de Fe(III).

El ensayo se realizó según lo descrito por Katalinic et al. (2004). Para ello se preparó una disolución de trabajo de reactivo compuesta por la mezcla de 10 volúmenes de tampón fosfato (a temperatura ambiente) 0,3 M, pH 3,6, 1 volumen de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM y 1 volumen de cloruro férrico 20 mM. A 300 μ L de esta mezcla se le añadieron 30 μ L de agua MilliQ y 10 μ L de extracto. Los medios de reacción se incubaron durante 30 min a 37 °C y, una vez transcurrido este tiempo, se registró la absorbancia a 593 nm.

Los resultados se expresaron como μ mol de Fe(II) por g de peso fresco del material vegetal. Para ello se construyó una recta patrón con disoluciones de concentración conocida de FeSO₄, comprendidas entre 0 y 100 μ M.

3.7. Análisis cromatográficos

3.7.1. Análisis del patrón de compuestos fenólicos por HPLC

Todos los análisis fueron llevados a cabo con un sistema Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography) modelo Alliance 2695, compuesto por un módulo de separación modelo 2695, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de fotodiodo modelo 2996. Los datos fueron procesados con el programa informático Empowers 2002.

Para la cromatografía en fase reversa se empleó una columna Luna C-18 (Phenomenex) de 4 mm de diámetro interno x 250 mm de longitud y 5 μ m de tamaño de partícula. Las separaciones se realizaron a una temperatura de 40 °C, tal y como se describen en Xu et al. (2017). La fase móvil utilizada consistió en una disolución de ácido fórmico al 0,1 % en agua (disolución A) y metanol puro (B) que fueron combinados de acuerdo con el siguiente gradiente: 0 min, 95 % (A); 15 min, 80 % (A); 20 min, 70 % (A); 25 min, 63 % (A); 40 min, 60 % (A); 60 min, 50 % (A) y vuelta a las condiciones iniciales en

5 min. La velocidad de flujo de la fase móvil se fijó en 0,8 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 μ L.

La asignación a sub-familias de fenoles de los compuestos presentes en las muestras se llevó a cabo por comparación de las propiedades espectrales y tiempos de retención de los picos mayoritarios de las muestras con esas mismas características en los siguientes compuestos estándar: ácido cafeico, ácido gálico, catequina, plumbagina y rutina. La cuantificación de estos compuestos individuales, así como la de compuestos relacionados, se llevó a cabo por comparación de las áreas de los picos seleccionados con las correspondientes a los de concentraciones crecientes de los estándares mencionados. La cuantificación se realizó a partir de los cromatogramas obtenidos a 270, 280, 325 y 360 nm para el ácido gálico, derivados de ácido gálico y catequinas, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides, respectivamente.

3.7.2. Análisis de metabolitos primarios por GC-MS

El análisis por GC-MS se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Badr et al. (2011). Para ello los extractos metanólicos se secaron por medio de una corriente de nitrógeno y el residuo seco se redisolvió y derivatizó durante 90 min a 30 °C en 80 μ L de una disolución 20 mg/mL de clorhidrato de 1-metoxiamina en piridina, seguido por un tratamiento a 37 °C durante 30 min con 80 μ L de MSTFA [N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida]. Para la separación de metabolitos se utilizó un sistema cromatográfico Agilent Technologies 6890 Network GS System, equipado con un detector de masas Agilent 5973. La separación de los compuestos se realizó sobre una columna capilar Agilent CP8982 VF17ms, con un flujo de 1,0 mL/min de helio como gas portador. La temperatura del horno se programó desde 60 °C hasta 310 °C y el volumen de inyección fue de 1,0 μ L en modo split (1:25). El programa de análisis consistió en un inicio a 70 °C (durante 5 min) con subida hasta 310 °C en incrementos de 5 °C/min, manteniendo esta temperatura máxima durante 1 min adicional. Los espectro de masas se registraron en el rango de 50-600 m/z y los picos se identificaron manualmente por comparación de los espectros de masas y el tiempo de

retención experimentales y los obtenidos a partir de patrones externos comerciales (ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, glucosa, glutamina, m-inositol, prolina y sacarosa) y de aquellos que aparecen en la base de datos NIST 2011.

3.8. Condiciones de cultivo en invernadero

Tras el proceso de aclimatación las plantas se pasaron a macetas de 22 cm de diámetro donde se colocó una planta por maceta. La densidad de plantas en el invernadero fue de 20-25 por m² y el ciclo de cultivo duró entre 20 y 28 semanas.

El sustrato utilizado fue ligero y con buena retención de humedad, con un pH comprendido en 5,5 y 6,2 y con capacidad de aireación. Para elaborarlo se usaron las siguientes proporciones, como base un 70 % de fibra de coco, como material de alta retención de humedad 30 % de turba. También tuvo buen resultado usar 100 % de fibra de coco, pues presentó una buena retención y permitió una buena aireación de las raíces.

Los riegos no fueron abundantes pues la planta no requiere mucha agua, con lo que se regó cuando se observaba el sustrato casi seco, aproximadamente cada dos o tres días. Se aportó la fertilización descrita en la Tabla 3.8.1. por cada 1000 litros de agua de dos a tres veces por semana.

Tabla 3.8.1. Cantidad de abono aportado por cada 1000 litros de agua para *Limonium sinuatum* según estado fenológico.

Periodo fenológico	Abonado					
	Nitrato amónico (g)	Nitrato potásico (g)	Ácido fosfórico (ml)	Fosfato monopotásico (g)	Sulfato de magnesio (g)	Micro (g)
Plantación- floración	420	450	120	---	100	60
Floración- recolección	300	---	---	580	100	60

Regularmente, se intercaló un riego con agua sola entre los riegos con abono.

Limonium sinuatum es una planta que requiere una alta intensidad luminosa por lo que tolera el sol directo. De hecho, lo mejor es utilizar un invernadero donde no haya sombreado, pues este puede provocar un excesivo alargamiento de los tallos lo que se traduce en una falta de rigidez de los mismos. Así, la temperatura óptima de cultivo oscila entre 15-25 °C, la planta deja de trabajar por debajo de 8 °C y por encima de 30 °C.

La temperatura del invernadero estaba entre 28-30 °C, con una humedad relativa del 38-40 %, y la concentración de CO₂ osciló entre las 400 y 450 ppm. Para mantener esta temperatura constante el invernadero estaba dotado con un sistema de enfriamiento evaporativo (Fig. 3.8.1.) y ventilación cenital.



Figura 3.8.1. Sistema de climatización de invernaderos en la empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dummen Orange. **(A)** Sistema de enfriamiento evaporativo. **(B)** Ventilación cenital. **(C)** Malla de sombreado. **(D)** Calefactor.

Para la inducción floral es necesaria una diferencia como mínimo de 10 °C entre el día y la noche. Si esta diferencia es mayor de 25 °C la planta tampoco inducirá a flor permaneciendo en estado vegetativo.

Se realizó un pinzado pues en el estatices, como en otras muchas plantas, existe una relación directa entre el volumen de hojas en la base y la producción. Por tanto, era conveniente eliminar los primeros tallo florales para inducir el crecimiento de la roseta basal, además estos primeros tallos suelen quedarse cortos y con escaso valor comercial.

La humedad relativa, principalmente durante la floración, se mantuvo baja, para prevenir enfermedades de pudrición, por lo que era básica una buena ventilación del invernadero.

Estas plantas podían ser atacadas por plagas comunes, tales como mosca blanca, pulgón, minador, babosas y otras. También son susceptibles a enfermedades fúngicas, tales como la cenicilla, botritis y pudrición de raíz. Por esto, se recomiendan aplicaciones preventivas de fungicidas si las condiciones ambientales son de alta humedad relativa.

Así los tratamientos fitosanitarios, siguieron un calendario mensual que se aplicaba de manera preventiva (Tabla 3.8.2.).

Tabla 3.8.2. Tratamiento fitosanitario mensual para *L. sinuatum*.

Ciclo mensual	Materia activa	Dosificación
Primera semana	Iprodione 50%	100 ml / 100 L
	Metiocarb 50%	150 g / 100 L
Segunda semana	Carbendazima 8% +	200 ml / 100 L
	Clortalonil 45%	
	Tuflubenzuron 15%	100 ml / 100 L
Tercera semana	Iprodione 50%	100 ml / 100 L
	Azadiractin 3,2%	50 ml / 100 L
Cuarta semana	Mancozeb 64% +	200 g / 100 L
	Mefenoxam 4%	

3.9. Parámetros de producción comercial

Las plantas trasplantadas en macetas en el invernadero se cultivaron durante aproximadamente 6 meses. A los dos meses se le practicaba el pinzamiento del tallo principal para promover el crecimiento vegetativo de la planta. A partir del tercer-cuarto mes comenzaba a producir tallos comercialmente válidos, y fue entonces cuando se tomaron muestras de los cortes de la producción para medir los parámetros de calidad agronómica y comercial (Fig. 3.9.1.) que sirvieron de referencia para la valoración de estos tallos producidos por las diferentes plantas derivadas de los distintos tratamientos ensayados en la fase de cultivo *in vitro* y cultivadas en el invernadero. Así, para cada uno de los tratamientos se plantaron entre 10-15 plantas por tratamiento y variedad, y se procedió a la recogida de datos de al menos tres cortes durante el ciclo de producción.

Tabla 3.9.1. Parámetros estudiados durante la fase de cultivo y producción en invernadero.

Parte a estudiar de la planta	Parámetro	Valoración del parámetro				
Planta	Producción	Nº de tallos/corte y planta				
Espiga	Longitud de espiga (cm)	<5	5-10	>10		
	Grosor de espiga (cm)	<3,5		>3,5		
	Verticalidad de la espiga	<45°	45° - 70°	>70°		
	Apertura del cáliz	Abierto		Estrecho		
Tallo	Altura de tallo (cm)	< 60	60-70	70-80	80-90	>90
	Espigas por tallo	Nº de espigas/tallo				
	Ramificaciones tallo	Nº de ramas/tallo				
	Apertura del tallo	Abierto (> 30°)		Normal (< 30°)		
Vegetación	Volumen de la planta	Excesivo		Normal		
	Presencia de enfermedad	Si		No		



Figura 3.9.1. Medidas de los diferentes parámetros para estudiar la calidad comercial y agronómica de las plantas de *Limonium sinuatum* en invernadero. **(A)** Longitud de la espiga. **(B)** Grosor de la espiga. **(C)** Longitud de tallo (calidad comercial).

3.10. Análisis estadístico

Todos los datos recogidos fueron estudiados realizando un análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa IBM SPSS Statistics (versión 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, US). Los resultados han sido expresados en medias \pm error estándar. Se realizaron comparaciones entre medias muestrales mediante el test de Tukey (HSD) con un nivel de significación $p < 0,05$. Previamente se pasó una prueba para asegurar la homogeneidad de la varianza.

El análisis de componentes principales (PCA) se llevo a cabo para reducir la cantidad de datos y poder interpretarlos en un gráfico bidimensional que explicará la gran proporción de las variaciones. Para el PCA se utilizó el programa CANOCO for Windows v. 4.02 (Ter Braak y Smilauer, 1999) usando los valores por defecto excepto la centralización y estandarización. Se usaron ocho pares de datos ($n=8$, para todos los tratamientos).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la distancia de la planta al foco emisor de luz durante la fase de multiplicación *in vitro*

4.1.1. Crecimiento, tasa de multiplicación, peso fresco y peso seco

El crecimiento en las variedades SN8946 y SN9001 al cabo de los 35 días se vio ligeramente afectado por la cercanía al foco emisor de luz, disminuyendo un poco para el T-3 con respecto al T-1 (Tabla 4.1.1.). Sin embargo, para las otras dos variedades el T-3 fue el tratamiento donde el crecimiento aumentó ligeramente con respecto a T-1 y T-2, no mostrándose diferencias significativas en ninguno de los casos. En esta línea, podría pensarse que las diferencias en intensidad lumínica son demasiado pequeñas como para ver un efecto claro. Sin embargo, se ha descrito que pequeñas diferencias en el flujo de fotones (de 27 a 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en *Achillea millefolium* produjeron una reducción en la longitud de la planta, mientras que incrementos del mismo orden en ese parámetro (de 35 a 45 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) dieron lugar a un aumento en el crecimiento (Alvarenga et al., 2015).

En cuanto a la tasa de multiplicación, se observó que en todas las variedades se mantuvieron los valores entre 1,10 y 1,50 brotes/planta, que son los límites para este parámetro que producían resultados satisfactorios desde el punto de vista productivo. Destacar que en la variedad SN9013 se pudieron ver diferencias significativas entre T-1 y T-2, pero no con T-3 que tendría un valor intermedio. Los valores de la tasa de multiplicación no presentaron diferencias significativas entre tratamientos en el resto de variedades estudiadas. La luz es un factor clave en el desarrollo vegetal y puede afectar de forma significativa a la capacidad de regeneración de las plantas. Así, en ensayos realizados con *Arabidopsis* se ha descrito que la exposición a FFF de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante breves periodos de tiempo, inmediatamente después de llevar a cabo las operaciones de subcultivo, fueron suficientes para afectar negativamente a la regeneración de brotes

(Nameth et al, 2013). A la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio, parece claro que las variaciones en intensidad luminosa ensayadas no afectan de forma notable a la capacidad de regeneración de las variedades analizadas.

Respecto a los datos referidos al peso fresco y al peso seco tampoco pudieron observarse diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las variedades estudiadas (Tabla 4.1.1.). Estos resultados concuerdan con los anteriores y, junto con la observación del material vegetal al principio y al final de los subcultivos (Fig. 4.1.1. a 4.1.6.), refuerzan la idea de que los tratamientos luminosos aplicados no afectan significativamente al crecimiento de los cultivares de *L. sinuatum* estudiados durante la fase de multiplicación del proceso de micropropagación.

Tabla 4.1.1. Parámetros de producción *in vitro* de las variedades estudiadas en la fase de multiplicación sometidas a diferentes intensidades lumínicas.

Variedad	Tratamiento	Crecimiento (cm)	Tasa de multiplicación (brotes/planta)	Peso fresco (g/planta)	Peso seco (g/planta)
SN8946	T-1	5.96 ± 0.78a	1.25 ± 0.03a	1.61 ± 0.47a	0.11 ± 0.03a
	T-2	5.36 ± 0.37a	1.37 ± 0.06a	1.36 ± 0.47a	0.09 ± 0.03a
	T-3	5.01 ± 0.51a	1.25 ± 0.02a	1.51 ± 0.24a	0.09 ± 0.01a
SN9013	T-1	6.37 ± 0.44a	1.24 ± 0.05b	2.15 ± 0.66a	0.14 ± 0.04a
	T-2	6.21 ± 0.43a	1.47 ± 0.03a	2.10 ± 0.08a	0.12 ± 0.01a
	T-3	6.47 ± 0.94a	1.34 ± 0.01ab	1.69 ± 0.25a	0.09 ± 0.02a
SN9000	T-1	2.55 ± 0.35a	1.20 ± 0.06a	1.29 ± 0.32a	0.09 ± 0.03a
	T-2	2.16 ± 0.16a	1.25 ± 0.03a	1.19 ± 0.20a	0.06 ± 0.01a
	T-3	2.63 ± 0.31a	1.27 ± 0.04a	1.55 ± 0.42a	0.09 ± 0.02a
SN9001	T-1	4.47 ± 0.34a	1.21 ± 0.05a	1.33 ± 0.31a	0.09 ± 0.01a
	T-2	3.78 ± 0.95a	1.45 ± 0.10a	1.06 ± 0.17a	0.08 ± 0.01a
	T-3	3.76 ± 0.51a	1.35 ± 0.02a	1.74 ± 0.43a	0.10 ± 0.02a

La existencia de interacciones entre la regulación del desarrollo mediada por la luz y por las citoquininas es bien conocida desde hace tiempo. La luz

induce un aumento en los niveles endógenos de estas hormonas (Zubo et al., 2008) y el crecimiento de las yemas axilares regulado por la intensidad luminosa parece venir determinado por la interacción entre citoquininas, ácido abscísico, auxinas y los niveles de azúcares (Corot et al., 2017). Un bajo nivel de FFF reduciría los niveles de citoquininas circulantes en los tallos e, indirectamente, a través de la reducción de la tasa fotosintética, provocaría una bajada en el contenido de azúcares en el vástago, lo que, junto con el mantenimiento de niveles relativamente altos de ácido abscísico, resultaría en una inhibición del desarrollo de las yemas laterales (Corot et al., 2017). La aplicación exógena de citoquininas en condiciones de baja iluminación podría revertir esta inhibición mediante el incremento de la actividad organogénica del meristemo.

En el presente estudio, los tratamientos lumínicos aplicados podrían ser considerados como de bajo FFF, motivo por el que los medios de cultivo de multiplicación contenían una citoquinina, la BA. Dentro de las citoquininas más usadas en micropropagación, se ha descrito que la kinetina tiene un menor efecto de inducción de brotes que la BA (Razdan, 2003). En todas las variedades estudiadas no se observaron diferencias entre tratamientos, con lo que el medio de cultivo usado, con la concentración de BA aplicada, parece ser adecuado para amortiguar cualquier efecto negativo sobre la proliferación provocado por los menores FFF. Una concentración adecuada de BA es necesaria, por otra parte, para un buen balance entre la tasa de multiplicación y la calidad de los brotes obtenidos (Pierik et al., 1982; Hempel, 1985). En el presente ensayo sólo se usaron citoquininas, mientras que algunos autores afirman que la tasa de multiplicación puede favorecerse si estos reguladores se combinan en el medio con auxinas (Bhojwani y Razdan, 1996). En *Limonium sinuatum* al igual que en otras especies como *Syringa vulgaris* las citoquininas juegan un papel muy importante, pero la fase de multiplicación depende como se ha comentado anteriormente, de otros factores (Charlebois y Richter, 2004; Nestorowicz et al., 2006). También se debe tener en cuenta, por ejemplo, la concentración de sacarosa (azúcares) y de nitrógeno en los vástagos, que podrían dar lugar a intoxicaciones de las plantas cultivadas *in vitro* (Desjardines et al., 2009),

pues en plantas perennes como el limonio, altas concentraciones de azúcares provocaban una bajada en la actividad fotosintética (Hdider y Desjardines, 1995; Jones et al., 1996; Kilb et al., 1997; Serret et al., 1997). Sin embargo, tanto en *Syringa vulgaris* como en limonio el peso fresco subió conforme aumentaba la concentración de azúcares en el medio, y por tanto también la se elevó el contenido de almidón en las plántulas (Gabryszewska, 2011). Otros estudios afirman, que se debe tener en cuenta la interacción entre las citoquininas y el nitrógeno del medio, pues tiene un efecto directo en el metabolismo y desarrollo de las plantas (Sakakibara et al., 2006).

La concentración de BA que se utilizó durante el ensayo no interfirió con los tratamientos planteados, al igual que se ha descrito en *Limonium cavanillesii* Erben cuando la concentraciones de kinetina o 2iP eran altas o las de BA bajas (Amo-Marco e Ibañez, 1998). Algo similar sucedió en especies amenazadas como *L. rigualii* (Lledó et al., 1994), *L. duforii*, *L. santapolense*, *L. furfuraceum* (Lledó et al., 1996) y *L. thiniense* (Lledó et al., 1993). Además, esta concentración no se aumentó, pues se tenía constancia de que al subir el contenido de este regulador se producían anomalías (hiperhidratación) en los brotes (Ziv, 1991; Debergh et al., 1992; Amo-Marco e Ibañez, 1998), tal y como se ha descrito para *L. sinuatum* L. Miller, *L. estevei* y *L. thiniense* (Lledó et al., 1993), *L. duforii* y *L. furfuraceum* (Lledó, 1996). De hecho, si las concentraciones de BA eran muy altas o las de 2iP muy bajas se paraba el desarrollo de los brotes *in vitro* (Harazy et al., 1985, Martín y Pérez, 1995; Lledó y Amo-Marco, 1993). Este hecho podría deberse a que elevadas concentraciones de reguladores del crecimiento pueden provocar variaciones epigenéticas y genéticas en el material vegetal (Waldenmaier y Bünemann, 1991).

Aunque no pudo apreciarse un efecto significativo de los tratamientos lumínicos sobre la multiplicación y el crecimiento de las variedades estudiadas de *L. sinuatum*, no puede descartarse que se produzca alguna respuesta diferencial a nivel celular. Por este motivo, se decidió analizar algunos parámetros bioquímicos que podrían indicar variaciones

metabólicas, especialmente, aquellas relacionadas con la incidencia de cierto nivel de estrés.



Figura 4.1.1. Estado de las plantas al inicio del subcultivo en el tratamiento T-1. Las variedades de izquierda a derecha son SN8946, SN9013, SN9001 y SN9000.



Figura 4.1.2. Estado de las plantas al inicio del subcultivo en el tratamiento T-2. Las variedades de izquierda a derecha son SN8946, SN9013, SN9001 y SN9000.



Figura 4.1.3. Estado de las plantas al inicio del subcultivo en el tratamiento T-3. Las variedades de izquierda a derecha son SN8946, SN9013, SN9001 y SN9000.



Figura 4.1.4. Estado de las plantas al final del subcultivo en el tratamiento T-1. Las variedades de izquierda a derecha son SN9000, SN9013, SN9001 y SN8946.



Figura 4.1.5. Estado de las plantas al final del subcultivo en el tratamiento T-2. Las variedades de izquierda a derecha son SN9001, SN9013, SN8946 y SN9000.



Figura 4.1.6. Estado de las plantas al final del subcultivo en el tratamiento T-3. Las variedades de izquierda a derecha son SN9013, SN8946, SN9001 y SN9000.

4.1.2. Concentración de clorofilas a, b y totales

La concentración de clorofila a en los vástagos de las diferentes variedades descendió a medida que aumentaba el flujo de fotones, de manera que la menor concentración del pigmento se encontró para el T-3. Entre las variedades estudiadas, la SN8946 fue la que mostró valores más elevados de clorofila a, siendo similares los datos para SN9000 y algo menores para las otras dos. Destacar que, con la excepción de SN9013, sí se observaron diferencias significativas entre el T-1 (Control) y los demás tratamientos en todas las variedades (Tabla 4.1.2.).

Los niveles de la clorofila b, mostraron la misma tendencia que la clorofila a en todas variedades, apareciendo una bajada en la concentración a medida que aumentaba la iluminación recibida por las plantas. Se encontraron diferencias significativas del tratamiento T-1 con respecto a T-2 y T-3 para SN8946 y SN9001, y del T-1 y T-2 respecto a T-3 en las variedades SN9013 y SN9000.

Para las clorofilas totales sucedió lo mismo, la tendencia era igual que para los otros dos parámetros anteriores, y se observaron diferencias significativas entre el T-3 y los otros dos tratamientos.

En cuanto la relación clorofila a/b se mantuvo el mismo patrón que en las clorofilas totales, presentado los valores más bajos en el tratamiento que recibió más iluminación (T-3) y mostrando diferencias con los demás tratamientos.

La concentración de clorofila juega un papel muy importante en la absorción de luz durante la fotosíntesis (Xiao y Kozai, 2006), con lo que la concentración de los dos tipos de clorofilas podría estar relacionada con el crecimiento descrito en el apartado anterior, llegando a observarse que los niveles más altos de clorofilas totales se corresponden con un crecimiento mayor.

La concentración de BA se mantuvo igual en todos los tratamientos y subcultivos de las variedades estudiadas, y dentro de los márgenes idóneos ya establecidos para *Limonium sinuatum*, pues si estas son excesivamente elevadas pueden producir desordenes fisiológicos y morfológicos (hiperhidricidad y mutaciones) que llevaría consigo un descenso en la concentración de clorofilas (George, 1996). Además, las propiedades físicas del medio también se mantuvieron iguales, pues se sabía que la concentración de clorofilas estaba influenciada por estas propiedades (Guimaraes et al., 1999).

Para evitar la clorosis durante la fase de multiplicación, la adición de FeEDDHA pudo ayudar, incrementando el contenido de clorofilas y de hierro, pero sin tener un efecto en el número de brotes (Kim et al., 2003b).

Los niveles de pigmentos fotosintéticos pueden ser considerados un marcador de la vitalidad de la planta, de manera que los niveles de clorofilas pueden dar una estimación indirecta del funcionamiento fotosintético. Así, la

relación clorofila a/b se ha relacionado con la composición proteica y estructura del cloroplasto, con la distribución del nitrógeno entre los complejos proteicos fotosintéticos y con el ambiente luminoso en el que se encontraban las muestras estudiadas (Fritschi y Ray, 2007).

Tabla 4.1.2. Concentración de clorofilas a, b y totales durante la fase de multiplicación *in vitro* en el ensayo de iluminación.

Variedad	Tratamiento	Clorofila a (microg/g PF)	Clorofila b (microg/g PF)	Clorofilas totales (microg/g PF)	Relación clorofila a/b
SN8946	T-1	173.94 ± 2.98a	167.57 ± 2.93a	341.52 ± 4.52a	1.04 ± 0.02a
	T-2	130.54 ± 2.78b	138.79 ± 2.91b	269.34 ± 5.42b	0.94 ± 0.01b
	T-3	124.87 ± 2.55b	130.73 ± 1.09b	255.60 ± 3.49b	0.95 ± 0.04b
SN9013	T-1	147.75 ± 1.79a	146.63 ± 1.02a	294.37 ± 2.62a	1.01 ± 0.01a
	T-2	139.04 ± 4.94a	145.35 ± 3.14a	284.39 ± 7.94a	0.95 ± 0.02b
	T-3	125.53 ± 1.16b	131.59 ± 0.77b	257.13 ± 1.71b	0.95 ± 0.01b
SN9000	T-1	170.41 ± 2.24a	158.72 ± 1.09a	329.13 ± 3.19a	1.07 ± 0.01a
	T-2	156.90 ± 4.32b	155.11 ± 2.05a	312.01 ± 6.34a	1.01 ± 0.01a
	T-3	140.49 ± 3.11c	142.48 ± 3.68b	282.97 ± 6.64b	0.99 ± 0.01b
SN9001	T-1	141.54 ± 5.61a	146.02 ± 2.56a	287.56 ± 7.89a	0.96 ± 0.03a
	T-2	121.99 ± 1.86b	128.71 ± 0.97b	256.71 ± 2.79a	0.95 ± 0.01a
	T-3	105.31 ± 1.15c	120.08 ± 1.59b	225.39 ± 2.68b	0.88 ± 0.00b

Los resultados obtenidos en relación con el contenido total de clorofila en respuesta al aumento de la intensidad luminosa están de acuerdo con lo esperado, ya que a mayor disponibilidad de luz (y a igualdad de otros factores) se necesitaría una menor concentración de pigmentos para mantener una tasa fotosintética determinada. Sin embargo, las variaciones observadas en la relación de clorofila a/b parecen apartarse de lo comúnmente descrito en la bibliografía. En efecto, a mayor FFF sería esperable que el tamaño de la antena del fotosistema II se redujera, lo que conduciría a un aumento de la relación clorofila a/b. De hecho, Kitajima y Hogan (2003) observaron una correlación negativa entre esta relación entre pigmentos y el contenido total de clorofilas y propusieron la relación clorofila a/b como un indicador de la distribución del nitrógeno foliar, teniendo en cuenta que esta relación es, a su vez, un reflejo de la relación existente entre

los niveles de centros de reacción del fotosistema II y los de complejos de antena.

Aun así, los resultados obtenidos en el presente trabajo son similares a los descritos en plantas micropropagadas de *Whitania somnifera* (Lee et al., 2007) y *Alocasia amazonica* (Jo et al., 2008) que indican que con valores altos de FFF se producía cierto grado de estrés en el material vegetal. De acuerdo con Blackburn (2007), los niveles de clorofila a pueden actuar como un factor limitante de la eficiencia fotosintética, por lo que el reajuste de la estequiometría de los complejos fotosintéticos, en respuesta a los cambios de intensidad luminosa, resulta en el mantenimiento de niveles de centros de reacción adecuados para que esa posible situación de estrés no se manifieste a efectos de crecimiento y tasa de multiplicación del material vegetal.

Pueden existir varios mecanismos que explicarían cómo un excesivo tamaño de la antena en relación al centro de reacción del fotosistema II, bajo condiciones de, relativamente, alta irradiación no causan fotoinhibición. Así, por ejemplo, se ha descrito que es posible que el complejo de antena sufra cambios que provoquen su desacoplamiento del centro de reacción, pasando de una función captadora a una función disipadora de energía (Ruban et al., 2012). Otros mecanismos están relacionados con la acumulación en el cloroplasto de compuestos con actividad antioxidante, que evitarían la acumulación de altas concentraciones de especies reactivas del oxígeno en ese orgánulo. La naturaleza de esos compuestos antioxidantes puede ser variada, de forma que se establecerían varias líneas de defensa en los cloroplastos (cada una de ellas basada en la actuación de un grupo determinado de antioxidantes) que entrarían en juego, de forma consecutiva, para conferir fotoprotección a medida que se fueran incrementando los niveles de estrés (Brunetti et al, 2015). Uno de los grupos de compuestos con actividad antioxidante que participarían en este mecanismo de fotoprotección sería el de los compuestos fenólicos.

4.1.3. Niveles de fenoles solubles totales, flavonoides solubles y almidón

Los resultados obtenidos muestran que la concentración de fenoles solubles totales en los extractos metanólicos de las variedades SN8946 y SN9001 presentaron un comportamiento similar, de manera que conforme aumentaba la iluminación se producía una disminución del contenido fenólico de las muestras (Tabla 4.1.3.). Además, se apreciaron diferencias significativas entre el tratamiento T-1 (control) y los tratamientos T-2 y T-3. En cuanto a las otras dos variedades, SN9013 y SN9000, con flores de color blanco y amarillo, respectivamente, se pudo ver que también tenían una evolución similar. Así, el mayor valor se presentó en T-3, que venía precedido de una bajada de contenido de T-2 con respecto al T-1. Para SN9013 se hallaron diferencias significativas entre T-2 y T-3, pero para SN9000 no se observó ninguna entre tratamientos.

La concentración de flavonoides en SN8946 disminuyó a la vez que aumentaba la intensidad lumínica, observándose diferencias significativas entre el T-1 y el T-3 (Tabla 4.1.3.). Por otro lado, para SN9000 ocurrió lo contrario, es decir, subió el contenido en estos compuestos a la vez que aumentaba el flujo fotosintético de fotones, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Respecto a la variedad blanca, SN9013, y a la rosa, SN9001, se presentaron evoluciones similares, partiendo del valor más elevado en T-1, bajando en T-2 y subiendo, pero muy poco en T-3. Para SN9013 no se observaron diferencias significativas, pero para SN9001 sí, concretamente entre el T-1 y los otros tratamientos.

Otro de los compuestos que se midió en las muestras fue el contenido en almidón, con el fin de tener algún indicio sobre el destino del carbono acumulado por el material vegetal. Así, pudo observarse que para la variedad de color violeta, SN8946, el contenido en este componente disminuía conforme aumentaba la intensidad lumínica, presentando diferencias significativas entre el tratamiento control (T-1) y el T-3. Para las variedades SN9013 y SN9000 el contenido en almidón mostró su valor más

alto para el T-3, aumentando desde los valores del T-2 tras sufrir una bajada en el tratamiento control. Sin embargo, sólo se vieron diferencias significativas entre T-1 y el resto de tratamientos en la variedad SN9013. Por otro lado, la variedad de color rosa presentó una evolución similar a las dos anteriores, salvo que el T-1 fue el tratamiento con el valor más alto. Además, no se observaron diferencias entre tratamientos para este cultivar.

El suministro de azúcar en los medios de cultivo normalmente resulta en un aumento de los depósitos de almidón en los materiales vegetales cultivados (Capellades et al., 1991; Azcon-Bieto, 1983). La actividad fotosintética del material vegetal cultivado *in vitro* suele ser baja y, normalmente, insuficiente para atender las demandas metabólicas de los tejidos. A la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio parece existir una relación entre la mayor sensibilidad hacia los tratamientos lumínicos mostrada por la variedad SN8946 (con una caída del 25 % en los niveles de clorofila total) y la disminución del contenido en almidón (con disminución del 22 %, aproximadamente). Además, los patrones de acumulación de fenoles solubles (fenoles totales y flavonoides) muestran una tendencia similar a los de acumulación de almidón, especialmente, para la variedad SN8946, lo que hace pensar en la existencia de alguna relación entre sus rutas metabólicas. Tendencias similares a las descritas, aunque menos marcadas, se observaron para la variedad SN9001, mientras que en el caso de las variedades blanca (SN9013) y amarilla (SN9000) los niveles de almidón y compuestos fenólicos solubles se mantuvieron, e incluso aumentaron significativamente en el caso de SN9013, al aumentar la intensidad luminosa (Tabla 4.1.3.).

Tabla 4.1.3. Concentración de fenoles, flavonoides y almidón en la fase de multiplicación *in vitro* en el ensayo de iluminación.

Variedad	Tratamiento	Fenoles ($\mu\text{mol eq. ácido gálico/g PF}$)	Flavonoides ($\mu\text{mol eq. rutina/g PF}$)	Almidón ($\mu\text{mol eq. glucosa/g PF}$)
SN8946	T-1	57.89 \pm 5.54a	1.72 \pm 0.18a	503.48 \pm 31.19a
	T-2	37.05 \pm 1.88b	1.30 \pm 0.09ab	488.23 \pm 19.88ab
	T-3	38.59 \pm 0.67b	1.14 \pm 0.16b	391.32 \pm 28.03b
SN9013	T-1	27.69 \pm 1.31ab	1.38 \pm 0.09a	514.82 \pm 38.53ab
	T-2	24.25 \pm 1.01b	1.12 \pm 0.09a	426.74 \pm 37.50b
	T-3	29.28 \pm 1.01a	1.28 \pm 0.11a	624.79 \pm 28.40a
SN9000	T-1	28.17 \pm 0.76a	1.19 \pm 0.09a	555.01 \pm 21.28a
	T-2	26.82 \pm 0.57a	1.21 \pm 0.12a	473.65 \pm 12.57a
	T-3	30.32 \pm 1.98a	1.30 \pm 0.13a	567.74 \pm 45.25a
SN9001	T-1	41.44 \pm 2.37a	1.59 \pm 0.14a	499.93 \pm 12.81a
	T-2	34.39 \pm 0.50b	1.03 \pm 0.09b	442.36 \pm 6.51a
	T-3	35.02 \pm 1.01b	1.07 \pm 0.10b	450.73 \pm 34.5a

Los compuestos fenólicos se cree que están implicados en el control del estado redox (oxidación-reducción) en plantas estresadas por exceso de luz. Además, de un efecto indirecto a través de la absorción de la radiación, que prevendría el daño causado por el exceso de luz visible o UV, estos compuestos, acumulados en cloroplastos y vacuolas, pueden ejercer una acción directa de desactivación de las especies reactivas del oxígeno (Brunetti et al., 2015). Entre los compuestos fenólicos, los flavonoides parecen ser los antioxidantes más importantes como respuesta a los largos periodos de exposición a un exceso de radiación. Algunas evidencias confirmarían la gran fotoprotección conferida por estos compuestos (Havaux y Kloppstech, 2001). La localización de los flavonoides en cloroplastos ha sido reportada hace décadas (Saunders y McClure, 1976). Las evidencias sugieren que estos compuestos protegen frente al daño foto-oxidativo a través de varios mecanismos (Agati et al., 2013). Los flavonoides no solo pueden proteger contra el H_2O_2 , con el subsiguiente efecto en las rutas redox, sino que también reaccionan con el $^1\text{O}_2$, completando probablemente la acción de otros antioxidantes de los cloroplastos (Agati et al., 2007),

principalmente carotenoides y tocoferol. Estos flavonoides han sido localizados sobre la membrana de los cloroplastos (Agati et al., 2007), confiriendo una estabilidad química a la membrana y reduciendo el riesgo de peroxidación lipídica y limitando la difusión de las especies reactivas del oxígeno fuera del cloroplasto (Agati et al., 2013).

La información sobre compuestos fenólicos en *L. sinuatum* es escasa. Ross y El-Sayyad (1980) indentificaron seis flavonoides en las hojas de plantas cultivadas en Egipto: dos flavonas (apigenina y luteolina) y cuatro flavonoles (herbacetina, herbacetina-8-O-glucosido, gossipina y gossipetina). Los derivados de flavonas y flavonoles continenen un grupo o-dihidroxi en el anillo B y han sido considerados como “flavonoides que responden a la luz” (un término acuñado por Agati et al., 2011), jugando, por lo tanto, un papel en la fotoprotección como pantalla ante los rayos UV. La biosíntesis de dihidroxiflavonoides parece ser que se da bajo muchas condiciones de estrés (incluidas las de alta luminosidad) y da como consecuencia un incremento en la capacidad antioxidante de los tejidos, algo crucial para superar el estrés oxidativo (Di Ferdinando et al., 2014). Luteonina y gossipetina contienen la estructura o-dihidroxi en el anillo B y de ahí que parezca plausible que estos flavonoides puedan estar implicados en la respuesta del *L. sinuatum* cultivado *in vitro* a los cambios en la intensidad lumínica.

Con el fin de tratar de aclarar este extremo, los extractos metanólicos obtenidos de los vástagos de las variedades de limonio estudiadas se sometieron a un análisis por HPLC. El patrón cromatográfico encontrado fue muy similar para las cuatro variedades y presenta regiones con cierta complejidad en cuanto al número de analitos hallados, aunque su interpretación es, relativamente, sencilla (Fig. 4.1.7.). Como diferencias más significativas entre los cromatogramas a 280 nm de las cuatro variedades, merecen destacarse la práctica desaparición del pico 5 en los extractos de la variedad SN9013 (blanca) y la simplificación del grupo de picos anotado como 2 en las variedades blanca y amarilla, SN9013 y SN9000, con respecto a SN8946 y SN9001 (Fig. 4.1.7.).

En todos los extractos pudo detectarse la presencia de ácido gálico (pico 1), aunque a niveles muy bajos. Más significativa es la presencia de un grupo de picos, no muy bien resueltos con las condiciones cromatográficas empleadas, que presentan máximos de absorción en la banda de 270-280 nm (Fig. 4.1.7. y 4.1.8.). De acuerdo con la información disponible en la bibliografía, estos picos podrían corresponder a catequinas y galocatequinas, cuya presencia ha sido descrita en extractos procedentes de vástagos de otras especies del género *Limonium* (Korul'kina et al., 2004; Blainski et al., 2017). Los picos 3, 4 y 5 pueden ser identificados como flavonoides, teniendo en cuenta el espectro UV que presentan (Fig. 4.1.7. y 4.1.8.). A la vista de las propiedades espectrales, los picos 3 y 4 podrían ser derivados del flavonol canferol, mientras que el pico 5 podría ser un derivado de tipo flavona. En cuanto a los tres picos que forman el grupo marcado como 6, presentan un espectro similar al de derivados de ácidos hidroxicinámicos, con máximos de absorción en torno a 320 nm.

Los tratamientos con diferentes intensidades de luz durante la fase de multiplicación *in vitro* no provocaron cambios cualitativos destacables en el perfil de compuestos fenólicos de los extractos de limonio; tan sólo se observaron variaciones entre tratamientos en la intensidad de las señales asociadas a los picos principales (Fig. 4.1.7.).

Las galocatequinas y los flavonoides son considerados compuestos bioactivos, con innumerables propiedades. Tal vez por este motivo diferentes especies del género *Limonium* se han utilizado desde tiempo inmemorial como remedio para un gran número de enfermedades (Rodrigues et al., 2015). Muchos de los efectos fisiológicos causados por estos compuestos se deben a su carácter antioxidante, que es también clave para el correcto funcionamiento de las plantas, tanto en condiciones normales de desarrollo, como, especialmente, ante la incidencia de situaciones de estrés.

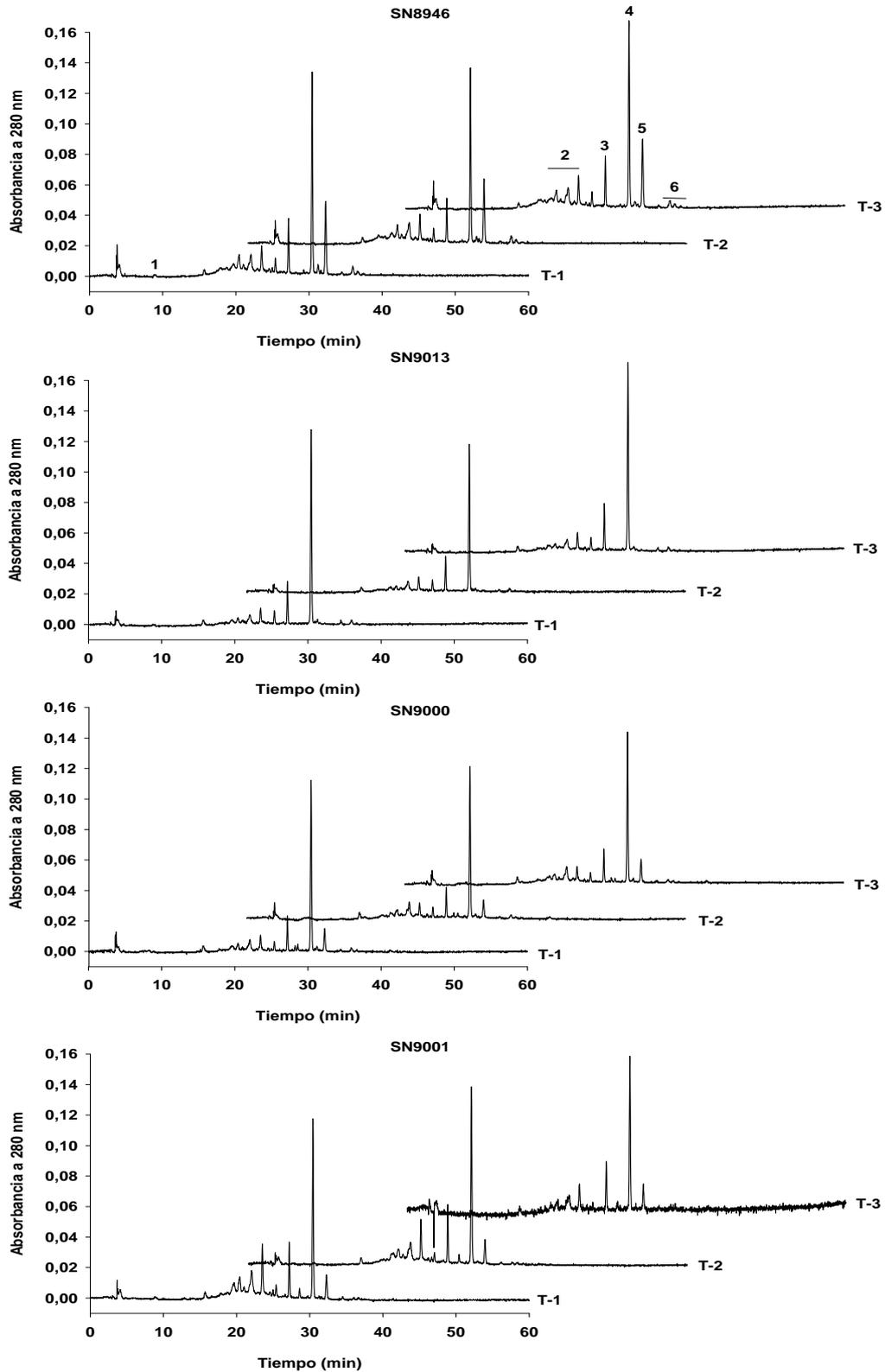


Figura 4.1.7. Cromatogramas obtenidos a 280 nm de los extractos metanólicos de vástagos procedentes de las cuatro variedades de *L. sinuatum* sometidas a diferentes condiciones de iluminación durante la fase de multiplicación *in vitro*. Los números en los cromatogramas muestran regiones/picos de los mismos que los caracterizan.

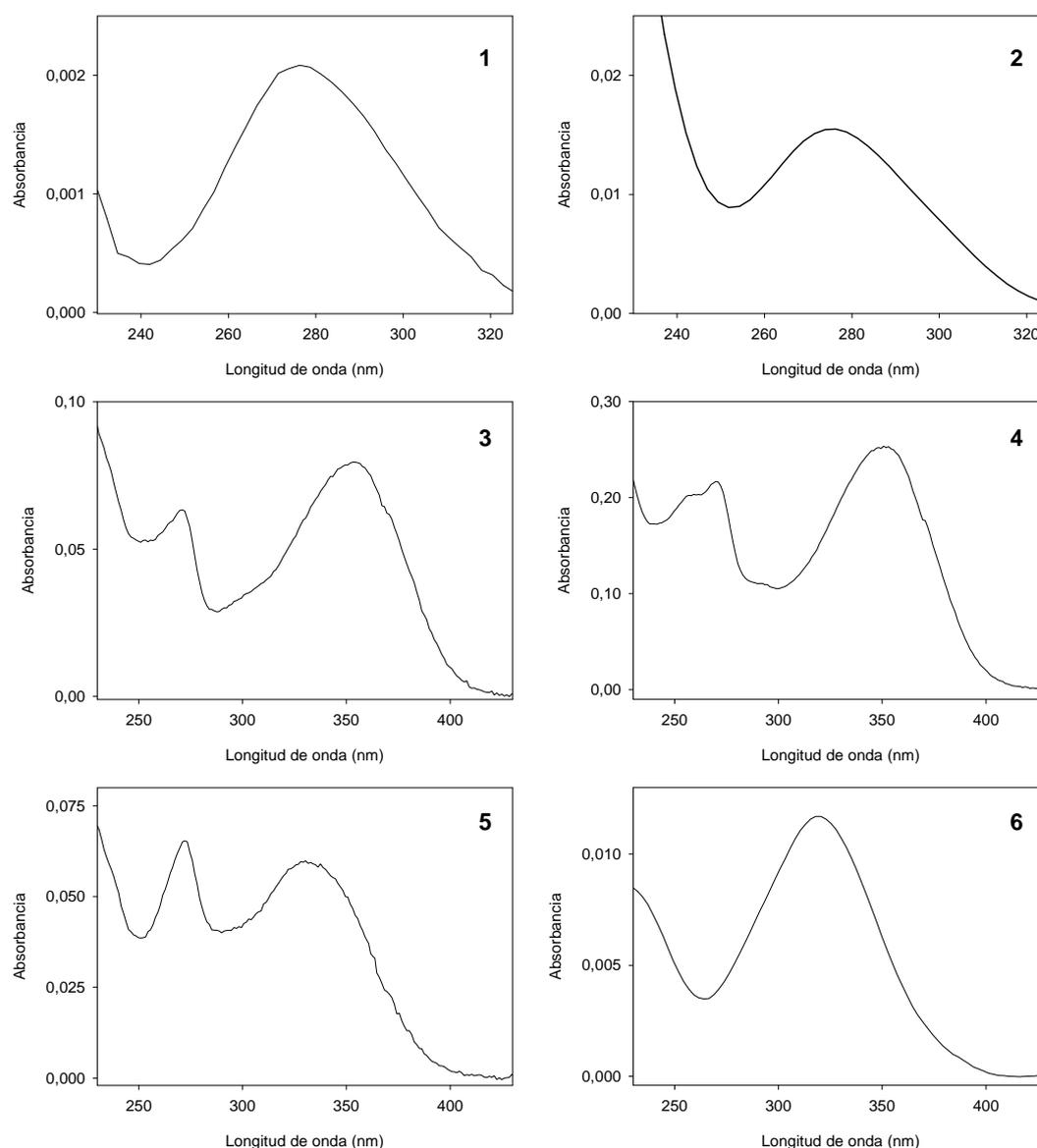


Figura 4.1.8. Espectros UV de los picos seleccionados en los cromatogramas de la Figura 4.1.7.

4.1.4. Capacidad antioxidante: ABTS y FRAP

Existe una conexión entre la acumulación de pigmentos fotosintéticos y la biosíntesis de otros metabolitos con propiedades antioxidantes cuando el tejido cultivado *in vitro* está bajo condiciones moderadas de estrés (Sánchez-Sánchez et al., 2018).

La capacidad antioxidante medida con dos protocolos (ABTS, en este caso utilizando dos compuestos estándar, y FRAP) arrojó comportamientos y

valores similares en las variedades estudiadas en función de los tratamientos de iluminación recibidos (Fig. 4.1.9. a 4.1.11.)

Así, para las variedades SN8946 y SN9001 el comportamiento encontrado fue similar, produciéndose una bajada en la capacidad antioxidante conforme aumentaba el flujo de fotones fotosintéticamente activo (Fig. 4.1.9.). Además, se observaron diferencias significativas entre el T-1 y los otros dos tratamientos en la variedad de color violeta (SN8946), y sólo entre T-1 y T-3 en la variedad de color rosa (SN9001). Para el cultivar SN9013 (variedad blanca) el valor más elevado se observó para T-1, bajando a continuación en T-2 y volviendo a subir en T-3, aunque sólo se vieron diferencias significativas entre los tratamientos extremos. En la variedad de color amarillo (SN9000) el valor más alto lo presentó el T-3, el cual mostró diferencias con el T-1 y T-2 que presentaron valores similares.

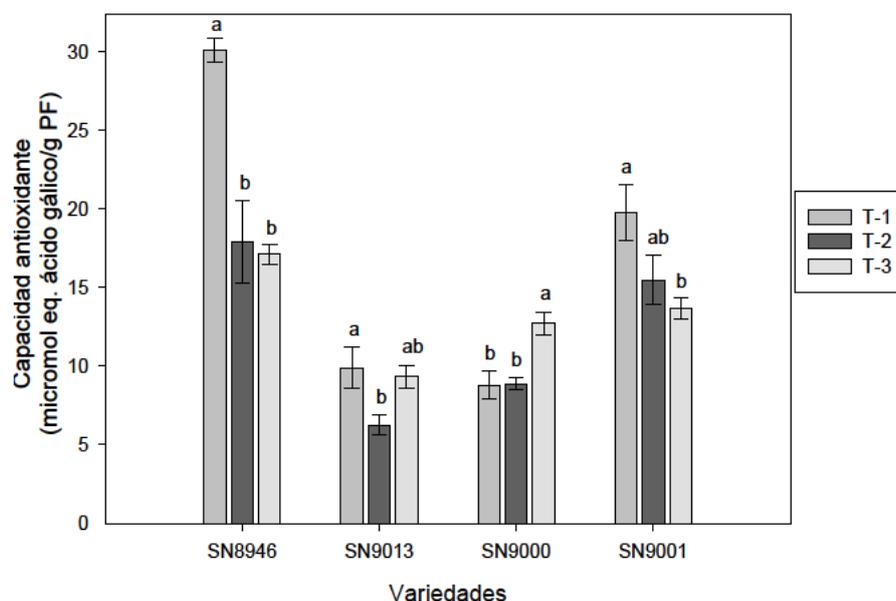


Figura 4.1.9. Capacidad antioxidante determinada como capacidad atrapadora del catión radical ABTS de las variedades de *L. sinuatum* estudiadas en el ensayo de iluminación, usando ácido gálico como estándar.

El mismo comportamiento se observó cuando en las determinaciones de la capacidad antioxidante usando el método del ABTS se tomó como referencia la oxidación del trolox (Fig. 4.1.10.). Además, atendiendo a los valores obtenidos utilizando uno u otro estándar para los cálculos, se

observa que esos valores fueron alrededor de cuatro veces mayores para la segunda sustancia de referencia, manteniéndose esta relación para todas las muestras, lo cual es un reflejo de la diferente estequiometría de reacción con el catión radical del ABTS de los estándares.

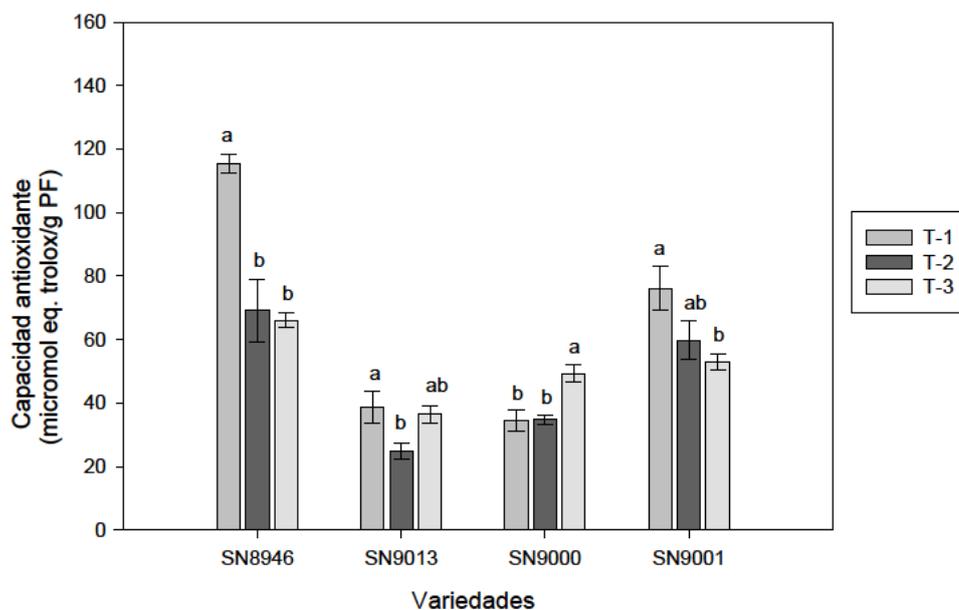


Figura 4.1.10 .Capacidad antioxidante determinada como capacidad atrapadora del catión radical ABTS de las variedades de *L. sinuatum* estudiadas en el ensayo de iluminación, usando trolox como estándar.

En cuanto a la medida de la capacidad antioxidante usando FRAP, se observó que el comportamiento fue similar, aunque con algunas diferencias. De esta manera, la evolución para SN8946 fue similar al observado para el método del ABTS, donde la capacidad antioxidante disminuye a la vez que sube la intensidad lumínica. También sucedió algo parecido con SN9001, excepto que sí se observaron diferencias significativas entre el T-1 y los otros dos tratamientos. Para las variedades blanca y amarilla, los valores más altos aparecieron en T-3, mostrando diferencias significativas con los otros tratamientos en SN9013, y sólo con T-1 en la SN9000.

En general, se observa mayor capacidad antioxidante estuvo asociada a SN8946, variedad con flores de color violeta, seguida por la variedad con flores de color rosa (SN9001). Por último, y con valores similares en cuanto

a este parámetro se encontraron las variedades con flores de color blanco (SN9013) y amarillo (SN9000). Este hecho podría implicar que la capacidad antioxidante en vástagos de *L. sinuatum* está ligada al color de sus flores, de forma que cuantas más intenso sea el tono, mayor será esta capacidad, siendo esto algo que debería estudiarse con mayor profundidad. Esto sería, posiblemente, un reflejo de la capacidad biosintética de las diferentes variedades. Lo que sí parece desprenderse del presente estudio es que las variedades SN8946 y SN9001 muestran comportamientos similares en los parámetros estudiados y, a su vez, hasta cierto punto, diferentes de los encontrados para SN9000 y SN9013, que guardan cierta similitud entre ellas.

La capacidad antioxidante puede ser considerada como un marcador del estrés del material que se cultiva *in vitro* (López-Orenes et al., 2013). Se observó como bajaban los niveles de este parámetro según subían los niveles de iluminación en SN8946 y SN9001; sin embargo, para las otras dos variedades el valor más alto se mostró en relación a la iluminación mayor. Este efecto puede resultar difícil de explicar, máxime cuando, para estas variedades, se produce la mayor caída en los niveles de pigmentos fotosintéticos con la iluminación, lo que podría indicar una mayor sensibilidad al cambio de las condiciones ambientales, tal y como se ha descrito para otras especies sometidas a diferentes grados de estrés (Shi et al., 2015). Sin embargo, hay que tener en cuenta dos factores que indicarían que, efectivamente, las variedades SN9001 y, sobre todo, SN8946 están respondiendo a una situación de estrés: En primer lugar, los niveles “constitutivos” de compuestos antioxidantes son superiores en estas variedades con respecto a los de las otras dos variedades; por otra parte, la reducción de los niveles de compuestos fenólicos solubles podría indicar que el material vegetal ha puesto en marcha un mecanismo de protección que conllevaría la utilización y degradación de esos fenoles solubles.

En relación con esto último, el acoplamiento oxidativo de fenoles podría contribuir al control de los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno a través de la interacción directa e indirecta (en una reacción

mediada por la enzima peroxidasa) de estas especies con los compuestos fenólicos (Agati et al., 2013). Teniendo en cuenta la posible disminución de la capacidad fotosintética y el mantenimiento del crecimiento observados, esto podría resultar en la reducción de los niveles de compuestos fenólicos solubles y, a su vez, en la también observada disminución en el contenido de sustancias de reserva (Tabla 4.1.3.).

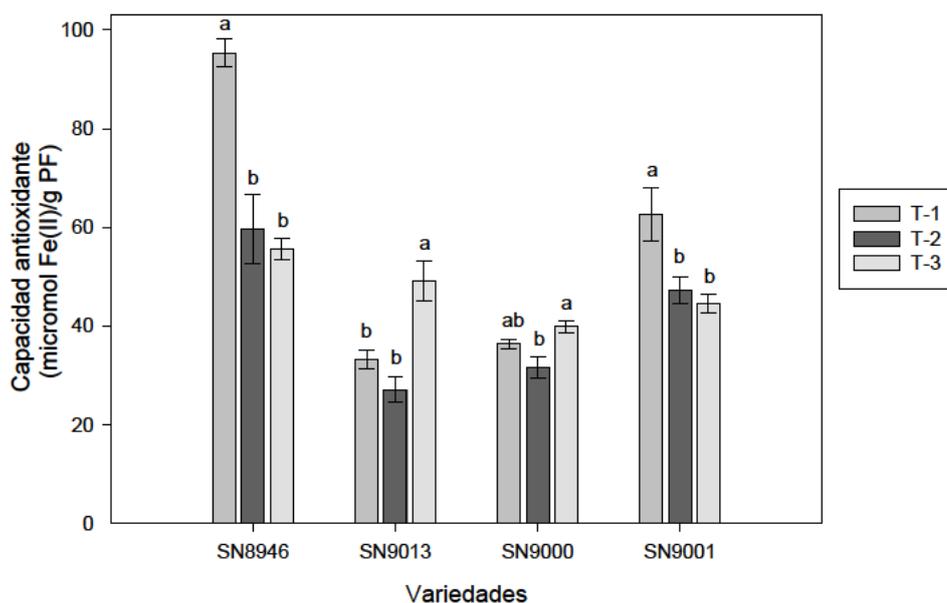


Figura 4.1.11. Capacidad antioxidante de las variedades en el ensayo de iluminación mediante el ensayo FRAP y utilizando FeSO_4 como referencia.

4.1.5. Producción y parámetros de calidad comercial

Una de las mayores preocupaciones cuando se inicia un programa de micropropagación comercial es el de la posible incidencia de alteraciones a nivel genético y epigenético en el material vegetal como consecuencia de las condiciones de cultivo *in vitro*. Estos fenómenos de variación somaclonal podrían afectar negativamente a la productividad de los cultivos, haciendo disminuir la calidad y/o la cantidad del producto final.

La producción de las plantas de todas las variedades derivadas de todos los tratamientos estuvo por encima de lo exigido (8 tallos/planta), mostrando la variedad SN9000 un valor bastante más alto que el resto, cercano a los 20 tallos por planta y corte. En las variedades SN9013, SN9000 y SN9001 no

hubo diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, el cultivar de color violeta presentó una producción ligeramente superior para el T-1 con diferencias significativas respecto al T-2 y al T-3.

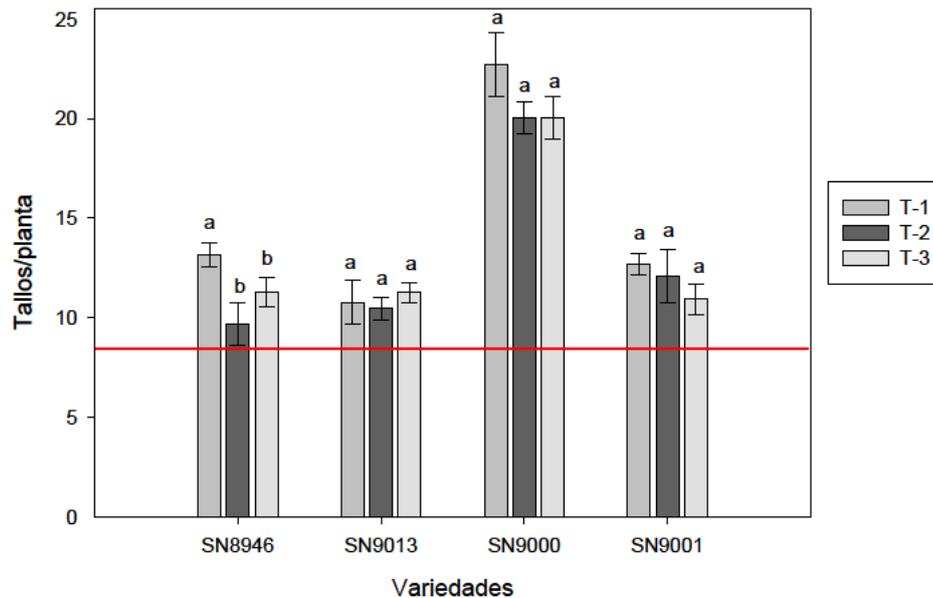


Figura 4.1.12. Efecto de la iluminación durante la micropropagación sobre la producción de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo de producción exigido (8 tallos/planta).

En cuanto a la longitud del tallo todas las variedades y tratamientos presentaron datos que superaron el valor mínimo de 60 cm necesarios para tener una calidad extra (Figura 4.1.11). Así, las variedades SN8946, SN9000 y SN9001 mostraron longitudes cercanas a los 70 cm, mientras que la variedad SN9013 produjo los tallos más largos superando los 80 cm. También cabe destacar que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para las distintas variedades.

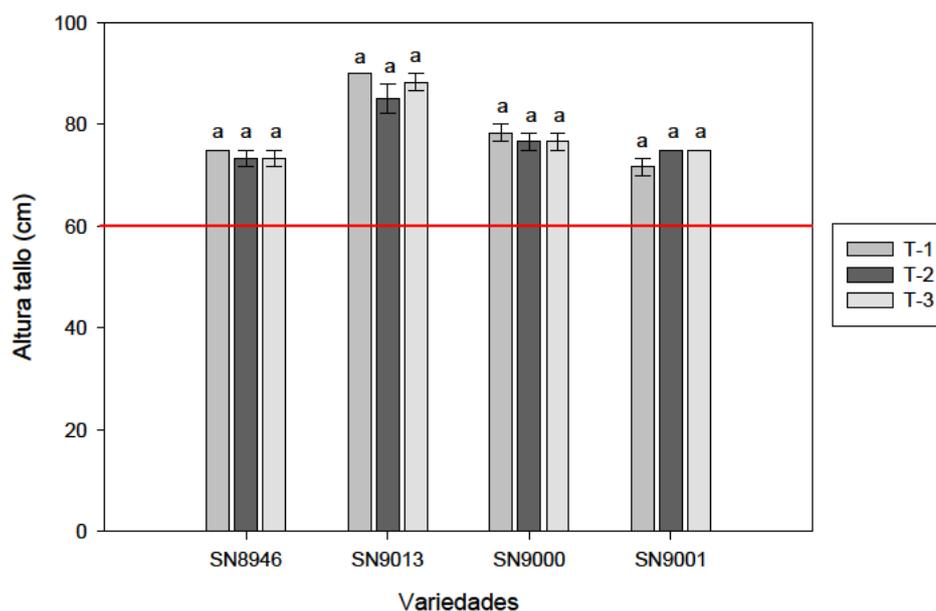


Figura 4.1.13. Efecto de la iluminación durante la micropropagación sobre la longitud del tallo (calidad de la producción) de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica la longitud mínima para calidad extra (60 centímetros).

Para todas las variedades el número de espigas por tallo se encontraba en un valor igual o superior a 6, cumpliendo así con el mínimo exigido. Concretamente para la variedad SN8946 en todos los tratamientos el número de espigas estaba alrededor de lo exigido, no encontrándose diferencias significativas entre ellos. Para las variedades de color amarillo y rosa tampoco se dieron diferencias entre tratamientos, si bien los datos de la primera eran mayores que la segunda. El valor más alto lo presentó el T-2 en la variedad SN9013 con valor cercano a 12 espigas por tallo, mostrando diferencias con T-1 y T-3 que tenían 8 y 10 espigas por tallo, respectivamente.

En cuanto al número de ramificaciones por tallo todos los tratamientos de las diferentes variedades alcanzaron valores por encima de lo exigido (3-4 ramas por tallo). Así, las variedades SN8946, SN9000 y SN9001 tenían valores muy próximos entre tratamientos, con datos que estaban entre 4 y 5 ramas por tallo. Solamente la variedad de color blanco, SN9013 mostró valores un poco más elevados, llegando el T-2 a tener hasta 6 ramas/tallo.

Destacar que no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en este parámetro en ninguna de las variedades estudiadas.

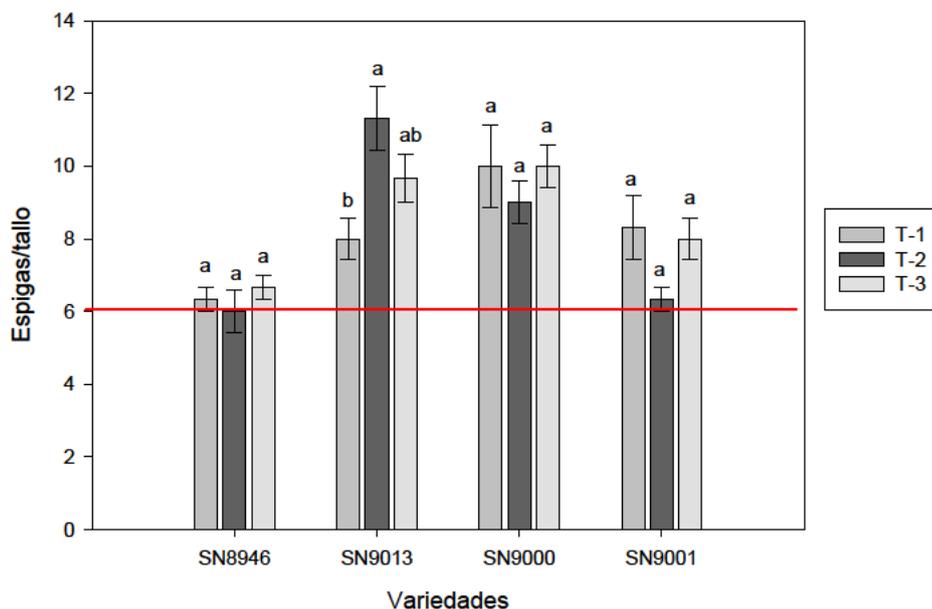


Figura 4.1.14. Efecto de la iluminación durante la micropropagación sobre el número de espigas por tallo de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (6 espigas/tallo).

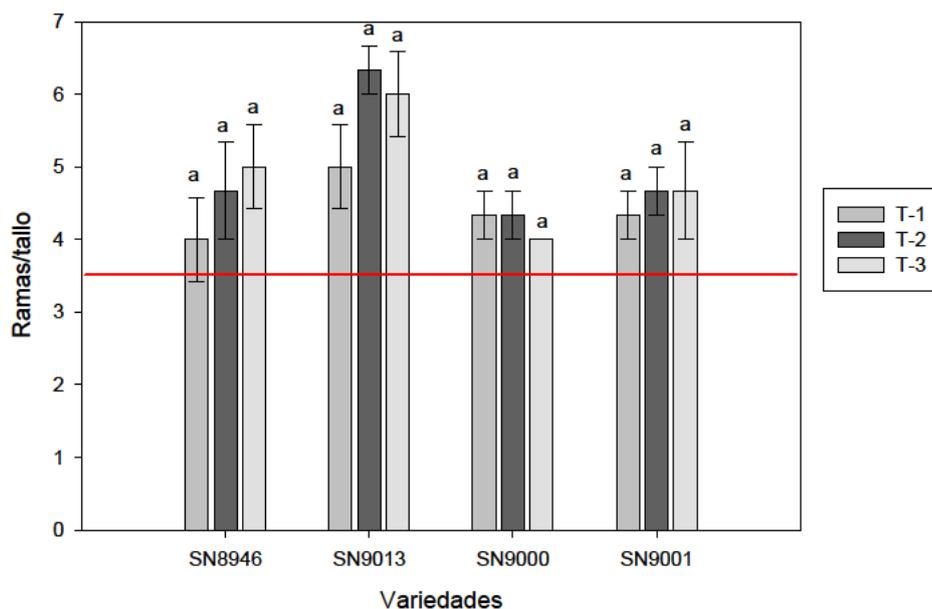


Figura 4.1.15. Efecto de la iluminación durante la micropropagación sobre el número de ramificaciones por tallo de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (3-4 ramas/tallo).

Los parámetros estudiados resultan útiles para poder comparar la calidad agronómica y comercial de las variedades y tratamientos. De hecho otros autores también usan la altura de la planta (cm) y el número de inflorescencias por planta (número de espigas) como medida de desarrollo, además de otros parámetros como el diámetro de la roseta (cm) (Kaninski et al., 2012). También se tienen en cuenta periodos fenológicos, como una etapa inicial (hasta el 10% de brotes con flores abiertas) y el de plena floración (dos tercios de las flores por rama abiertas) (Kaninski et al., 2012) mientras que solamente se cortaron los tallos cuando tenían calidad comercial, y esta selección se dejó a criterio del agricultor.

La intensidad de la luz y su calidad durante la fase de cultivo *in vitro* pueden también determinar el éxito del proceso de aclimatación. Así, por ejemplo, en algunos estudios llevados a cabo con un híbrido de *Limonium* se observó una ligera disminución de la supervivencia *ex vitro* de las plantas cuando éstas se sometieron a condiciones heterotróficas, con alta intensidad lumínica durante la fase de cultivo *in vitro* (Lian et al., 2002).

Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, relativos a parámetros de producción convencional, pueden encontrarse en la bibliografía. Así, se ha descrito que los tallos de *Limonium sinuatum* medían entre 60-75 cm cuando se estudiaba la producción en función de la densidad de plantación (Mellese et al., 2013); y también en plantaciones obtenidas a partir de material propagado por semillas (Verlinden y McDonald, 2007).

En resumen, las variaciones en las condiciones de iluminación durante la etapa de multiplicación *in vitro* de las variedades de *L. sinuatum* estudiadas no afectaron a los parámetros de productividad del cultivo. Aunque los materiales vegetales parecen presentar diferente sensibilidad a las intensidades luminosas aplicadas, los cambios bioquímicos observados durante la fase de cultivo *in vitro* no repercuten en una merma de la cantidad ni de la calidad de las inflorescencias.

4.1.6. Análisis multivariable de los parámetros estudiados (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) se llevó a cabo para identificar qué parámetros podían describir el comportamiento de las variedades estudiadas con respecto a los tratamientos de iluminación recibidos.

Para la variedad con flores de color violeta, SN8946, la Figura 4.1.14 muestra que la primera componente principal (PC1), que explica el 49,0 % de la varianza total, estaba fuertemente relacionada con los parámetros de clorofilas y capacidad antioxidante en el eje positivo de las X, y con la cantidad de iluminación recibida en la parte negativa. La segunda componente principal (PC2) que explica el 15,1 % estaba relacionada con los pesos fresco y seco (eje positivo de la Y) y el crecimiento (parte negativa). Además, la proyección de las muestras sobre los ejes mostró una clara separación en los datos del T-1 (control) que se encontraban a la derecha y los del T-2 y T-3 que se encontraban más próximas entre sí.

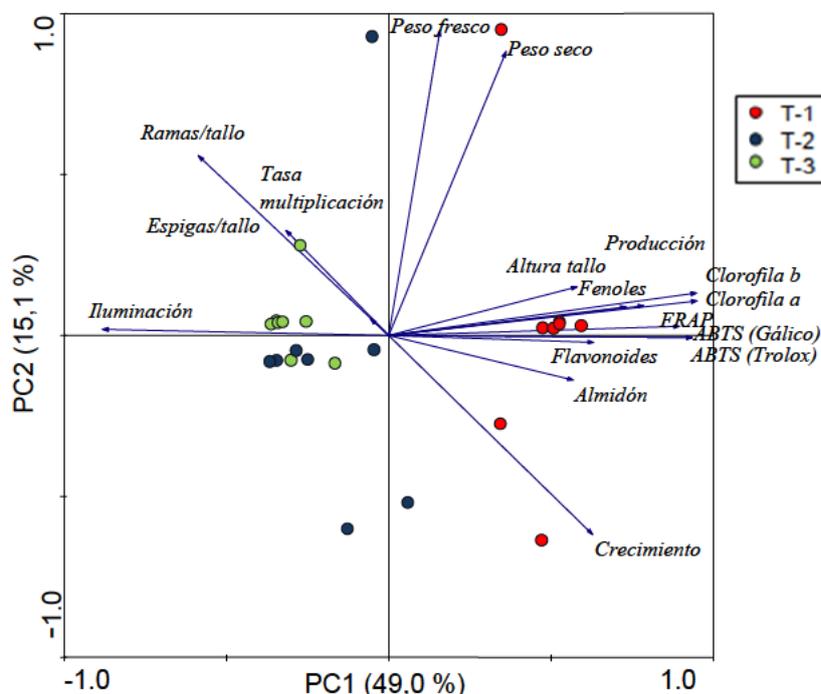


Figura 4.1.16. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN8946 expuestas a diferentes tratamientos de iluminación en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 49,0 % de la variación y el segundo eje el 15,1 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

En la Figura 4.1.17 se observa que la variedad SN9013 mostró en el PCA en la primera componente principal (PC1), que explicaba el 28,4 % de la varianza, y que estaba fuertemente relacionada con los parámetros de tasa de multiplicación, ramas y espigas por tallo, en el eje positivo de la X, y capacidad antioxidante, fenoles, almidón y altura de tallo en la parte negativa. La segunda componente principal (PC2) que explicaba el 26,1 % de la variabilidad, estaba definida por clorofilas en la parte positiva, y por la iluminación en la parte negativa. Además, se ven tres zonas diferenciadas, y la proyección de las muestras sobre el eje X mostró diferencias entre el T-1 y T-3 (izquierda) con el T-2 (derecha).

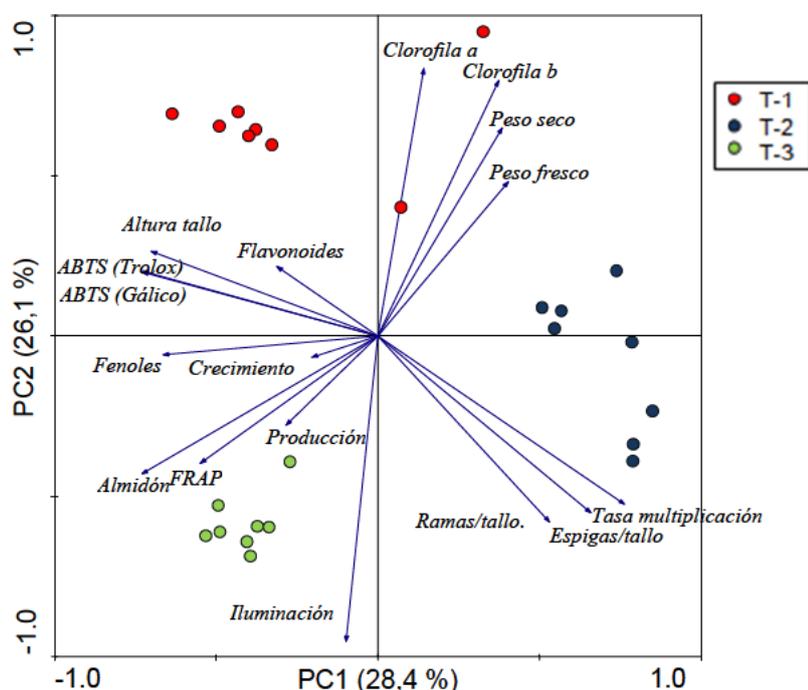


Figura 4.1.17. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9013 expuestas a diferentes tratamientos de iluminación en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 28,4 % de la variación y el segundo eje el 26,1 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

Para la variedad SN9000, con flores de color amarillo, el PCA (Fig. 4.1.18) muestra que la primera componente principal (PC1,) que explica el 30,9 % de la varianza total, estaba fuertemente relacionada con los parámetros de capacidad antioxidante (ABTS), peso fresco e iluminación en el eje positivo de las X, y con el contenido de clorofilas en la parte negativa. La segunda componente principal (PC2) que explica el 20,8 %, estaba relacionada con la producción, el número de espigas por tallo y el crecimiento *in vitro* (eje

positivo de la Y) y, en menor medida, con la tasa de multiplicación (parte negativa). Además, al igual que en el caso de la variedad anterior, SN9013, se podían observar tres zonas diferenciadas por tratamiento, si bien la proyección de las muestras sobre los ejes mostró una clara separación en los datos de la T-1 (control) y T-2 que se encontraban a la izquierda y la T-3 que se encontraban a la derecha.

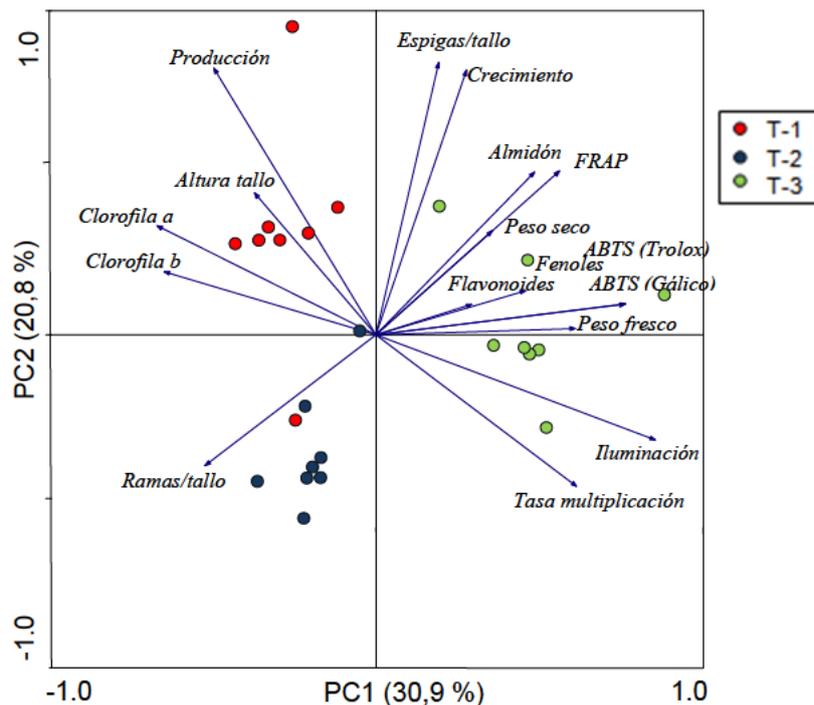


Figura 4.1.18. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9000 expuestas a diferentes tratamientos de iluminación en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 30,9 % de la variación y el segundo eje el 20,8 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

En la Figura 4.1.19 se observa que la variedad SN9001, con flores de color rosa, que mostró en el PCA una primera componente principal (PC1), que explicaba el 48,1 % de la varianza, fuertemente relacionada con los parámetros clorofilas, capacidad antioxidante (ABTS y FRAP) y almidón en el eje positivo de la X, y la iluminación y altura de tallo en la parte negativa. La segunda componente principal (PC2) que explicaba el 15,2 % de la variabilidad, estuvo definida por los pesos fresco y seco y por el nº de espigas por tallo en la parte positiva, y por la tasa de multiplicación *in vitro* en

la parte negativa. Además, se ven tres agrupamientos diferenciados en función del tratamiento observado. La proyección de las muestras sobre el eje X muestra tres zonas diferenciadas, donde la primera estaría a la izquierda para T-3, a continuación y más centrada T-2, y en la parte de la derecha se encontraría T-1.

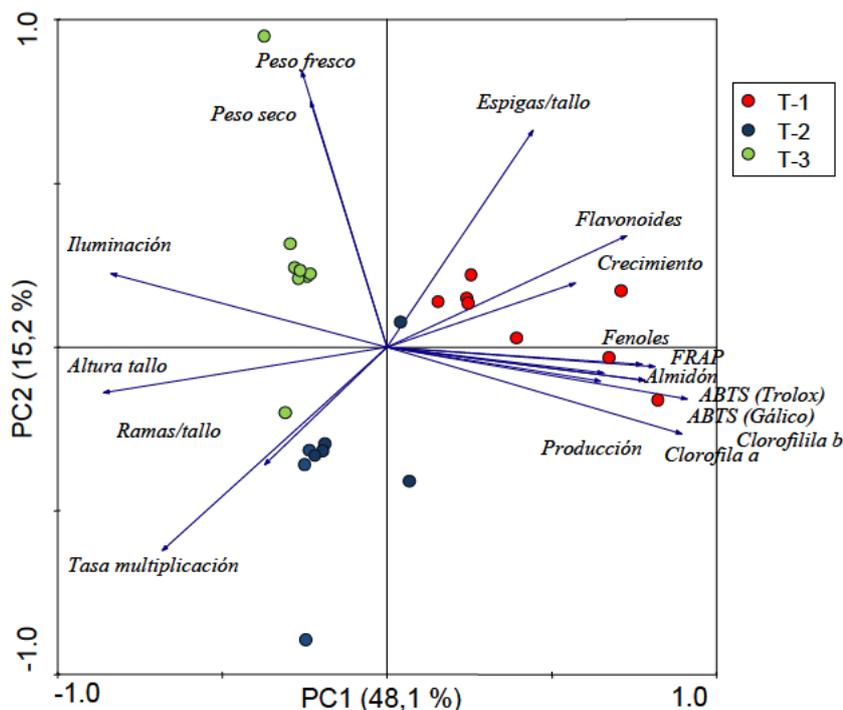


Figura 4.1.19. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9001 expuestas a diferentes tratamientos de iluminación en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 48,1 % de la variación y el segundo eje el 15,2 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

4.2. Efecto de la temperatura durante la fase de multiplicación *in vitro*

4.2.1. Crecimiento, tasa de multiplicación, peso fresco y peso seco

En una primera fase se compararon subcultivos realizados en cámaras de cultivo con diferentes temperaturas. Se intentó ver si el almacenamiento del material vegetal a bajas temperaturas manteniendo su viabilidad y su valor agronómico era posible. Para ello, se experimentó con 4 °C (T-1) y 12 °C (T-2), y se compararon los resultados con los del tratamiento control de 22 °C

(T-3), en experimentos llevados a cabo en paralelo. El crecimiento a los 40 días para todas las variedades apenas presentó diferencias entre T-1 y T-2 (Fig. 4.2.1 a 4.2.4.). Para SN9001, SN8946 y SN9013 el crecimiento a 4 °C fue menor que para las otras temperaturas, sin embargo en SN9000 no se observaron diferencias significativas entre los crecimientos al final del periodo de subcultivo. Finalmente se pudo observar como el punto final de crecimiento bajo el tratamiento T-2 presentaba un valor similar al del T-3, aunque con la diferencia de que el primero se alcanzó a los 90 días, mientras que el segundo se produjo a los 40 días.

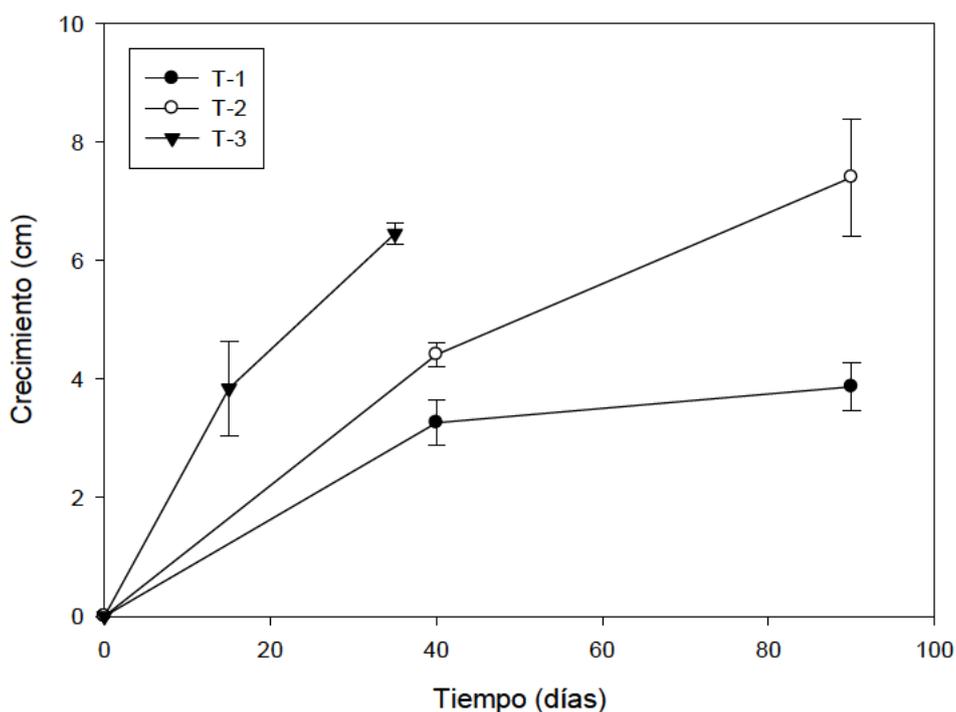


Figura 4.2.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento *in vitro* de la variedad SN8946.

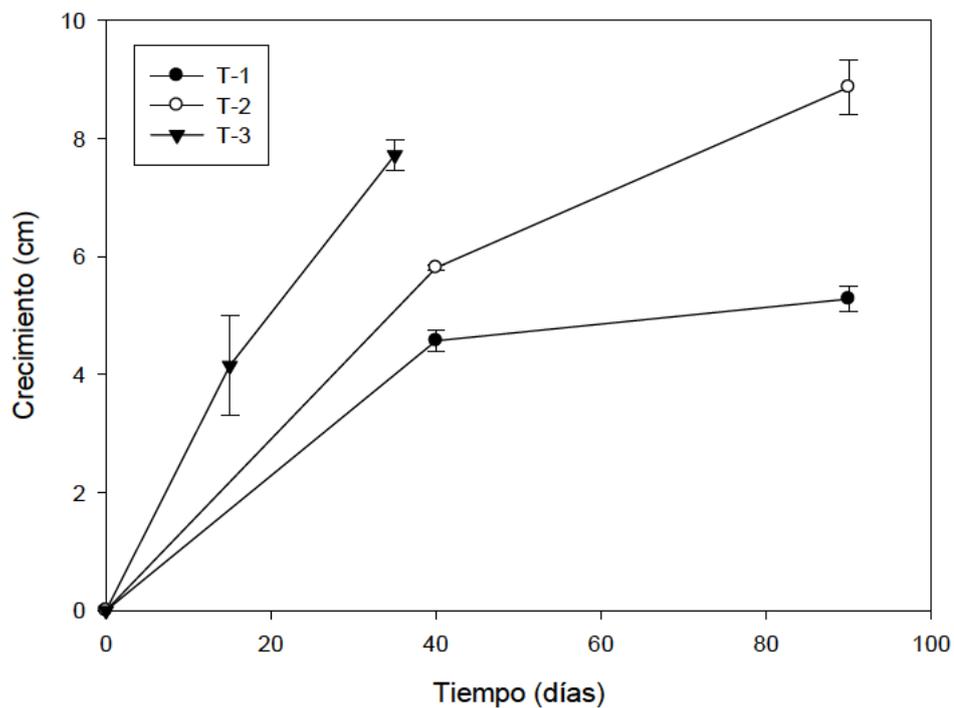


Figura 4.2.2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento *in vitro* de la variedad SN9013.

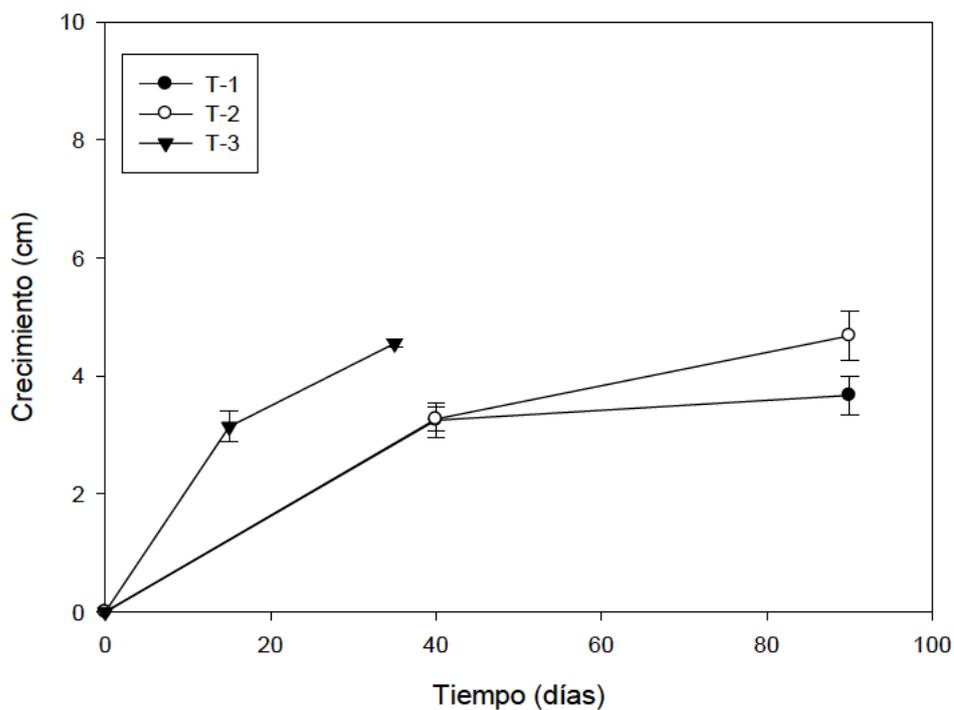


Figura 4.2.3. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento *in vitro* de la variedad SN9000.

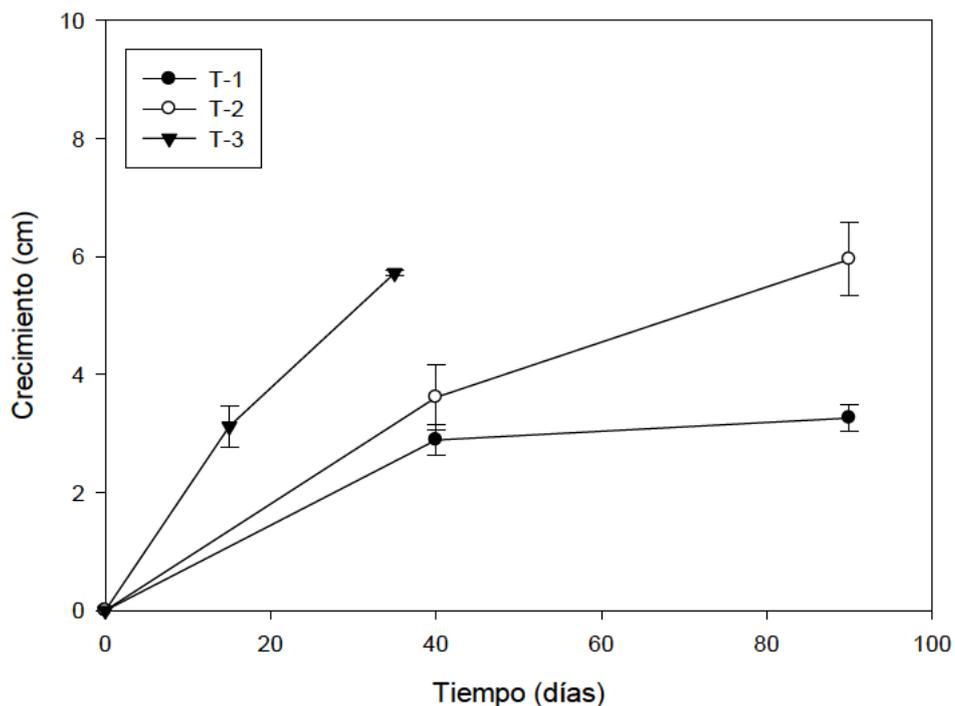


Figura 4.2.4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento *in vitro* de la variedad SN9001.

En la Tabla 4.2.1. se muestran los resultados encontrados en los parámetros relacionados con la producción *in vitro* del material vegetal. Con respecto a la tasa de multiplicación, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las variedades. Igualmente ocurrió con el peso fresco y el peso seco en las variedades SN9013, SN9000 y SN9001, pues no presentaron diferencias significativas entre tratamientos; sin embargo para SN8946 se mostró una diferencia entre T-2 y el resto, pues el peso fresco y el seco llegaron a doblar los valores determinados en los otros dos tratamientos, estando la explicación, posiblemente, en la combinación de un crecimiento alto y una tasa de multiplicación baja. Estos pesos se midieron al finalizar los respectivos periodos de subcultivo.

Tabla 4.2.1. Parámetros de producción *in vitro* de las variedades estudiadas en la fase de multiplicación sometidas a diferentes temperaturas.

Variedad	Tratamiento	Tasa de multiplicación (brotes/planta)	Peso fresco (g/planta)	Peso seco (g/planta)
SN8946	T-1	2.17 ± 0.48a	2.18 ± 0.47b	0.12 ± 0.02b
	T-2	1.55 ± 0.27a	4.85 ± 0.47a	0.27 ± 0.01a
	T-3	2.17 ± 0.17a	2.78 ± 0.24b	0.15 ± 0.01b
SN9013	T-1	1.29 ± 0.05a	2.07 ± 0.31a	0.12 ± 0.01a
	T-2	2.17 ± 0.56a	2.90 ± 0.18a	0.18 ± 0.02a
	T-3	2.07 ± 0.11a	2.49 ± 0.16a	0.15 ± 0.01a
SN9000	T-1	1.94 ± 0.31a	1.61 ± 0.31a	0.11 ± 0.01a
	T-2	2.29 ± 0.15a	2.68 ± 0.18a	0.19 ± 0.03a
	T-3	2.07 ± 0.11a	1.67 ± 0.16a	0.11 ± 0.02a
SN9001	T-1	1.35 ± 0.13a	2.24 ± 0.72a	0.14 ± 0.03a
	T-2	1.47 ± 0.15a	3.27 ± 0.47a	0.20 ± 0.02a
	T-3	1.61 ± 0.02a	2.63 ± 0.29a	0.16 ± 0.01a

En las Figuras 4.2.5. a 4.2.20. se muestra la apariencia inicial y final de los cultivos sometidos a bajas temperaturas. En general, en las figuras se puede observar que el material vegetal presentaba un buen aspecto en relación con el presentado por el crecido en las condiciones del control (Fig. 4.1.4.) Como aspectos destacables, podrían mencionarse la aparición de pigmentación roja en las hojas de las variedades SN9013 y SN9001, tanto a 4 °C como a 12 °C, y un mayor número de hojas, aparentemente, en estado de senescencia en la variedad SN9001.

En la segunda fase del ensayo cuando se compararon los parámetros de crecimiento y producción *in vitro* de las variedades subcultivadas en la cámara de 22 °C, tras aplicar los tratamientos a baja temperatura, se pudo observar que todos los cultivares presentaron datos similares para los tratamientos llevados a cabo. Por tanto, no se observaron diferencias significativas entre T-3, T-4 y T-5 para las variedades SN8946, SN9013 y SN9000. Solamente en el caso de SN9001 el T-4 presentó valores más bajos con diferencias con respecto a los demás tratamientos (Fig. 4.2.21. a 4.2.24. y Tabla 4.2.2.).

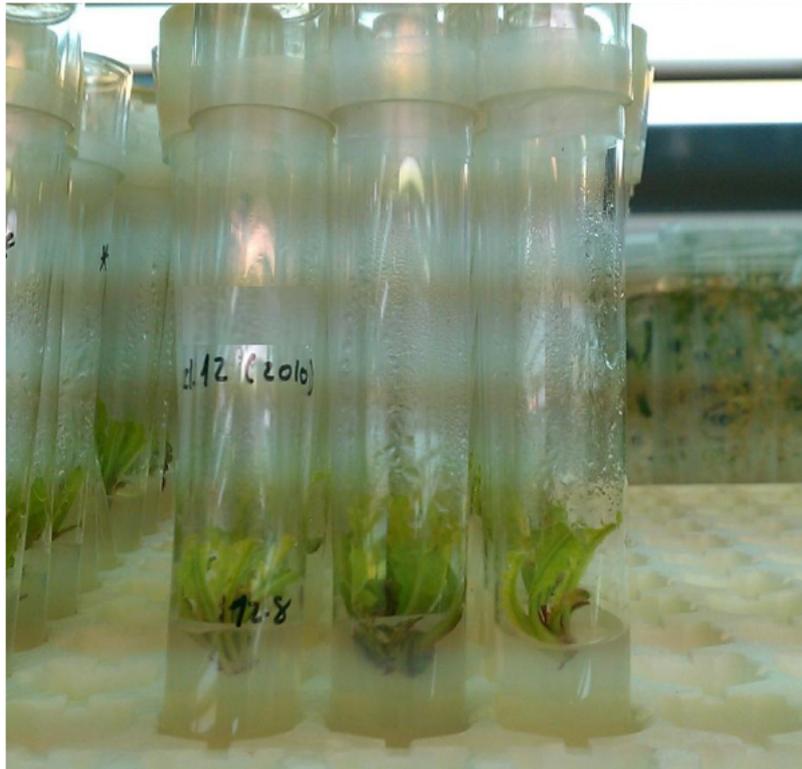


Figura 4.2.5. Estado de las plantas de SN8946 al inicio del subcultivo a 4 °C.



Figura 4.2.6. Estado de las plantas de SN8946 al final del subcultivo a 4 °C.

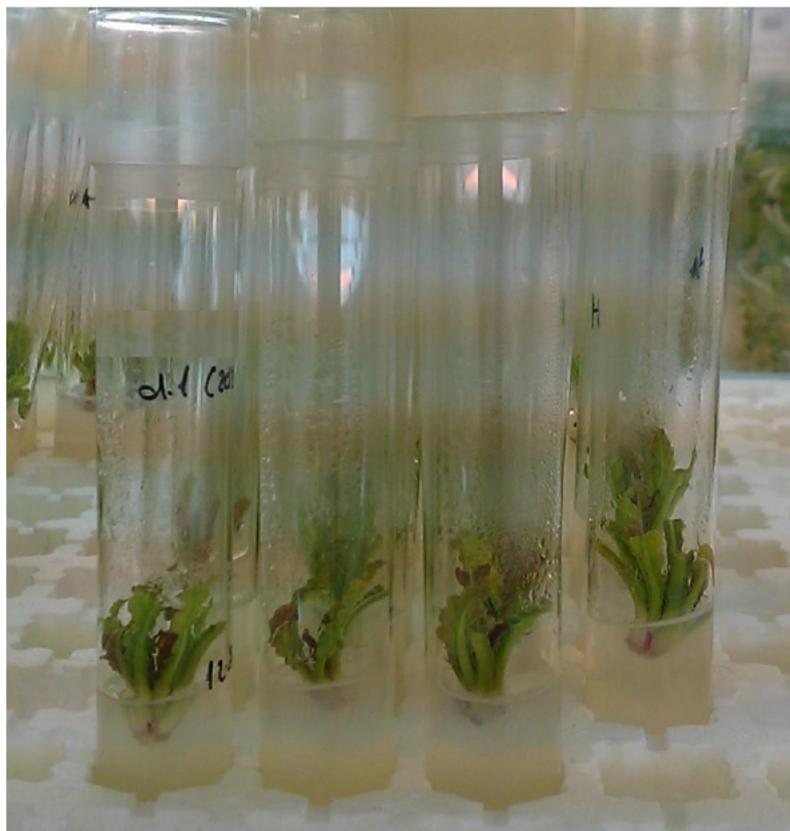


Figura 4.2.7. Estado de las plantas de SN9013 al inicio del subcultivo a 4 °C.



Figura 4.2.8. Estado de las plantas de SN9013 al final del subcultivo a 4 °C.

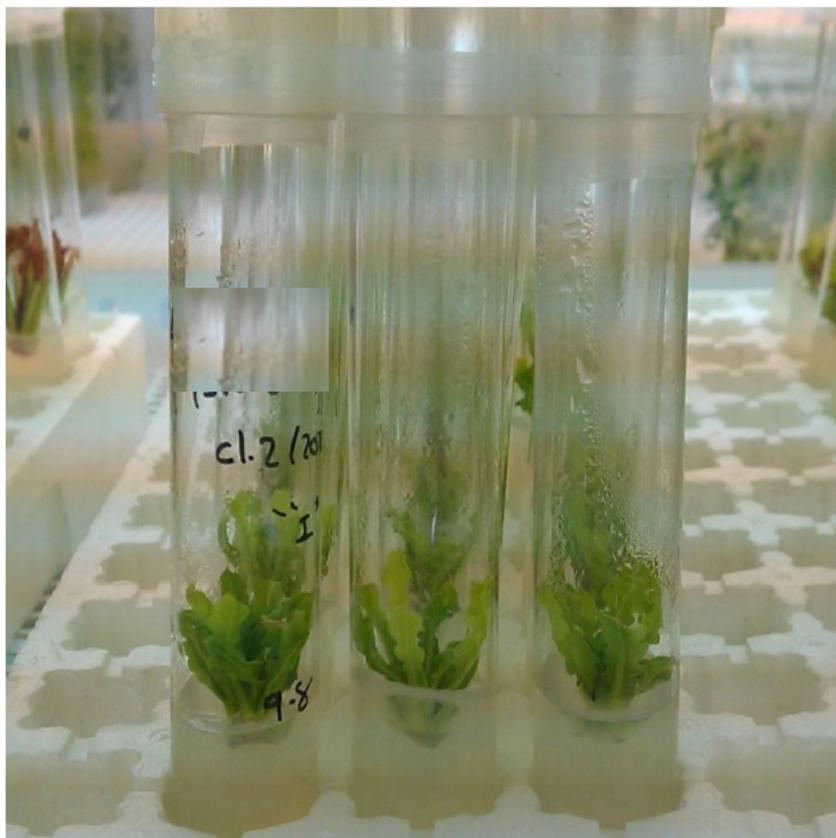


Figura 4.2.9. Estado de las plantas de SN9000 al inicio del subcultivo a 4 °C.

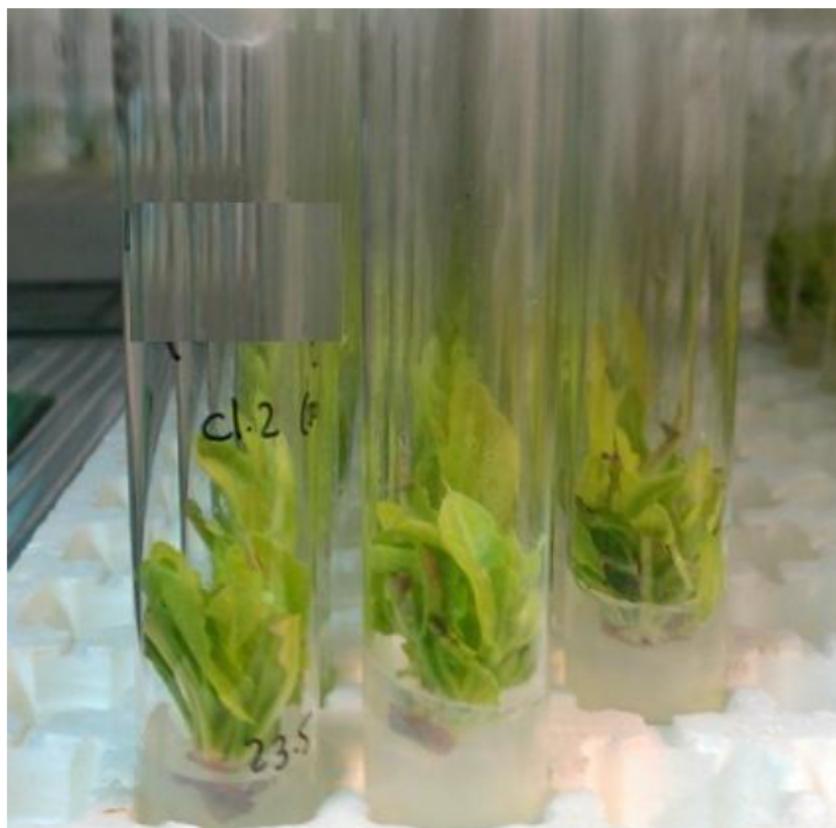


Figura 4.2.10. Estado de las plantas de SN9000 al final del subcultivo a 4 °C.

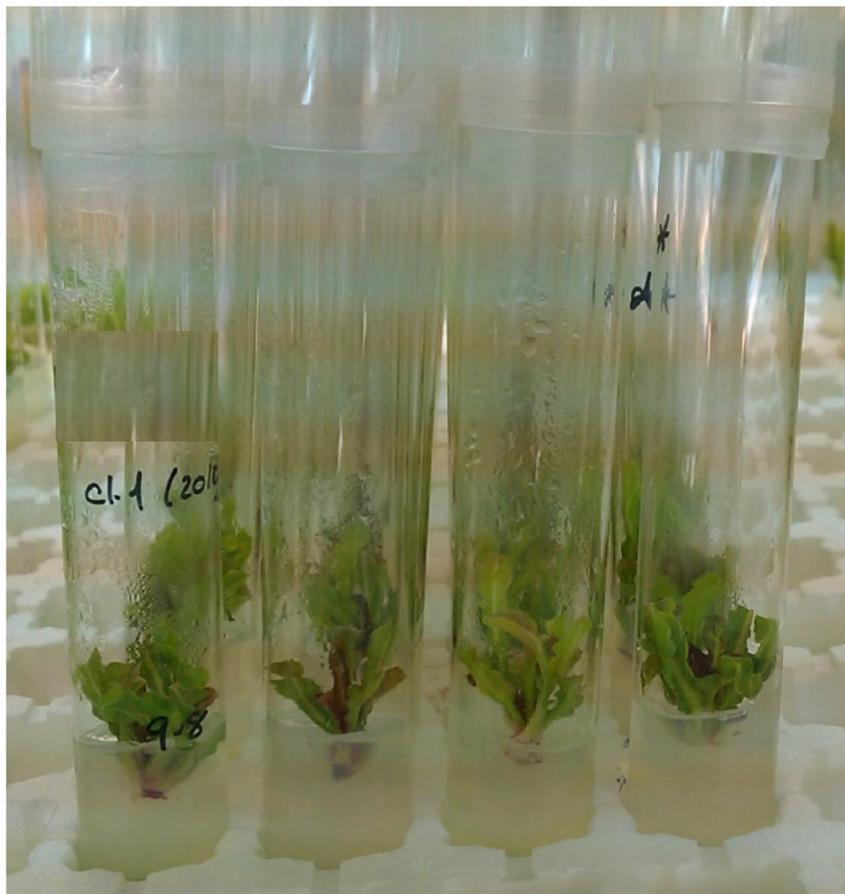


Figura 4.2.11. Estado de las plantas de SN9001 al inicio del subcultivo e a 4 °C.

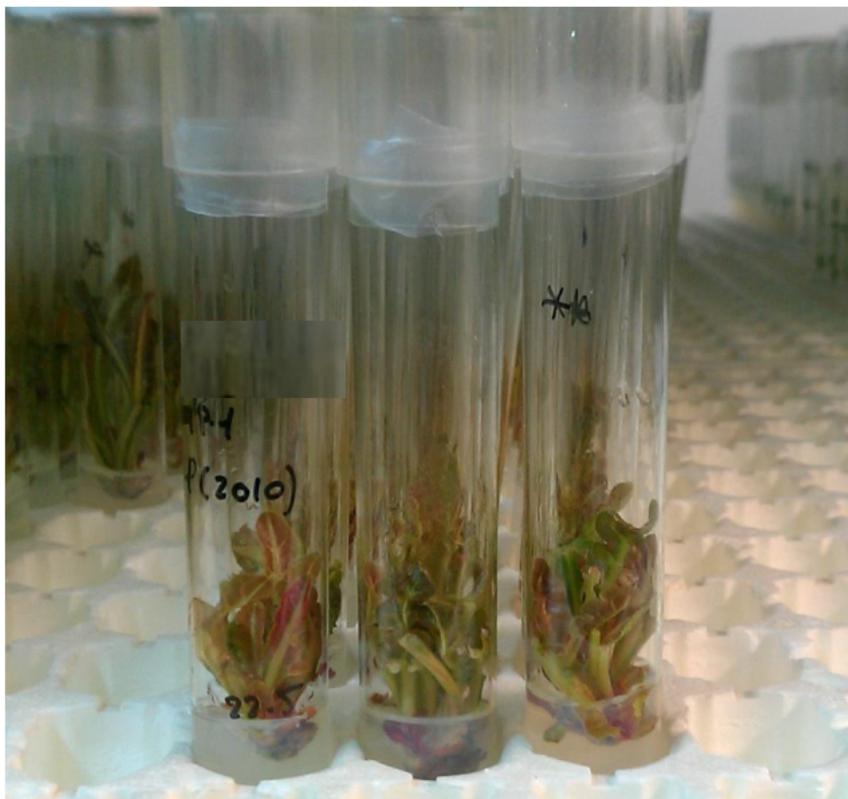


Figura 4.2.12. Estado de las plantas de SN9001 al final del subcultivo a 4 °C.

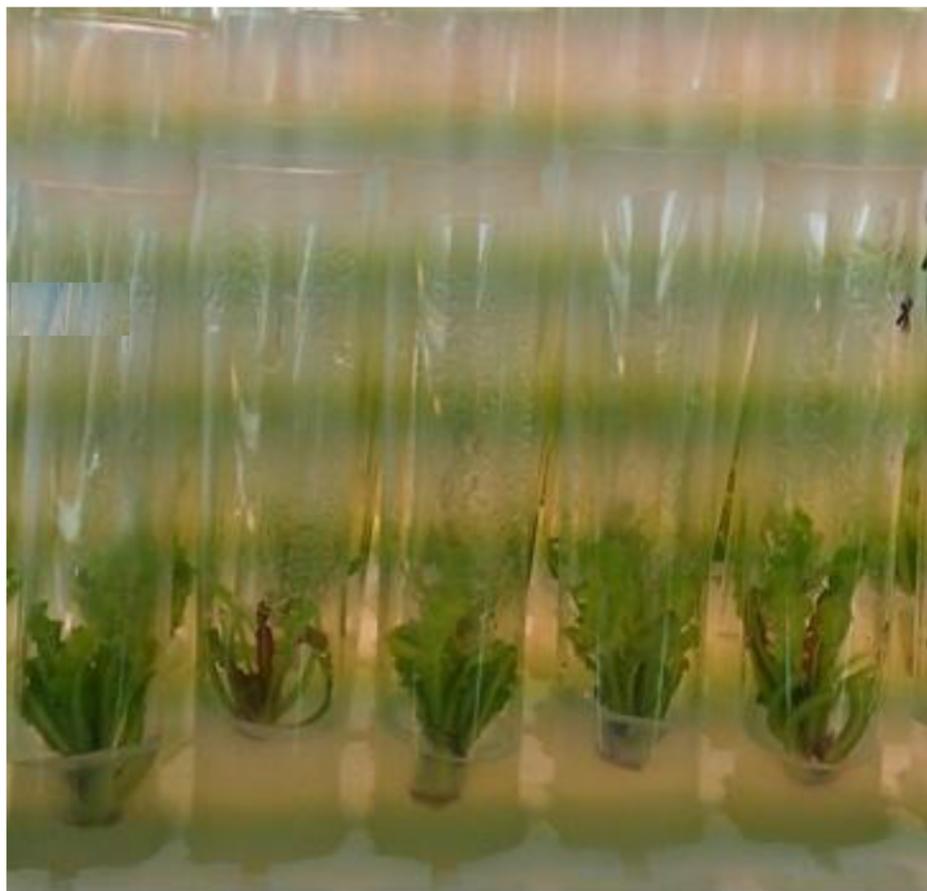


Figura 4.2.13. Estado de las plantas de SN8946 al inicio del subcultivo a 12 °C.

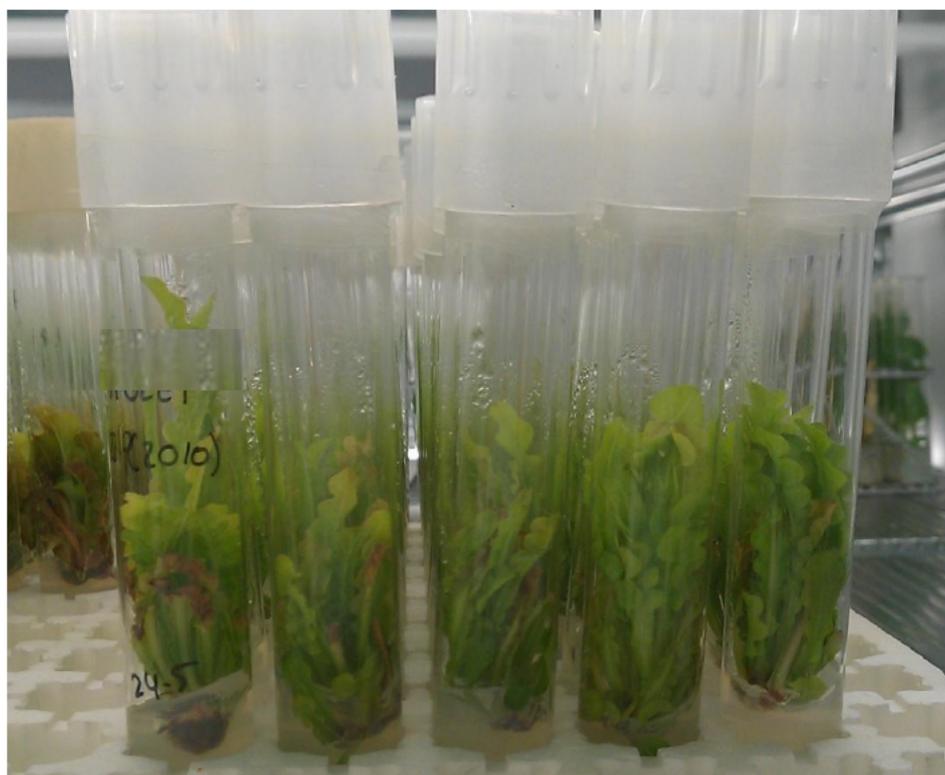


Figura 4.2.14. Estado de las plantas de SN8946 al final del subcultivo a 12 °C.

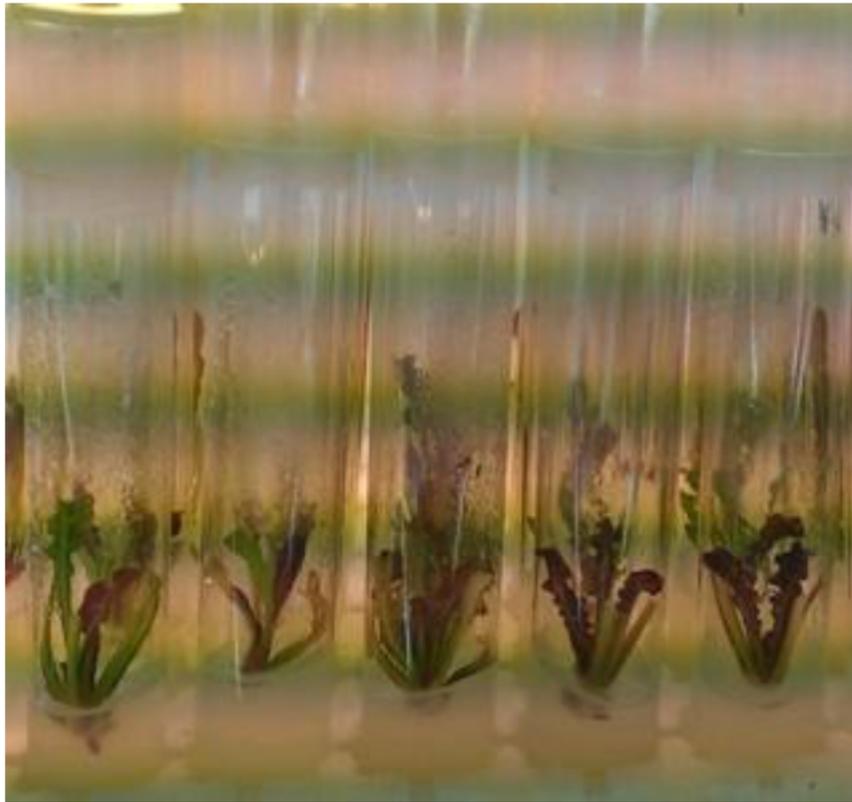


Figura 4.2.15. Estado de las plantas de SN9013 al inicio del subcultivo a 12 °C.



Figura 4.2.16. Estado de las plantas de SN9013 al final del subcultivo a 12 °C.

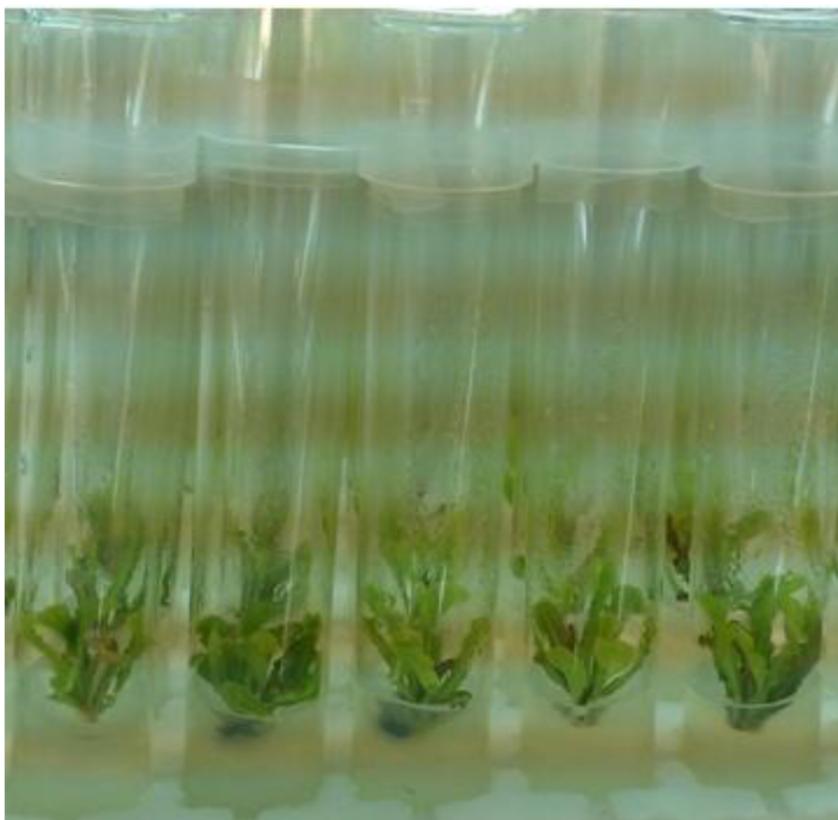


Figura 4.2.17. Estado de las plantas de SN9000 al inicio del subcultivo a 12 °C.

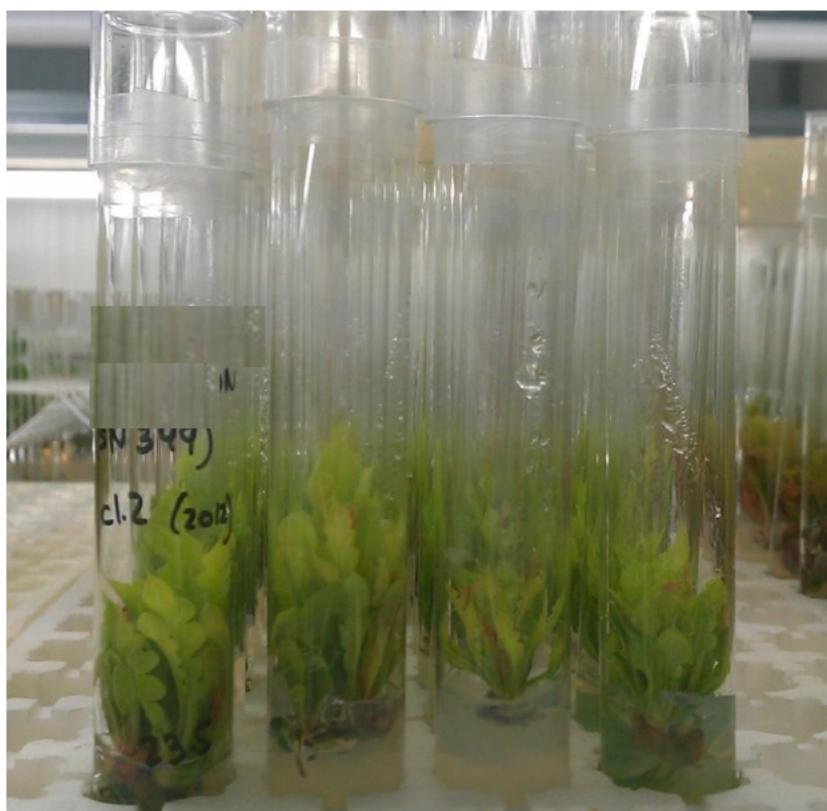


Figura 4.2.18. Estado de las plantas de SN9000 al final del subcultivo a 12 °C.

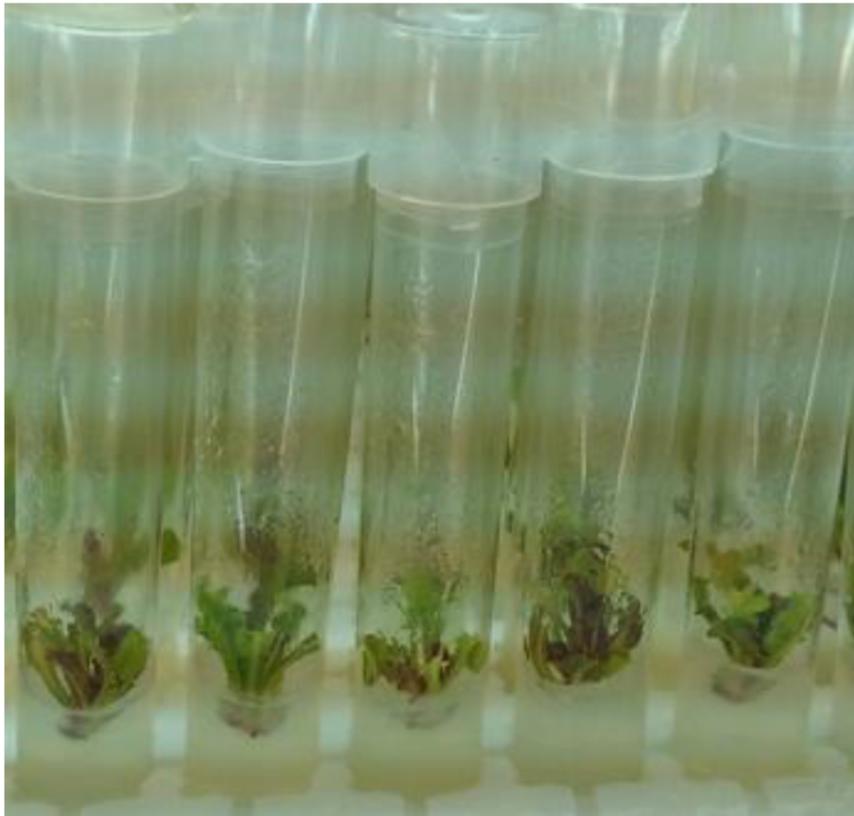


Figura 4.2.19. Estado de las plantas de SN9001 al inicio del subcultivo a 12 °C.

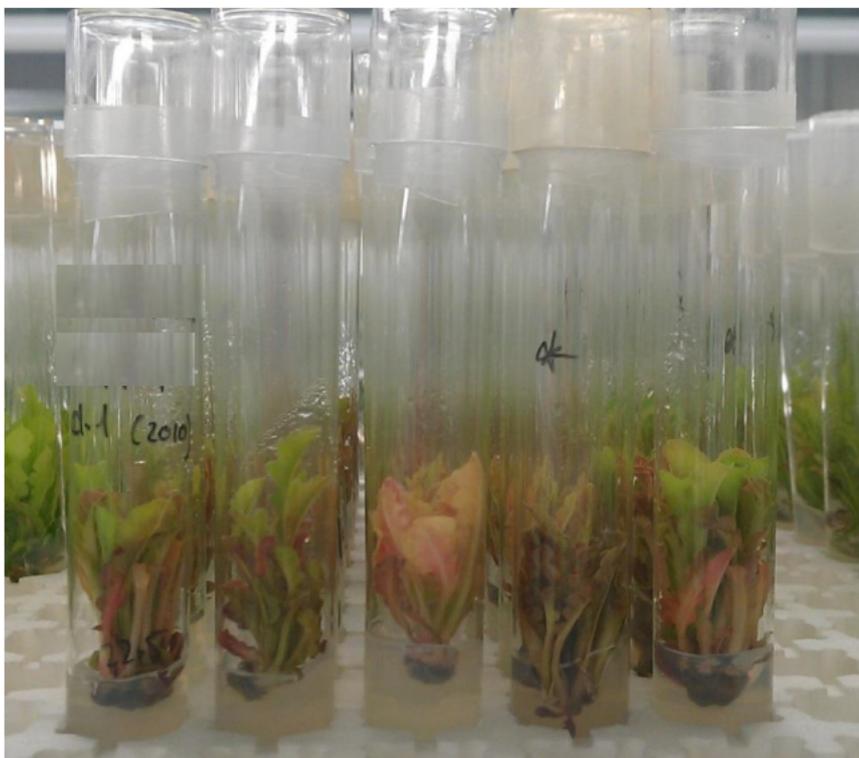


Figura 4.2.20. Estado de las plantas de SN9001 al final del subcultivo a 12 °C.

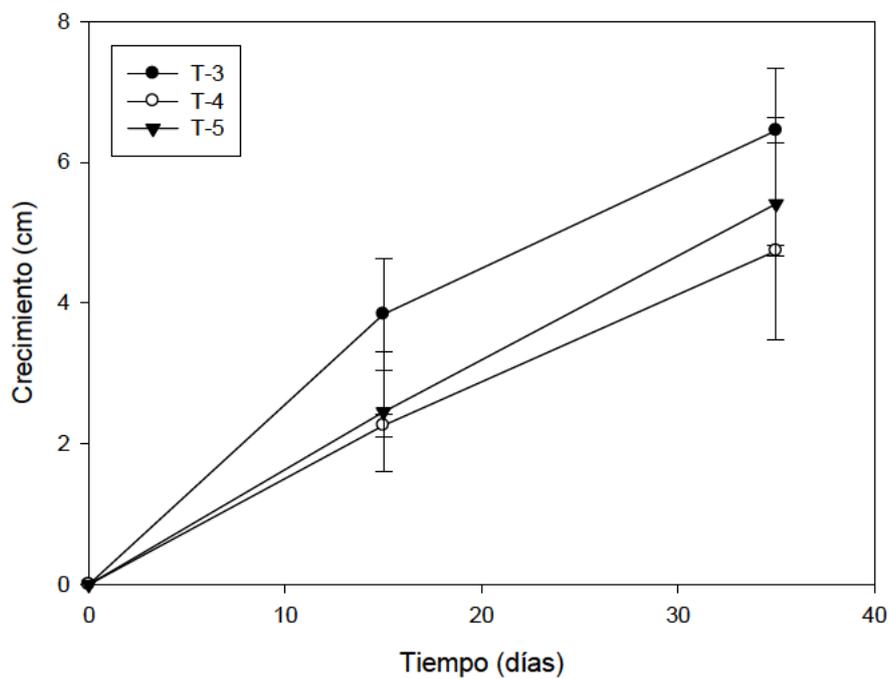


Figura 4.2.21. Evolución del crecimiento *in vitro* a 22 °C de la variedad SN8946 tras los tratamientos a bajas temperaturas.

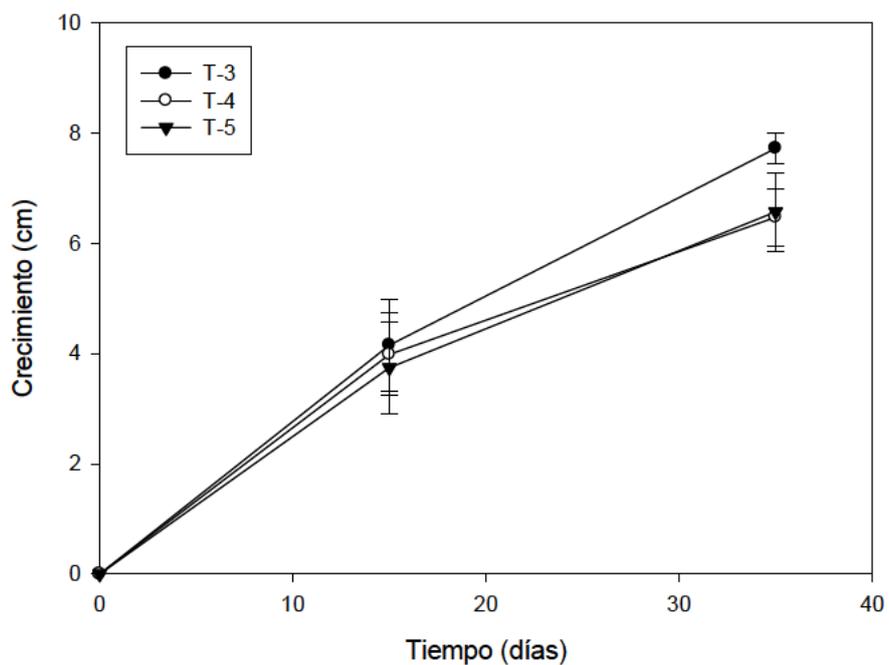


Figura 4.2.22. Evolución del crecimiento *in vitro* a 22 °C de la variedad SN9013 tras los tratamientos a bajas temperaturas.

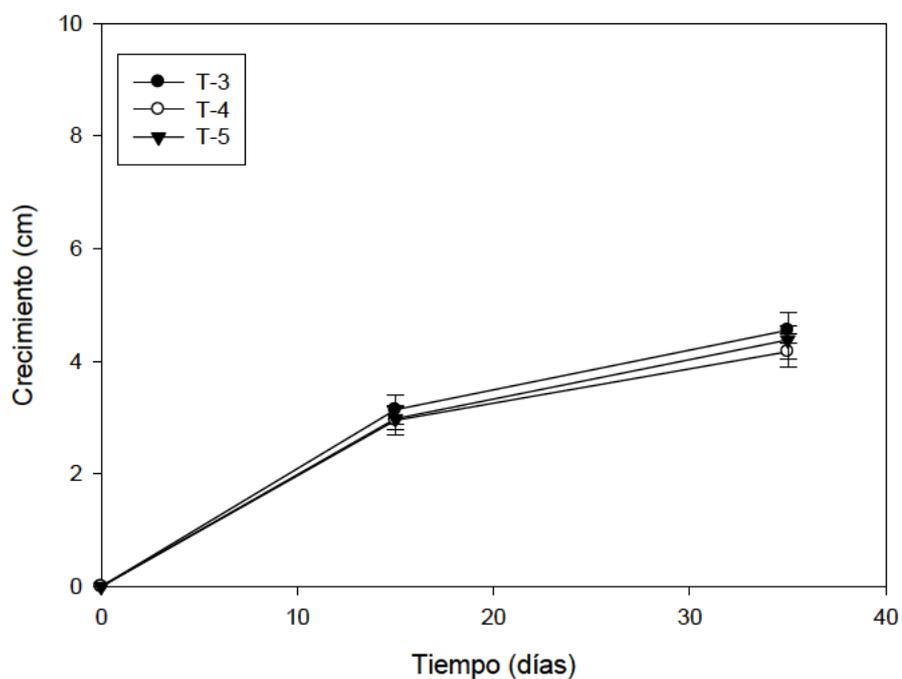


Figura 4.2.23. Evolución del crecimiento *in vitro* a 22 °C de la variedad SN9000 tras los tratamientos a bajas temperaturas.

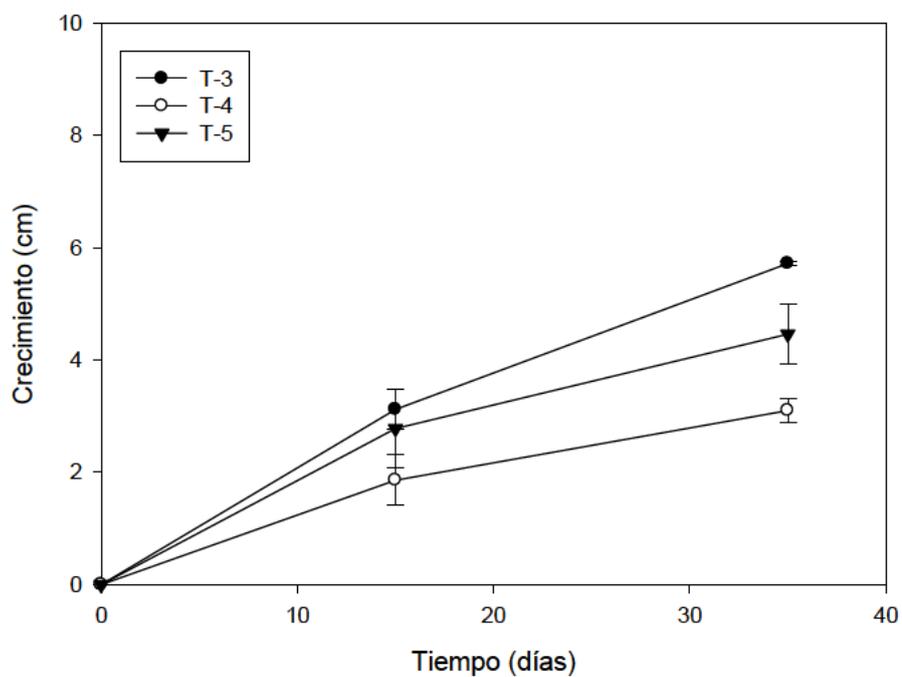


Figura 4.2.24. Evolución del crecimiento *in vitro* a 22 °C de la variedad SN9001 tras los tratamientos a bajas temperaturas.

Tabla 4.2.2. Parámetros de producción *in vitro* de las variedades en la fase de multiplicación a 22 °C después de los tratamientos a bajas temperaturas.

Variedad	Tratamiento	Tasa de multiplicación (brotes/planta)	Peso fresco (g/planta)	Peso seco (g/planta)
SN8946	T-3	2.17 ± 0.17a	2.78 ± 0.24a	0.15 ± 0.01a
	T-4	1.40 ± 0.23a	1.93 ± 0.24a	0.13 ± 0.02a
	T-5	1.93 ± 0.52a	2.14 ± 0.24a	0.14 ± 0.01a
SN9013	T-3	2.07 ± 0.11a	2.49 ± 0.16a	0.15 ± 0.01a
	T-4	1.38 ± 0.26a	1.86 ± 0.35a	0.11 ± 0.02a
	T-5	2.09 ± 0.54a	1.83 ± 0.44a	0.12 ± 0.02a
SN9000	T-3	2.07 ± 0.11a	1.67 ± 0.16a	0.11 ± 0.02a
	T-4	1.55 ± 0.07a	1.27 ± 0.35a	0.07 ± 0.00a
	T-5	1.74 ± 0.39a	1.74 ± 0.44a	0.11 ± 0.01a
SN9001	T-3	1.61 ± 0.02ab	2.63 ± 0.29a	0.16 ± 0.01a
	T-4	1.26 ± 0.04b	1.41 ± 0.11b	0.09 ± 0.00b
	T-5	2.26 ± 0.29a	2.65 ± 0.26a	0.17 ± 0.02a

La utilización del almacenamiento bajas temperaturas también ha demostrado ser un método útil en otras especies como *Syringa vulgaris* para conservar durante un largo periodo de tiempo el germoplasma (banco de variedades) usando poco espacio y con un coste reducido (Refouvelet et al., 1998; Jacobson et al., 2006).

El número de brotes (tasa de multiplicación) y la longitud de los mismos normalmente es mayor cuanto más alta es la temperatura de incubación, sin embargo en *Syringa vulgaris*, estos parámetros mejoraron cuando la temperatura pasó de 20 °C a 15 °C (Gabryszewska, 2011).

En general, en los estudios de aplicación de técnicas de crecimiento lento, se observa como en función de la temperatura de almacenamiento la variación de los parámetros estudiados fue mayor con respecto al control, llegando a ser las diferencias significativas. Lo que se busca normalmente, en estos estudios es concretar un sistema de almacenamiento que, sin sacrificar la calidad requerida en la manipulación, minimice la temperatura de conservación. En este sentido, otros autores, cuando han realizado ensayos

de este tipo, muestran que también hay que tener en cuenta otras interacciones, como, por ejemplo, con la composición del medio de cultivo (reguladores de crecimiento y azúcar) y con la luz. En relación a este último factor, se suele intentar almacenar las plantas cerca de su punto de compensación para la luz (balance entre fotosíntesis y respiración), lo cual reduce la elongación excesiva del material (Wilson et al., 2000). Kubota y Kozai (1995) mostraron que este punto de compensación para la luz varía con la temperatura y el nivel de azúcar en el medio. Almacenar las plantas cerca de este punto hacía que crecieran lentas y sin un incremento de peso seco (Kubota et al., 1996). Añadiendo sacarosa al medio subió el peso seco, los azúcares solubles (almidón) y la calidad de las plantas (Wilson et al., 1998a; 1998b), pero si se bajaba se reducía el gasto en materiales y la incidencia de contaminación (Kozai, 1991).

El tipo de luz (su calidad) no se ha tenido en cuenta durante este ensayo, pues la iluminación en función de la cámara de cultivo donde estaban las plantas era menor cuanto menor era la temperatura, aunque siempre se usó el mismo tipo (luz blanca). Sin embargo, la calidad de la luz sí fue tomada en cuenta por otros autores, ya que esta podía afectar al crecimiento y desarrollo de las plantas (Economou y Read, 1987, Sergeeva et al., 1994); concretamente la luz roja incrementaba la longitud internodal y la formación de raíces en *Artemisia balchanorum* H. Kraschen (Sprinchanu y Butenko, 1992), favorecía el enraizamiento *in vitro* de plantas de *Pyrus communis* L. (Bertazza et al., 1995), y el almacenamiento de semillas de brócoli (Wilson et al., 1998a). Estudios llevados a cabo con *Hosta tokudama* mostraron que las plantas micropropagadas a una temperatura de 5 °C durante 6 semanas no respondieron a la luz roja ni a la luz azul (Kubota et al., 1996). Está claro que diferentes especies responden de forma distinta a la calidad de la luz durante el almacenamiento a bajas temperaturas, como en las plantas de brócoli, que sí aumentaron su crecimiento bajo la irradiación con luz roja (Wilson et al., 1998a).

El almacenamiento a baja temperatura ha sido usado en la conservación de la calidad en postrecolección de diferentes hortícolas, de manera que la

elección de la luz durante este almacenamiento puede mejorar la calidad de las plantas. De hecho, estudios revelaron que la irradiación con luz roja durante el almacenamiento de plantas de fresa a bajas temperaturas incrementaron el área foliar, el contenido de clorofilas y la tasa fotosintética (Nishizawa et al., 1997). Sin embargo, en lo referido a la temperatura durante el almacenamiento en condiciones de cultivo en *in vitro* existen muy pocos informes. Así, las plantas de brócoli pudieron sobrevivir *in vitro* a 5 °C durante 6 semanas (Kubota et al., 1996), pero no más de 8 semanas (Wilson et al., 1998a).

Diferentes especies responden de manera distinta a los tratamientos de bajas temperaturas (Lange et al., 1991). Así, cuando se usaron tubos fluorescentes que emitieron cerca del punto de compensación de luz para *Hosta tokudama* a 5, 10 y 22 °C, con el fin de poder tener las plantas micropropagadas después de la fase *in vitro* en las mejores condiciones, se encontró que la iluminación ayudó a mantener el peso seco de las plantas durante la fase de multiplicación en la cámara de cultivo, llegando incluso a subir su peso seco cuando fueron almacenadas a 22 °C bajo luz blanca y sin apenas amarilleamiento (Wilson et al., 2000). Por contra, las plantas que fueron almacenadas en oscuridad no se pudieron recuperar en el invernadero, lo que, finalmente, afectó al rendimiento del proceso de micropropagación (Wilson et al., 2000).

Los resultados de los ensayos realizados en el presente estudio muestran que las condiciones de almacenamiento de las plantas a 12 °C pueden ser idóneas para almacenar el stock durante 3 meses, recuperándose el crecimiento normal al subcultivar el material almacenado e incubar de nuevo a 22 °C. Con otras especies, como *Hosta tokudama*, las plantas almacenadas a 22 °C con iluminación blanca presentaron incluso el mejor aspecto (antes ser trasplantadas al invernadero), pero conforme pasó el tiempo la calidad visual iba subiendo en todos los tratamientos (5 °C y 10 °C) (Wilson et al., 2000). El ensayo aludido concluyó que a 22 °C las plantas iluminadas con luz blanca podían ser almacenadas durante 12 semanas bajo su punto de compensación para la luz y que podían crecer en invernadero

durante 8 semanas sin variaciones en el peso seco o la calidad visual (Wilson et al., 2000).

4.2.2. Concentración clorofilas a, b y totales

En la primera fase del ensayo las variedades SN8946 y SN9001 presentaron los contenidos más altos de clorofila a en el T-1, observándose diferencias con respecto a T2 y T-3 en la variedad violeta, y a T-3 en la variedad rosa. Los cultivares de color blanco y amarillo mostraron el valor más elevado en el T-3, y se vieron diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos. También siguieron el mismo patrón los contenidos de clorofila b y clorofilas totales (Tabla 4.2.3.)

Respecto a la relación clorofila a/b los datos fueron similares en SN8946 y SN9001, donde el valor más alto se dio en el T-2 y mostró diferencias con T-1 y T-3. Sin embargo, en las otras dos variedades el valor más alto se obtuvo para T-3 llegando casi a 1.

Tabla 4.2.3. Concentración de clorofilas a, b y totales durante la fase de multiplicación *in vitro* en el ensayo de bajas temperaturas.

Variedad	Tratamiento	Clorofila a (microg/g PF)	Clorofila b (microg/g PF)	Clorofilas totales (microg/g PF)	Relación clorofila a/b
SN8946	T-1	151.69 ± 12.61a	201.39 ± 25.37a	353.09 ± 37.93a	0.78 ± 0.03b
	T-2	113.81 ± 5.90b	119.13 ± 3.99b	232.94 ± 9.83b	0.95 ± 0.02a
	T-3	111.91 ± 3.19b	132.95 ± 5.26b	244.85 ± 5.81b	0.85 ± 0.04b
SN9013	T-1	116.42 ± 1.09b	122.12 ± 2.10b	238.54 ± 2.88b	0.95 ± 0.01a
	T-2	110.42 ± 2.78b	121.01 ± 5.01b	231.44 ± 7.69b	0.91 ± 0.02a
	T-3	139.60 ± 6.69a	140.66 ± 2.87a	280.26 ± 6.55a	0.99 ± 0.06a
SN9000	T-1	122.91 ± 3.03b	126.42 ± 1.43b	249.33 ± 4.43b	0.97 ± 0.01a
	T-2	111.93 ± 3.61b	123.41 ± 3.45b	235.35 ± 6.34b	0.91 ± 0.02b
	T-3	137.02 ± 3.48a	137.71 ± 2.62a	274.74 ± 5.62a	0.99 ± 0.02a
SN9001	T-1	115.18 ± 6.35a	137.81 ± 11.40a	252.99 ± 17.68a	0.85 ± 0.02b
	T-2	129.80 ± 6.55a	123.66 ± 3.28ab	253.46 ± 9.81a	1.04 ± 0.02a
	T-3	96.76 ± 1.78b	109.83 ± 1.13b	206.59 ± 2.90b	0.88 ± 0.01b

Cuando el material cultivado a baja temperatura fue subcultivado e incubado de nuevo a 22 °C, los contenidos en clorofila a en las variedades SN8946 y SN9001 presentaron el mayor valor en el T-4, el cual se diferenció de los otros dos tratamientos. También ocurrió algo similar en la variedad amarilla, pero en ese caso no hubo diferencias entre tratamientos. Con respecto a la variedad de flores blancas, SN9013, el dato más alto lo mostró el T-3, y solo se hallaron diferencias significativas con el T-5 (Tabla 4.2.4.).

En cuanto a la cantidad de clorofila b, las variedades violeta, amarilla y rosa, mostraron patrones de contenidos similares a los de la clorofila a, pero sin diferencias significativas entre tratamientos. En SN9013 ocurrió lo mismo que para la clorofila a.

Tabla 4.2.4. Concentración de clorofilas a, b y totales durante la fase de multiplicación *in vitro* después de los tratamientos a bajas temperaturas.

Variedad	Tratamiento	Clorofila a (microg/g PF)	Clorofila b (microg/g PF)	Clorofilas totales (microg/g PF)	Relación clorofila a/b
SN8946	T-3	111.91 ± 3.19b	132.95 ± 5.26a	244.85 ± 5.81a	0.85 ± 0.04b
	T-4	145.86 ± 3.02a	138.51 ± 4.94a	284.38 ± 7.67a	1.06 ± 0.02a
	T-5	107.01 ± 1.72b	114.34 ± 2.52a	221.35 ± 4.09a	0.94 ± 0.03b
SN9013	T-3	139.60 ± 6.69a	140.66 ± 2.87a	280.26 ± 6.55a	0.99 ± 0.06a
	T-4	128.59 ± 3.31ab	124.97 ± 3.13b	253.57 ± 6.31b	1.03 ± 0.01a
	T-5	114.57 ± 1.39b	123.68 ± 1.57b	238.26 ± 2.15b	0.93 ± 0.02a
SN9000	T-3	137.02 ± 3.48a	137.71 ± 2.62a	274.74 ± 5.62a	0.99 ± 0.02b
	T-4	148.91 ± 3.07a	140.63 ± 1.39a	289.55 ± 4.30a	1.06 ± 0.01a
	T-5	141.19 ± 3.41a	142.34 ± 2.43a	283.53 ± 5.57a	0.99 ± 0.01b
SN9001	T-3	96.76 ± 1.78b	109.83 ± 1.13a	206.59 ± 2.90a	0.88 ± 0.01b
	T-4	119.22 ± 1.85a	117.65 ± 1.87a	236.87 ± 3.67a	1.01 ± 0.01a
	T-5	94.39 ± 2.86b	106.98 ± 1.41a	201.38 ± 3.71a	0.88 ± 0.02b

La evolución de las clorofilas totales fue similar a la de los parámetros anteriores en todas las variedades, no mostrándose diferencias entre tratamientos en los cultivares SN8946, SN9000 y SN9001. También se produjo para la variedad blanca un comportamiento igual al encontrado para las clorofilas a y b.

En cuanto a la relación clorofila a/b los valores mayores se encontraron en el T-4 para las variedades de color violeta, amarillo y rosa, mostrando diferencias con los tratamientos T-3 y T-5. La variedad SN9013 también mostró el valor más alto en el T-4, pero aquí no se hallaron diferencias entre tratamientos.

La interpretación de los resultados obtenidos en este ensayo, en lo que respecta al contenido de pigmentos fotosintéticos, lleva a la conclusión de que, por una parte, las variedades que no acumulan antocianinas en sus flores (SN9000 y SN9013) son más sensibles a las bajas temperaturas, ya que presentan un mayor descenso en los niveles de clorofilas con respecto a las condiciones control. Entre las variedades SN8946 y SN9001, la primera necesita una mayor bajada de la temperatura para mostrar una respuesta, aunque, en ambos casos, ésta consistió en un aumento de los niveles de clorofila total. Por otra parte, todas las variedades, con la excepción de SN9013, recuperan los niveles de clorofila cuando vuelven a ser subcultivadas en condiciones control, tras pasar por un periodo de crecimiento a baja temperatura. En el caso de la variedad SN9013, la incubación a 4 °C parece afectar a la capacidad de síntesis de clorofilas, al menos durante el primer subcultivo después del tratamiento frío.

4.2.3. Niveles de fenoles solubles totales, flavonoides solubles y almidón

Las variedades SN8946 y SN9000 presentaron niveles de fenoles solubles similares en el T-2 y el T-3, y con diferencias significativas con respecto al T-1 que mostró casi la mitad de estos compuestos en la variedad violeta, y por debajo de la mitad en la amarilla. Ocurrió algo parecido en la variedad de color blanco, SN9013, pero los valores de los tres tratamientos estaban más próximos. Para la variedad SN9001 se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos. De manera global los datos más altos fueron similares en todas las variedades, si bien la variedad con flores de color violeta mostró los valores más elevados (Tabla 4.2.5.).

El contenido de flavonoides mostró la misma evolución en las variedades SN8946, SN9013 y SN9000, de forma que el valor más alto fue para el T-3 y bajaba el contenido conforme disminuía la temperatura a la que se desarrolló el ensayo. Para el cultivar de color violeta se hallaron diferencias significativas entre los tres tratamientos, mientras que en la de color blanco la distinción se encontró entre el T-1 y T-3, y por último en la de color amarillo los valores significativamente diferentes se dieron entre T-2 y T-3 con respecto al T-1. En cuanto a la variedad SN9001 el dato más alto fue para el T-2, donde la temperatura del subcultivo fue de 12 °C, y se observaron diferencias con respecto al T-1, que resultó en los valores más bajos (Tabla 4.2.5.).

En cuanto al contenido en almidón las variedades SN8946 y SN9001 mostraron resultados muy similares, donde el tratamiento T-2 dio los valores más altos, seguido del T-3 y T-1, que arrojó los más bajos. En estas variedades no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Para la variedad de color blanco, el valor más alto correspondió también para T-2 y se diferenció significativamente de los otros tratamientos. En la variedad SN9000 se observó que el mayor contenido de almidón fue el T-1, cuya temperatura de la cámara de cultivo fue de 4 °C, y el contenido de este compuesto disminuía a medida que aumentaba la temperatura. Se hallaron diferencias significativas entre el T-1 y el T-3 (Tabla 4.2.5.).

La disminución de la temperatura de crecimiento debería provocar un enlentecimiento de la actividad metabólica de los tejidos que llevaría a un menor consumo de reservas. En este sentido, el comportamiento de la variedad SN9000 sería el esperado, con mayores niveles de almidón en los materiales cultivados a la menor temperatura. Más difícil de entender es lo descrito para la variedad SN9013, en la que se produce un aumento de las reservas para la temperatura de incubación intermedia. Resultados preliminares obtenidos por GC-MS parecen indicar que se produce una reducción notable del contenido de azúcares solubles, como la sacarosa, en los tejidos del material cultivado a 12 °C (datos no mostrados) en

comparación con lo que sucede a las otras temperaturas y en las otras variedades.

Tabla 4.2.5. Concentración de fenoles, flavonoides y almidón en la fase de multiplicación *in vitro* en el ensayo de bajas temperaturas.

Variedad	Tratamiento	Fenoles ($\mu\text{mol eq. ácido gálico/g PF}$)	Flavonoides ($\mu\text{mol eq. rutina/g PF}$)	Almidón ($\mu\text{mol eq. glucosa/g PF}$)
SN8946	T-1	18.25 \pm 0.68b	2.69 \pm 0.17c	314.22 \pm 15.71a
	T-2	32.81 \pm 1.53a	3.84 \pm 0.11b	354.68 \pm 28.60a
	T-3	33.23 \pm 0.93a	4.89 \pm 0.10a	345.70 \pm 27.55a
SN9013	T-1	17.01 \pm 0.99b	3.19 \pm 0.15b	316.47 \pm 3.56b
	T-2	22.15 \pm 0.45a	3.81 \pm 0.05ab	388.92 \pm 15.54a
	T-3	23.56 \pm 0.91a	4.03 \pm 0.32a	304.92 \pm 24.07b
SN9000	T-1	12.28 \pm 0.32b	2.27 \pm 0.07b	307.36 \pm 26.97a
	T-2	26.65 \pm 1.21a	3.85 \pm 0.30a	259.11 \pm 11.28ab
	T-3	26.57 \pm 1.18a	4.17 \pm 0.29a	223.59 \pm 15.17b
SN9001	T-1	16.99 \pm 0.36c	2.60 \pm 0.13b	300.39 \pm 11.89a
	T-2	22.19 \pm 1.65b	3.61 \pm 0.15a	353.46 \pm 7.45a
	T-3	27.39 \pm 1.23a	3.16 \pm 0.54ab	308.98 \pm 16.36a

Los perfiles de compuestos fenólicos obtenidos por HPLC tras los tratamientos a baja temperatura no mostraron diferencias cualitativas destacables entre los extractos de cada una de las variedades (Fig. 4.2.25.). El cultivo a baja temperatura tiende a provocar una reducción de la complejidad de los picos de la denominada región 2 de los cromatogramas extraídos a 280 nm, indicativo de una disminución de la acumulación de galocatequinas en los tejidos del vástago. También provoca una disminución de las señales asociadas a derivados de ácidos hidroxicinámicos (región 6 en la Fig. 4.2.25.) y del derivado flavonoide correspondiente al pico 3. En cuanto al pico mayoritario en los cromatogramas de todas las variedades, el pico 4, no presenta grandes variaciones con los tratamientos térmicos, con la excepción de la variedad SN9000, en la que se produce una disminución considerable en la intensidad del pico para el tratamiento a 4 °C.

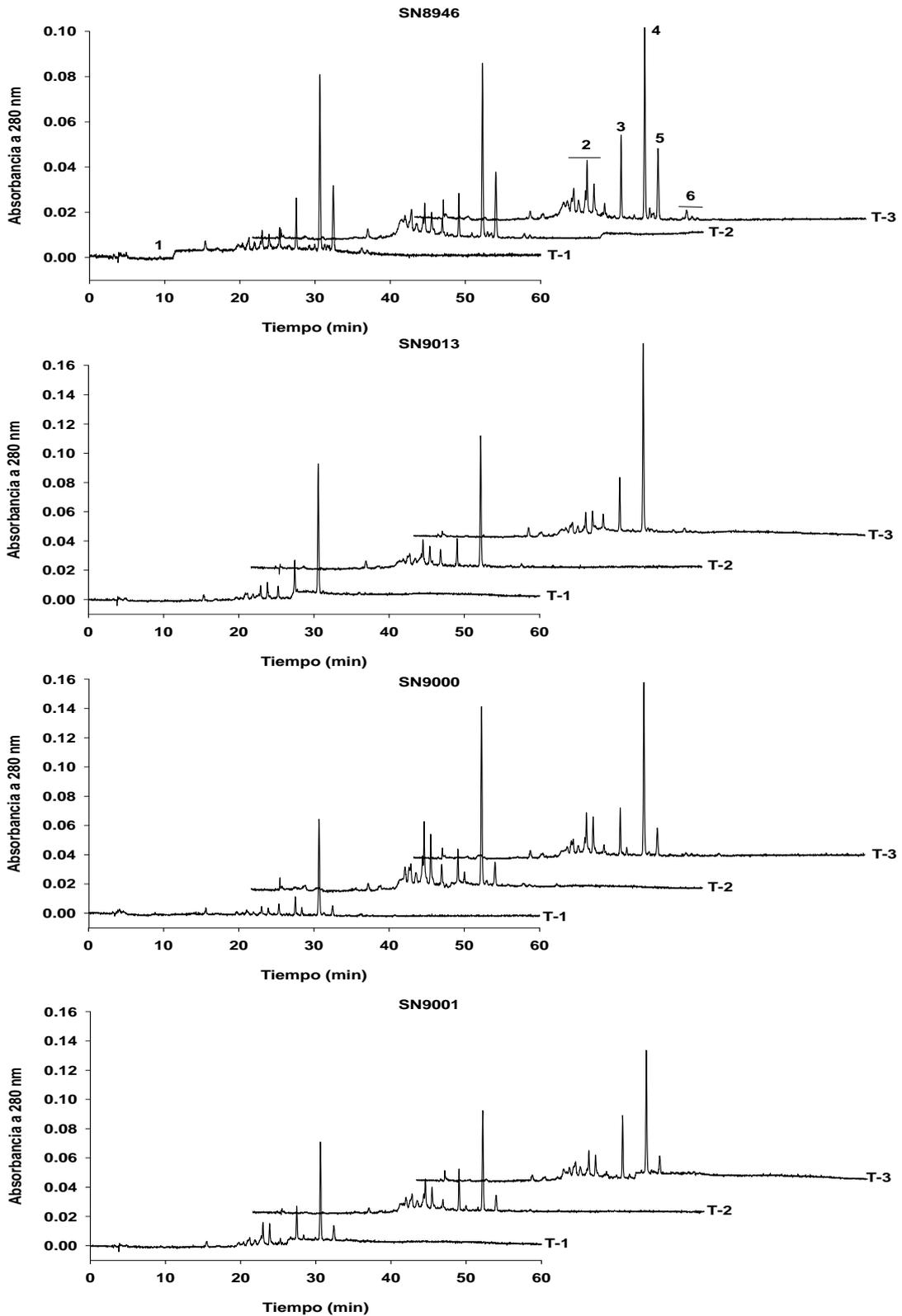


Figura 4.2.25. Cromatogramas obtenidos a 280 nm de los extractos metanólicos de vástagos procedentes de las cuatro variedades de *L. sinuatum* sometidas a diferentes condiciones de temperatura durante la fase de multiplicación *in vitro*.

En la segunda parte del ensayo (resultados mostrados en la Tabla 4.2.6.), la variedad SN8946 mostró los datos más elevados en cuanto al contenido de fenoles en el T-3, seguido del T-4 y T-5, en el que se obtuvieron los valores más bajos. Se observaron diferencias significativas entre T-3 y T-4 con respecto a T-5. En los cultivares de color blanco y amarillo, el comportamiento de los tratamientos respecto al contenido fenólico fue similar, encontrándose diferencias entre T-3 y T-5 con respecto al T-4, que mostró los datos más bajos. La variedad SN9001 presentó diferencias entre todos los tratamientos, siendo el valor más elevado para el T-5.

En cuanto al contenido de flavonoides el cultivar de color violeta mostró los datos más altos en el T-3, el cual se diferenció significativamente con respecto a T-5. Las variedades SN9013 y SN9001 presentaron los datos más elevados en el T-5, encontrándose diferencias con el T-4. Por último, en la variedad SN9000 el contenido en flavonoides fue similar en todos los tratamientos, por lo que esta variedad no se vio afectada en este parámetro cuando después de ser subcultivado a temperaturas distintas volvió a la cámara de 22 °C.

Tabla 4.2.6. Concentración de fenoles, flavonoides y almidón en la fase de multiplicación *in vitro* después de los tratamientos a bajas temperaturas.

Variedad	Tratamiento	Fenoles ($\mu\text{mol eq. ácido gálico/g PF}$)	Flavonoides ($\mu\text{mol eq. rutina/g PF}$)	Almidón ($\mu\text{mol eq. glucosa/g PF}$)
SN8946	T-3	33.23 \pm 0.93a	4.89 \pm 0.10a	345.70 \pm 27.55a
	T-4	32.21 \pm 1.25a	4.51 \pm 0.09ab	228.11 \pm 17.36b
	T-5	25.74 \pm 0.61b	3.97 \pm 0.26b	360.79 \pm 22.55a
SN9013	T-3	23.56 \pm 0.91a	4.03 \pm 0.32ab	304.92 \pm 24.07b
	T-4	20.01 \pm 0.51b	3.32 \pm 0.12b	365.65 \pm 13.84ab
	T-5	26.41 \pm 0.44a	4.12 \pm 0.18a	423.36 \pm 13.20a
SN9000	T-3	26.57 \pm 1.18a	4.17 \pm 0.29a	223.59 \pm 15.17b
	T-4	21.07 \pm 1.49b	3.93 \pm 0.16a	314.25 \pm 18.39a
	T-5	28.58 \pm 0.59a	4.01 \pm 0.17a	380.92 \pm 19.83a
SN9001	T-3	27.39 \pm 1.23b	3.16 \pm 0.54ab	308.98 \pm 16.36a
	T-4	21.63 \pm 0.58c	2.81 \pm 0.06b	391.86 \pm 34.57a
	T-5	33.48 \pm 0.73a	4.43 \pm 0.19a	378.03 \pm 19.82a

En las variedades SN8946, SN9013 y SN9000 el contenido más alto en almidón correspondió al T-5. En la variedad violeta se observaron diferencias con respecto al T-4, mientras que en la de color blanco y amarillo la distinción fue con relación a T-3. En cuanto a SN9001 el valor más elevado en almidón correspondió al T-4, seguido del T-5 y T-3, sin hallarse diferencias entre tratamientos.

4.2.4. Capacidad antioxidante: ABTS y FRAP

La capacidad antioxidante medida con dos protocolos diferentes arrojó comportamientos y valores similares entre ellos en las variedades estudiadas en función de las temperaturas de la cámara de cultivo durante la fase de multiplicación *in vitro* (Fig. 4.2.26. a 4.2.31.).

En un primer apartado se estudiaron los datos comparando temperaturas de los tratamientos T-1 (4 °C), T-2 (12 °C) y T-3 (22 °C) y su capacidad antioxidante al finalizar el periodo de subcultivo en esas condiciones.

Se observaron evoluciones similares para las variedades SN8946, SN9013 y SN9001, de manera que la capacidad antioxidante medida con el protocolo ABTS que tuvo como referencia el ácido gálico aumentaba al subir la temperatura de la cámara de cultivo. Además, en estos tres cultivares se observaron diferencias significativas entre T-2 y T-3 que tenían valores más elevados que el T-1. Sin embargo, la evolución en la variedad amarilla es diferente, pues el dato más alto fue para las plantas subcultivadas a 12 °C, presentándose también diferencias entre T-2 y T-3 con respecto a T-1, que mostró el valor más bajo del todo el ensayo en esta primera parte.

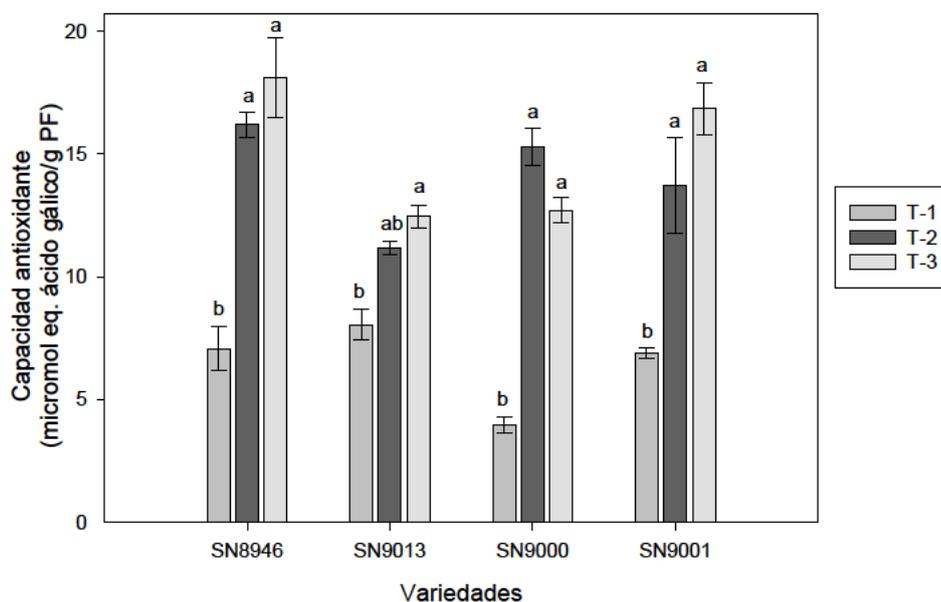


Figura 4.2.26. Capacidad antioxidante de las variedades determinada mediante el método del ABTS usando ácido gálico como estándar en el ensayo de bajas temperaturas.

En cuanto a la medida de la capacidad antioxidante, también mediante el ensayo del ABTS, pero expresando los resultados con referencia a la oxidación del trolox, el patrón se repitió en todas las variedades y tratamientos.

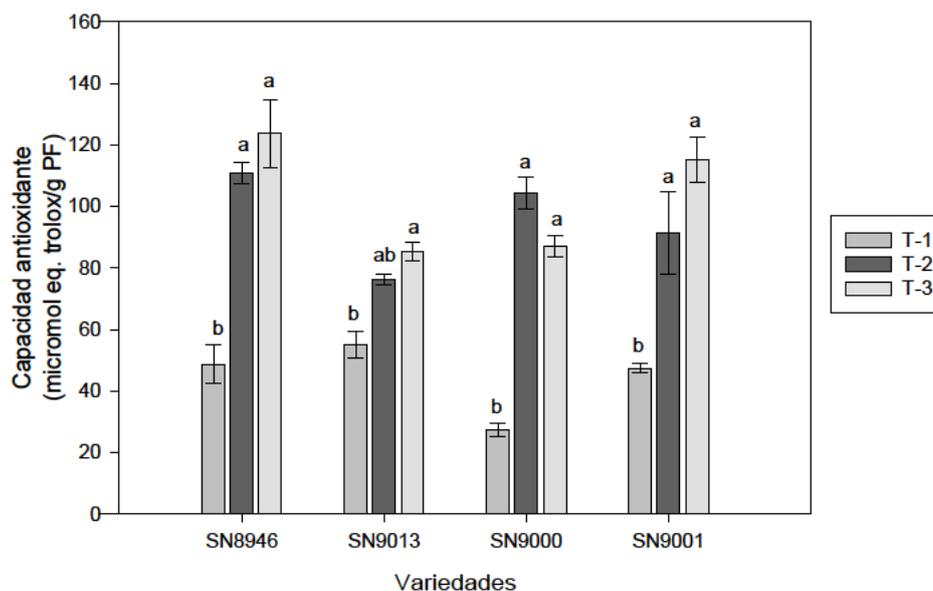


Figura 4.2.27. Capacidad antioxidante de las variedades determinada con el ensayo ABTS usando trolox como referencia en el ensayo de bajas temperaturas.

Respecto al ensayo FRAP, el otro protocolo que se utilizó para medir la capacidad antioxidante, se observó también la misma evolución en todas las variedades y tratamientos que en las metodologías anteriores. Solo destacar en este caso que en las variedades SN9013, SN9000 y SN9001 las diferencias significativas se dieron entre los tres tratamientos.

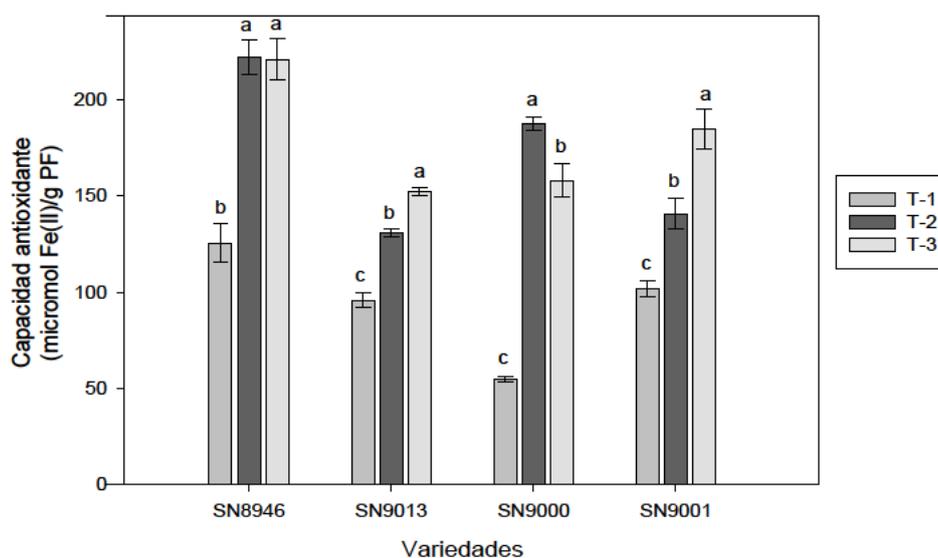


Figura 4.2.28. Capacidad antioxidante de las variedades en el ensayo de bajas temperaturas determinada mediante el método FRAP.

En la segunda parte del ensayo, se compararon los valores de la evolución de la capacidad antioxidante de las plantas de las variedades estudiadas que después de realizar varios periodos de subcultivo (tres para este ensayo) a temperaturas menores a las estándar (22 °C), volvieron a la cámara para retomar su proceso productivo. Concretamente el T-3 corresponde a la temperatura de 22 °C, el T-4 a las plantas que están a 22 °C pero han pasado por la cámara de 4 °C y el T-5 se refiere a la plantas que también están a 22 °C pero que pasaron anteriormente por la cámara de cultivo de 12 °C.

Así, para el protocolo ABTS que toma como referencia la oxidación del ácido gálico se observó que las variedades SN9013, SN9000 y SN9001 tenían un comportamiento similar, de manera que el dato más bajo de capacidad antioxidante se observaba en el T-4. Además también se vio un valor ligeramente superior para T-5 con respecto al T-3. Por tanto, se apreciaron

diferencias significativas entre el T-4 y los otros dos tratamientos. Para la variedad de color violeta el dato más alto lo presentó T-3, siguiéndole el T-4 y T-5. Se presentaron diferencias significativas en el T-3, dato más alto de todo el ensayo en esta segunda parte y el T-5.

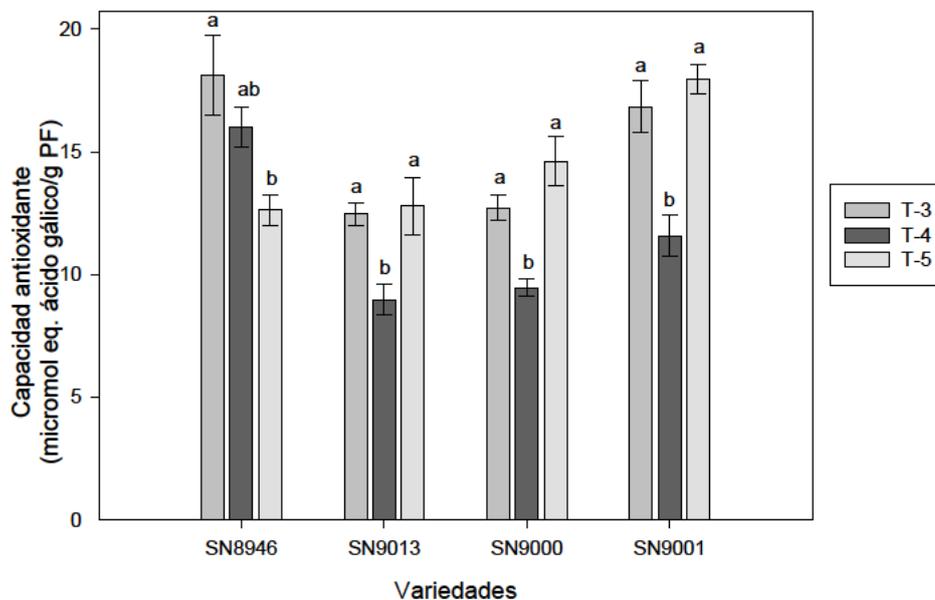


Figura 4.2.29. Capacidad antioxidante de las variedades determinada mediante el método del ABTS usando ácido gálico como estándar en el ensayo de reintroducción a 22 °C de los materiales cultivados previamente a bajas temperaturas.

En cuanto a la medida de la capacidad antioxidante usando también el método del ABTS, pero calculando los resultados con referencia a la oxidación del trolox, el patrón se repite en todas las variedades y tratamientos.

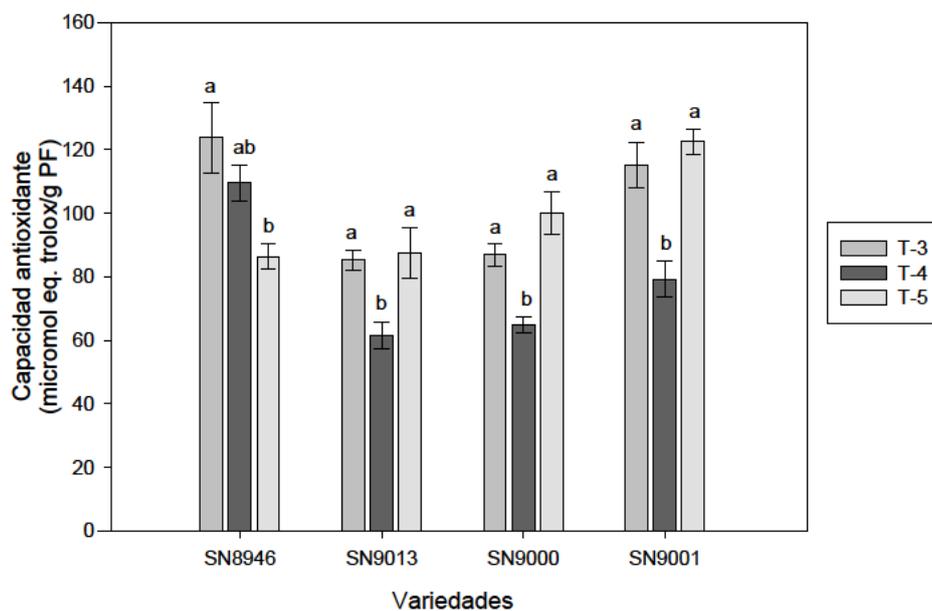


Figura 4.2.30. Capacidad antioxidante determinada como capacidad atrapadora del catión radical ABTS de las variedades de *L. sinuatum* estudiadas después del tratamiento de bajas temperaturas, usando trolox como estándar.

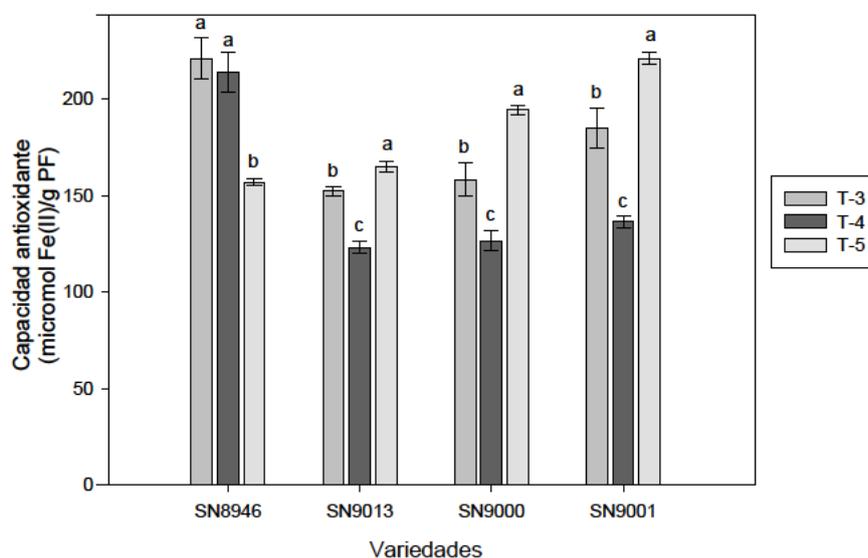


Figura 4.2.31. Capacidad antioxidante de las variedades determinada mediante el método FRAP en el ensayo de reintroducción a 22 °C de los materiales cultivados previamente a bajas temperaturas

Respecto al FRAP, el otro protocolo que se utilizó para medir la capacidad antioxidante, se observó también la misma evolución en todas las variedades y tratamientos. Solo destacar en este caso que en las variedades SN9013, SN9000 y SN9001 las diferencias significativas se dieron entre los tres tratamientos.

4.2.5. Producción y parámetros de calidad

En las variedades SN8946 y SN9001 la producción para T-1 (T-4) y T-2 (T-5) estuvo por debajo de lo exigido (>8 tallos/planta), mostrando además diferencias significativas con T-3. Para SN9000 solo el tratamiento de 4 °C presentó una producción baja, estando los otros tratamientos por encima (Fig. 4.2.32.). Para SN9013 las producciones se mantuvieron por encima de lo exigido y no se hallaron diferencias entre tratamientos. Para la variedad amarilla, SN9000, el T-2 fue el tratamiento que tuvo la mayor producción y se diferenció con respecto a T-1 y T-3, dando este último una producción acorde a lo necesario.

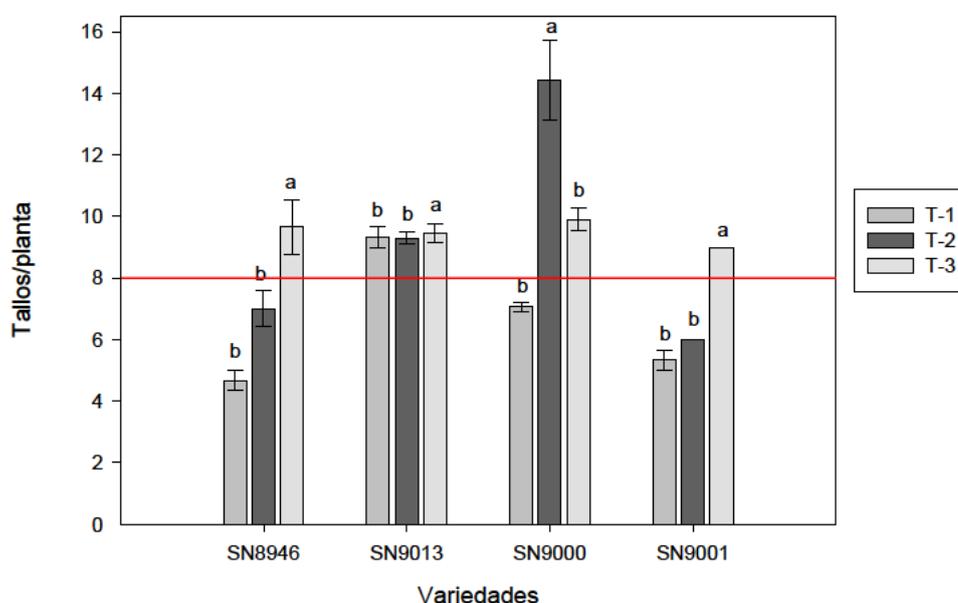


Figura 4.2.32. Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre la producción de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo de producción exigido (8 tallos/planta).

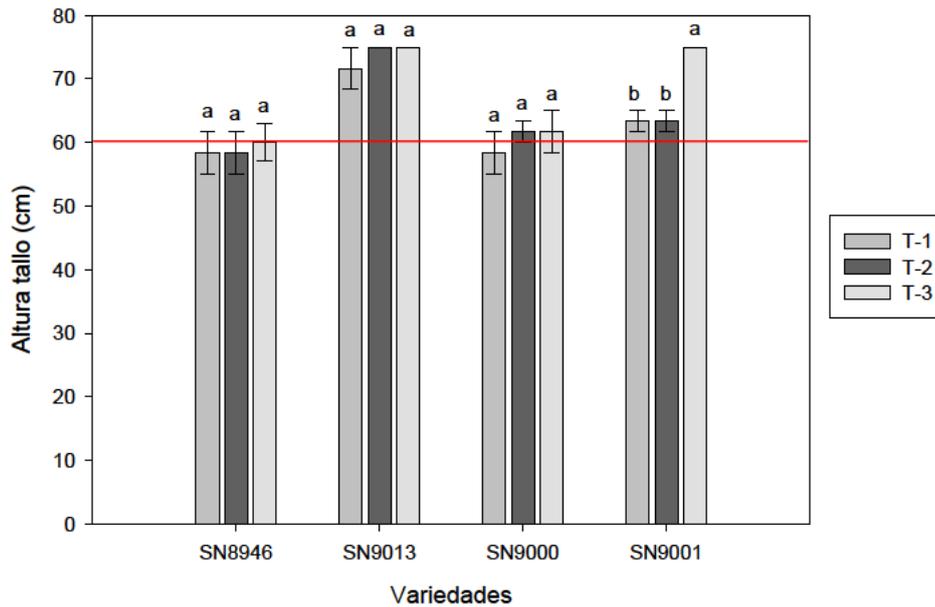


Figura 4.2.33. Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre la longitud del tallo (calidad de la producción) de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica la longitud mínima para calidad extra (60 centímetros).

En cuanto a la longitud del tallo, en las variedades violeta, amarilla y blanca, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, situándose SN8946 y SN9000 en todas las temperaturas cerca de lo exigido, y SN9013 presentó, incluso, tallos más largos de lo requerido. Se puede apreciar en la Figura 4.2.33. que el T-3 en SN9001 presentó diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos, aunque todas estuvieron por encima de 60 cm. Por tanto, el cambio del sistema productivo no afectó a la calidad final de los tallos.

En la Figura 4.2.34. se puede observar como el número de espigas por tallo estuvo muy próximo o ligeramente por encima de lo exigido (6 espigas/tallo) en las variedades SN8946 y SN9001, no hallándose diferencias entre los tratamientos. Lo mismo ocurrió con la variedad de color blanco, es decir, no se mostraron diferencias entre tratamientos, aunque el dato de este parámetro estaba para todos ellos por encima del doble de lo necesario. En cuanto a SN9000, los tratamientos superaron lo exigido, pero hubo

diferencias del T-3 con los otros dos, siendo este el tratamiento para el que se obtuvo el valor más alto.

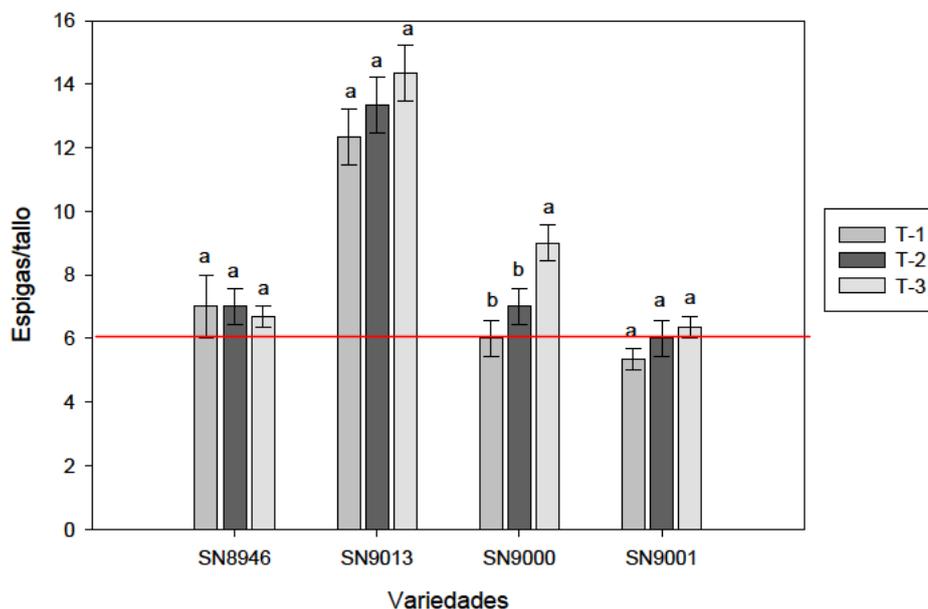


Figura 4.2.34. Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre el número de espigas por tallo de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (6 espigas/tallo).

Todas las variedades presentaron un número de ramificaciones por tallo superior a lo necesario (3-4 ramas por tallo) y no se observó en ninguna de ellas diferencias entre los tratamientos (Fig. 4.2.35.). Ahora bien, cabe destacar que las variedades SN9000 y SN9001 presentaron evoluciones similares y datos globales parecidos. Para SN8946 y SN9013 también se pudo ver una subida del número de ramificaciones conforme aumentaba la temperatura en la fase de multiplicación, mostrando datos similares para T-2 y T-3. Además, la variedad de color blanco fue la que presentó los datos más altos para este parámetro.

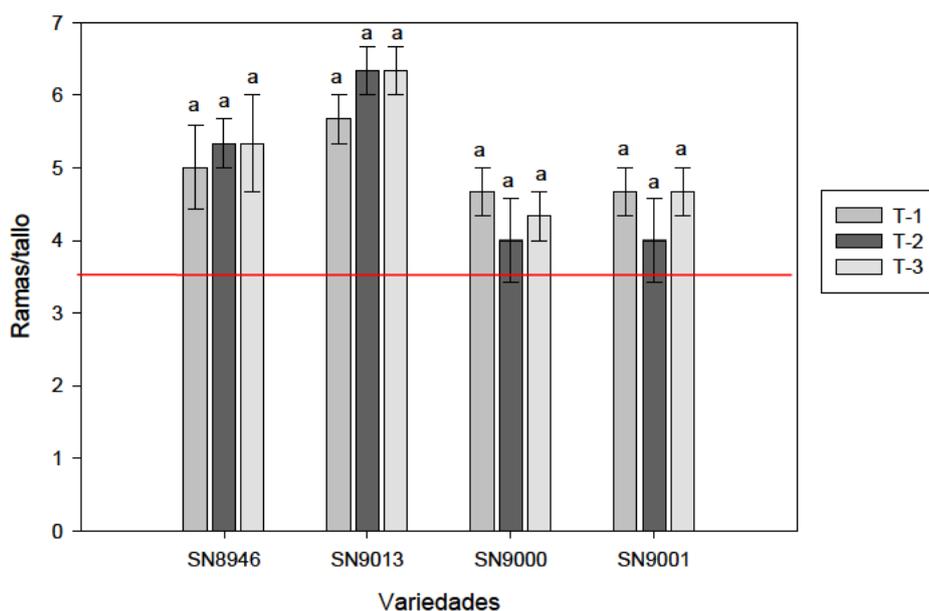


Figura 4.2.35. Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre el número de ramificaciones por tallo de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (3-4 ramas/tallo).

4.2.6. Análisis multivariable de los parámetros estudiados (PCA)

Se realizó un PCA para poder identificar qué parámetros podrían describir el comportamiento de las variedades estudiadas en los ensayos llevados a cabo con diferentes tratamientos de temperaturas.

Para la variedad de flores de color violeta, SN8946, la Figura 4.2.36. muestra la primera componente principal (PC1), que explica el 39,1 % de la varianza total, estaba fuertemente relacionada con los parámetros de clorofilas a y b, en el eje positivo de las X, y con la capacidad antioxidante (ABTS y FRAP), el crecimiento y producción en la parte negativa. En la segunda componente principal (PC2) que explica el 16,2 %, se relacionó con el contenido en almidón (eje negativo del eje Y). Además, la proyección de las muestras sobre los ejes mostró una clara separación, dividiendo el gráfico en cuatro zonas diferenciadas, donde se puede ver al T-1 (4 °C), T-4 (22 °C tras 4 °C), T-5 (22 °C tras 12 °C) y, juntos, T-2 (12 °C) y T-3 (22 °C).

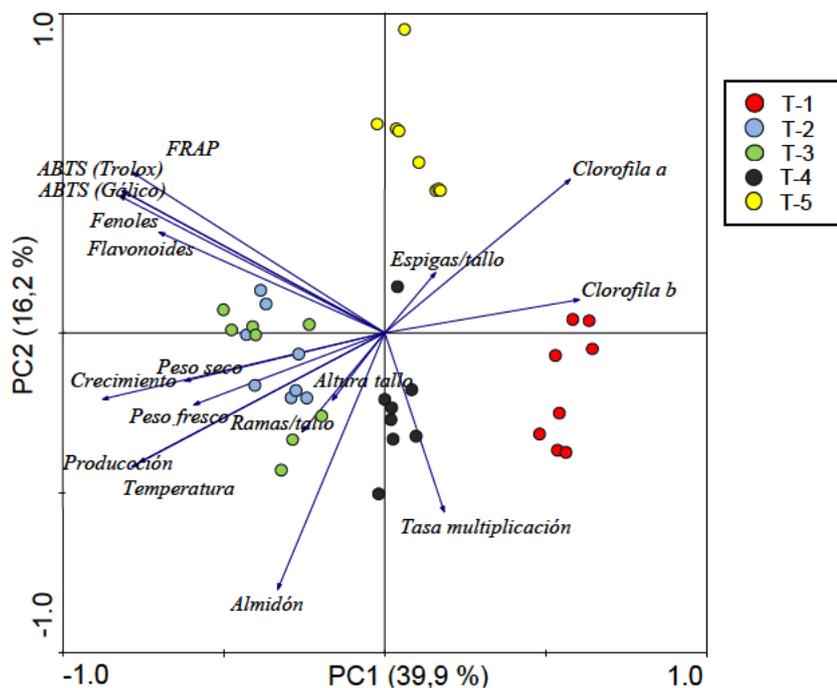


Figura 4.2.36. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN8946 expuestas a tratamientos de diferentes temperaturas en la fase de mantenimiento y vuelta a la temperatura estándar durante la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 39,9 % de la variación y el segundo eje el 16,2 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

En la Figura 4.2.37. se observa que la variedad SN9013, blanca, mostró en el PCA que la primera componente principal (PC1), que explicaba el 42,6 % de la variabilidad, estaba fuertemente relacionada con los parámetros capacidad antioxidante (ABTS y FRAP), crecimiento y tasa de multiplicación *in vitro* y temperatura en el eje negativo de la X, no hallándose ninguna variable en la parte positiva. La segunda componente principal (PC2) que explicaba el 13,3 % de la variabilidad, estaba definida por el contenido de almidón en la parte positiva, y por los pesos fresco y seco a la finalización de los subcultivos en la parte negativa. Además, si se proyectaban las muestras sobre los ejes, se podían ver diferenciadas dos partes, de manera que en la zona de la derecha del eje X se concentraban las muestras que habían sido subcultivadas a 4 °C (T-1 y T-4) y en la parte de la izquierda se situaban las muestras de las plantas que se subcultivaron a 12 °C (T-2 y T-5) y a 22 °C (T-3).

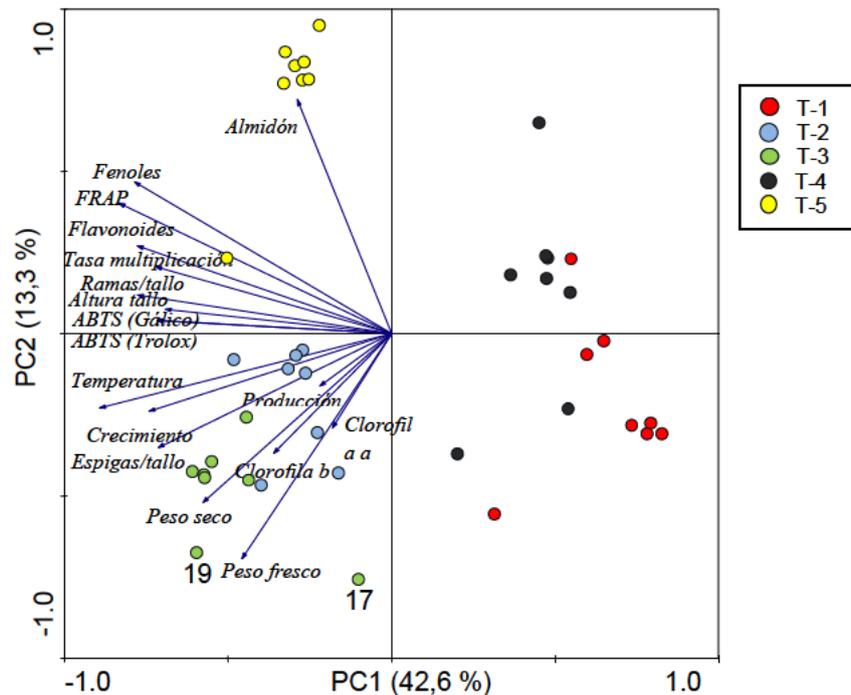


Figura 4.2.37. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9013 expuestas a tratamientos de diferentes temperaturas durante la fase de mantenimiento y vuelta a la temperatura estándar en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 42,6 % de la variación y el segundo eje el 13,3 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

Para la variedad SN9000, de flores de color amarillo, el PCA (Fig. 4.2.38.) mostró que la primera componente principal (PC1), que explica el 45,7 % de la varianza total, estaba fuertemente relacionada con el número de ramas/tallo en el eje positivo de las X, y con la capacidad antioxidante (ABTS y FRAP), crecimiento, producción y temperatura en la parte negativa. La segunda componente principal (PC2) que explica el 21,9 %, de la varianza, estaba relacionada con los pesos fresco y seco (eje positivo de la Y) y, con las clorofilas a y b (parte negativa). También se puede observar que si se proyectan las muestras sobre los ejes, se pueden ver diferenciadas dos partes, de manera que en la zona de la derecha del eje X se concentraban las muestras que habían sido subcultivadas a 4 °C (T-1 y T-4) y en la parte de la izquierda se situaban las muestras de las plantas que se subcultivaron a 12 °C (T-2 y T-5) y a 22 °C (T-3). Además, se pudo ver que las muestras del T-3 y del T-5 ocupaban la misma superficie, lo cual nos habla de

comportamientos muy parecidos de esta variedad cuando se expone a estos tratamientos.

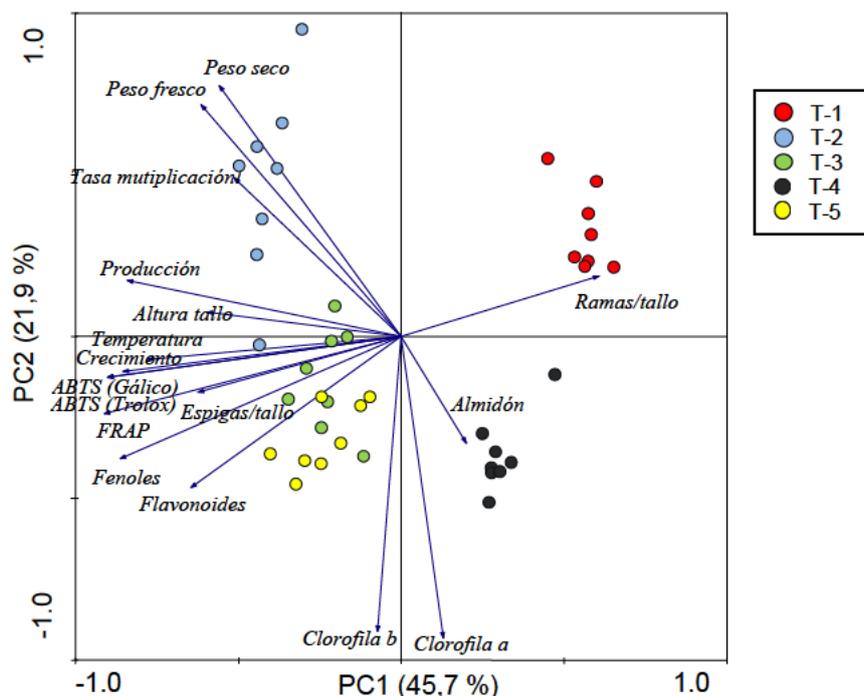


Figura 4.2.38. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9000 expuestas a tratamientos de diferentes temperaturas durante la fase de mantenimiento y vuelta a la temperatura estándar en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 45,7 % de la variación y el segundo eje el 21,9 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

En la variedad de color rosa SN9001, el PCA (Fig. 4.2.39.) mostró que la primera componente principal (PC1,) que explica el 50,7 % de la varianza total, estaba fuertemente relacionada con las clorofilas a y b en el eje positivo de las X, y con la capacidad antioxidante (ABTS y FRAP), crecimiento, fenoles y temperatura en la parte negativa. La segunda componente principal (PC2) que explica el 13,4 %, estaba relacionada con la altura del tallo y número de ramas/tallo (eje positivo de la Y) y, débilmente relacionada con los peso fresco y seco y con las clorofilas (parte negativa). También se puede observar que si se proyectaban las muestras sobre los ejes, se pueden ver diferenciadas tres partes, de manera que en la zona de la derecha del eje X se concentraban las muestras que habían sido

subcultivadas a 4 °C (T-1 y T-4), estando entremezclados los valores de los tratamientos, y en la parte de la izquierda se situaban las muestras de los tratamientos T-3 y T-5, subcultivadas a 22 °C, si bien T-5 había pasado previamente por un tratamiento a 12 °C, y en la parte central está T-2, subcultivada a 12 °C.

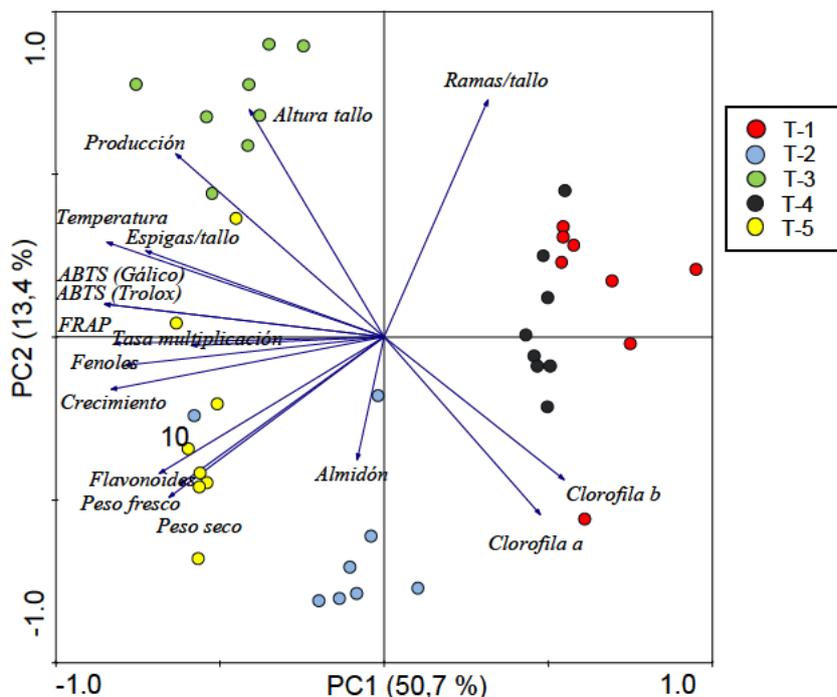


Figura 4.2.39. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9001 expuestas a tratamientos de diferentes temperaturas durante la fase de mantenimiento y vuelta a la temperatura estándar en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 50,7 % de la variación y el segundo eje el 13,4 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

4.3. Efecto de diferentes tipos de auxinas y concentraciones durante la fase de enraizamiento *in vitro*

4.3.1. Enraizamiento, aclimatación, peso fresco y peso seco

Para la variedad SN8946 el número de esquejes que presentaron raíces aumentó a medida que subía la concentración de IBA en el medio, llegando a valores para el T-3 del 92,5%, muy próximo al 93,67% del T-4 al finalizar el ensayo (40 días). También ocurrió algo similar con la variedad SN9000, que presentó valores parecidos tanto a los 20 como a los 40 días, llegando a

porcentajes del 91,67 y del 94,67 para el T-3 y T-4, respectivamente. Para la variedad de color blanco y la de color rosa, la tendencia de subida del porcentaje de plantas con raíces conforme aumentaba la concentración de IBA se mantenía, pero dándose en T-4 (cuando se usó ANA) una bajada, la cual no produjo diferencias significativas entre tratamientos, es decir, cuando se utilizó otro regulador para inducir la rizogénesis no se producían cambios significativos en cuanto al porcentaje de plantas con raíces (Fig. 4.3.1. a 4.3.4.).

En las Figuras 4.3.5. a 4.3.8. se muestra el estado de las plantas y la densidad de raíces producidas en cada una de las variedades estudiadas al final de los ensayos con las dos auxinas. En general, se aprecia el buen estado de las partes aéreas de las plantas producidas, así como una elevada densidad de raíces, especialmente en los tratamientos con las concentraciones más altas de IBA y con los de ANA.

Resultados similares se han descrito para otras especies de *Limonium* donde los diferentes medios de enraizamiento con diferentes reguladores, como IBA o AIA, usados no mostraron diferencias significativas entre ellos, estando el porcentaje de enraizamiento entre el 80-85 % de esquejes enraizados después de permanecer 30 días en el medio de cultivo (Amo-Marco e Ibañez, 1998). Sin embargo, en otros ensayos con esta especie, la respuesta en la fase de enraizamiento al medio sin hormona fue similar a la del medio que contenía IBA o AIA, pero diferente al medio que estaba suplementado con ANA, pues en este último caso se dio formación de callo y las plantas no fueron útiles para la fase de aclimatación (Lledó et al., 1996). Estos resultados de enraizamiento que se han considerado buenos, se podían haber mejorado usando un medio de pre-enraizamiento para realizar una mejor transición entre la fase de multiplicación y la de enraizamiento, pues no queda muy claro cómo influyen las hormonas de la primera fase en la segunda (Zhao Hang, 2010). Aunque si se sabe que se requiere un balance entre auxinas y citoquininas favorable a las primeras para inducir la formación de raíces (Hansen et al., 1985). En muchas otras especies, como, por ejemplo, *Syringa vulgaris* se ha descrito que la tasa de propagación

aumenta conforme sube el contenido en citoquininas, pero esto reduce muy significativamente el potencial de enraizamiento (Gabryszewska, 2011).

El valor óptimo de supervivencia tras la aclimatación debía estar por encima de un 85 % de plantas aclimatadas. Así, para la variedad SN8946 los tratamientos T-2, T-3 y T-4 cumplían este requisito, no presentando diferencias entre los mismos, ni tampoco con respecto a T-1. En las variedades de color blanco y rosa, todos los datos en todos los tratamientos estaban por encima de lo buscado, llegando en el caso de SN9001 al 100% de plantas supervivientes en todos los ensayos. Tampoco se dieron diferencias en estas dos variedades entre los tratamientos. Sin embargo, para SN9000 sólo los tratamientos T-3 y T-4 superaron lo exigido, mostrando diferencias significativas con T-1 que se quedó en un valor de un 61,97 % (Tabla 4.3.1.)

Se considera que las condiciones de la fase de aclimatación utilizadas en el presente estudio fueron idóneas para obtener porcentajes de supervivencia altos, siguiendo la línea de autores que indican que debían mantenerse las mismas condiciones de fotoperiodo e intensidad lumínica que en la fase de enraizamiento (Van Huylenbroeck y Debergh, 1996). Además, este proceso se realizó teniendo en cuenta que las plantas tenían, probablemente, una epidermis modificada y sensible (Nashar, 1989).

Muy parecidos fueron los resultados con otras especies de *Limonium*, pues el porcentaje de supervivencia tras aclimatación llegó al 90% independientemente de la auxina utilizada. También se pudo comprobar, que el número o talla de las raíces no se vieron afectados durante la aclimatación a las condiciones de invernadero (Amo-Marco e Ibáñez, 1998).

También se obtuvieron resultados similares en *Limonium* cuando se utilizaron otras condiciones de aclimatación como bandejas de plástico que contenían una relación 3:1 de turba y perlita con temperaturas de 18-25 °C, 70 % de humedad relativa y ventilación normal durante seis semanas

(Kaninski et al., 2012). Pero la utilización del jiffy de fibra de coco permite agilizar el proceso de aclimatación.

En otros ensayos con *Limonium* se ha corroborado que el 90 % de las plantas producidas *in vitro* se han aclimatado y desarrollado hasta el estado adulto y han florecido (Kaninski et al., 2012). En las Figuras 4.3.9. a 4.3.11. se muestran ejemplos representativos de las diferentes fases por las que pasó el proceso de aclimatación y entrada en producción de las variedades de limonio estudiadas en el presente trabajo. En general, en estas figuras puede apreciarse que el desarrollo de las plantas micropropagadas fue el apropiado.

En cuanto al peso fresco, en las variedades SN8946 y SN9001 se observó la misma tendencia, donde el T-3 presentó los valores más elevados y sólo mostraba diferencias significativas con el T-1, siendo los valores muy cercanos entre tratamientos. Para la variedad SN9000 no se encontraron diferencias entre los tratamientos pues los valores eran muy próximos, y en SN9013 sí hubo diferencias entre T-2 y T-3 con respecto a T-1 y T-4, siendo este último tratamiento el que mostró valores más bajos (Tabla 4.3.1.).

Exceptuando a SN9013, en las otras variedades se pudo observar que para T-3 y T-4, tratamientos con mayor porcentaje de aclimatación, el peso fresco era mayor que en los otros dos tratamientos. Por tanto, se deduce que un mayor peso fresco de las plantas ayudó a que el porcentaje de aclimatación fuera superior. Así, se vio que el tamaño de los brotes enraizados y trasplantados sí tuvo importancia sobre la supervivencia durante la aclimatación, pues los que presentaron un menor tamaño (menor peso fresco) tuvieron un menor porcentaje en aclimatación o murieron durante esta fase (Amo-Marco e Ibañez, 1998).

Por otro lado, cuando se analizaron los resultados del peso seco, se observó que no hubo diferencias entre tratamientos para SN8946 y SN9000. Sin embargo, para las variedades de color blanco y rosa, el T-3 mostró los

valores más altos, diferenciándose con respecto a T-4 que presentó los menores valores (Tabla 4.3.1.).

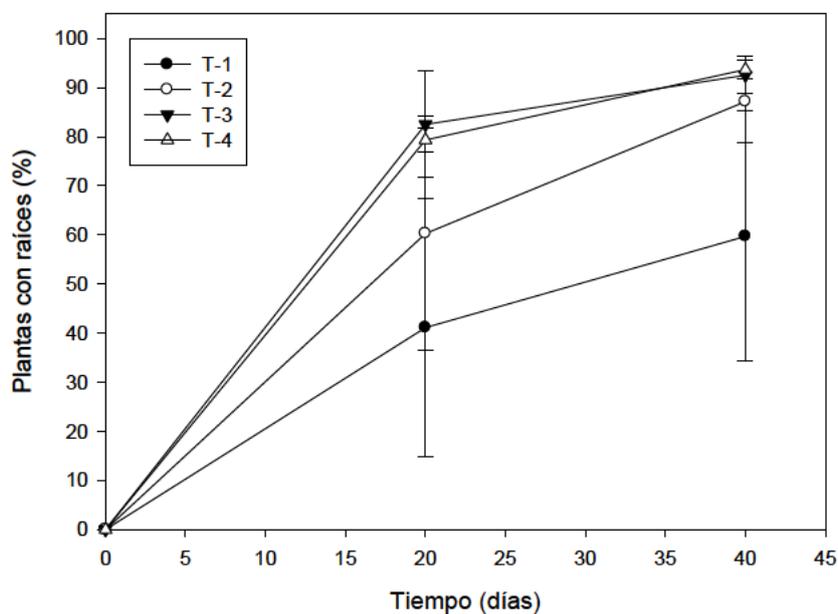


Figura 4.3.1. Evolución del porcentaje de plantas con raíces durante la fase de enraizamiento de la variedad SN8946.

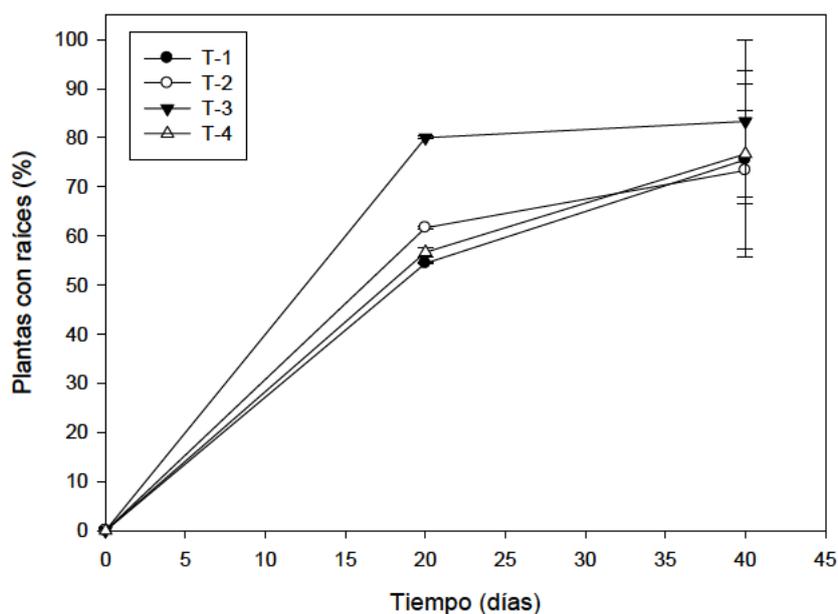


Figura 4.3.2. Evolución del porcentaje de plantas con raíces durante la fase de enraizamiento de la variedad SN9013.

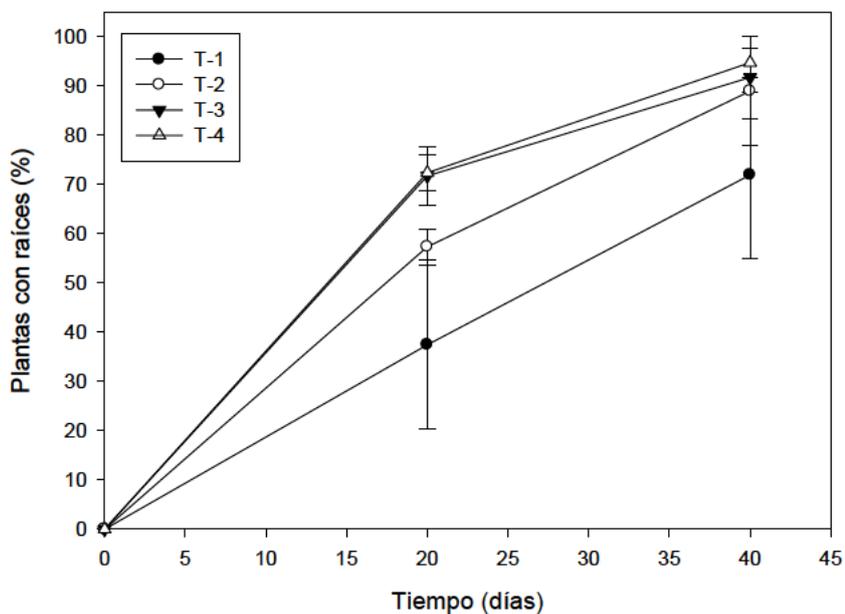


Figura 4.3.3. Evolución del porcentaje de plantas con raíces durante la fase de enraizamiento de la variedad SN9000.

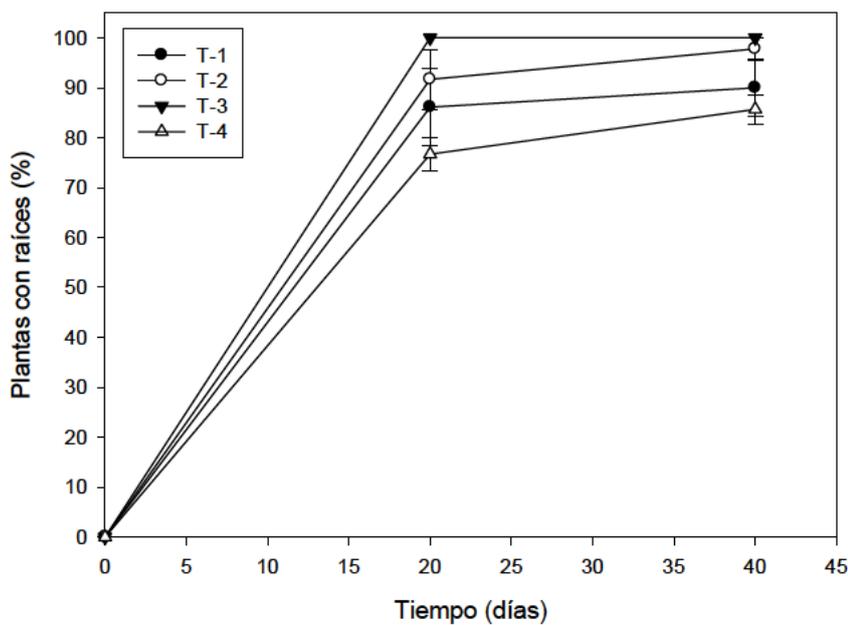


Figura 4.3.4. Evolución del porcentaje de plantas con raíces durante la fase de enraizamiento de la variedad SN9001.

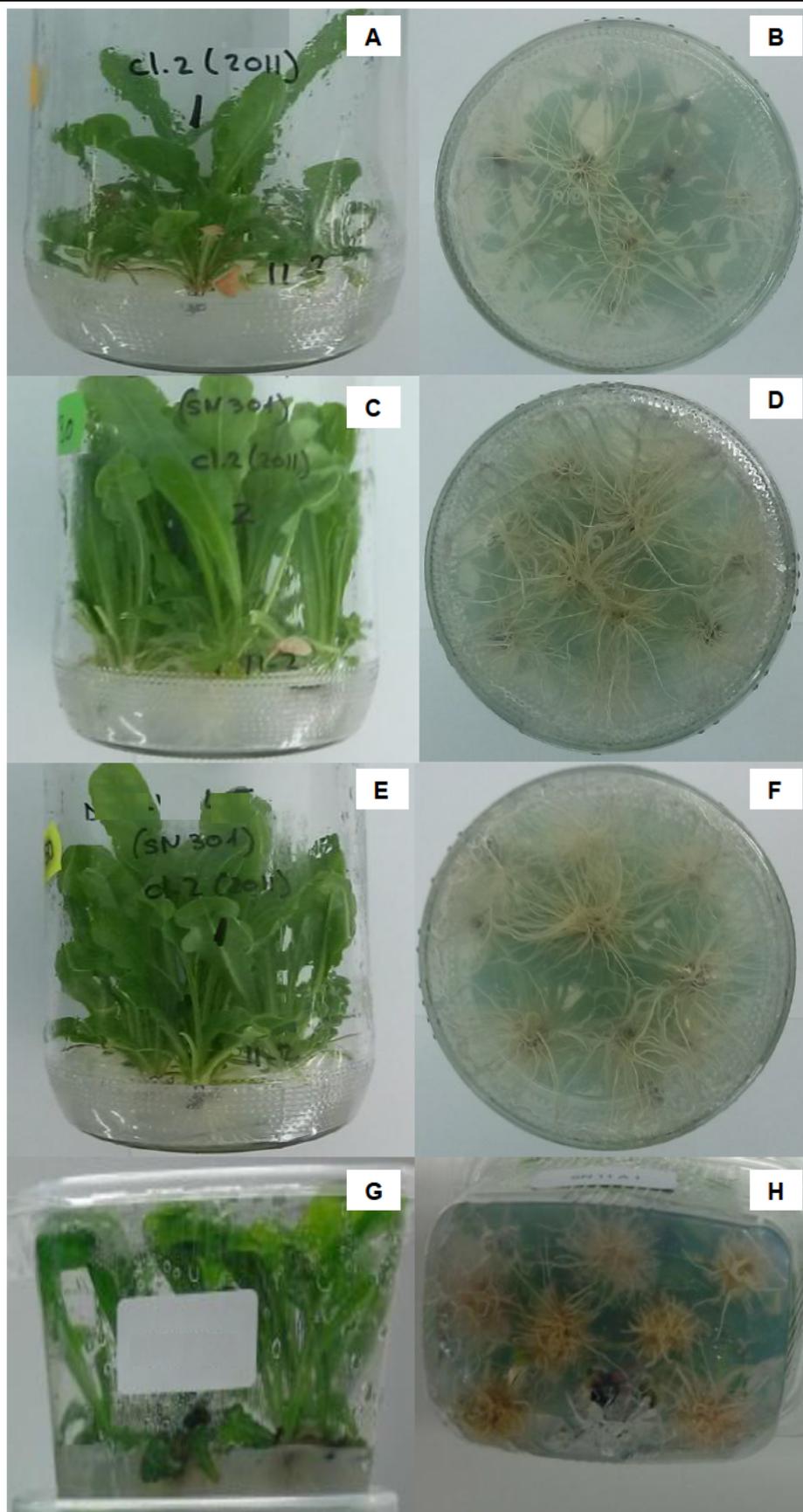


Figura 4.3.5. Plántulas y raíces de la variedad SN8946 al finalizar el periodo de la fase de enraizamiento (40 días). **(A)** Estado de las plantas T-1. **(B)** Densidad radicular T-1. **(C)** Estado de las plantas T-2. **(D)** Densidad radicular T-2. **(E)** Estado de las plantas T-3. **(F)** Densidad radicular T-3. **(G)** Estado de las plantas T-4. **(H)** Densidad radicular T-4.

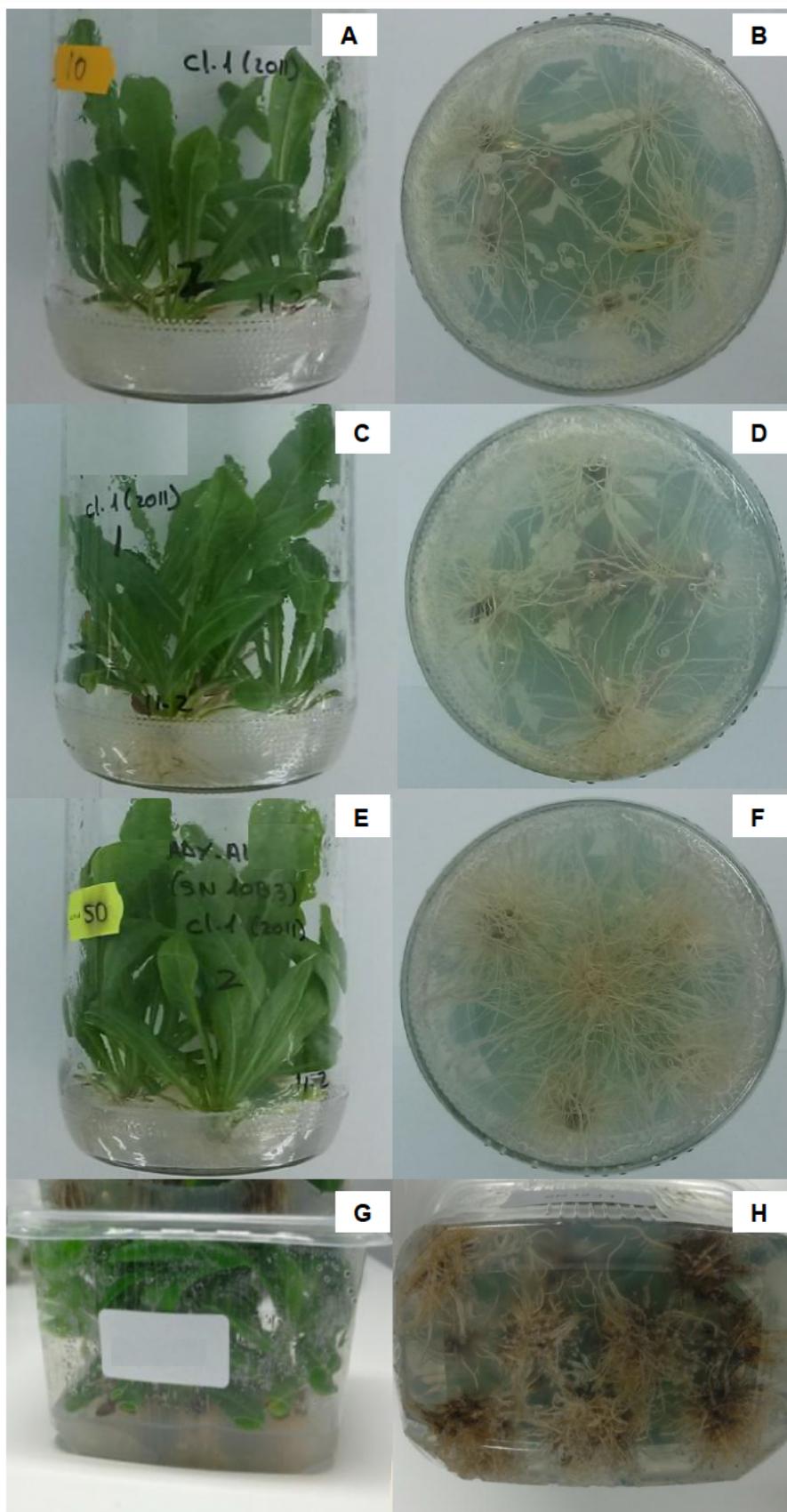


Figura 4.3.6. Plántulas y raíces de la variedad SN9013 al finalizar el periodo de la fase de enraizamiento (40 días). **(A)** Estado de las plantas T-1. **(B)** Densidad radicular T-1. **(C)** Estado de las plantas T-2. **(D)** Densidad radicular T-2. **(E)** Estado de las plantas T-3. **(F)** Densidad radicular T-3. **(G)** Estado de las plantas T-4. **(H)** Densidad radicular T-4.

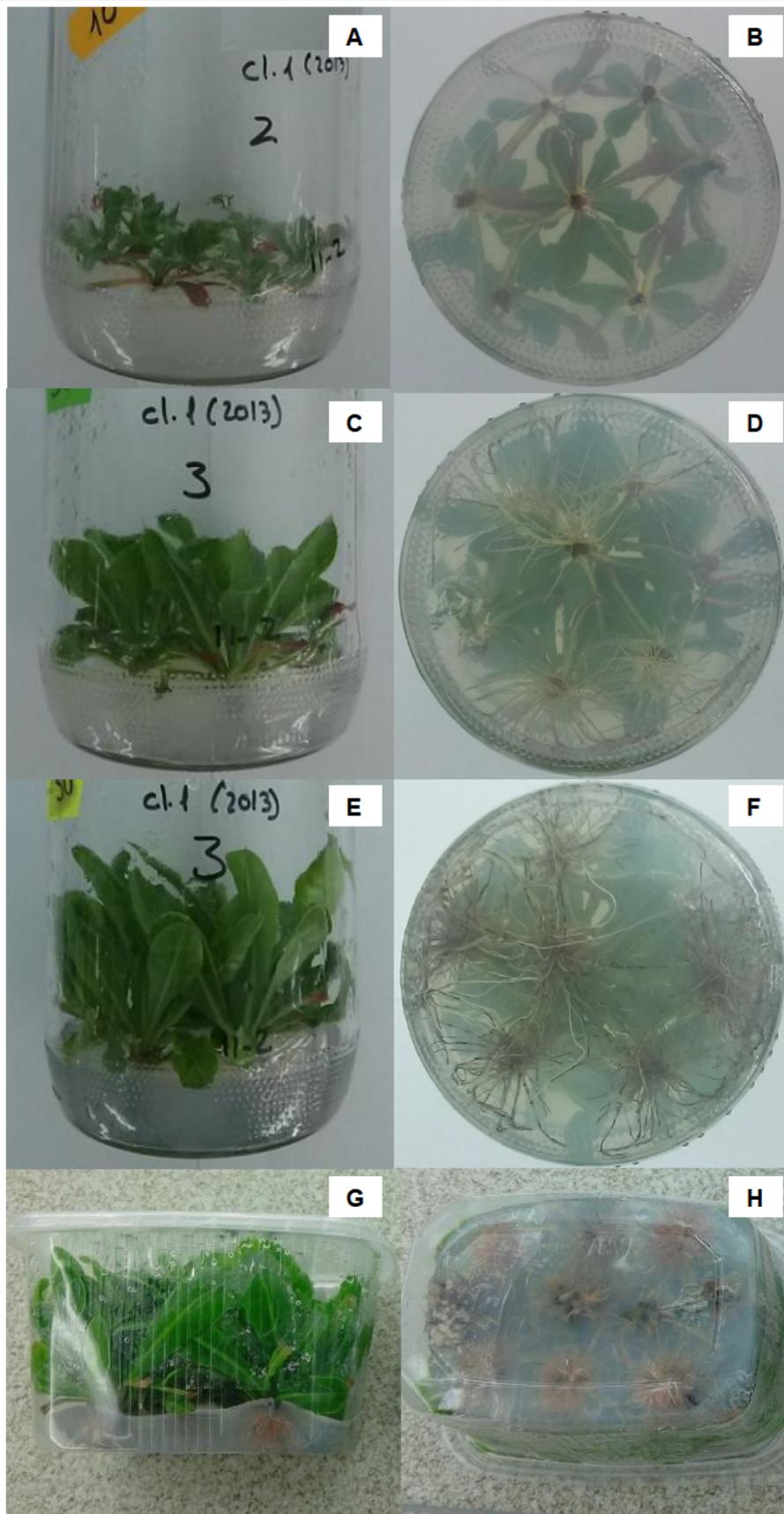


Figura 4.3.7. Plántulas y raíces de la variedad SN9000 al finalizar el periodo de la fase de enraizamiento (40 días). **(A)** Estado de las plantas T-1. **(B)** Densidad radicular T-1. **(C)** Estado de las plantas T-2. **(D)** Densidad radicular T-2. **(E)** Estado de las plantas T-3. **(F)** Densidad radicular T-3. **(G)** Estado de las plantas T-4. **(H)** Densidad radicular T-4.

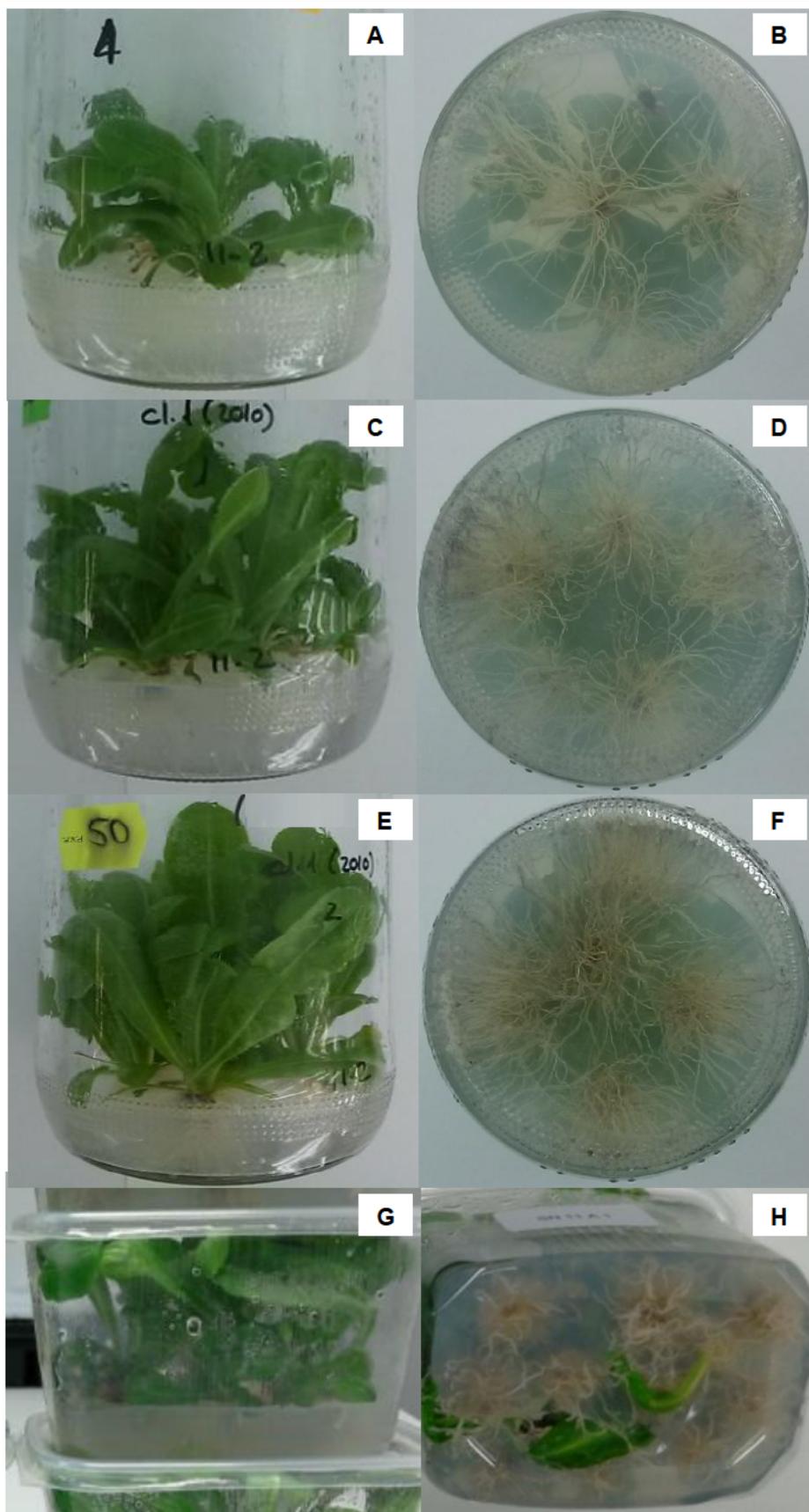


Figura 4.3.8. Plántulas y raíces de la variedad SN9001 al finalizar el periodo de la fase de enraizamiento (40 días). (A) Estado de las plantas T-1. (B) Densidad radicular T-1. (C) Estado de las plantas T-2. (D) Densidad radicular T-2. (E) Estado de las plantas T-3. (F) Densidad radicular T-3. (G) Estado de las plantas T-4. (H) Densidad radicular T-4.



Figura 4.3.9. Plántulas de *Limonium sinuatum* de las variedades SN9013 y SN9001 en la fase de aclimatación.



Figura 4.3.10. Plantas de *Limonium sinuatum* de la variedad SN8946 en condiciones bajo invernadero a los 3 meses del trasplante.



Figura 4.3.11. Plantas de *Limonium sinuatum* de la variedad SN9001 después de realizar el pinzamiento de los tallos principales antes de entrar en la fase de producción.

Tabla 4.3.1. Parámetros de enraizamiento *in vitro* de las distintas variedades.

Variedad	Tratamientos	Supervivencia aclimatación (%)	Peso fresco (g/planta)	Peso seco (g/planta)
SN8946	T-1	75.28 ± 7.99a	1.08 ± 0.07b	0.10 ± 0.01a
	T-2	88.23 ± 3.60a	1.84 ± 0.06ab	0.14 ± 0.02a
	T-3	90.75 ± 3.15a	2.20 ± 0.16a	0.21 ± 0.03a
	T-4	90.33 ± 2.60a	1.91 ± 0.40ab	0.11 ± 0.03a
SN9013	T-1	95.00 ± 5.00a	1.34 ± 0.05b	0.17 ± 0.02ab
	T-2	95.00 ± 5.00a	2.28 ± 0.10a	0.17 ± 0.04ab
	T-3	96.67 ± 3.33a	2.24 ± 0.12a	0.27 ± 0.04a
	T-4	95.00 ± 2.88a	0.69 ± 0.16c	0.05 ± 0.01b
SN9000	T-1	61.97 ± 11.62b	0.85 ± 0.05a	0.09 ± 0.00a
	T-2	79.97 ± 5.41ab	0.96 ± 0.03a	0.08 ± 0.01a
	T-3	92.17 ± 1.05a	1.56 ± 0.12a	0.12 ± 0.03a
	T-4	89.33 ± 2.33ab	1.28 ± 0.30a	0.09 ± 0.01a
SN9001	T-1	100.00 ± 0.00a	1.57 ± 0.09b	0.14 ± 0.01ab
	T-2	100.00 ± 0.00a	1.90 ± 0.08ab	0.11 ± 0.00b
	T-3	100.00 ± 0.00a	2.40 ± 0.08a	0.18 ± 0.02a
	T-4	100.00 ± 0.00a	2.14 ± 0.28ab	0.11 ± 0.01b

4.3.2. Concentración clorofilas a, b y totales

Para las variedades SN9013 y SN9001 se observó una bajada del valor de la clorofila a conforme aumentó la concentración de IBA, siendo los datos más altos para el T-4 que estaba implementado con ANA. En el resto de variedades también se pudo ver el valor más bajo de clorofila a para el T-4. Sin embargo, hubo un repunte en SN8946 para el T-3, y otro en SN9000 en T-2 rompiéndose esa tendencia marcada que había en las variedades blanca y rosa. Además, se debe destacar que el T-4 presentó diferencias significativas con los otros tratamientos del ensayo en todas las variedades (Tabla 4.3.2.).

Los valores de clorofila b y clorofilas totales mostraron la misma evolución que los de clorofila a, siendo los valores más bajos los del T-4, llegando incluso a ser en algunos casos la mitad en todas las variedades con respecto al T-1, el cual presentó los valores más altos de los parámetros considerados.

En cuanto la relación clorofila a/b se mantuvo una tendencia similar en las variedades SN8946, SN9013 y SN9001, siendo el valor más elevado para T-1 y el más bajo para T-4. Se observó para estos cultivares que conforme aumentó la concentración de IBA bajaba la relación clorofila a/b. En la variedad de color amarillo, el valor más elevado fue para el T-2 (3 mg/L de IBA), coincidiendo en las otras variedades que el dato más bajo también fue para el T-4.

Todo esto demostró que el tratamiento 4, que tenía ANA como regulador para favorecer el enraizamiento, provocó un descenso en los valores de clorofila a y b, y por tanto en las clorofilas totales y la relación clorofila a/b.

Es bien conocido el antagonismo existente entre auxinas y citoquininas, de forma que los procesos estimulados por uno de estos reguladores suelen ser inhibidos por el otro. En el caso de la síntesis de clorofilas, el proceso resulta estimulado por la presencia de balances citoquinina:auxina relativamente

altos. Por este motivo, podría pensarse que el desequilibrio del balance entre estos dos reguladores al aumentar la concentración de IBA añadido a los medios de cultivo favorecería la inhibición de la síntesis de clorofila e, incluso, llegaría a estimular su degradación, de forma indirecta, por estimular la producción de etileno por los tejidos. Estos efectos se verían reforzados en el caso de la aplicación de ANA, ya que este fitorregulador presenta, normalmente, una actividad auxínica mayor que la del IBA. La reducción observada en la relación clorofila a/b al aumentar los niveles de IBA en los medios (o al aplicar ANA a menor concentración) apoyaría esta idea, ya que la degradación de las clorofilas se produce a partir de la clorofila a, para lo que la clorofila b debe convertirse en la primera antes de ser degradada (Folly y Engel, 1999).

Tabla 4.3.2. Concentración de clorofilas a, b y totales durante la fase de enraizamiento *in vitro* con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.

Variedad	Tratamientos	Clorofila a (microg/g PF)	Clorofila b (microg/g PF)	Clorofilas Totales (microg/g PF)	Relación clorofila a/b
SN8946	T-1	386.91 ± 7.57a	268.12 ± 2.81a	655.04 ± 10.31a	1.44 ± 0.01a
	T-2	243.99 ± 13.19b	192.69 ± 5.95b	436.69 ± 19.12b	1.26 ± 0.03b
	T-3	257.38 ± 4.32b	198.85 ± 1.93b	456.24 ± 6.21b	1.29 ± 0.01b
	T-4	160.41 ± 1.48c	155.01 ± 2.41c	315.42 ± 3.77c	1.03 ± 0.01c
SN9013	T-1	467.85 ± 8.94a	310.39 ± 6.39a	778.25 ± 15.18a	1.51 ± 0.01a
	T-2	401.34 ± 18.13b	271.59 ± 10.47b	672.94 ± 28.57b	1.47 ± 0.01a
	T-3	323.59 ± 4.91c	231.23 ± 2.18c	554.83 ± 6.90c	1.39 ± 0.01b
	T-4	259.07 ± 13.28d	214.81 ± 6.40c	473.89 ± 19.64d	1.20 ± 0.03c
SN9000	T-1	379.17 ± 10.14b	268.58 ± 4.01b	647.75 ± 14.03b	1.41 ± 0.02b
	T-2	463.29 ± 5.85a	307.04 ± 5.61a	770.32 ± 10.89a	1.51 ± 0.02a
	T-3	365.31 ± 13.14b	258.31 ± 6.44b	623.62 ± 19.51b	1.41 ± 0.02b
	T-4	150.34 ± 1.78c	158.12 ± 2.30c	308.45 ± 3.60c	0.95 ± 0.01c
SN9001	T-1	332.45 ± 22.48a	232.91 ± 12.20a	565.36 ± 34.67a	1.42 ± 0.02a
	T-2	315.90 ± 7.50a	231.61 ± 4.76a	547.52 ± 12.20a	1.36 ± 0.01a
	T-3	298.91 ± 8.64a	217.48 ± 10.84a	516.38 ± 16.21a	1.39 ± 0.08a
	T-4	136.10 ± 8.45b	146.59 ± 4.75b	282.70 ± 13.13b	0.92 ± 0.03b

4.3.3. Niveles de fenoles solubles totales, flavonoides solubles y almidón

En la variedad SN8946 el dato más alto de fenoles correspondió a T-1, el cual presentó diferencias significativas con el resto de tratamientos, llegando a duplicar los valores. Sin embargo, para el cultivar de color blanco no se apreciaron diferencias entre tratamientos (Tabla 4.3.3.). Por otro lado, se encontró que en SN9000 sí hubo diferencias entre todos los tratamientos, observándose que el T-1, con 1 mg/L de IBA, tuvo el dato más alto con 84,39 microg/g PF. Finalmente para SN9001, de color rosa, se hallaron resultados diferentes entre T-1 y T-3, encontrándose los otros dos tratamientos con valores entre los dos mencionados.

En cuanto al contenido de flavonoides se observó que el mayor dato correspondía en todas las variedades al T-1 y el menor al T-4, que tenía el medio suplementado con ANA. Además, también se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos T-2 y T-3 con respecto al primero y al último. Solamente en SN9013 y SN9000 T-1 y T-2 no mostraron diferencias significativas.

Respecto a la cantidad de almidón, en la variedad SN8946 no se aprecian diferencias entre tratamientos y mostró, en general, datos más bajos que las otras variedades (Tabla 4.3.3.). En la variedad SN9013 fueron las plantas de los tratamientos T-2 y T-3 con 3 mg/l y 5 mg/l de IBA respectivamente los que produjeron los mayores contenidos de almidón, encontrándose diferencias con el T-1 y T-4. Para la variedad de color amarillo, el contenido más alto en almidón lo presentó el T-2, el cual se diferenció significativamente de los otros tres tratamientos. Por último, el T-4 en la variedad SN9001 fue el que mostró el dato más alto de todo el ensayo, diferenciándose del resto de tratamientos en este cultivar.

Tabla 4.3.3. Concentración de fenoles, flavonoides y almidón durante la fase de enraizamiento *in vitro* con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.

Variedades	Tratamientos	Fenoles ($\mu\text{mol eq. ácido gálico/g PF}$)	Flavonoides ($\mu\text{mol eq. rutina/g PF}$)	Almidón ($\mu\text{mol eq. glucosa/g PF}$)
SN8946	T-1	44.87 \pm 0.65a	6.51 \pm 0.38a	402.71 \pm 14.84a
	T-2	21.58 \pm 0.66c	3.57 \pm 0.20b	456.78 \pm 9.69a
	T-3	22.84 \pm 0.62bc	4.39 \pm 0.48b	471.34 \pm 35.38a
	T-4	24.36 \pm 0.65b	1.26 \pm 0.12c	432.26 \pm 27.79a
SN9013	T-1	27.94 \pm 0.67a	5.67 \pm 0.16a	418.45 \pm 33.63b
	T-2	25.20 \pm 0.48a	5.49 \pm 0.12a	553.75 \pm 28.33a
	T-3	25.24 \pm 0.60a	4.57 \pm 0.16b	560.68 \pm 35.72a
	T-4	26.87 \pm 1.57a	1.51 \pm 0.11c	392.27 \pm 28.29b
SN9000	T-1	84.39 \pm 2.95a	13.76 \pm 0.21a	394.20 \pm 9.34c
	T-2	53.04 \pm 2.06b	9.67 \pm 0.39b	624.03 \pm 22.51a
	T-3	43.30 \pm 0.92c	7.69 \pm 0.23c	494.02 \pm 27.59b
	T-4	27.48 \pm 1.05d	1.13 \pm 0.13d	437.94 \pm 17.50bc
SN9001	T-1	27.06 \pm 1.02a	5.68 \pm 0.73a	394.73 \pm 28.05b
	T-2	24.19 \pm 0.59ab	4.76 \pm 0.34ab	514.56 \pm 26.32b
	T-3	22.37 \pm 0.47b	3.79 \pm 0.03b	517.59 \pm 29.30b
	T-4	26.11 \pm 1.79ab	1.30 \pm 0.13c	693.47 \pm 34.96a

El contenido y la composición de compuestos fenólicos y la interacción de estos compuestos con las auxinas y determinadas enzimas (por ejemplo, las peroxidases) tienen un efecto determinante de la formación de raíces adventicias (De Klerk et al., 1999). Los flavonoides, por ejemplo, pueden afectar al transporte polar de auxinas a través de su interacción directa con las proteínas transportadoras o afectando a su distribución en las células (Peer y Murphy, 2007), lo cual lleva a que no se establezcan los gradientes del regulador necesarios para estimular la formación de las raíces. La reducción de los niveles de flavonoides podría ser, por lo tanto, un requisito previo al enraizamiento de los vástagos. En el presente estudio se observó que los tratamientos con concentraciones crecientes de IBA provocan una reducción de los niveles de fenoles solubles totales, en general, y de flavonoides, en particular (Tabla 4.3.3.). Este efecto también se deduce de la observación de los cromatogramas extraídos a 360 nm resultantes del análisis por HPLC de los extractos metanólicos de las variedades

estudiadas (Figuras 4.3.12. a 4.3.15.), donde se aprecia que los tres principales flavonoides hallados en los extractos tendían a disminuir a medida que aumentaba la concentración de auxina en los medios de enraizamiento.

Shang et al. (2017) sugirieron que, en contraposición al efecto inhibitor del enraizamiento debido a algunos flavonoides, determinados ácidos fenólicos (entre ellos algunos derivados de ácidos hidroxicinámicos) podrían estimular la rizogénesis. En las Figuras 4.3.12. a 4.3.15. se observa que los niveles de los principales ácidos hidroxicinámicos encontrados en los extractos mantienen, en general, sus niveles, independientemente del tratamiento recibido por el material vegetal (Tabla 4.3.4.).

Los azúcares también contribuyen a la formación de las raíces adventicias mediante el suministro de la energía y de los esqueletos carbonados necesarios para que se produzca la división celular, el establecimiento de los nuevos centros meristemáticos y la formación en sí misma de la raíz. Altos niveles de azúcares solubles y de almidón en la zona de iniciación de las raíces se han asociado a una mayor respuesta rizogénica, aunque un exceso de carbohidratos también puede provocar la inhibición del enraizamiento. En algunos trabajos se ha sugerido que el aporte de auxinas exógenas puede aumentar los niveles de azúcares solubles y almidón, promoviendo la formación de raíces adventicias, aunque otros factores, como el tipo de azúcar acumulado o las relaciones fuente-sumidero en los tejidos, pueden modular la respuesta encontrada (da Costa et al., 2013). En el presente trabajo, el análisis por GC-MS de los extractos metanólicos apunta a una relación entre el contenido de carbohidratos y el porcentaje de enraizamiento, lo que estaría de acuerdo con lo comentado anteriormente

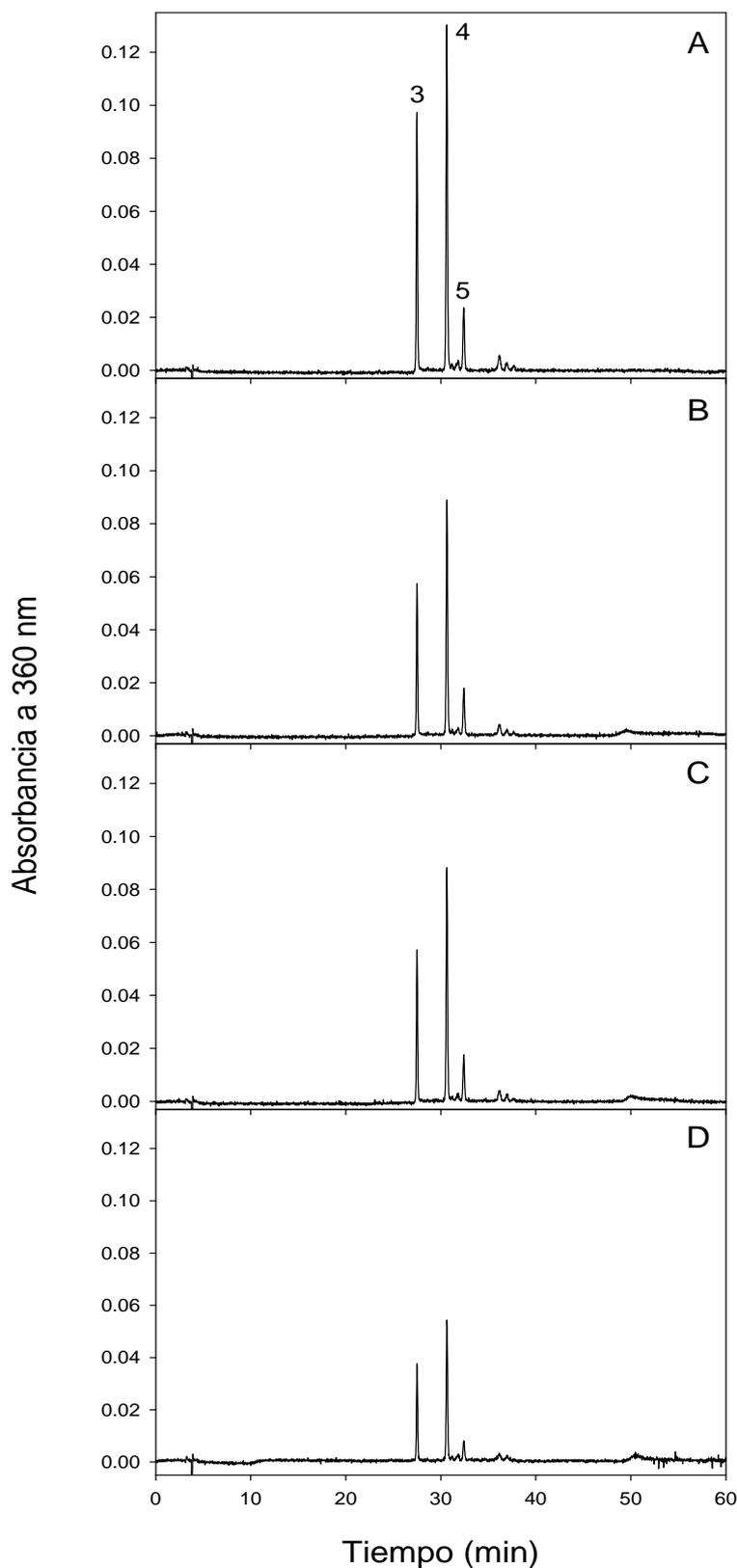


Figura 4.3.12. Cromatogramas obtenidos a 360 nm de los extractos metanólicos de vástagos procedentes de la variedad SN8946 de *L. sinuatum* sometida a diferentes concentraciones de auxinas durante la fase de enraizamiento *in vitro* (A: T-1; B: T-2; C: T-3, D: T-4). Los números sobre los picos indican analitos con posible naturaleza flavonoide.

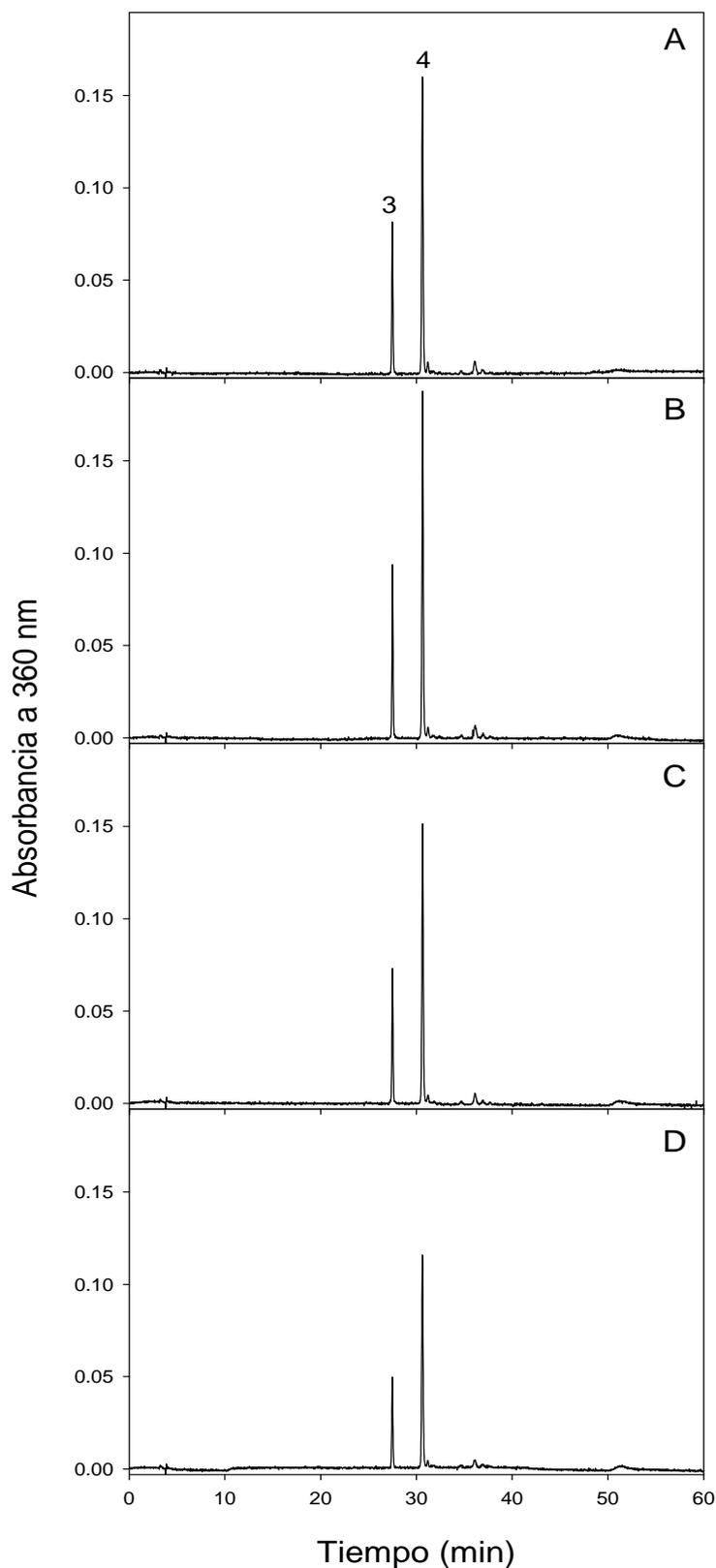


Figura 4.3.13. Cromatogramas obtenidos a 360 nm de los extractos metanólicos de vástagos procedentes de la variedad SN9013 de *L. sinuatum* sometida a diferentes concentraciones de auxinas durante la fase de enraizamiento *in vitro* (A: T-1; B: T-2; C: T-3, D: T-4). Los números sobre los picos indican analitos con posible naturaleza flavonoide.

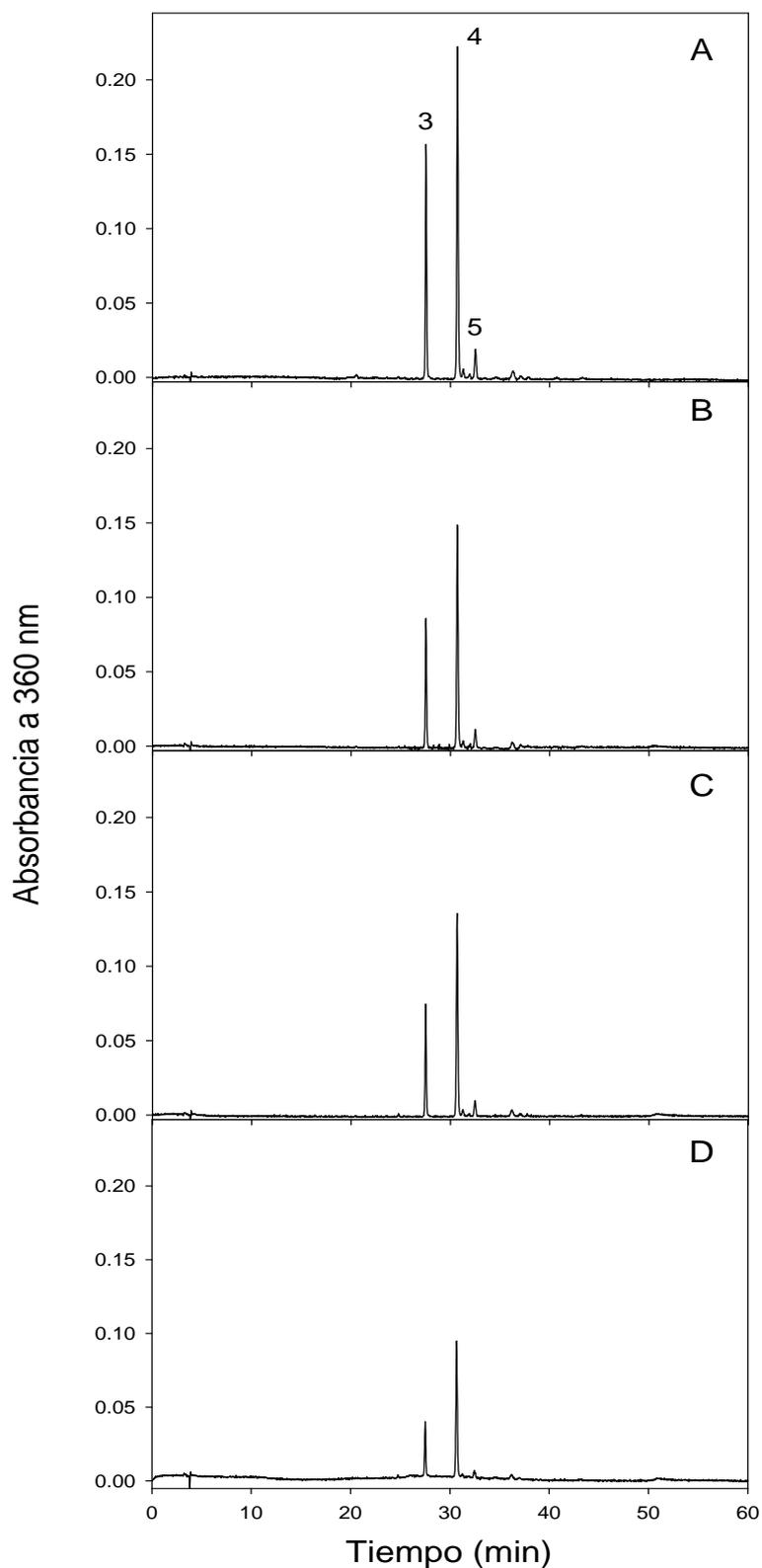


Figura 4.3.14. Cromatogramas obtenidos a 360 nm de los extractos metanólicos de vástagos procedentes de la variedad SN9000 de *L. sinuatum* sometida a diferentes concentraciones de auxinas durante la fase de enraizamiento *in vitro* (A: T-1; B: T-2; C: T-3, D: T-4). Los números sobre los picos indican analitos con posible naturaleza flavonoide.

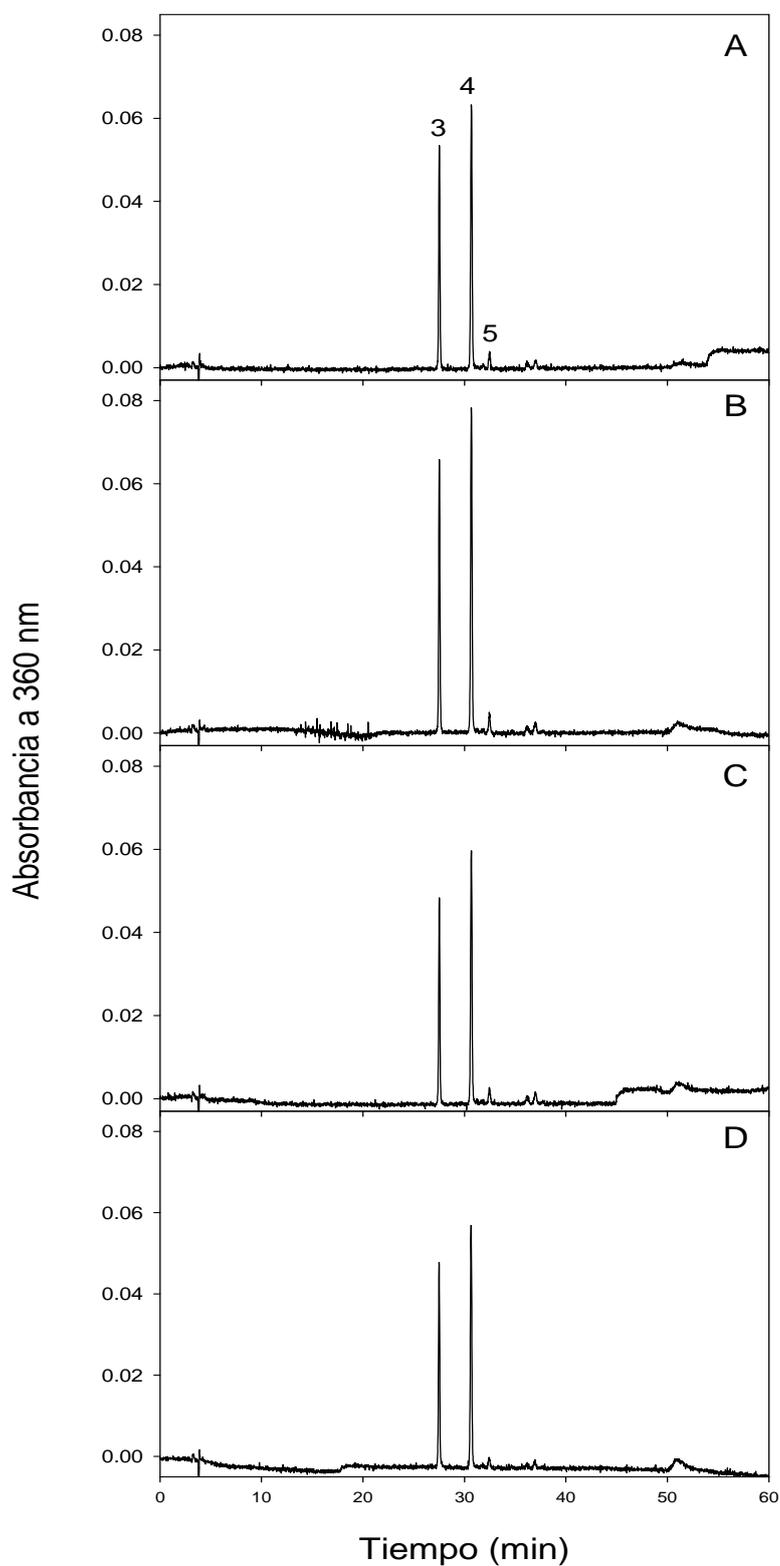


Figura 4.3.15. Cromatogramas obtenidos a 360 nm de los extractos metanólicos de vástagos procedentes de la variedad SN9001 de *L. sinuatum* sometida a diferentes concentraciones de auxinas durante la fase de enraizamiento *in vitro* (A: T-1; B: T-2; C: T-3, D: T-4). Los números sobre los picos indican analitos con posible naturaleza flavonoide.

Tabla 4.3.4. Concentración de derivados de ácidos hidroxicinámicos (HCA), determinada a partir de los cromatogramas de HPLC obtenidos a 325 nm, en los vástagos de las variedades de *L. sinuatum* durante la fase de enraizamiento *in vitro* con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.

Variedades	Tratamientos	HCA ($\mu\text{mol eq. ácido cafeico/g PF}$)
SN8946	T-1	$0.290 \pm 0.003a$
	T-2	$0.175 \pm 0.002b$
	T-3	$0.174 \pm 0.003b$
	T-4	$0.172 \pm 0.001b$
SN9013	T-1	$0.159 \pm 0.005b$
	T-2	$0.182 \pm 0.000a$
	T-3	$0.183 \pm 0.001a$
	T-4	$0.182 \pm 0.002a$
SN9000	T-1	$0.220 \pm 0.001a$
	T-2	$0.192 \pm 0.001b$
	T-3	$0.124 \pm 0.004c$
	T-4	$0.098 \pm 0.004d$
SN9001	T-1	$0.108 \pm 0.000a$
	T-2	$0.110 \pm 0.003a$
	T-3	$0.095 \pm 0.002b$
	T-4	$0.079 \pm 0.002c$

4.3.4. Capacidad antioxidante: ABTS y FRAP

La capacidad antioxidante medida con dos protocolos arrojó comportamientos y valores similares. Así, la variedad de color violeta SN8946 en el T-1 mostró el mayor valor en cuanto a capacidad antioxidante medida tomando como referencia de la oxidación del ácido gálico. Se observaron diferencias significativas entre T-1 y los tratamientos siguientes, T-2 y T-3, y entre estos y T-4, siendo el valor más bajo para este último, donde el medio de enraizamiento estuvo suplementado con ANA. Para SN9013, los valores para los tratamientos con IBA fueron muy similares, y solo se diferenciaron con el T-4 que presentó el valor más bajo. En el cultivar de color amarillo se mostraron los resultados más desiguales, observándose

diferencias entre todos los tratamientos. Así, el dato más alto para esta variedad, y también para todo el ensayo, lo mostró el T-1. Los valores fueron bajando a medida que aumentaba la concentración de IBA, y el dato más bajo lo presentó, como en otras variedades, el T-4. Para SN9001, de color rosa, los datos de capacidad antioxidante estaban muy próximos, no mostrándose diferencias entre T-2, T-3 y T-4. Sin embargo, el T-1 a pesar de tener un valor cercano a los anteriores, si mostró diferencias con los otros tratamientos.

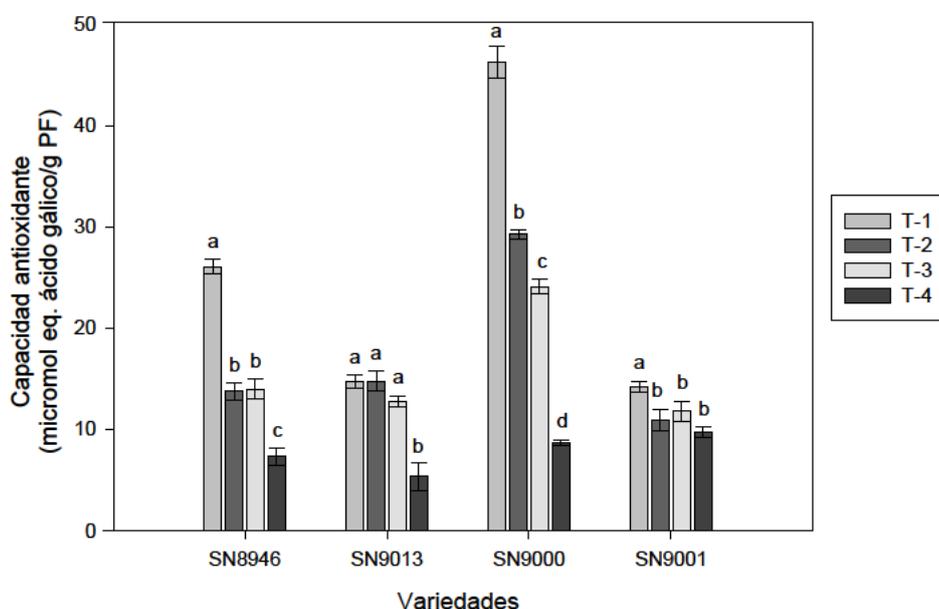


Figura 4.3.16. Capacidad antioxidante de las variedades, determinada con el método ABTS y usando ácido gálico como estándar, en la fase de enraizamiento *in vitro* con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.

Igual ocurrió con la medida del ABTS pero tomando como referencia la oxidación del trolox, donde el comportamiento fue idéntico. Además, la con la referencia de los otros valores, se vio que estos que eran de tres a cuatro veces mayores que aquellos, manteniendo esta relación para todas las muestras.

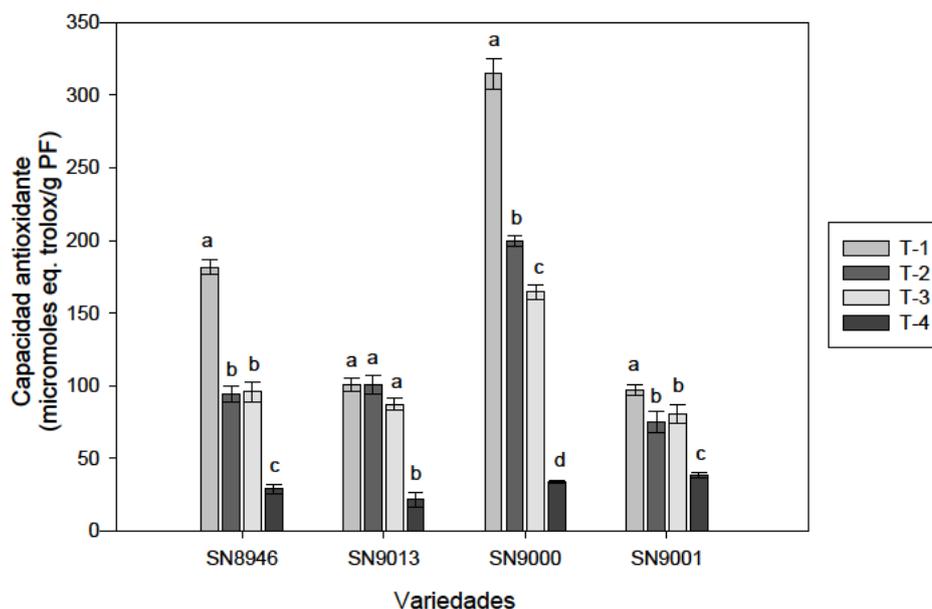


Figura 4.3.17. Capacidad antioxidante de las variedades, determinada con el método ABTS y usando trolox como estándar, en la fase de enraizamiento *in vitro* con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.

En cuanto a la medida de la capacidad antioxidante usando FRAP se observó que el comportamiento fue casi similar, detectándose algunas diferencias. De esta manera, la evolución para SN8946 fue igual que para el ABTS, donde disminuyó a la vez que lo hacía la concentración de IBA aplicada, mostrando el valor más bajo para el tratamiento con ANA (T-4). También sucedió algo parecido con SN9013, excepto que sí se vieron diferencias entre el T-1 y T-2 con respecto a T-3. Para la variedad de color amarillo, el patrón de evolución de la capacidad antioxidante con respecto a los tratamientos fue el mismo que para el ABTS. Y finalmente, para SN9001, de color rosa, la tendencia para este parámetro se mantuvo igual en el FRAP que para el ABTS.

En general, se presentó la mayor capacidad antioxidante en SN9000, variedad de color amarillo, en el tratamiento de menor concentración de IBA, y los menores valores se encontraron para todas las variedades en los tratamientos con ANA.

Esto podría dar una pista, proponiendo que la capacidad antioxidante de los extractos estaría ligada a la hormona y a su concentración en el medio de enraizamiento, de forma que cuanto menor sea la concentración de IBA aplicada, mayor sería la capacidad antioxidante. A esto se le debería sumar que al añadir ANA al medio se produce un descenso muy acusado en este parámetro con respecto al efecto que provoca la otra hormona.

Los resultados obtenidos parecen apuntar a que los compuestos fenólicos solubles, especialmente los flavonoides, estarían estrechamente relacionados con la capacidad antioxidante de los extractos y sus niveles estarían en relación inversa con la concentración de auxina (o con la actividad del fitorregulador) aplicada a los medios de enraizamiento.

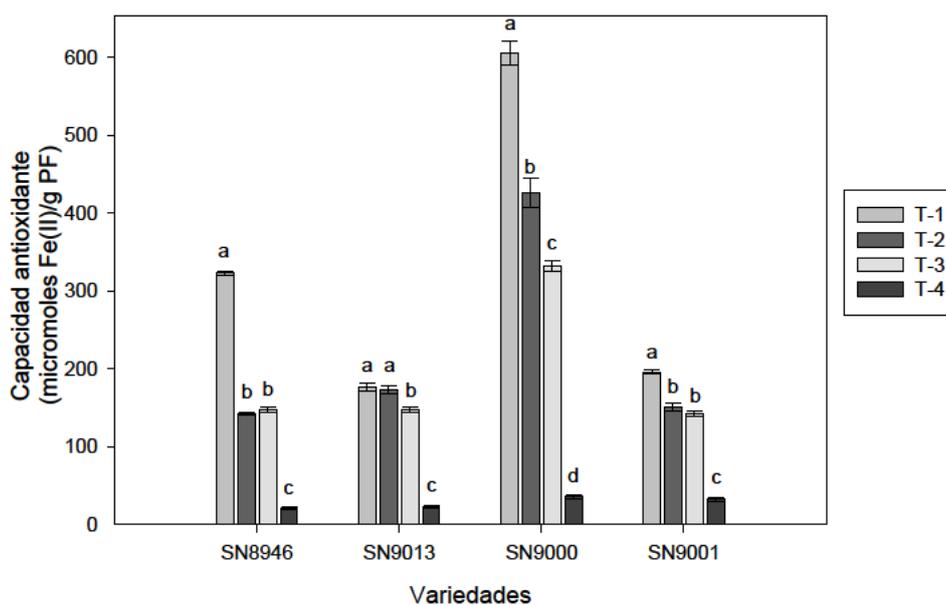


Figura 4.3.18. Capacidad antioxidante de las variedades, determinada con el ensayo FRAP, en la fase de enraizamiento *in vitro* con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.

4.3.5. Producción y parámetros de calidad

La producción en todas las variedades ensayadas no presentó diferencias significativas entre los tratamientos realizados y se mantuvo siempre por encima de lo exigido respecto a este parámetro que se fijó en 8 tallos por

planta y corte (Fig. 4.3.19.). El T-4, donde el medio estaba suplementado con ANA, presentó las producciones más altas en todos los cultivares.

En cuanto a la longitud del tallo, se puede apreciar en la Figura 4.3.20. que el tratamiento T-4 fue el que presentó los tallos más largos, excepto en SN9001, donde el T-1 dio la mayor calidad. En las variedades SN8946 y SN9001 se observaron diferencias significativas entre tratamientos, concretamente el T-2 y T-3 mostraron valores ligeramente más bajos.

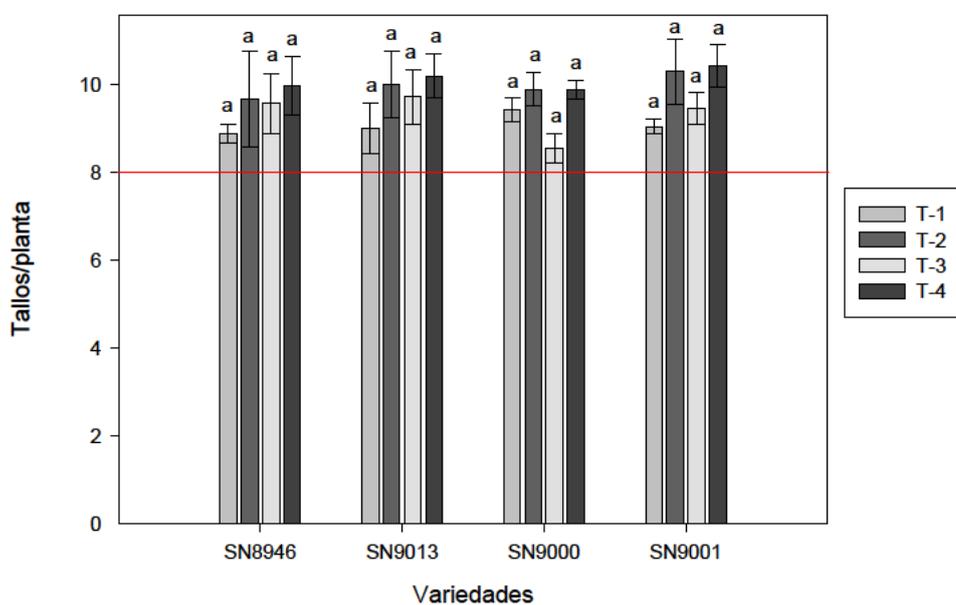


Figura 4.3.19. Efecto de las auxinas y su concentración durante el enraizamiento *in vitro* sobre la producción de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo de producción exigido (8 tallos/planta).

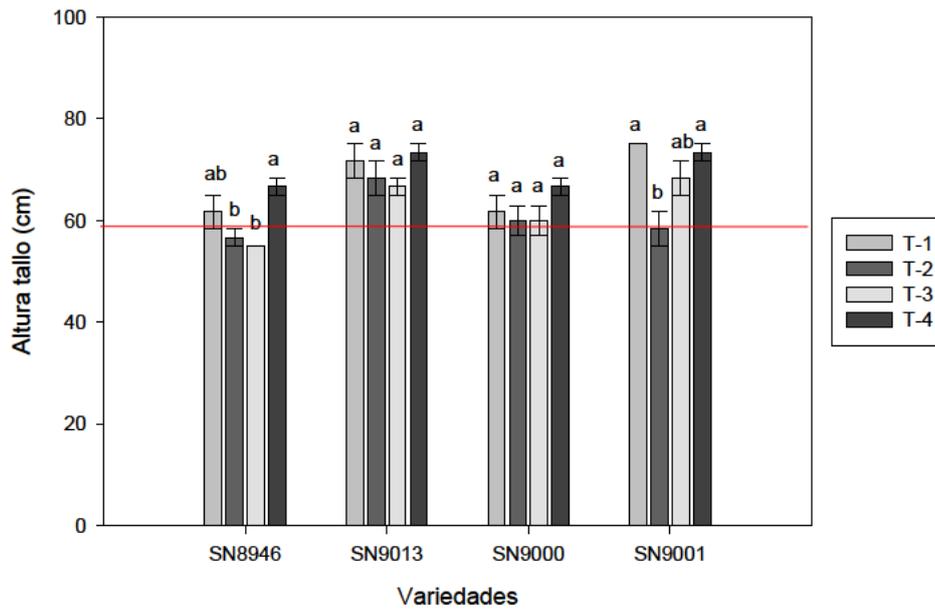


Figura 4.3.20. Efecto de las auxinas y su concentración durante el enraizamiento *in vitro* sobre la longitud del tallo (calidad de la producción) de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica la longitud mínima para calidad extra (60 centímetros).

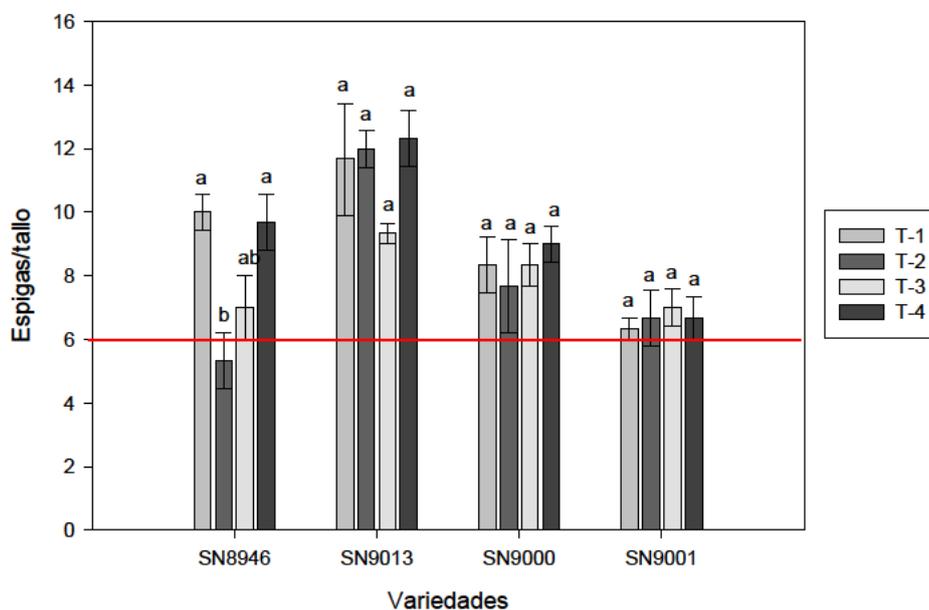


Figura 4.3.21. Efecto de las auxinas y su concentración durante el enraizamiento *in vitro* sobre el número de espigas por tallo de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (6 espigas/tallo).

Con respecto al número de espigas por tallo (Fig. 4.3.21.), el comportamiento estuvo en función de la variedad a considerar, pero este parámetro se encontró siempre por encima del mínimo requerido (6 espigas/tallo). Solamente SN8946 en el T-2 presentó un valor bajo, mostrando además diferencias significativas con los otros tratamientos. En las demás variedades no hay diferencias significativas entre tratamientos para este parámetro.

El número de ramificaciones por tallo debía estar por encima de 3-4, y se puede observar en la Figura 4.3.22. que para todas variedades se mantuvo el dato por encima de ese valor, no encontrándose diferencias significativas entre tratamientos.

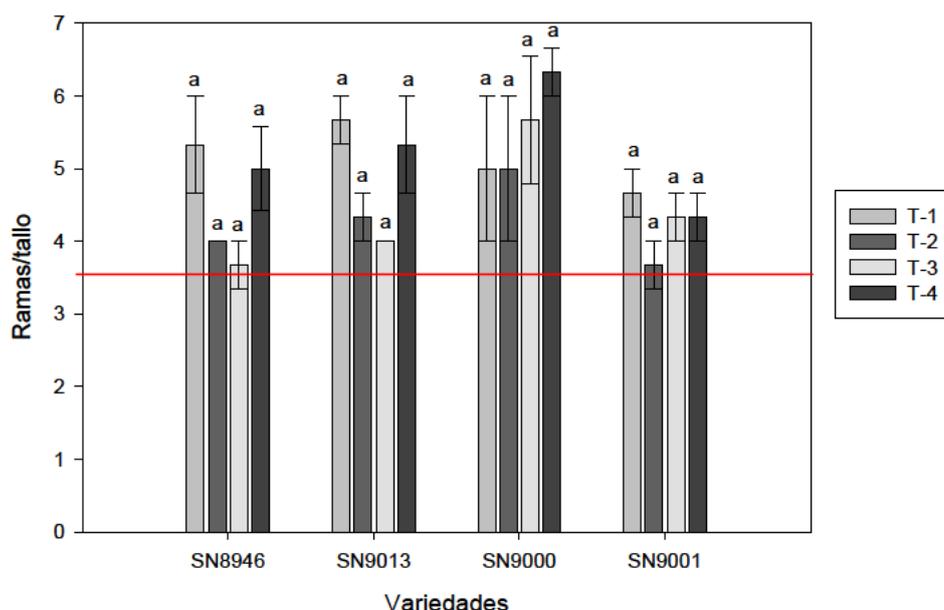


Figura 4.3.22. Efecto de las auxinas y su concentración durante el enraizamiento *in vitro* sobre el número de ramificaciones por tallo de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (3-4 ramas/tallo).

En función de la variedad y el parámetro observado se puede concluir que el T-4 sería el más beneficioso, mostrando valores en lo referido a la calidad comercial muy satisfactorios (Figura 4.3.23.), al contrario que pasa con otras especies endémicas de *Limonium* donde fue el enraizamiento con IBA e AIA el que mostraba un mejor comportamiento de las plantas una vez que

estaban en campo con fenología y criterios agronómicos y comerciales adecuados en comparación con las poblaciones naturales (Lledó et al., 1996).



Figura 4.3.23. Plantas en producción, antes de corte, de *Limonium sinuatum* durante su cultivo bajo condiciones de invernadero. **(A)** SN8946. **(B)** SN9013. **(C)** SN9000. **(D)** SN9001.

4.3.6. Análisis multivariable de los parámetros estudiados (PCA)

El análisis multivariable (PCA) se llevó a cabo para identificar los parámetros que podían describir el comportamiento de las variedades

estudiadas con respecto a los distintos tratamientos de enraizamiento con diferentes concentraciones y tipos de auxinas.

Para la variedad de color violeta, SN8946, la Figura 4.3.24. muestra que la primera componente principal (PC1), que explicó el 54,7 % de la varianza total, estaba fuertemente relacionada con los parámetros de clorofilas y capacidad antioxidante (ABTS y FRAP), flavonoides y fenoles en el eje positivo de las X, y con el peso fresco, enraizamiento y aclimatación en la parte negativa. La segunda componente principal (PC2) que explica el 24,8 % estaba relacionada con la altura del tallo (eje positivo de la Y) y la concentración de hormona y peso seco (parte negativa). Por otro lado, la proyección de las muestras sobre los ejes mostró una clara separación en los datos del T-1 (control) que se encontraban a la derecha y los del T-2, T-3 y T-4 que se encontraban a la izquierda, estando T-2 y T-3 muy próximas entre ellas (IBA) y más alejadas de T-4 (ANA) en el eje Y.

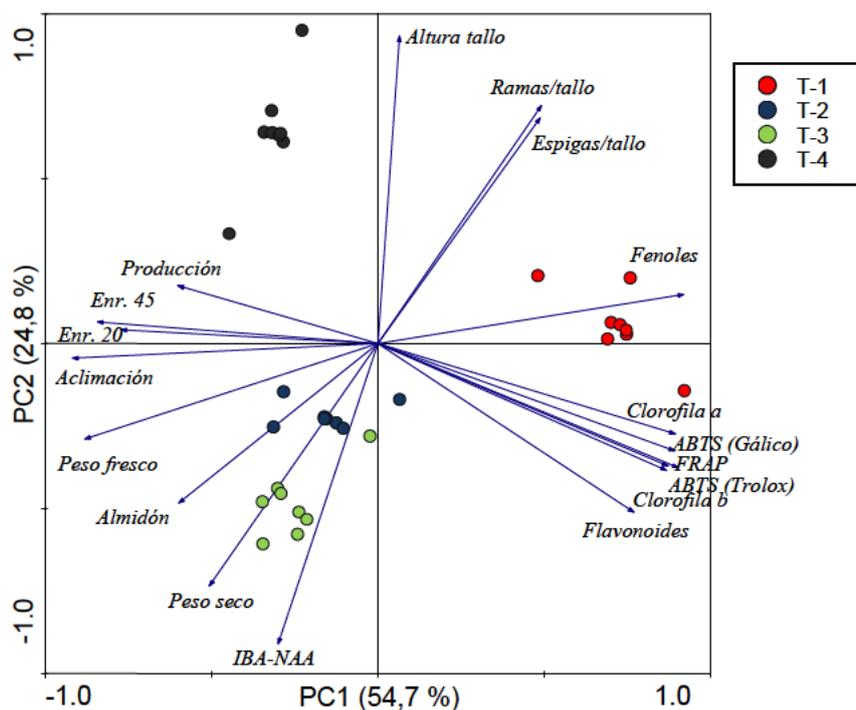


Figura 4.3.24. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN8946 sometidas a diferentes tratamientos en la fase de enraizamiento *in vitro*. El primer eje explica el 54,7 % de la variación y el segundo eje el 24,8 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

En la Figura 4.3.25. se observa que la variedad SN9013 mostró para la PCA una primera componente principal (PC1), que explicaba el 42,2 % de la variabilidad, y que estaba relacionada con el parámetro de altura del tallo en el eje positivo de la X, y con la capacidad antioxidante (ABTS y FRAP), peso seco, peso fresco y almidón en la parte negativa. La segunda componente principal (PC2), que explicaba el 23,3 % de la variabilidad, estaba definida por las clorofilas a y b en la parte positiva, y por el enraizamiento a los 20 días en la parte negativa. Además, se ven dos zonas diferenciadas, así la proyección de las muestras sobre el eje X mostró diferencias entre el T-4, tratamiento con ANA, que estaba a la derecha, y T-1, T-2 y T-3 (IBA) que partían del centro y se distanciaban del origen conforme aumentaba la concentración de esa hormona hacia la izquierda.

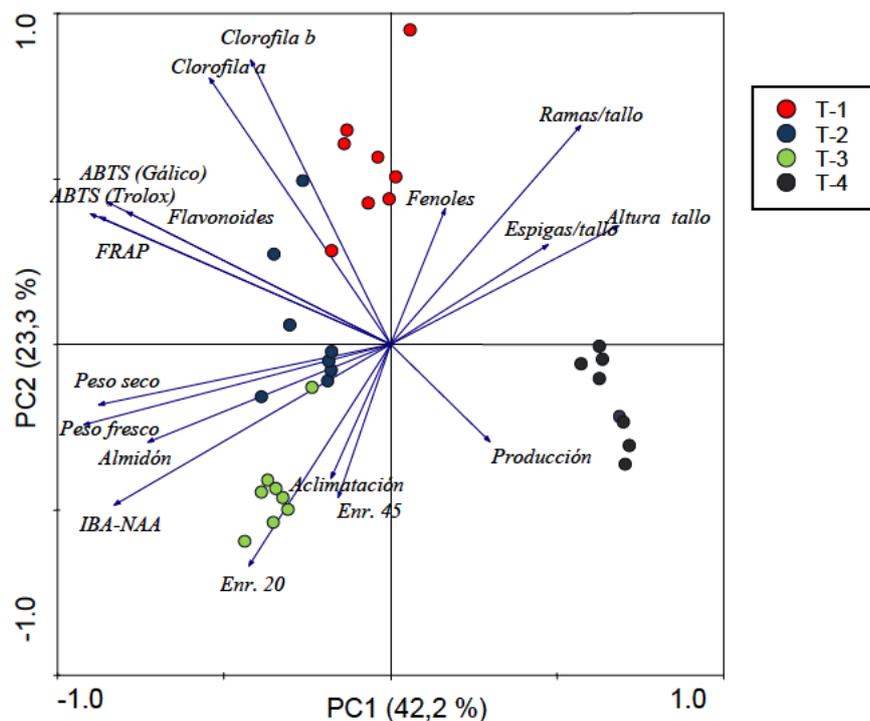


Figura 4.3.25. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9013 sometidas a diferentes tratamientos en la fase de enraizamiento *in vitro*. El primer eje explica el 42,2 % de la variación y el segundo eje el 23,3 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

Para la variedad SN9000, de color amarillo, el PCA (Fig. 4.2.26.) mostró que la primera componente principal (PC1), que explica el 50,0 % de la varianza total, estaba fuertemente relacionada con los parámetros de capacidad

antioxidante (ABTS y FRAP), flavonoides, fenoles y clorofilas en el eje positivo de las X, y con el enraizamiento y aclimatación en la parte negativa. La segunda componente principal (PC2) que explica el 20,9 % de la varianza estaba relacionado con la concentración de hormona (eje positivo de la Y) y, en menor medida, con la producción (parte negativa). Además, al igual que en la variedad SN9013, se podían observar zonas diferenciadas por tratamiento, estando muy localizados en el gráfico, ya que los valores de las muestras son muy similares.

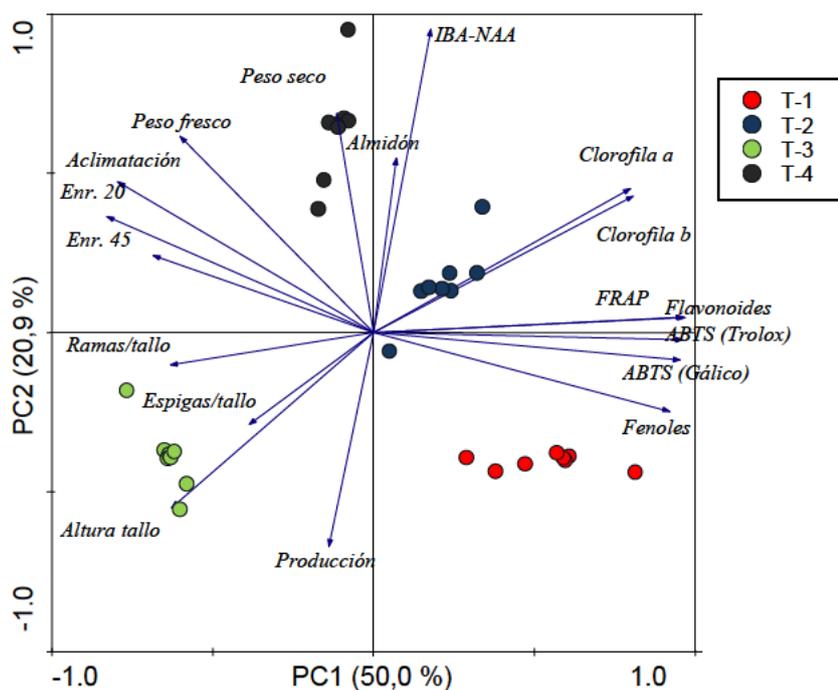


Figura 4.3.26. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9000 sometidas a diferentes tratamientos en la fase de enraizamiento *in vitro*. El primer eje explica el 50,0 % de la variación y el segundo eje el 20,9 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

Para la variedad de color rosa, SN9001, la Figura 4.3.27. arroja que la primera componente principal (PC1) que explica el 39,2 % de la variabilidad total, estaba relacionada con el contenido de almidón en el eje positivo de las X, y con las clorofilas, capacidad antioxidante y flavonoides en la parte negativa. La segunda componente principal (PC2) que explica el 20,8 % de la varianza estaba relacionada, en menor medida con la altura del tallo y el contenido de fenoles (eje positivo de la Y) y la concentración de hormona y

peso fresco (parte negativa). Por otro lado, la proyección de las muestras sobre los ejes mostró una clara separación en los datos del T-1 (control) y T-4, que se encontraban a la izquierda y derecha del origen respectivamente, y que el T-2 y el T-3 estuvieron muy próximos, lo que indicaba que tenían comportamientos similares.

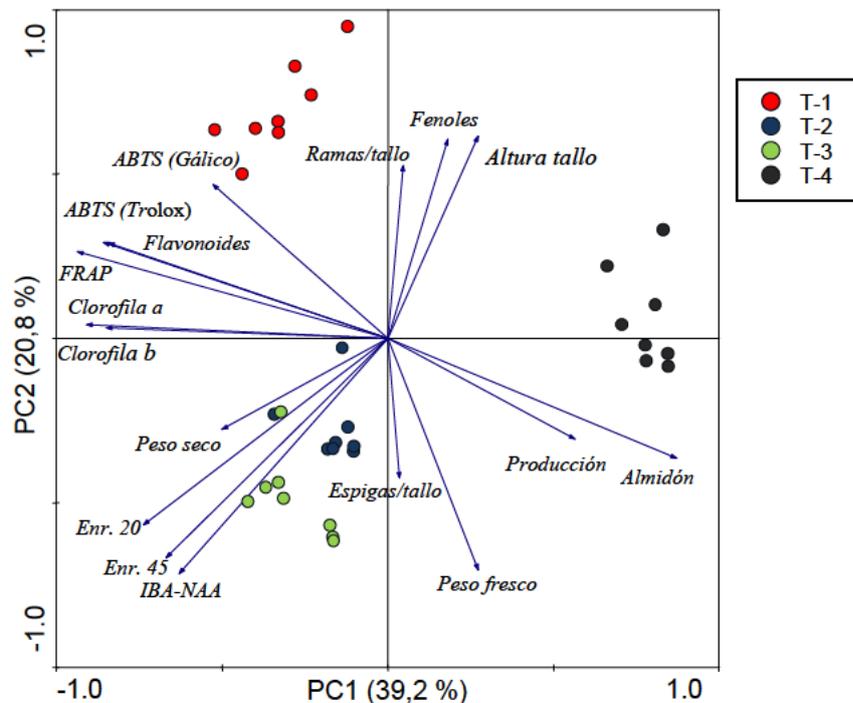


Figura 4.3.27. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de SN9001 sometidas a diferentes tratamientos en la fase de enraizamiento *in vitro*. El primer eje explica el 39,2 % de la variación y el segundo eje el 20,8 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

4.4. Establecimiento *in vitro* de *Limonium sinuatum* a partir de hojas jóvenes

4.4.1. Contaminaciones y establecimiento

En la variedad SN8946 se observó que el número de tubos de ensayo contaminados por bacterias u hongos era más elevado para los tratamientos T-2 y T-4, lo cual arrojó al final del ensayo un 45 % de explantes supervivientes (Tabla 4.4.1). A pesar de esto, solamente un 2,90 % y un 1,39 %, respectivamente, presentaron callo para esos tratamientos, a lo que

se le debía añadir que en ninguno de los tubos de ensayo con callo aparecieron plantas.

Tabla 4.4.1. Parámetros de establecimiento *in vitro* de la variedad SN8946 a partir de explantes de hojas jóvenes.

Tratamiento	Contaminados 30 días (%)	Contaminados 60 días (%)	Explantes supervivientes (%)	Explantes con callo (%)	Tubos con plantas (%)
T-1 (Control)	44.15 ± 3.33b	70.69 ± 3.39a	29.31 ± 3.39b	1.39 ± 0.95a	0.00 ± 0.00a
T-2	36.54 ± 2.17b	54.89 ± 1.37b	45.10 ± 1.37a	2.90 ± 1.45a	0.00 ± 0.00a
T-3	67.17 ± 1.98a	77.55 ± 2.99a	22.45 ± 2.99b	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
T-4	47.18 ± 7.69ab	54.63 ± 2.4b	45.37 ± 2.45a	1.39 ± 1.39a	0.00 ± 0.00a

Para la variedad de color blanco, SN9013, los tratamientos T-1 (control), T-3 y T-4 presentaron un número superior al 85 % en lo referido a la supervivencia de explantes (Tabla 4.4.2.). En cuanto a los tubos de ensayo que mostraron explantes con callo, el T-4, que estaba suplementado con TDZ e AIA mostró el resultado más alto, al cual siguió el T-3, que llevaba TDZ solamente. Estos dos mostraron diferencias significativas con el T-1, que únicamente tenía BA. Sin embargo, todos los porcentajes en lo referido a tubos donde se observaba callo fueron bajos, lo que dio lugar a que ninguno de estos tuviera plantas que pudieran subcultivarse.

Tabla 4.4.2. Parámetros de establecimiento *in vitro* de la variedad SN9013 a partir de explantes de hojas jóvenes.

Tratamiento	Contaminados 30 días (%)	Contaminados 60 días (%)	Explantes supervivientes (%)	Explantes con callo (%)	Tubos con plantas (%)
T-1 (Control)	12.33 ± 2.41b	13.72 ± 3.71b	86.28 ± 3.07a	6.83 ± 2.31bc	0.00 ± 0.00a
T-2	35.81 ± 4.16a	37.20 ± 3.17a	62.80 ± 3.16b	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00a
T-3	10.23 ± 0.96b	14.35 ± 2.96ab	85.65 ± 2.96a	10.34 ± 1.46ab	0.00 ± 0.00a
T-4	7.87 ± 2.01b	13.12 ± 2.96b	86.88 ± 2.96a	16.20 ± 2.81 ^a	0.00 ± 0.00a

Para la variedad SN9000 el porcentaje de contaminaciones estuvo por debajo del 30 %, un valor muy significativo, si se tiene en cuenta que el

establecimiento a partir de inflorescencia inmadura resulta normalmente en un 50-60 % de los explantes contaminados. Así, hubo una supervivencia de explantes por encima del 70% para todos los tratamientos. A pesar de esto, el T-1 tuvo un número de explantes con callo muy bajo, estando el resto de tratamientos cercanos al 25% como T-2 y T-4, y por encima de este valor el T-3. Con esta evolución se observó que solamente los tratamientos T-2 con un 14,62 % de los tubos y el T-3 con un 31,93 % de los tubos, dieron plantas para poder realizar una posterior multiplicación (Fig. 4.4.1. a 4.4.3.).

Tabla 4.4.3. Parámetros de establecimiento *in vitro* de la variedad SN9000 a partir de explantes de hojas jóvenes.

Tratamiento	Contaminados 30 días (%)	Contaminados 60 días (%)	Explantes supervivientes (%)	Explantes con callo (%)	Tubos con plantas (%)
T-1 (Control)	22.73 ± 3.67a	29.09 ± 3.02a	70.91 ± 3.02b	6.52 ± 1.74b	0.00 ± 0.00c
T-2	21.33 ± 3.53a	28.00 ± 2.31a	72.00 ± 2.31b	24.00 ± 6.11ab	14.67 ± 2.67b
T-3	3.95 ± 2.31b	5.23 ± 2.61b	94.77 ± 2.61a	39.83 ± 3.71a	31.93 ± 1.57a
T-4	21.29 ± 2.45a	24.07 ± 2.58a	75.93 ± 2.58b	25.15 ± 2.54ab	0.00 ± 0.00c

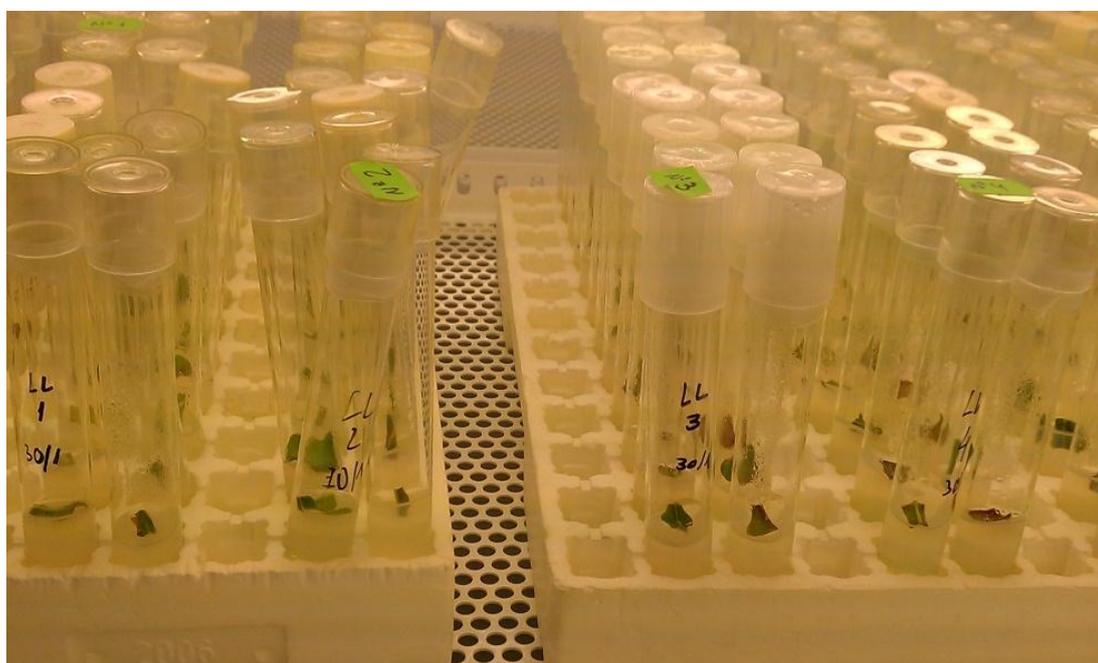


Figura 4.4.1. Estado inicial de los explantes de SN9000 al ponerse en el primer subcultivo en el medio de establecimiento con TDZ.



Figura 4.4.2. Estado final de los explantes con brotes de SN9000 tras dos subcultivos en el medio de establecimiento con TDZ.



Figura 4.4.3. Detalle de los brotes de SN9000 generados a partir de los explantes de hojas jóvenes.

Al igual que ocurría en las variedades SN8946 y SN9013, el cultivar SN9001 mostró porcentajes de explantes supervivientes por encima del 35 % en todos los tratamientos, datos bajos para un establecimiento adecuado. Además, a esto se le suma valores muy bajos en cuanto al número de explantes con callo. Este último valor repercutió, como en SN8946 y en SN9013, en que no aparecieran plantas en ninguno de los tubos de los tratamientos llevados a cabo.

Tabla 4.4.4. Parámetros de establecimiento *in vitro* de la variedad SN9001 a partir de explantes de hojas jóvenes.

Tratamiento	Contaminados 30 días (%)	Contaminados 60 días (%)	Explantes supervivientes (%)	Explantes con callo (%)	Tubos con plantas (%)
T-1 (Control)	48.98 ± 2.63ab	64.99 ± 6.04a	35.01 ± 6.04a	1.39 ± 1.39ab	0.00 ± 0.00a
T-2	48.00 ± 2.36ab	55.01 ± 2.93ab	44.98 ± 2.93a	2.90 ± 1.45ab	0.00 ± 0.00a
T-3	38.43 ± 1.23a	51.71 ± 2.77ab	48.29 ± 2.77a	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
T-4	57.85 ± 3.01a	62.41 ± 2.22b	37.58 ± 2.22a	7.37 ± 0.56a	0.00 ± 0.00a

En este ensayo el establecimiento a partir de explantes de hojas jóvenes usando TDZ como fitorregulador inductor solamente resultó viable en la variedad SN9000 de color amarillo. En ensayos realizados por otros investigadores, las citoquininas BA, ZT y TDZ también resultaron útiles en la diferenciación de órganos a partir de yemas axilares (Harazy et al., 1985; Witomska, 1995), o en la formación directa de brotes en *Limonium peregrinum* a partir de discos de hojas (Seelye et al., 1994).

Así, en otras especies como en *Syringa vulgaris*, se vio que la propagación a partir de yemas axilares necesitaba altos niveles de citoquininas para activarlas (Hildebrandt y Harney, 1983; Gabryszewska, 1989; Waldenmaier y Bünemann, 1991; Cui et al., 2009), mientras que cuando se usaba un sólo nodo, los niveles debían ser bajos favoreciendo el establecimiento y la elongación el tallo (Einset y Alexander, 1985; Waldenmaier y Bünemann, 1991; Pierik et al., 1982; Gabryszewska y Warabieda, 1992; Charlebois y Richter, 2004).

También se vio una alta eficiencia de la ZT y de la BA en la regeneración de brotes a partir de callo en *L. perezii* (Kunikate y Mii, 1990), y aunque la BA ha sido usado principalmente para la multiplicación de brotes de diversas especies de *Limonium*, incluido *Limonium sinuatum* (Harazy et al., 1985; Martín y Pérez, 1992, 1995; Witomska, 1995; Amo-Marco e Ibañez, 1998), no ha tenido éxito en la inducción a partir de explantes de hojas jóvenes

como se ha observado en el T-1 (Control) en todas las variedades estudiadas en el presente trabajo.

El TDZ también fue una citoquinina muy eficiente en la inducción de organogénesis a partir de explantes de hojas tanto en manzana (Fasolo et al., 1989), como en pera (Leblay et al., 1991) y en gerbera (Reynoird et al., 1993).

En varias especies, la utilización del peciolo y la parte central de las hojas mostró una mejor respuesta que el resto de la hoja (Wei-lun et al., 1980; Oka y Ohyama, 1981; Nair et al., 1984). Sin embargo, para *L. altaica* cv Emilie los segmentos de la hoja y del peciolo respondieron igual y desarrollaron brotes adventicios rápidamente (Srivatsava et al., 1985; Lee y Rao, 1986; Fink et al., 1986), al igual que ocurrió en el caso de SN9000, aunque no se dio este desarrollo de forma tan veloz.

Este proceso de regeneración permite tener gran número de plantas en un espacio corto de tiempo y conservando la plante madre de la cual se tomaron las hojas como explantes (Jeong et al., 2001). En comparación con la capacidad de regeneración a partir de inflorescencias inmaduras que permite obtener explantes con menos contaminación (Ruffoni et al., 2000) la velocidad fue mayor. Así, también se regeneraron brotes a partir de hojas de plantas *in vitro* de las especies *L. otolepis*, *L. latifolium* y *L. dumosum*, mostrando que la citoquinina más efectiva fue la 2iP, y constatando que, a menudo, los brotes en presencia de BA presentaban hiperhidricidad y callo basal (Ruffoni et al., 2000).

En otros ensayos ciertos autores observaron una pérdida de longitud en los brotes de especies cultivadas *in vitro* en los medios que estaban suplementados de forma continua con TDZ (Briggs et al., 1988). Por tanto, se sugirió aplicar pulsos de TDZ durante periodos cortos de tiempo evitando este problema en brotes de *Acnitidia* (Seelye y Butcher, 1991), lo cual sirvió para realizar un buen establecimiento y posteriores subcultivos de *L. sinuatum* variedad SN9000. Estos pulsos fueron de 0,25 mg/L en dos

ocasiones, cada 60 días, mientras que en ensayos con petunia los pulsos de TDZ fueron de 100 μ M (22,0 mg/L) durante 30 días (Fellman et al., 1987).

En relación a la cantidad de contaminaciones detectadas en el ensayo, algunos autores sugieren que la obtención de un cultivo aséptico de estatiche usando procedimientos estándar (explantes de la roseta basal) resulta muy complicado, pues se necesitaban muchas plantas para obtener explantes sin contaminación (Amo-Marco e Ibañez, 1998). Por ese motivo, los tallos de inflorescencia eran una buena opción para la introducción y establecimiento *in vitro*, evitando contaminaciones como en los casos de *Eleusine coracana* (George y Eapen, 1990), *Cortaderia selloana* (Robacker, 1992) y *Beta marítima* (Zhong et al., 1993). Pero, claro está, que la segunda opción conlleva mayor variación somaclonal que la primera (Pierik, 1975).

El protocolo de esterilización ha podido ser a la vista de los resultados quizás no muy adecuado. Así, otros métodos de desinfección que han sido utilizados para segmentos nodales de tallos de inflorescencias inmaduras consistirían en una secuencia que comenzaría por una inmersión en solución acuosa al 1 % de hipoclorito sódico durante un minuto, seguido de un triple enjuague con agua destilada estéril (Kaninski et al., 2012); mientras que para semillas se realizaba una esterilización superficial comenzando por una inmersión en etanol al 70 % durante 1 minuto, seguido de 1 minuto en solución de hipoclorito sódico al 1 %, un enjuague con cloruro de mercurio al 0,1 % y posteriormente tres enjuagues con agua destilada estéril (Kaninski et al., 2012). Otros protocolos establecidos para la desinfección se llevaron a cabo en dos pasos, primero un enjuague con solución jabonosa, y segundo un tratamiento con etanol al 70 % durante 30 segundos seguido de hipoclorito sódico al 1 % durante 10 minutos, y a continuación se enjuagaron cuatro veces, durante 5 minutos cada una, en agua destilada estéril (Pedroza et al., 1997).

En el establecimiento el tipo de explante usado (hoja joven de unos 2 cm de longitud) ha dado buenos resultados de introducción para *Limonium sinuatum*, concretamente para la variedad SN9000. Pero el éxito de la

introducción también se dio con otro tipo de explantes (tallos de inflorescencias inmaduras o escapos de flores inmaduras) o con el mismo tipo (hojas jóvenes) en *L. cordatum*, *L. gmlinii* y *L. sinuatum* cuando el medio fue suplementado con varias combinaciones de citoquininas y auxinas como BA, 2iP y AIA (Gabryszewska et al., 2000; Rufoni et al., 2000; Mercuri et al., 2003; Savona et al., 2009). También se usaron explantes de cotiledones en medio con 2,4-D en *Limonium bellidifolium* con buenos resultados (Aly et al., 2002). También ha sido llevado a cabo el cultivo de hojas en la propagación masiva *in vitro* del café con el fin de obtener embriones somáticos vía formación de callo. La mayor producción de plántulas en café se consiguió combinando tanto BA con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, una auxina) como 2iP con IBA (García y Menéndez, 1987). En violeta africana se usaron segmentos de hojas para obtener brotes y posteriormente enraizarlos para una clonación rápida, así como en banana, piña, orquídeas, claveles, begonias, gerberas y otras especies de interés agronómico y ornamental (Hurtado y Merino, 1987; Okhi, 1994).

Otro factor a tener en cuenta a la hora de un establecimiento exitoso es la posición del explante en el medio de cultivo. En este ensayo los trozos de hojas jóvenes se colocaron de forma abaxial (envés de la hoja) y el callo se formó alrededor del corte. Otros autores indican que era la parte adaxial (haz de la hoja) en *Sinningia speciosa* la que, por tener un mayor número de tricomas, fue donde se llevó a cabo mejor la dediferenciación y rediferenciación celular y esto favoreció la obtención de un buen número de plantas (Pacheco, 2001). Recalcar que en otras plantas ornamentales, como la begonia (*Begonia spp*) y la violeta africana (*Saintpaulia spp*) se pudo ver una intensa activación de los tejidos superficiales, específicamente células epidérmicas, para la posterior diferenciación (Okhi, 1994).

El éxito del protocolo de propagación *in vitro* reside en el tipo de explante escogido para su establecimiento, de forma que debe ser un tejido donde el riesgo de contaminación sea mínimo y que provoque el menor grado de destrozo a los individuos seleccionados de la población original (Ibañez, 2013). Por este motivo, los explantes de la inflorescencia, eran buenos,

tienen fácil esterilización y conservan las plantas madre (Singh y Sehgal, 1999).

Dentro de los factores ambientales durante el establecimiento, la temperatura y la luz deben ser tenidas muy en cuenta. Así, se mantuvieron los valores de estos dos parámetros usados para el establecimiento a partir de inflorescencia inmadura. Se puede ver como este nuevo protocolo no es apto para todas variedades, mientras que el anterior si lo era. Esto sugiere que debería también tenerse en cuenta los dos aspectos ambientales mencionados. Así, en otros ensayos se ha descrito que los resultados obtenidos en el establecimiento de *Sinningia speciosa* sugerían que la luz directa incide en un incremento de la temperatura interna y externa de los frascos, lo que pudo afectar a la capacidad organogénica, siendo esta más favorable con menor intensidad y cantidad lumínica, pues la luz directa y el incremento de temperatura incurrieron en la oxidación de los explantes y en su muerte prematura (Pacheco, 2001). Además, la presencia de estrés lumínico y calórico sobre los explantes, pudo haber provocado la secreción de fenoles en la base de los mismos y esto, como consecuencia provoco su muerte. Los compuestos fenólicos emitidos por los explantes en los medios de cultivo pueden oxidarse causando un ennegrecimiento del medio y muerte de los propios explantes (Navarro y Perea, 1996).

4.4.2. Crecimiento, tasa de multiplicación, peso fresco y peso seco

La variedad estudiada SN9000 presentó datos de crecimiento similares entre tratamientos, de manera que las variaciones estuvieron entre 1,98 y 2,55 centímetros sin diferencias significativas, y no observándose visualmente distinciones (Fig. 4.4.4. y 4.4.5.). Sin embargo, sí hubo diferencias entre las plantas establecidas con el protocolo comercial y el T-3 con respecto a la tasa de multiplicación. A pesar de esto, como el valor del T-3 está en 1,20 brotes por planta, el resultado se dio por bueno (Tabla 4.4.5.).

En cuanto al peso fresco y peso fresco se observó que no había diferencias significativas entre los tratamientos estudiados.

Tabla 4.4.5. Parámetros producción *in vitro* de la variedad SN9000 en la fase de multiplicación establecida a partir de explantes de hojas jóvenes.

Tratamiento	Crecimiento (cm)	Tasa de multiplicación (brotes/planta)	Peso fresco (g/planta)	Peso seco (g/planta)
Comercial (Control)	1.98 ± 0.01a	1.44 ± 0.06a	1.09 ± 0.24a	0.07 ± 0.01a
T-2	2.08 ± 0.06a	1.23 ± 0.02ab	2.49 ± 0.83a	0.16 ± 0.04a
T-3	2.55 ± 0.34a	1.20 ± 0.06b	1.29 ± 0.32a	0.09 ± 0.02a



Figura 4.4.4. Estado de las plantas del T.2 al finalizar un periodo de subcultivo.



Figura 4.4.5. Estado de las plantas de T-3 al finalizar un periodo de subcultivo.

4.4.3. Concentración de clorofilas a, b y totales

En este ensayo los valores de clorofila a se mostraron similares para el control y el T-3, mostrando diferencias con el T-2, tratamiento suplementado con IBA y AIA. Lo mismo ocurrió con la clorofila b y las clorofilas totales. Sin embargo, para la relación de clorofila a/b el valor más alto se mostró en el tratamiento en el que solo se utilizó TDZ, mostrando ligeras diferencias con el control que solo tuvo en el medio BA.

Tabla 4.4.6. Concentración de clorofilas a, b y totales durante la fase de multiplicación *in vitro* de la variedad SN9000.

Tratamientos	Clorofila a (microg/g PF)	Clorofila b (microg/g PF)	Clorofilas Totales (microg/g PF)	Relación clorofila a/b
Comercial (Control)	164.12 ± 5.35a	158.56 ± 3.42a	322.68 ± 8.67a	1.03 ± 0.01b
T-2	144.63 ± 4.27b	143.48 ± 3.52b	288.11 ± 7.37b	1.01 ± 0.02ab
T-3	170.41 ± 2.24a	158.72 ± 1.09a	329.13 ± 3.19a	1.07 ± 0.01a

4.4.4. Niveles de fenoles solubles totales, flavonoides solubles y almidón

El contenido en fenoles solubles totales no presentó diferencias entre los tratamientos estudiados en la variedad SN9000. Se pudo observar lo mismo en cuanto al contenido de flavonoides, ya que los datos fueron muy similares. Sin embargo, en el contenido de almidón, el tratamiento T-3, fue el que mostró un mayor contenido de este compuesto, observándose diferencias significativas con el T-2.

Tabla 4.4.7. Concentración de fenoles, flavonoides y almidón en la variedad SN9000 durante la fase de multiplicación *in vitro*.

Tratamientos	Fenoles ($\mu\text{mol eq. ácido gálico/g PF}$)	Flavonoides ($\mu\text{mol eq. rutina/g PF}$)	Almidón ($\mu\text{mol eq. glucosa/g PF}$)
Comercial (Control)	27.21 \pm 0.82a	1.02 \pm 0.14a	526.51 \pm 21.11ab
T-2	24.87 \pm 1.33a	1.02 \pm 0.12a	455.24 \pm 24.48b
T-3	28.17 \pm 0.76a	1.19 \pm 0.09a	555.01 \pm 21.27a

4.4.5. Capacidad antioxidante: ABTS y FRAP

En la variedad de color amarillo no se encontraron diferencias entre tratamientos con respecto a la capacidad antioxidante cuando se midió con referencia a la oxidación del ácido gálico (Fig. 4.4.6.).

La tendencia se mantiene igual cuando se realizó la medida de la capacidad antioxidante con el protocolo ABTS usando como referencia el trolox (Fig. 4.4.7.). Además se observó que la relación entre valores de ambas medidas estuvo relacionada por un factor de entre 4 y 5.

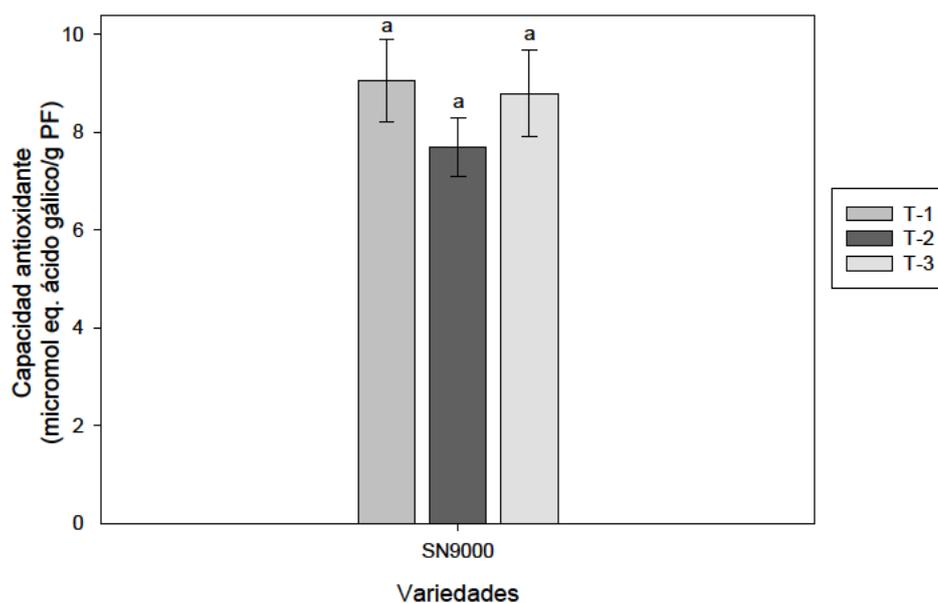


Figura 4.4.6. Capacidad antioxidante en extractos de la variedad SN9000, determinada con el ensayo del ABTS y usando ácido gálico como estándar, durante la fase de multiplicación.

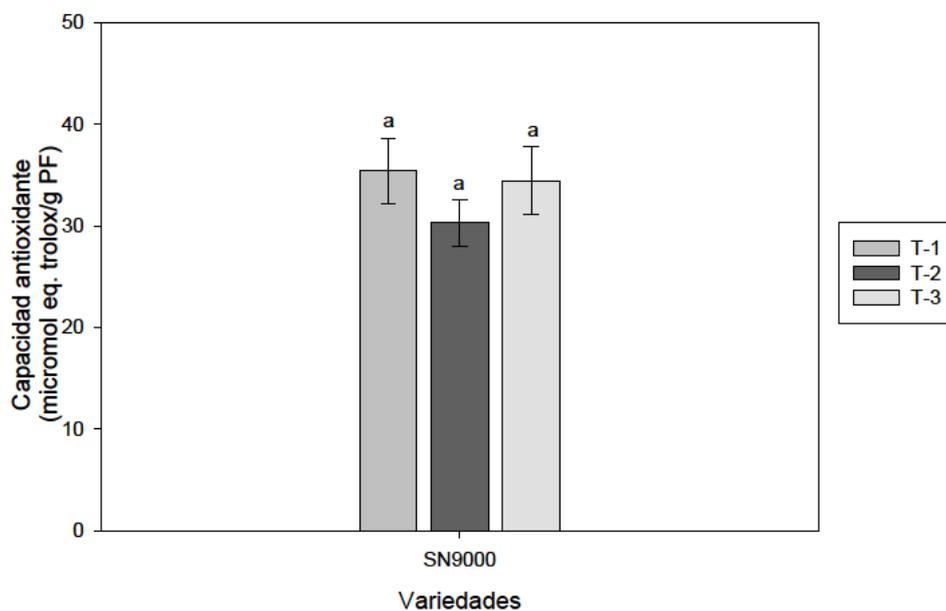


Figura 4.4.7. Capacidad antioxidante en extractos de la variedad SN9000, determinada con ABTS y usando trolox como referencia, durante la fase de multiplicación.

La medida de la capacidad antioxidante medida con FRAP mostró la misma tendencia, pero el T-3 presentó diferencias significativas con respecto a los otros dos tratamientos (Fig. 4.4.8.).

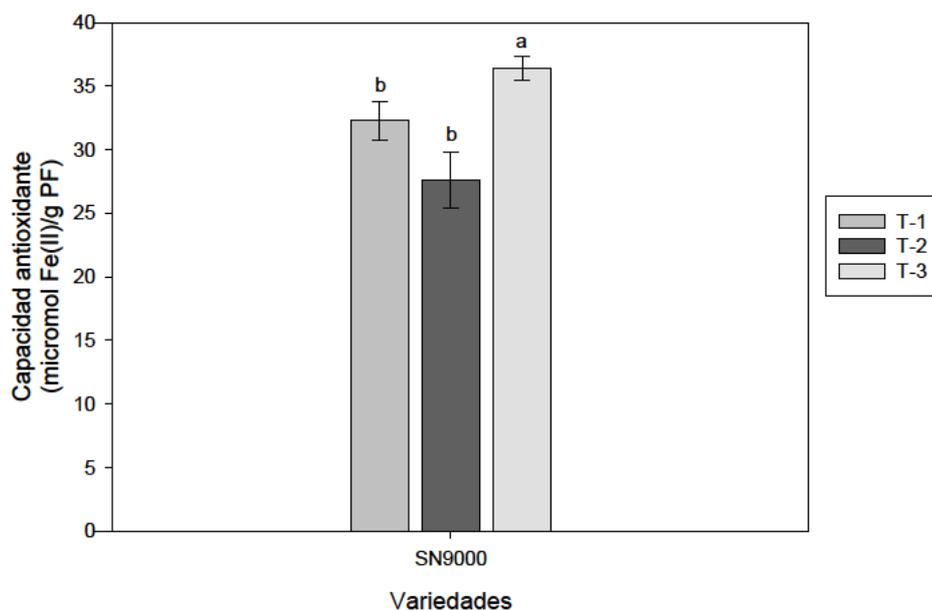


Figura 4.4.8. Capacidad antioxidante de la variedad SN9000, determinada con el método con FRAP, durante la fase de multiplicación.

4.4.6. Producción y parámetros de calidad

La producción en el tratamiento control y T-2 con BA y con BA más AIA, respectivamente, no llega al valor de 8 tallos por planta y corte que se exige, si bien están en valores muy cercanos de 7,5 y 7. El T-3 supera el valor esperado, presentando diferencias significativas con el T-2 (Fig. 4.4.9.).

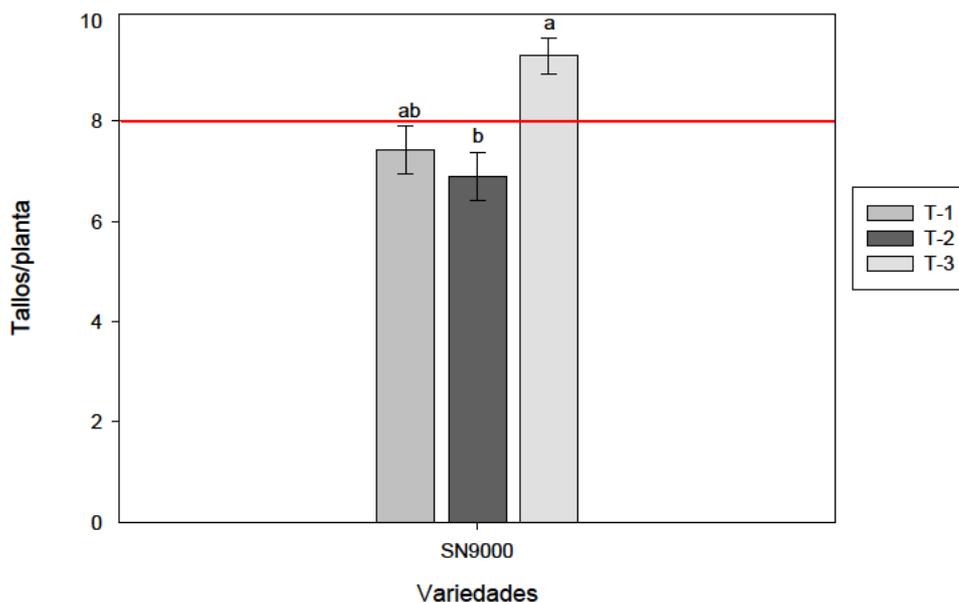


Figura 4.4.9. Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes durante la micropropagación sobre la producción de la variedad SN9000 en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo de producción exigido (8 tallos/planta).

Todas las plantas de los distintos tratamientos de la variedad ensayada SN9000 de color amarillo presentaron una altura de tallo por encima de 60 centímetros, de manera que cumplen con el parámetro de calidad extra. Además, no hay diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 4.4.10.).

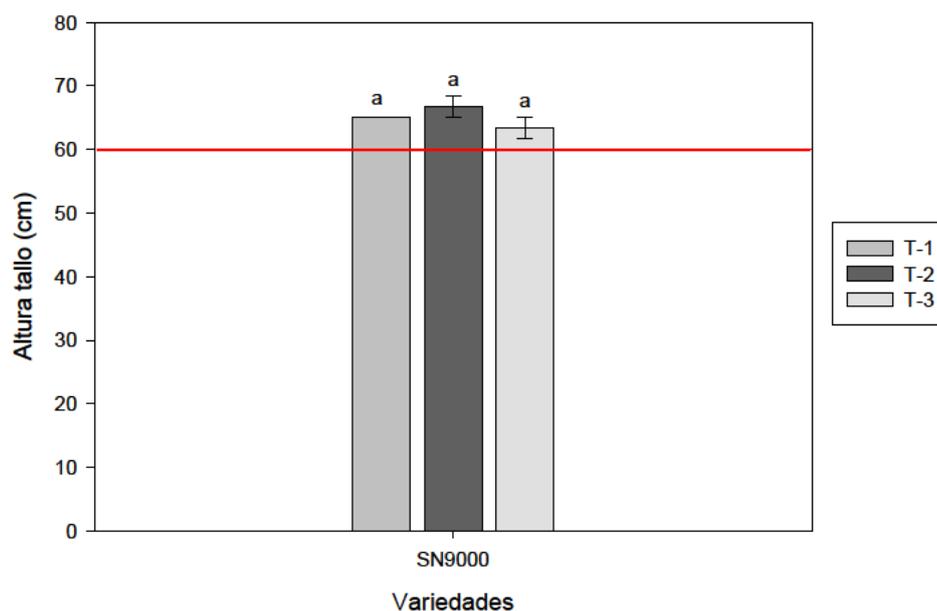


Figura 4.4.10. Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes durante la micropropagación sobre la longitud del tallo (calidad de la producción) de la variedad SN9000 en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica la longitud mínima para calidad extra (60 centímetros).

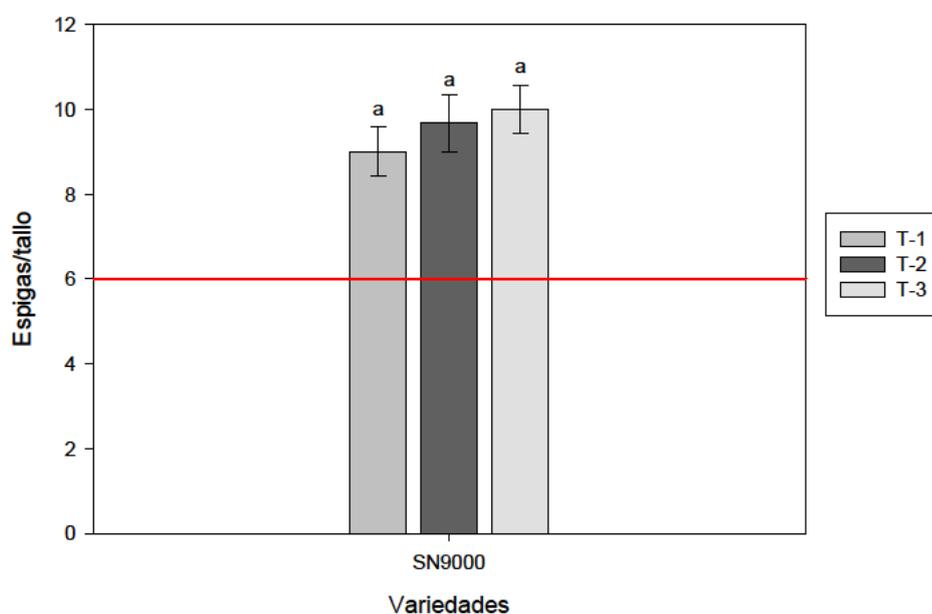


Figura 4.4.11. Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes durante la micropropagación sobre el número de espigas por tallo de la variedad SN9000 en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (6 espigas/tallo).

Todos los tratamientos mostraron valores entre 9 y 10 espigas por tallo, superando el valor exigido de 6. También se observó que no hubo diferencias significativas entre tratamientos. Esto puede indicar que el suplemento hormonal no afecta a este parámetro (Fig. 4.4.11.).

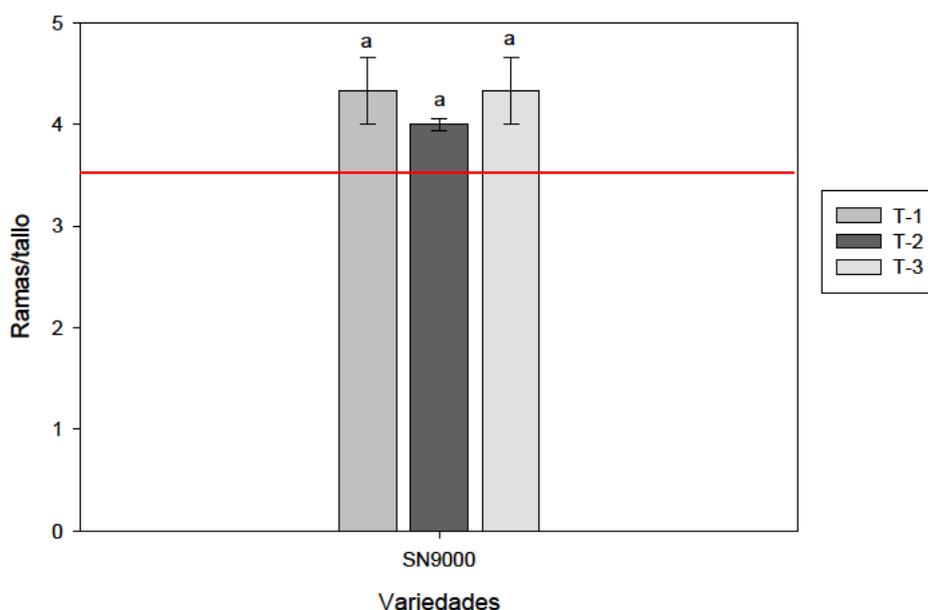


Figura 4.4.12. Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes durante la micropropagación sobre el número de ramificaciones por tallo de SN9000 en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (3-4 ramas/tallo).

Los valores de ramas por tallo también se encuentran por encima de lo exigido en los tres tratamientos, no presentándose diferencias entre ellos (Fig. 4.4.12). En definitiva, los tratamientos T-2 y T-3 produjeron un material adecuado para la producción, tal y como se muestra en las Figuras 4.4.13 a 4.4.17.



Figura 4.4.13. Variedad SN9000 del T-2 establecida a partir de explantes de hojas jóvenes en producción bajo condiciones de cultivo en invernadero.



Figura 4.4.14. Variedad SN9000 del T-3 establecida a partir de explantes de hojas jóvenes en producción bajo condiciones de cultivo en invernadero.



Figura 4.4.15. Perspectiva general de las plantas de SN9000 obtenidas a partir del establecimiento de explantes de hojas jóvenes en producción bajo condiciones de invernadero



Figura 4.4.16. Detalle de la inflorescencia de plantas de SN9000 obtenida a partir del tratamiento de establecimiento T-2.



Figura 4.4.17. Detalle de la inflorescencia de plantas de SN9000 obtenida a partir del tratamiento de establecimiento T-3.

4.4.7. Análisis multivariable de las componentes estudiadas (PCA)

El PCA se llevó a cabo para identificar qué parámetros podían describir el comportamiento de los tratamientos en la variedad estudiada, SN9000, con respecto a los tratamientos de establecimiento aplicados.

Así, el PCA (Fig. 4.4.18.) muestra que la primera componente principal (PC1), que explica el 45,7 % de la variabilidad total, estaba fuertemente relacionada con los parámetros de altura de tallo, peso fresco y peso seco en el eje positivo de las X, y con el almidón y clorofilas en la parte negativa. La segunda componente principal (PC2) que explica el 21,9 % de la varianza, estaba relacionada con la tasa de multiplicación *in vitro* en la parte positiva del eje Y, y, en menor medida, con el crecimiento en la parte negativa. También, se podían observar tres zonas diferenciadas en función de los tratamientos, de manera que el T-2 (derecha) y el T-3 (izquierda) estaban separados del T-1 (control), y por tanto cada tratamiento presentaba unas condiciones que favorecían a unos parámetros en detrimento de otros.

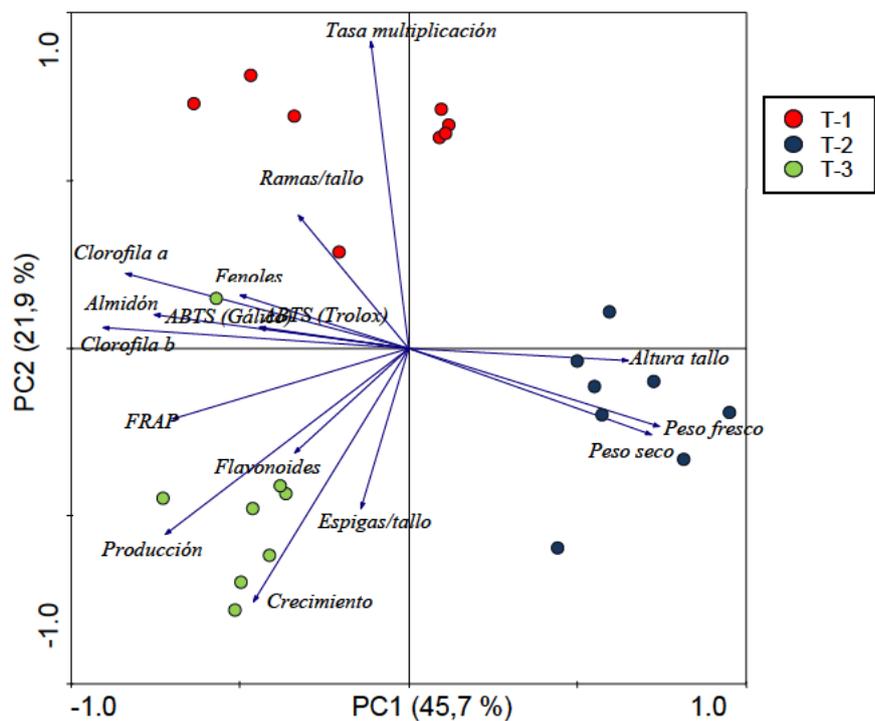


Figura 4.4.18. Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9000 tanto en la fase de multiplicación *in vitro* como en el cultivo en invernadero tras haber sido expuestas a diferentes tratamientos de establecimiento. El primer eje explica el 45,7 % de la variación y el segundo eje el 21,9 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

□ Ensayo de iluminación

Para la variedad con flores de color violeta, SN8946, no se encuentran diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a crecimiento y tasa de multiplicación *in vitro*. Existen diferencias significativas en la producción en invernadero entre los tratamientos T-1 y T-2, pero siempre por encima de lo exigido en todos los parámetros comerciales. El resto de parámetros analizados son similares entre tratamientos y cumplen con lo requerido. Por tanto, se podría usar el tratamiento T-3 para subcultivar la variedad SN8946 mientras esté dentro del ciclo productivo.

Para la variedad SN9013, el crecimiento *in vitro* es similar en todos los tratamientos, pero hay diferencias en la tasa de multiplicación de los tratamientos T-1 y T-2. Respecto a la calidad comercial, a pesar de encontrar diferencias en el número de espigas también entre los tratamientos T-1 y T-2, todos los valores están por encima de los valores deseados. Por tanto, también se puede usar el T-3 para subcultivar esta variedad.

En la variedad SN9000, con flores de color amarillo, no se ven diferencias significativas en lo referido al crecimiento ni a la tasa de multiplicación. Por este motivo, y debido a que los parámetros de calidad para todos los tratamientos se mantienen de acuerdo a los valores exigidos, esta variedad se puede pasar a subcultivar en las condiciones del tratamiento T-3.

En la variedad SN9001 se observa un crecimiento y una tasa de multiplicación similar en todos los tratamientos. Además, todos los parámetros referidos a la calidad comercial de producción están por encima de lo exigido. En consecuencia, se considera que puede utilizarse el tratamiento T-3 como nuevo método de subcultivo.

En resumen, aunque el tratamiento T-3 provoca algunos cambios a nivel bioquímico y en el crecimiento del material cultivado in vitro con respecto a condiciones de menor iluminación, no se aprecian mermas ni en la cantidad ni en la calidad de la producción de flores para ninguna de las variedades estudiadas. La posibilidad de reducir el espacio entre baldas dentro de las cámaras de cultivo, permitiría un mejor aprovechamiento de éstas y, por lo tanto, una previsible disminución de los costes de producción.

□ **Ensayo de almacenamiento a baja temperatura**

Para la variedad con flores de color violeta SN8946, el crecimiento se ve reducido en el tratamiento 1. También se observa para ese tratamiento una menor producción. Además, como en los tratamientos T-2 y T-3 los resultados son similares y acorde a los exigidos en producción comercial se podría pasar a realizar los subcultivos a una temperatura de 12 °C.

Para la variedad SN9013, el crecimiento y tasa de multiplicación son mayores en los tratamientos de 12 °C (T-2) y 22 °C (T-3), siendo aceptables los resultados obtenidos con el tratamiento a 4 °C (T-1). Como no se aprecian diferencias entre tratamientos respecto a los parámetros de calidad, se considera que esta variedad se podría subcultivar a 4 °C o a 12 °C.

En la variedad SN9000, con flores de color amarillo, no se ven diferencias en cuanto al crecimiento y a la tasa de multiplicación entre tratamientos. Sin embargo, la producción para el tratamiento T-1 es menor. Por este motivo, y debido a que los parámetros de calidad para los otros tratamientos se mantienen de acuerdo a lo exigido, esta variedad se puede pasar a subcultivar a 12 °C.

En la variedad SN9001 se aprecia un crecimiento parecido a 12 °C y 22 °C, que es superior al obtenido a 4 °C, siendo las tasa de multiplicación similar en todos los tratamientos. Sin embargo, la producción para los tratamientos T-1 y T-2 está por debajo de lo exigido comercialmente. En consecuencia, se

considera conveniente continuar con el subcultivo de esta variedad a una temperatura de 22 °C.

En general, las alteraciones producidas a nivel bioquímico y en el crecimiento *in vitro* por la incubación a bajas temperaturas revierten cuando se vuelve a hacer crecer el material vegetal *in vitro* a 22 °C, lo que sugiere que la técnica de crecimiento lento aplicada puede ser adecuada para extender el periodo entre subcultivos y, por tanto, podría contribuir a una reducción de los costes de producción.

❑ **Ensayo de enraizamiento**

Para la variedad con flores de color violeta SN8946, los porcentajes de enraizamiento y aclimatación mejoran para los tratamientos T-2, T-3 y T-4 con respecto al control. Sin embargo, debido a la disminución en la longitud del tallo en los tratamientos T-2 y T-3, se considera más apropiado el tratamiento T-4, que usa un medio suplementado con ANA.

En la variedad SN9001 se aprecian buenos porcentajes de enraizamiento y aclimatación con independencia del tratamiento utilizado. Por otro lado, debido a que la longitud del tallo es mayor en el tratamiento con ANA, se considera utilizar este tratamiento para esta variedad.

En la variedad SN9000, con flores de color amarillo, mejora el porcentaje de plantas con raíces y aclimatadas tanto al aumentar la concentración de IBA como al usar ANA. Por otro lado, en medios con una concentración de IBA de 5 mg/L (tratamiento T-3) se aprecia una bajada en la producción. Por tanto, para esta variedad se considera que es conveniente utilizar el tratamiento T-4.

Para la variedad SN9001 los porcentajes de enraizamiento y los de aclimatación aumentan al aumentar las concentraciones de IBA aplicadas, bajando para el tratamiento T-4, con ANA. Sin embargo, el tratamiento T-4

muestra los mejores datos en cuanto a producción y calidad comercial, con lo que se considera interesante usar este tratamiento.

La utilización de ANA en el T-4 arrojó los valores más bajos en la mayoría de los parámetros bioquímicos determinados en el material vegetal cultivado *in vitro*. A pesar de esto, dicho tratamiento mostró, excepto en la variedad SN9001, una notable mejora en cuanto al porcentaje de enraizamiento, llegando a ser la aclimatación del 100% en todas variedades y el T-4. Por este motivo, se recomendaría usar el tratamiento T-4 en la fase de enraizamiento del sistema de producción *in vitro*.

❑ Ensayo de establecimiento del cultivo *in vitro* a partir de explantes foliares

Para las variedades SN8946, SN9013 y SN9001 el método de establecimiento del cultivo *in vitro* a partir de explantes foliares, con los fitorreguladores y dosis ensayadas, no es efectivo.

En cuanto a la variedad con flores de color amarillo SN9000, se observa que los tratamientos T-2 y T-3 son efectivos para la regeneración de plantas a partir de hojas jóvenes.

En SN9000 solo se observan diferencias en los parámetros de calidad, concretamente en la producción, que es más alta para el tratamiento T-3, por lo que este tratamiento se podría adoptar como un nuevo método de establecimiento y, una vez obtenidas la plántulas, seguir con el método de multiplicación que se usa actualmente.

CAPÍTULO 6: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam, P. (1990). Saltmarsh ecology. Cambridge University Press, New York.

Andrews, T.S. (1997). Factors affecting the germination of Giant Parramatta grass. Aust J Exp Agri 37, 439-446.

Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. Plant Physiol Bioch 72, 35-45.

Agati, G., Cerovic, Z. G., Pinelli, P., Tattini, M. (2011). Light-induced accumulation of orthodihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence excitation techniques. Environ Exp Bot 73, 3-9.

Agati, G., Matteini, P., Goti, A., Tattini, M. (2007). Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. New Phytologist 174, 77-89.

Aguilera, A., Carretero, J. L., Crespo, M. B., Figuerola, R., Mateo, G. (1994). Flora vascular rara, endémica o amenazada de la Comunidad Valenciana. Consellería de Medi Ambient. Generalitat Valenciana. Valencia.

Alarcón, J. J., Morales, M. A., Torrecillas, A., Sánchez-Blanco, M. J. (1999). Growth water relations and accumulation of organic solutes in the halophyte *Limonium latifolium* cv. Avignon and its interespecific hybrid *L. caspia* x *L. latifolium* cv. Beltaard during salt stress. Plant Physiol 154, 795-801.

Alvarenga, I. C. A., Pacheco, F. V., Vitorim, F., Silva, S. T., Bertolucci, S. K. V., Pinto, J. E. B. (2015). In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. Plant Cell Tiss Org 122, 299-308.

Aly, M. A. M., Rathinasabapathi, B., Kelley, K. (2002). Somatic embryogenesis in perennial statice *Limonium bellidifolium*, Plumbaginaceae. *Plant Cell Tiss Org* 68, 127-135.

Amo-Marco, J. B., Ibañez, M. R. (1998). Micropropagation of *Limonium caranillesii* Erben, a threatened statice, from inflorescence stems. *Plant Growth Regul* 24, 49-54.

Azcon-Bieto, J. (1983). Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiol* 73, 681-686.

Badr, A., Angers, P., Desjardins, Y. (2011). Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. *Plant Cell Tiss Org* 107, 13-24.

Bailey, L. H. (1978). *Hortus Third*. Macmillan, New York. USA.

Barz, W., Reinherd, E., Zenk, M.H. (1977). *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Benzie I.F., Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239, 70-76.

Bernier, G. (1992). Attempts to bridge the molecular genetics and physiology of inflorescence and flower morphogenesis are an exciting experience. *Flowering Newslett* 13, 34-40.

Bertazza, G., Baraldi, R., Predieri, S. (1995). Light effects on in vitro rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability. *Plant Cell Tiss Org* 41, 139-143.

Bhoywani, S., Razdan, M. (1996). *Plant tissue culture: Theory and practice*, a revised edition. Elsevier Science. Netherlands.

Bienkowska, E., Norwa, M. (1994). The environmental factors affecting growth and development of *Limonium sinuatum* in mother stock and culture. Abstracts VIIth Internacional Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Firenze, Italy.

Blackburn, G.A. (2007). Hyperspectral remote sensing of plant pigments. *J Exp Bot* 58, 855-867.

Blainski, A., Gionco, B., Oliveira, A.G., Andrade, G., Scarminio, I.S., Silva, D.B., Lopes, N.P., Mello, J.C.P. (2017). Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrug-resistant bacteria using a statistical mixture design. *J Ethnopharmacol* 198, 313-323.

Blakesley, D., Lenton, J. R. (1978). Cytokinin uptake and metabolism in relation to shoot multiplication *in vitro*. In Jackson et al. (eds) Pp. 87-99.

Bhojwani, S., Razdan, M. K. (1983). *Plant tissue cultura: Theory and Practice*. Elsevier.

Borman, C. H., Vogelmann, T. C. (1984). Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. *Physiol Plantarum* 61, 505-512.

Bramwell, D. (1990). The role of *in vitro* cultivation in the conservation of endangered species. In Hernández-Bermejo, J. E., Clemente, M. y Heywood, V. (Ed.) *Conservation Techniques in Botanic Gardens*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books 52, 3-15.

Briggs, B. A., McCulloch, S. M., Edick, L. A. (1988). Micropropagation of azalea using thidiazuron. *Acta Hort* 227, 330-333.

Brunetti, C., Guidi, L., Sebastiani, F., Tattini, M. (2015). Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. *Environ Exp Bot* 119, 54-62.

Burchi, G., Mercatelli, E., Maletta, M., Mercuri, A., Bianchini, C. Schiva, T. (2006). Results of a breeding activity on *Limonium* spp. *Acta Hort* 714, 43-50.

Butcher, S., Bicknell, R., Borst, N. (1986). Propagation of *Limonium peregrinum* The international plant propagators society combined proceedings of annual meetings. 36, 448-450.

Capellades, M., Lemeur, L., Debergh, P. (1991). Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured in vitro. *Plant Cell Tiss Org.* 25, 21-26.

Charlebois, D., Richter, C. (2004). Multiplication *in vitro* de *Syringa vulgaris* “Katherine Havemeyer” et “Charles Joly”. *Can J Plant Sci* 84, 279-289.

Cline, M. G. (1994). The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiol Plantarum* 92, 601-607.

Compton, M.E., Veilleux, R.E. (1991). Shoot, root and flower morphogenesis of tomato inflorescence explants. *Plant Cell Tiss Org* 24, 223-231.

Corot, A., Roman, H., Douillet, O., Autret, H., Perez-Garcia, M.D., Citerne, S., Bertheloot, J., Sakr, S., Leduc, N., Demotes-Mainard, S. (2017). Cytokinins and abscisic acid act antagonistically in the regulation of the bud outgrowth pattern by light Intensity. *Front Plant Sci* 8, 1724.

Cui, H., Gu, X., Shi, L. (2009). *In vitro* proliferation from axillary buds and *ex vitro* protocol for effective propagation of *Syringa x hyacinthiflora* “Luo Lan Zi”. *Sci Hort* 121, 186-191.

D'Amato, F. (1975). The problem of genetic stability in plant tissue and cell cultures. In Frankel O. H. & Hawkes J. G. (eds) *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow* (Pp 338-348). Cambridge University Press, Cambridge.

D'Amato, F. (1977). *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Springer-Verlag. Pp 343-357.

daCosta, C.T., deAlmeida, M.R., Ruedell, C.M., Schwambach, J., Maraschin, F.S., Fett-Neto, A.G. (2013). When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Front Plant Sci* 4, 133.

Davies, P. J. (ed) (1995). *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd. ED., Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands.
de Klerk, G. J. (2009). Handouts given by breeding. Geert-Jan de Klerk, September 2009.

De Klerk, G. J., Van der Krieken, W., De Jong, J. C. (1999). The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In VitroCell Dev Biol Plant* 35, 189-199.

Debergh, P. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium, *Physiol Plant* 59: 270–276.

Debergh, P., Aitken-Christie, J., Cohen, D., Grout, B., Arnold S., Zimmerman, R., Ziv, M. (1992). Reconsideration of the term “vitrification” as used in micropropagation. *Plant Cell Tiss Org* 30, 135-140.

Debi, B. R., Taketa, S., Ichii, M. (2005). Cytokinin inhibits lateral root initiation but stimulates lateral root elongation in rice (*Oryza sativa*). *J Plant Physiol* 162, 507-515.

Desjardines, Y., Dubuc, J. F., Badr, A. (2009). *In vitro* culture of plants: a stressful activity! Acta Hort 812, 29-50.

Desjardins, Y., Hdider, C., Riek, J. (1995). Carbon nutrient in vitro regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagation system. In: Aitken-christie, J., Kozai, T., Smith, M. A. L. (Eds.), Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp.441-465.

Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Agati, G., Tattini, M. (2014). Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. Environ Exp Bot 103, 107-116.

Dunstan, D. I., Short, K. C. (1979). Shoot production from the flower head of *Allium cepa* L. Sci Hort- Amsterdam 10, 345-346.

Economou, A.S. and Read, P. E. (1987). Light treatments to improve efficiency of in vitro propagation systems. Hortscience 22, 751-753.

Einset, J. W., Alexander, J. H. (III) (1985). Multiplication of *Syringa vulgaris* species and cultivars in tissue culture. Comb Proc Int Plant Prop Soc 34, 628-636.

Erben, M. (1993). *Limonium* Miller. In: Castroviejo S et al (Eds). *Flora ibérica*. 4. Real Jardín Botánico, CISC. Madrid.

Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W., Walker, R.B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. J Agric Food Chem 58, 8139-8144.

Fasolo, F., Zimmerman, R. H., Fordham, I. (1989). Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars. *Plant Cell Tiss Org* 16, 75-87.

Fay, M. F. (1992). Karyotype differentiation and its consequences in Mediterranean *Limonium*. *Webbia* 34, 409-417.

Fay, M. F. (1993). Micropropagation of plants from the Canary Islands. *Bol Mus Mun Funchal* 2, 85-88.

Fay, M. F. (1994). In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiv Conserv* 3, 176-183.

Fellman, C.D., Read, P. E., Hosier, M. A. (1987). Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and proliferation. *Hortscience* 22, 1197-1200.

Fink, C. V. M., Sticklen, M. B., Linerberger, R. D., Dormir, S. C. (1986). *In vitro* organogenesis from shoot tips, internode and leaf explants *Ulmus* "Pioneer". *Plan Cell Tiss Org* 7, 237-245.

Folly, P., Engel, N. (1999). Chlorophyll *b* to chlorophyll *a* conversion precedes chlorophyll degradation in *Hordeum vulgare* L. *J Biol Chem* 274, 21811-21816.

Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A. Kim, S. Ch., Crawford, D. J. (2000). Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *Am J Bot* 87, 909-919.

Fritschi, F.B., Ray, J. D. (2007). Soybean leaf nitrogen, chlorophyll content, and chlorophyll *a/b* ratio. *Photosynthetica* 45, 92-98.

Fujita, M. (1993). Breeding and Cultivation: Statice (*Limonium*). Seibunndo-Shinkosha CO. Ltd., Tokyo. Pp. 136-15. (in Japanese).

Gabryszewska, E. (1989). A preliminary study on in vitro propagation *Syringa vulgaris* L. Acta Hortic 251, 205-208.

Gabryszewska, E. (2011). Effect of various levels of sucrose, nitrogen salts and temperature on the growth and development of *Syringa vulgaris* L. shoots in vitro. J. Fruit Ornam Plant Res 19, 133-148.

Gabryszewska, E., Kaminska, M., Korbin, M., Rudzinska-Langward, A. (2000). Micropropagation of phytoplasma-affected *Limonium sinuatum* mill. Plants. Acta Soc Bot Pol 69, 109-113.

Gabryszewska, E., Warabieda, D. (1992). Ukorzeniate microsadzzonek lilaka zwyczajnego (*Syringa vulgaris* L.) cv. Madame Florent Stepman *in vitro* i *in vivo*. Pr Inst. Sad I Kwiac Seria B 17, 189-202.

García, E., Menéndez, A. (1987). Embriogénesis somática a partir de explantes de cafeto. En: <http://www.café-cacao.es>.

Gaspar, T. (1995). The concept of cancer *in vitro* plant cultures and the implication to hormones and hyperhydricity. Plant Tissue Culture and Biotechnology 1, 126-136.

Gebhard, M. (1983). Mitteilungen Klosterneuburg 33, 24-30.

George, E. F. (1996). Plant Propagation by Tissue Culture. Part 2 in Practice, second ed. Butler & Tanner Ltd., Frome, Smerset. Pp. 744-745.

George, E., Hall, M., de Klerk G. (Ed). (2008). Plant Propagation by Tissue Culture (3rd edition) Dordrecht: Springer.

George, I., Eapen, S. (1990). High frequency plant-regeneration through direct shoot development and somatic embryogenesis from immature inflorescence cultures of finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn). Euphytica 48, 269-274.

González-Benito, M. E., Martín, C. (2011). In vitro preservation of Spanish Biodiversity. *In Vitro Cell Dev B* 47, 46-54.

Guimaraes, T., Fonts, G., Rezende, P. C., Pereira, P. R. (1999). Relations among chlorophyll contents determined by a portable meter and nitrogen forms in leaves of tomatoes cultivated in two soil types. *Bragantia* 58, 209-216.

Haberlandt, G. (1902) Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsberichte Math. Naturw Kl Kais Akad Wiss Wien* 111, 69-92.

Hansen, C. E., Meins, F. Jr., Milani, A. (1985). Clonal and physiological variation in the cytokinin content of tobacco cell lines differing in cytokinin requirement and capacity for neoplastic growth. *Differentiation* 29, 1-6.

Harada, D. (1992). How to grow Limonium. *FloraCulture International*, Nov-Dec 1992. Pp 22-25.

Harazy, A., Leshem, B., Cohen, A., Rabinowitch, H. D. (1985). In vitro propagation of statice as an aid to breeding. *Hortscience* 20, 361-362.

Havaux, M., Kloppstech K (2001) The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. *Planta* 213, 953-966.

Hdider, C., Desjardins, Y. (1994). Effect of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of in *vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell Tiss Org* 36, 27-33.

Hempel, M. (1985). The influence of micropropagation on progeny plants. *Acta Hort* 167, 263-272.

Heywood, V. H. (1978). Flowering plants of the world. Oxford Univ. Press. London.

Hildebrandt, V., Harney, P. M. (1983). *In vitro* propagation of *Syringa vulgaris* "Vesper". Hortisci 18, 432-434.

Hurtado, D., Merino, M. (1987). Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México, D.F. 232 p.

Ibañez, M.R. (2013). Propagación *in vitro* y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perxeplum* L. Sáez y Roselló. Departamento de Biología Vegetal. Universitat de València.

Igawa, T. Hoshino, Y., Mii, M. (2002). Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental statice, *Limonium sinuatum* Mill. In Vitro Cell Dev-PI 38, 157-162.

Ingels, J. E. (2001). Ornamental Horticulture: Science, Operations & Management. New York: Thomson Delmar Learning.

Iriondo J. M., Pérez, C. (1990). Application of *in vitro* culture techniques to the conservation of Iberian endemic endangered plant species. Botanic Gardens Micropropagation News 1, 4-6.

Jacobson, G., Auzenbaha, D., Megre, D. (2006). Influence of ABA on storage possibilities *in vitro* of lilacs. Acta Hort 725, 217-220.

Jeong, J. H., Murthy, H. N., Paek, K. Y. (2001). High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of statice. Plant Cell Tiss Org 65, 123-128.

Jo, E. A., Tewari, R. K., Hahn, E. J., Paek, K. Y. (2008). Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazonica*. Plant Biotechnol Rep 2, 207-212.

Jones, P. G., Lloyd, J. C., Raines, C. A. (1996). Glucose feeding of intact wheat plants represses the expression of a number of Calvin cycle genes. *Plant Cell Environ* 19, 231-236.

Kaninski, A. I., Inanova, I., Bistrichanov, S., Zapryanova, N., Atanassova, B., Iakimova, E. T. (2012). *Ex situ* conservation of endangered *Limonium* species in the bulgarian flora. *J Fruit Ornament Plant Res* 20, 115-129.

Katalinić V., Milos M., Modun D., Musić I., Boban M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem* 86, 593-600.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* 94, 550-557.

Khan, M. A., Gul, B., Weber, D. J. (2001). Effect of salinity and temperature on the germination of *Kochia scoparia*. *Wetlands Ecol and Manage* 9, 483-489.

Kilb, B., Wietoska, H., Godde, D. (1997). Changes in the expression of photosynthetic genes precede loss of photosynthetic activities and chlorophyll when glucose is supplied to mature spinach leaves. *Plant Sci* 115, 225-235.

Kim, D., Jeong, S.W., Lee, C.Y. (2003a). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81, 321-326.

Kim, S.W., Oh S. C., In D. S., Liu, J. R. (2003b). Plant regeneration of rose (*Rosa hybrid*) from embryogenic cell-derived protoplasts. *Plant Cell Tiss Org* 73, 15-19.

Kitajima, K., Hogan, K. P. (2003). Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant Cell Environ.* 26, 857-865.

Korul'kina, L.M., Schults, E.E., Zhusupova, G.E., Abilov, Z.A., Erzhanov, K.B., Chaudri, M.I. (2004). Biologically active compounds from *Limonium gmelinii* and *L. popovii*. *Chem Nat Compd* 40, 465-471.

Kozai, T. (1990). Environmental control and automation in micropropagation. In: Karube, I. (Ed). *Automation in Biotechnology*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. Pp. 279-304.

Kozai, T. (1991). Micropropagation under photoautotrophic conditions,. In: Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H. (eds.). *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 447-469

Kozai, T., Zobayed, S. M. A. (2000). Acclimatization. In: Spier, R. (Ed). *Encyclopedia of Cell Technology*. Jhon Wiley & Sons, New York. Pp. 1-12.

Kubitzki, K. (1993). Plumbaginaceae. In: Kubitzki K, Rehwer, J. G., & Bittrich, V (Ed.) *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer-Verlag. Berlin. Pp 523-530.

Kubota, C., Kozai, T. (1995). Low-temperature storage of transplants at the light compensation point: Air temperature and light intensity for growth suppression and quality preservation. *Sci Hortic-Amsterdam* 61,193-204.

Kubota, C., Rajapakse, N. C., Young, R. E. (1996). Low-temperature storage of micropropagated seedlings under selected light environments. *Hortscience* 31, 449-452.

Kunitake, H., Mii, M. (1990). Plant regeneration from cell culture-derived protoplasts of statice (*Limonium perezii* HUBBARD). *Plant Sci* 70, 115-119.

Kunneman-Kooij (1984). *Inventarisatie van de toepassingsmogelijkheden van weefselkweek voor de vegetatieve vermeerdering van houtige boomkwekerijgewassen*. Literature study, Department of Horticulture, Agricultural Univ. Wageningen, Países Bajos. Pp. 1-64.

Laimer, M., Rucker, W. (Ed.) (2003). *Plant Tissue Culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt*. New York: Springer. USA.

Lange, N., Heins, R., Carlson, W. (1991). Store plugs at low temperatures. In: *Greenhouse Grower* Jan. Pp. 22-28

Leblay, C., Chevreau, E., Raboin, L. M. (1991). Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several Pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Tiss Org* 25, 99-105.

Lee, M., Phillips, R. L. (1998). The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann Rev Plant Physiol Plan Mol Biol* 39, 413-437.

Lee, S. H., Tewari, R. K., Hahn, E. J., Paek, K. Y. (2007). Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Whitania somnifera* (L.) dunal plantlets. *Plant Cell Tiss Org* 90, 141-151.

Lee, S. K., Rao, A. N. (1986). *In vitro* regeneration of plantlets in *Fagraea fragrans* Roxb. *Plant Cell Tiss Org* 7, 43-51.

Lees, R. P. (1994). Effects of the light environment on photosynthesis and growth *in vitro*. In: Lumsden, P. J., Nicholas, J. R., Davies, W. J. (Ed.), *Physiology, Growth and Development of Plant in Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 31-46.

Lian, M. L., Murthy, H. N., Paek, K. Y. (2002). Culture method and photosynthetic photon flux affect photosynthesis, growth and survival of *Limonium* 'Misty Blue' *in vitro*. *Sci Hortic-Amsterdam* 95, 239-249.

Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11, 591-592.

Lledó M. D., Amo-Marco, J. B. (1993). Efecto de tres citoquininas sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de dos especies de *Limonium* (*Plumbaginaceae*) endémicas de la Comunidad Valenciana. X Reunión Nacional de la SEFV. Pamplona, Spain. Pp 202.

Lledó M. D., Crespo, M. B., Amo-Marco, J. B. (1993). Preliminary remarks on micropropagation of threatened *Limonium* species (*Plumbaginaceae*). *Botanic Gardens Micropropagation News* 1, 72-74.

Lledó M. D., Crespo, M. B., Amo-Marco, J. B. (1994). Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of three threatened species of *Limonium* (*Plumbaginaceae*) from the Valencian Community (Spain). VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Firenze, Italy. S2-68

Lledó, M. D., Crespo, M. B., Amo-Marco, J. B. (1995). *Ex situ* conservation of threatened *Limonium* species (*Plumbaginaceae*) by using *in vitro* culture. Congreso Planta-Europa. Hyères. Francia.

Lledó M. D., Crespo, M. B., Amo-Marco, J. B. (1996). Micropropagation of *Limonium thiniense* Erben (*Plumbaginaceae*) using herbarium material. *Botanic Gardens Micropropagation News* 2, 18-21.

Lledó, M. D. (1996). Sistemática molecular de la familia *Plumbaginaceae*. Conservación de especies endémicas de *Limonium* en la Comunidad Valenciana. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.

Lledó, M.D, Crespo, M. B., Fay, M. F., Chase, M. W. (2001). Phylogenetic position and taxonomic status of the genus *Aegialitis* and subfamilies *Staticoideae* and *Plumbaginoideae* (*Plumbaginaceae*): evidence from plastid DNA sequences and morphology. *Plant Syst Evol* 229, 107-124.

López, C., Perán, R. (2000). Embriogénesis Somática. En: <http://www.ciencias.upma.es/>

López-Orenes, A., Ros-Marín, A. F., Ferrer, M. A., Calderón, A. A. (2013). Antioxidant capacity as a marker for assessing the *in vitro* performance of the endangered *Cistus heterophyllus*. Sci World J doi:10.1155/2013/176295.

Margara, J. (1988). Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Ed. Mundi-Prensa.

Martín, C., Pérez, C. (1992). Multiplication *in vitro* of *Limonium estevei* Fdez. Casas. Ann Bot 70, 165-167.

Martín, C., Pérez, C. (1995). Micropropagation of five endemic species of *Limonium* from the Iberian Peninsula. J Hort Sci 70, 97-103.

Masvidal, L. y Ruiz, J., 1992. Selección de nuevos *Limonium*: selección de especies silvestres de *Limonium* con posibilidades de cultivo ornamental. Horticultura 82: 13-22.

Mellesse, B., Kassa, N., Mohammed, A. (2013). Yield and quality of statice [*Limonium sinuatum* (L.) Mill.] as affected by cultivars and planting densities. Afr J Plant Sci 7, 528-537.

Mercuri, A., Antonetti, M., Burchi, G., Bianchini, C., Pasqualetto, P. L., Schiva, T. (1999). Manipolazione *in vitro* di *Limonium*. Colture Protette 1, 89-93.

Mercuri, A., Anfosso, L., Burchi, G., Bruna, S., De Benedetti, L., Schiva, T. (2003). *RoI* genes and new genotypes of *Limonium gmelinii* through Agrobacterium-mediated transformation. Acta Hort 624, 455-462.

Miyamoto, Y. (1993). Breeding and cultivation of *Limonium* species. Seibundosinkousha. Pp. 87-92.

Morgan, E. R., Bruge, G. K., Seelye, J. F., Hopping, M. E., Grant, J. E. (1998). Production of inter-specific hybrids between *Limonium perezii* (Stapf) Hubb. and *Limonium sinuatum* (L.) Mill. Euphytica 102, 109-115.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15, 473-497.

Nair, S., Gupta, P. K., Shirgurkar, M. V., Mascarenhas, A. F. (1984). *In vitro* organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* Linn. Plant Cell Rep 4, 29-40.

Nameth, B., Dinka S. J., Chatfield, S. P., Morris, A., English, J., Lewis, D., Oro, R., Raizada, M. N. (2013). The shoot regeneration capacity of excised *Arabidopsis* cotyledons is established during the initial hours after injury and is modulated by a complex genetic network of light signalling. Plant Cell Environ 36, 68-86.

Nashar, L. (1989). Micropropagation. Australian J Biotech 3, 288-289.

Navarro, W; Perea, M. (1996). Técnica *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. 2 ed. Heredia, CR. Editorial de la Universidad Nacional.

Negrutiu, I., Jacobs, M., Cachita, D. (1978). Some factors controlling *in vitro* morphogenesis of *Arabidopsis thaliana*. Z Pflanzenphysiol 86, 113-124.

Nestorowicz, S., Kulpa, D. Moder, K., Kurek, J. (2006). Micropropagation of and old specimen of common lilac (*Syringa vulgaris* L.) from the dendrological garden at Przelewiec. Acta Sci Pol Hortoru 5, 27-35.

Nishizawa, T., Shishido, Y., Kudo, M., Kumakura, H., Hamamoto, H. (1997). Petiole length, chlorophyll and carbohydrate levels, and photosynthetic rates of June-bearing strawberry plants as influenced by red-light irradiation during storage under cool conditions. Sci Hortic-Amsterdam 72, 25-33.

Oka, S., Ohshima, K. (1981). *In vitro* initiation of adventitious bud and its modification by high concentrations of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*). Can J Bot 59, 68-74.

Okhi, S. (1994). Scanning electron microscopy of shoot differentiation *in vitro* from leaf explants of the African violet. Plant Cell Tiss Org 6, 157-162.

Ongaro, V., Leyser, O. (2008). Hormonal control of shoot branching. J Esp Bot 59, 67-47.

Oprea, M., Duta, M. (2008). The behaviour of *Syringa vulgaris* in the process of *in vitro* culture. Bull Univ Agric Sci 65, 491.

Ovideo, Y., Guevara, E. (1988). Propagación *in vitro* de la estatícia (*Limonium sinuatum* cv Midnight blue). Agron Costarric 12, 113-122.

Pacheco, R. (2001). Evaluación del efecto de la luz sobre la propagación masiva de *Sinningia speciosa* vía organogénesis. Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

Paek, K.Y., Ma, S. H. (1996). *In vitro* propagation of hosta using cultured shoot tips and somaclonal variability of regenerants. Acta Hort 440, 576-581.

Palacios, C., Roselló, J. A., González-Candelas, F. (2000). Study of the evolutionary relationship among *Limonium* species (*Plumbaginaceae*) using nuclear and cytoplasmic molecular markers. Mol Phylogenet Evol 14, 234-249.

Palop, M., Palacios, C., González-Candelas, F. (2000). Development and across species transferability of microsatellite markers in the genus *Limonium* (*Plumbaginaceae*). Conservation Genet 1, 177-179.

Pedroza, J., Corchuelo, G., Angarita, A. (1997). Análisis de crecimiento de *Limonium sinuatum* Mill cv. Midnight Blue propagada sexual y asexualmente a partir de yemas vegetativas y florales. *Agron Colomb* 14, 1-12,

Peer, W. A., Murphy, A. S. (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci* 12, 556-563.

Pierik, R. (1975). *Plantenteelt in Kweekbuizen*. Thieme, Zutphen, Países Bajos, 1-164.

Pierik, R. L. M., Steegmans, H. H. M., Verhaegh, J. A. M., Wouters, A. N. (1982). Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation of *Gerbera jamesonii* in vitro. *Neth J Agri Sci* 30, 341-346.

Popowich, E. A., Filipenya, V. L. (2000). Features on micropropagation of *Syringa vulgaris* L. *Sodiningystè Ir Darziningystè* 19, 434-440.

Razdan, M. K. (2003). *Introduction to Plant Tissue Culture*. Northampton: Science Publishers.

Refouvelet, E., Daguin, F. (2000). Effect of different media and of a CO₂ enriched atmosphere on growth of lilac (*Syringa vulgaris* L.) vitroplants. *Acta Hortic* 530, 567-572.

Refouvelet, E., Le Nours, S., Tallon, C., Daguin, F. (1998). A new method for *in vitro* propagation of lilac (*Syringa vulgaris* L): regrowth and storage conditions buds encapsulated in alginate beads, development of a preacclimatization stage. *Sci Hortic-Amsterdam* 74, 233-241.

Reynoird, J., Chriqui, D., Noin, M., Brown, S., Marie, D. (1993). Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several *Gerbera* species. *Plant Cell Tiss Org* 33, 203-210.

- Rizzotto, M. (1999). Research on the genus *Limonium* (*Plumbaginaceae*) in the Tuscan archipelago (Italy). *Webbia* 53, 241-282.
- Robacker, C., Corley, W. (1992). Plant Regeneration of Pampas Grass from Immature Inflorescences Cultured in Vitro. *Hortscience*. 7, 841-843.
- Rodrigues, M.J., Soszynska, A., Martins, A., Rauter, A.P., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Varela, J., Barreira, L., Custódio, L. (2015). Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Ind Crops Prod* 77, 315-322.
- Rodríguez, S., Palop, M. L., Palacios, C. González-Candelas, F. (2003). Molecular and morphological differentiation in *Limonium dufourii* (*Plumbaginaceae*), an endangered Mediterranean plant. *Conserv Gen* 4, 383-391.
- Ross, S. A., El-Sayyad, S. M. (1980). Flavonoids from the leaves of *Limonium sinuatum* grown in Egypt. *Planta Med* 39, 187-189.
- Ruban, A.V., Johnson, M.P., Duffy, C.D.P. (2012). The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim Biophys Acta* 1817, 167-181.
- Ruffoni, B., Fabbri, G., Semeria, C., Guda D., Volpi, L. (2000). Shoot differentiation from somatic tissues of ornamental *Limonium* species. *Acta Hort* 541, 289-294.
- Ruíz, O. (1990). Propagación vegetativa *in vitro* del estátice (*Limonium sinuatum* Mill). Tesis de grado para optar al título de Biólogo. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá. D. C.

Sakakibara, H., Takei, K., Hirose, N. (2006). Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends Plants Sci* 11, 440-448.

Salinger, J. (1991). Státice. In: Producción comercial de flores. J. Salinger, ed. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pp 272-273

Sánchez-Sánchez, J., López-Orenes, A., Ferrer, M.A., Calderón, A.A. (2018). Subtle changes in light intensity affect *in vitro* responses but not *ex vitro* performance of *Limonium sinuatum*. *3 Biotech* 8:335.

Sato, K. (1989). Statice. In: Matsuo T (ed) Collected Data of Plan Genetic Resources. Kodansha, Tokio Pp 1040-1041.

Saunders, J. A., McClure, J. W. (1976). The distribution of flavonoids in chloroplasts of twenty five species of vascular plants. *Phytochemistry* 15, 809-810.

Savona, M., Macarello, C., Mantovani, E., Minuto, L., Casazza, G., Ruffoni, B. (2009). Introduction of micropropagated plants of *Limonium cordatum* (L.) Mill., a Mediterranean Endemic. *Acta Hort* 812, 527-531.

Scholten, H. J. (1998). Effect of polyamines on the growth and development of some horticultural crops in micropropagation. *Sci Hortic-Amsterdam* 77, 83-88.

Seelye, J. F., Butcher, S. M. (1991). In vitro response of Actinidia leaf and callus tissue to thidiazuron. *New Zeal J Crop Hort* 19, 447-450.

Seelye, J. F., Maddocks, D. J., Burge, D.K., Morgan, E. R. (1994). Shoot regeneration from leaf disc of *Limonium peregrinum* using thidiazuron. *New Zeal J Crop Hort* 22, 23-29.

Sergeeva, L.I., Machackova, I., Konstantinova, T. N., Golyanovskaya, S. A. Eder, J., Zaltsman, O. O., Hanus, J., Aksenova, N. P. (1994). Morphogenesis of potato plants *in vitro*. II. Endogenous levels, distribution, and metabolism of IAA and cytokinins. *J Plant Growth Regul* 13, 147-152.

Serret, D., Trillas, M.I., Matas, J. Araus, J.L. (1997). The effect of different closure types, light, and sucrose concentrations on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. *Plant Cell Tiss Org* 47, 217-230.

Shang, W., Wang, Z., Hea, S., Hea, D., Liu, Y., Fu, Z. (2017). Research on the relationship between phenolic acids and rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) plantlets *in vitro*. *Sci Hortic-Amsterdam* 224, 53-60.

Shi, S. B., Shi, R., Li, M. (2015). Changes in photosynthesis of alpine plant *Saussurea superba* during leaf expansion. *Acta Physiol Plant* 37, 235.

Shimasaki, K., Uemoto, S. (1991). Rhizome induction and plantlet regeneration of *Cymbidium goeringii* from flower bud cultures *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org* 25, 49-52.

Singh, N. K., Sehgal, C.B. (1999). Micropropagation of "Holy Basil" (*Ocimum sanctum* Linn.) from young inflorescences of mature plants. *Plant Growth Regul* 29, 161-166.

Skoog, F., Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol.* 11, 118-131.

Skrzypczak, E. (1992). Mikrorozmnazanie wybranych odmian lilakow (*Syringa vulgaris* L.) *Arboretum Kórnickie* 37, 21-41.

Slater, A., Scott, N. W., Flowers, M. R. (2003). Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants. *J Arid Environments* 54, 133-147.

Sprinchanu, E., Butenko, R. (1992). Effect of light spectral composition on growth and development of *Artemisia balchanorum* cuttings in vitro . *Sov Plant Physiol (USA)* 38, 561-568.

Srivatsava, P. S., Stienhauer, A., Glock, H. (1985). Plantlet differentiation in leaf and root culture of birch (*Betula pendula* Roth.). *Plant Sci* 42, 209-214.

Stafford, A. Warren, G. (1991). Plant cell and tissue culture. (eds.) Plant Science Limited, Firth Court, Western Bank, Sheffield S10 2TN (United Kingdom).

Takayama, S. Arima, Y., Akita, M. (1986). Mass propagation of plants by fermenter culture techniques. D.A. Somers, B. G. Gengenbach, D. D. Biesboer, W. P. Hackett, C. E. Green (eds.), Book of abstracts: VI Int Cong Plant Tiss Cell Cult. Univ. Minnesota. Pp. 449.

Ter Braak, C.J., Smilauer, P. (1999). Canoco for Windows v. 4.02. Center for Biometry Wageningen CPRO-DLO, Wageningen.

Topoonyanont, N. Dillen, W. (1988). Capitulum explant as a start for micropropagation of *Gerbera*: culture technique and applicability. *Med Fac Landbouww. Rijks. Univ. Gent* 53. 169-173.

Topoonyanont, N., Ampawan, R., Debergh, P. D. (2000). Reversion of *Limonium* hybrid "Mysty Blue" inflorescence development and its applicability in micropropagación. *Sci Hortic-Amsterdam* 83, 283-299.

Ungar, I.A. (1995). Seed germination and seed-bank ecology in halophytes. *In* Seed development and germination. *Edited by* J. Kigel and G. Galili. Marcel Dekker, New York. Pp. 529-544.

Van Assche (1983). Technische en economische aspecten van de weefselteelt bij planten. Eindwerk, Kath. Univ. Leuven, Bélgica. Pp. 1-134.

Van Huylenbroeck, J. M., Debergh, P. C. (1996). Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. *Plant Tiss Cult Biotechnol* 2, 136-141.

Verlinden, S., McDonald, L. (2007). Productivity and quality of statice (*Limonium sinuatum* cv. Soiree Mix) and cockscomb (*Celosia argentea* cv. Chief Mix) under organic and inorganic fertilization regiments. *Sci Hortic- Amsterdam* 114, 199-206.

Waldenmaier, S., Bünemann, G. (1991). *Ex vitro* effects in micropropagation of *Syringa*. *Acta Hortic* 300, 201-209.

Wei-lun, C., Dong-hong, G., Shan-ying, Y., Cheg, T. (1980). Organogenesis of leaf explants of *Populus davidia* x *P. bolleana* Louene hybrid and effect of growth regulators on organogenesis. *Acta Bot Sin* 22, 313-315.

Wetzstein, H., Kim, C., Sommer, H. (1994). Vessel volume, gelling agent and basal salts affect pH and gel strength of autoclaved tissue culture media. *Hortscience* 29, 683-685.

Wicki, P. (1992). Mikrovermehrter meerlavendel. *Deutshcher gartenbau (Germany)* 46, 730-733.

Wilfret, G., Raulston, J. (1975). Acceleration of flowering of statice (*Limonium sinuatum*) by gibberellic acid (GA₃). *Hortscience* 10, 37-38.

Wilson, S.B., Iwabuchi, K., Rajapakse, N. C., Young. N. E. (1998a). Responses of broccoli seedlings to light quality during low temperature storage in vitro. I. Morphology and survival. *Hortscience* 33, 1253-1257.

Wilson, S.B., Iwabuchi, K., Rajapakse, N. C., Young. N. E. (1998b). Responses of broccoli seedlings to light quality during low temperature storage in vitro. II. Sugar content and photosynthetic efficiency. *Hortscience* 33, 1258-1261.

Wilson, S.B., Rajapakse, N. C., Young, N. E. (2000). Use of low temperature to improve storage of in vitro broccoli seedlings under various light qualities. *J Veg Crop Prod* 6, 51-67.

Witomska, M. (1995). Effect of cytokinin concentration on multiplication in vitro of shoots from *Limonium sinuatum* cv. Cream. *Ann Warsaw Agri Univ SCCW* 17, 17-23.

Wochok, Z. S. (1981). The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. *Biol Conserv* 20, 83-89.

Xiao, Y., Kozai, T. (2006). In vitro multiplication of statice plantlets using sugar-free media. *Sci Hortic-Amsterdam* 109, 71-77.

Xu, D.P., Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Li, S., Li, H. B. (2017). Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chem* 217, 552-559.

Zhao Hang, C. (2010). Optimization of *Limonium sinuatum* rooting by using multiplication media and pre-rooting media during tissue culture. 4th International Horticulture and Marketing, Hogeschool Larenstein, Wageningen University.

Zhong, Z., Smith, H. G., Thomas, T. H. (1993). Micropropagation of wild beet (*Beta maritima*) from inflorescence pieces. *Plant Growth Regul* 12, 53-57.

Zimmerman, R. (1984). Rooting apple cultivars *in vitro*: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. *Plant Cell Tiss Org Cul.* 3, 301-311.

Ziv, M. (1991). Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P. C., Zimmerman, R. H. (eds). *Micropropagation*. Springer, Dordrecht. Pp. 45-69.

Zubo, Y.O., Yamburenko, M.V., Selivankina, S.Y., Shakirova, F.M., Avalbaev, A.M., Kudryakova, N.V., Zubkova, N.K., Liere, K., Kulaeva, O.N., Kusnetsov, V.V., Börner, T. (2008). Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves. *Plant Physiol* 148, 1082-1093.

CAPÍTULO 7: ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

7. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

7.1. Índice de tablas

Tabla 1.1.	Características agronómicas de diversas especies de <i>Limonium</i> cultivadas en invernadero de plástico (Masvidal y Ruíz, 1992).	13
Tabla 1.2.	Ventajas e inconvenientes de la realización del plan de mejora en <i>Limonium spp.</i>	37
Tabla 1.3.	Estimación del posible mercado de <i>Limonium</i> realizada para el año 2010.	38
Tabla 3.1.	Características <i>in vitro</i> de las variedades seleccionadas de <i>Limonium sinuatum</i> .	45
Tabla 3.2.	Características comerciales de las variedades de <i>Limonium sinuatum</i> .	46
Tabla 3.2.1.	Iluminación recibida por el material vegetal en los distintos los tratamientos.	50
Tabla 3.2.2.	Datos técnicos de la lámpara OSRAM L36/865 LUMILUX.	50
Tabla 3.8.1.	Cantidad de abono aportado por cada 1000 litros de agua para <i>Limonium sinuatum</i> según estado fenológico.	65
Tabla 3.8.2.	Tratamiento fitosanitario mensual para <i>L. sinuatum</i> .	67
Tabla 3.9.1.	Parámetros estudiados durante la fase de cultivo y producción en invernadero.	68
Tabla 4.1.1.	Parámetros de producción <i>in vitro</i> de las variedades estudiadas en la fase de multiplicación sometidas a diferentes intensidades lumínicas.	74
Tabla 4.1.2.	Concentración de clorofilas a, b y totales durante la fase de multiplicación <i>in vitro</i> en el ensayo de iluminación.	82
Tabla 4.1.3.	Concentración de fenoles, flavonoides y almidón en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> en el ensayo de iluminación.	86
Tabla 4.2.1.	Parámetros de producción <i>in vitro</i> de las variedades	106

	estudiadas en la fase de multiplicación sometidas a diferentes temperaturas.	
Tabla 4.2.2.	Parámetros de producción <i>in vitro</i> de las variedades en la fase de multiplicación a 22 °C después de los tratamientos a bajas temperaturas.	117
Tabla 4.2.3.	Concentración de clorofilas a, b y totales durante la fase de multiplicación <i>in vitro</i> en el ensayo de bajas temperaturas.	120
Tabla 4.2.4.	Concentración de clorofilas a, b y totales durante la fase de multiplicación <i>in vitro</i> después de los tratamientos a bajas temperaturas.	121
Tabla 4.2.5.	Concentración de fenoles, flavonoides y almidón en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> en el ensayo de bajas temperaturas.	124
Tabla 4.2.6.	Concentración de fenoles, flavonoides y almidón en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> después de los tratamientos a bajas temperaturas.	126
Tabla 4.3.1.	Parámetros de enraizamiento <i>in vitro</i> de las distintas variedades estudiadas.	150
Tabla 4.3.2.	Concentración de clorofilas a, b y totales durante la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.	152
Tabla 4.3.3.	Concentración de fenoles, flavonoides y almidón durante la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.	154
Tabla 4.3.4.	Concentración de derivados de ácidos hidroxicinámicos (HCA), determinada a partir de los cromatogramas de HPLC obtenidos a 325 nm, en los vástagos de las variedades de <i>L. sinuatum</i> durante la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.	160
Tabla 4.4.1.	Parámetros de establecimiento <i>in vitro</i> de la variedad SN8946 a partir de explantes de hojas jóvenes.	172
Tabla 4.4.2.	Parámetros de establecimiento <i>in vitro</i> de la variedad	172

	SN9013 a partir de explantes de hojas jóvenes.	
Tabla 4.4.3.	Parámetros de establecimiento <i>in vitro</i> de la variedad SN9000 a partir de explantes de hojas jóvenes.	173
Tabla 4.4.4.	Parámetros de establecimiento <i>in vitro</i> de la variedad SN9001 a partir de explantes de hojas jóvenes.	175
Tabla 4.4.5.	Parámetros producción <i>in vitro</i> de la variedad SN9000 en la fase de multiplicación establecida a partir de explantes de hojas jóvenes.	180
Tabla 4.4.6.	Concentración de clorofilas a, b y totales durante la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de la variedad SN9000.	181
Tabla 4.4.7.	Contenidos en fenoles, flavonoides y almidón de SN9000 durante la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	182
Tabla A.1.	Optimización de la utilización de la cámara de cultivo.	245
Tabla B.1.	Ahorro en horas de mano de obra por el alargamiento del tiempo entre subcultivos en la fase de multiplicación.	246
Tabla B.2.	Ahorro del tiempo de elaboración de los medios de cultivo para la fase de multiplicación.	247
Tabla C.1.	Volumen de plantas enraizadas en función de los porcentajes de enraizamiento y aclimatación.	248
Tabla C.2.	Ahorro en horas de mano de obra debido a la mejora del porcentaje de plantas enraizadas.	248
Tabla C.3.	Ahorro del tiempo de elaboración de los medios de cultivo para la fase de enraizamiento.	249
Tabla D.1	Comparación entre métodos de establecimiento a partir de inflorescencia inmadura u hoja joven de ≈ 2 cm.	250
Tabla E.1.	Ahorro económico global anual del nuevo sistema de producción <i>in vitro</i> de <i>Limonium sinuatum</i> .	251

7.2 . Índice de figuras

Figura 1.1.	Empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümme Orange. (A) Panorámica aérea de la empresa. (B) Entrada a la Finca Nicole. (C) Invernaderos de recolección de esquejes. (D) Estación experimental.	7
Figura 1.2.	Departamento de I+D de Barberet & Blanc, S.A. by Dümme Orange. (A) Edificio I+D. (B) Operación en cabina de flujo. (C) Preparación de medios. (D) Realización del test de virus en clavel.	10
Figura 1.3.	Plantas en floración de <i>Limonium bonduelli</i> .	14
Figura 1.4.	Planta en floración de <i>Limonium fruticans</i> .	14
Figura 1.5.	Flores de <i>Limonium sinuatum</i> de la variedad Aqua Blue.	15
Figura 1.6.	Planta en floración de <i>Limonium insigne</i> .	15
Figura 1.7.	Planta en floración de <i>Limonium suworowii</i> .	16
Figura 1.8.	Planta en floración de <i>Limonium incanum</i> .	16
Figura 1.9.	Planta en floración de <i>Limonium latifolium</i> .	17
Figura 1.10.	Planta en floración de <i>Limonium caspium</i>	17
Figura 1.11.	Planta en floración de <i>Limonium perezii</i> .	18
Figura 1.12.	Planta en floración de <i>Limonium pectinatum</i> .	18
Figura 1.13.	Inflorescencia de <i>Limonium peregrinum</i> .	18
Figura 1.14.	Concentraciones relativas requeridas de auxinas y citoquininas para el crecimiento y la morfogénesis en cultivos de tejidos de plantas (George et al., 2008).	26
Figura 1.15.	Fases del cultivo in vitro de <i>Limonium sinuatum</i> . (A) Preacondicionamiento. (B) Establecimiento. (C) Multiplicación. (D) Enraizamiento. (E) Aclimatación. (F) Invernadero en producción.	33
Figura 1.16.	Mercado mundial de <i>Limonium sinuatum</i> 2015.	36
Figura 3.1.	Variedades estudiadas de <i>Limonium sinuatum</i> . (A) SN8946. (B) SN9013. (C) SN9000. (D) SN9001.	46
Figura 3.2.1.	Disposición de los tratamientos durante el ensayo de iluminación	49

Figura 3.2.2.	Luxómetro Eco LX1010B.	49
Figura 3.2.3.	Correlación entre la distancia de la planta al foco emisor de luz y el flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF).	49
Figura 3.2.4.	Distribución espectral de la radiación de las lámparas en las cámaras de cultivo <i>in vitro</i> ..	50
Figura 3.2.5.	Variación diurna de la temperatura en la cámara aérea de los tubos de cultivo en función de su distancia a la fuente de luz. Las distancias indicadas se establecen tomando como referencia la superficie superior de los tapones de los tubos.	51
Figura 3.2.6.	Medición del crecimiento de las plantas durante la fase de multiplicación.	52
Figura 3.8.1.	Sistema de climatización de invernaderos en la empresa Barberet & Blanc, S.A. by Dümmer Orange. (A) Sistema de enfriamiento evaporativo. (B) Ventilación cenital. (C) Malla de sombreo. (D) Calefactor.	66
Figura 3.9.1.	Medidas de los diferentes parámetros para estudiar la calidad comercial y agronómica de las plantas de <i>Limonium sinuatum</i> en invernadero. (A) Longitud de la espiga. (B) Grosor de la espiga. (C) Longitud de tallo (calidad comercial).	69
Figura 4.1.1.	Estado de las plantas al inicio del subcultivo en el tratamiento T-1. Las variedades de izquierda a derecha son SN8946, SN9013, SN9001 y SN9000.	77
Figura 4.1.2.	Estado de las plantas al inicio del subcultivo en el tratamiento T-2. Las variedades de izquierda a derecha son SN8946, SN9013, SN9001 y SN9000.	77
Figura 4.1.3.	Estado de las plantas al inicio del subcultivo en el tratamiento T-3. Las variedades de izquierda a derecha son SN8946, SN9013, SN9001 y SN9000.	78
Figura 4.1.4.	Estado de las plantas al final del subcultivo en el tratamiento T-1. Las variedades de izquierda a	79

	derecha son SN9000, SN9013, SN9001 y SN8946.	
Figura 4.1.5.	Estado de las plantas al final del subcultivo en el tratamiento T-2. Las variedades de izquierda a derecha son SN9001, SN9000, SN8946 y SN9013.	79
Figura 4.1.6.	Estado de las plantas al final del subcultivo en el tratamiento T-3. Las variedades de izquierda a derecha son SN9013, SN8946, SN9001 y SN9000.	80
Figura 4.1.7.	Cromatogramas obtenidos a 280 nm de los extractos metanólicos de vástagos procedentes de las cuatro variedades de <i>L. sinuatum</i> sometidas a diferentes condiciones de iluminación durante la fase de multiplicación <i>in vitro</i> . Los números en los cromatogramas muestran regiones/picos de los mismos que los caracterizan.	89
Figura 4.1.8.	Espectros UV de los picos seleccionados en los cromatogramas de la Figura 4.1.7.	90
Figura 4.1.9.	Capacidad antioxidante determinada como capacidad atrapadora del catión radical ABTS de las variedades de <i>L. sinuatum</i> estudiadas en el ensayo de iluminación, usando ácido gálico como estándar.	91
Figura 4.1.10.	Capacidad antioxidante determinada como capacidad atrapadora del catión radical ABTS de las variedades de <i>L. sinuatum</i> estudiadas en el ensayo de iluminación, usando trolox como estándar.	92
Figura 4.1.11.	Capacidad antioxidante de las variedades en el ensayo de iluminación mediante el ensayo FRAP y utilizando FeSO ₄ como referencia.	94
Figura 4.1.12.	Efecto de la iluminación durante la micropropagación sobre la producción de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo de producción exigido (8 tallos/planta).	95
Figura 4.1.13.	Efecto de la iluminación durante la micropropagación sobre la longitud del tallo (calidad de la producción) de	96

- las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica la longitud mínima para calidad extra (60 centímetros).
- Figura 4.1.14.** Efecto de la iluminación durante la micropropagación 97 sobre el número de espigas por tallo de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (6 espigas/tallo).
- Figura 4.1.15.** Efecto de la iluminación durante la micropropagación 97 sobre el número de ramificaciones por tallo de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (3-4 ramas/tallo).
- Figura 4.1.16.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de SN8946 expuestas a diferentes 99 tratamientos de iluminación en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 49,0 % de la variación y el segundo eje el 15,1 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).
- Figura 4.1.17.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de SN9013 expuestas a diferentes 100 tratamientos de iluminación en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 28,4 % de la variación y el segundo eje el 26,1 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).
- Figura 4.1.18.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de SN9000 expuestas a diferentes 101 tratamientos de iluminación en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 30,9 % de la variación y el segundo eje el 20,8 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).
- Figura 4.1.19.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de SN9001 expuestas a diferentes 102 tratamientos de iluminación en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 48,1 %

	de la variación y el segundo eje el 15,2 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).	
Figura 4.2.1.	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de la variedad SN8946.	103
Figura 4.2.2.	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de la variedad SN9013.	104
Figura 4.2.3.	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de la variedad SN9000.	104
Figura 4.2.4.	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de la variedad SN9001.	105
Figura 4.2.5.	Estado de las plantas de SN8946 al inicio del subcultivo a 4 °C.	107
Figura 4.2.6.	Estado de las plantas de SN8946 al final del subcultivo en el tratamiento a 4 °C.	107
Figura 4.2.7.	Estado de las plantas de SN9013 al inicio del subcultivo a 4 °C.	108
Figura 4.2.8.	Estado de las plantas de SN9013 al final del subcultivo a 4 °C.	108
Figura 4.2.9.	Estado de las plantas de SN9000 al inicio del subcultivo a 4 °C.	109
Figura 4.2.10.	Estado de las plantas de SN9000 al final del subcultivo a 4 °C.	109
Figura 4.2.11.	Estado de las plantas de SN9001 al inicio del subcultivo a 4 °C.	110
Figura 4.2.12.	Estado de las plantas de SN9001 al final del subcultivo a 4 °C.	110
Figura 4.2.13.	Estado de las plantas de SN8946 al inicio del subcultivo a 12 °C.	111
Figura 4.2.14.	Estado de las plantas de SN8946 al final del subcultivo a 12 °C.	111
Figura 4.2.15.	Estado de las plantas de SN9013 al inicio del subcultivo a 12 °C.	112
Figura 4.2.16.	Estado de las plantas de SN9013 al final del subcultivo a 12 °C.	112

-
- Figura 4.2.17.** Estado de las plantas de SN9000 al inicio del 113
subcultivo a 12 °C.
- Figura 4.2.18.** Estado de las plantas de SN9000 al final del 113
subcultivo a 12 °C.
- Figura 4.2.19.** Estado de las plantas de SN9001 al inicio del 114
subcultivo a 12 °C.
- Figura 4.2.20.** Estado de las plantas de SN9001 al final del 114
subcultivo a 12 °C.
- Figura 4.2.21.** Evolución del crecimiento *in vitro* a 22 °C de la 115
variedad SN8946 tras los tratamientos a bajas
temperaturas.
- Figura 4.2.22.** Evolución del crecimiento *in vitro* a 22 °C de la 115
variedad SN9013 tras los tratamientos a bajas
temperaturas.
- Figura 4.2.23.** Evolución del crecimiento *in vitro* a 22 °C de la 116
variedad SN9000 tras los tratamientos a bajas
temperaturas.
- Figura 4.2.24.** Evolución del crecimiento *in vitro* a 22 °C de la 116
variedad SN9001 tras los tratamientos a bajas
temperaturas.
- Figura 4.2.25.** Cromatogramas obtenidos a 280 nm de los extractos 125
metanólicos de vástagos procedentes de las cuatro
variedades de *L. sinuatum* sometidas a diferentes
condiciones de temperatura durante la fase de
multiplicación *in vitro*.
- Figura 4.2.26.** Capacidad antioxidante de las variedades 128
determinada mediante el método del ABTS usando
ácido gálico como estándar en el ensayo de bajas
temperaturas.
- Figura 4.2.27.** Capacidad antioxidante de las variedades 128
determinada con el ensayo ABTS usando trolox como
referencia en el ensayo de bajas temperaturas.
- Figura 4.2.28.** Capacidad antioxidante de las variedades en el 129
ensayo de bajas temperaturas determinada mediante

	el método FRAP.	
Figura 4.2.29.	Capacidad antioxidante de las variedades determinada mediante el método del ABTS usando ácido gálico como estándar en el ensayo de reintroducción a 22 °C de los materiales cultivados previamente a bajas temperaturas.	130
Figura 4.2.30.	Capacidad antioxidante determinada como capacidad atrapadora del catión radical ABTS de las variedades de <i>L. sinuatum</i> estudiadas después del tratamiento de bajas temperaturas, usando trolox como estándar.	131
Figura 4.2.31.	Capacidad antioxidante de las variedades determinada mediante el método FRAP en el ensayo de reintroducción a 22 °C de los materiales cultivados previamente a bajas temperaturas	131
Figura 4.2.32.	Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre la producción de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo de producción exigido (8 tallos/planta).	132
Figura 4.2.33.	Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre la longitud del tallo (calidad de la producción) de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica la longitud mínima para calidad extra (60 centímetros).	133
Figura 4.2.34.	Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre el número de espigas por tallo de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (6 espigas/tallo).	134
Figura 4.2.35.	Efecto de la temperatura durante la micropropagación sobre el número de ramificaciones por tallo de las variedades en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (3-4 ramas/tallo).	135
Figura 4.2.36.	Análisis PCA de la respuesta de las plantas de <i>L.</i>	136

- sinuatum* de la variedad SN8946 expuestas a tratamientos de diferentes temperaturas en la fase de mantenimiento y vuelta a la temperatura estándar durante la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 39,9 % de la variación y el segundo eje el 16,2 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8).
- Figura 4.2.37.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9013 expuestas a tratamientos de diferentes temperaturas durante la fase de mantenimiento y vuelta a la temperatura estándar en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 42,6 % de la variación y el segundo eje el 13,3 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8). 137
- Figura 4.2.38.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9000 expuestas a tratamientos de diferentes temperaturas durante la fase de mantenimiento y vuelta a la temperatura estándar en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 45,7 % de la variación y el segundo eje el 21,9 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8). 138
- Figura 4.2.39.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de la variedad SN9001 expuestas a tratamientos de diferentes temperaturas durante la fase de mantenimiento y vuelta a la temperatura estándar en la fase de multiplicación *in vitro*. El primer eje explica el 50,7 % de la variación y el segundo eje el 13,4 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8). 139
- Figura 4.3.1.** Evolución del porcentaje de plantas con raíces durante la fase de enraizamiento de la variedad SN8946. 143
- Figura 4.3.2.** Evolución del porcentaje de plantas con raíces durante la fase de enraizamiento de la variedad SN9013. 143
- Figura 4.3.3.** Evolución del porcentaje de plantas con raíces 144

	durante la fase de enraizamiento de la variedad SN9000.	
Figura 4.3.4.	Evolución del porcentaje de plantas con raíces durante la fase de enraizamiento de la variedad SN9001.	144
Figura 4.3.5.	Plántulas y raíces de la variedad SN8946 al finalizar el periodo de la fase de enraizamiento (40 días). (A) Estado de las plantas T-1. (B) Densidad radicular T-1. (C) Estado de las plantas T-2. (D) Densidad radicular T-2. (E) Estado de las plantas T-3. (F) Densidad radicular T-3. (G) Estado de las plantas T-4. (H) Densidad radicular T-4.	145
Figura 4.3.6.	Plántulas y raíces de la variedad SN9013 al finalizar el periodo de la fase de enraizamiento (40 días). (A) Estado de las plantas T-1. (B) Densidad radicular T-1. (C) Estado de las plantas T-2. (D) Densidad radicular T-2. (E) Estado de las plantas T-3. (F) Densidad radicular T-3. (G) Estado de las plantas T-4. (H) Densidad radicular T-4.	146
Figura 4.3.7.	Plántulas y raíces de la variedad SN9000 al finalizar el periodo de la fase de enraizamiento (40 días). (A) Estado de las plantas T-1. (B) Densidad radicular T-1. (C) Estado de las plantas T-2. (D) Densidad radicular T-2. (E) Estado de las plantas T-3. (F) Densidad radicular T-3. (G) Estado de las plantas T-4. (H) Densidad radicular T-4.	147
Figura 4.3.8.	Plántulas y raíces de la variedad SN9001 al finalizar el periodo de la fase de enraizamiento (40 días). (A) Estado de las plantas T-1. (B) Densidad radicular T-1. (C) Estado de las plantas T-2. (D) Densidad radicular T-2. (E) Estado de las plantas T-3. (F) Densidad radicular T-3. (G) Estado de las plantas T-4. (H) Densidad radicular T-4.	148
Figura 4.3.9.	Plántulas de <i>Limonium sinuatum</i> de las variedades	149

- SN9013 y SN9001 en la fase de aclimatación.
- Figura 4.3.10.** Plantas de *Limonium sinuatum* de la variedad SN8946 149
en condiciones bajo invernadero a los 3 meses del
trasplante.
- Figura 4.3.11.** Plantas de *Limonium sinuatum* de la variedad SN9001 150
después de realizar el pinzamiento de los tallos
principales antes de entrar en la fase de producción.
- Figura 4.3.12.** Cromatogramas obtenidos a 360 nm de los extractos 156
metanólicos de vástagos procedentes de la variedad
SN8946 de *L. sinuatum* sometida a diferentes
concentraciones de auxinas durante la fase de
enraizamiento *in vitro* (A: T-1; B: T-2; C: T-3, D: T-4).
Los números sobre los picos indican analitos con
posible naturaleza flavonoide.
- Figura 4.3.13.** Cromatogramas obtenidos a 360 nm de los extractos 157
metanólicos de vástagos procedentes de la variedad
SN9013 de *L. sinuatum* sometida a diferentes
concentraciones de auxinas durante la fase de
enraizamiento *in vitro* (A: T-1; B: T-2; C: T-3, D: T-4).
Los números sobre los picos indican analitos con
posible naturaleza flavonoide.
- Figura 4.3.14.** Cromatogramas obtenidos a 360 nm de los extractos 158
metanólicos de vástagos procedentes de la variedad
SN9000 de *L. sinuatum* sometida a diferentes
concentraciones de auxinas durante la fase de
enraizamiento *in vitro* (A: T-1; B: T-2; C: T-3, D: T-4).
Los números sobre los picos indican analitos con
posible naturaleza flavonoide.
- Figura 4.3.15.** Cromatogramas obtenidos a 360 nm de los extractos 159
metanólicos de vástagos procedentes de la variedad
SN9001 de *L. sinuatum* sometida a diferentes
concentraciones de auxinas durante la fase de
enraizamiento *in vitro* (A: T-1; B: T-2; C: T-3, D: T-4).
Los números sobre los picos indican analitos con

- posible naturaleza flavonoide.
- Figura 4.3.16.** Capacidad antioxidante de las variedades, 161
determinada con el método ABTS y usando ácido
gálico como estándar, en la fase de enraizamiento *in*
vitro con diferentes tipos y concentraciones de
auxinas.
- Figura 4.3.17.** Capacidad antioxidante de las variedades, 162
determinada con el método ABTS y usando trolox
como estándar, en la fase de enraizamiento *in*
vitro con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.
- Figura 4.3.18.** Capacidad antioxidante de las variedades, 163
determinada con el ensayo FRAP, en la fase de
enraizamiento *in* *vitro* con diferentes tipos y
concentraciones de auxinas.
- Figura 4.3.19.** Efecto de las auxinas y su concentración durante el 164
enraizamiento *in* *vitro* sobre la producción de las
variedades en plantas crecidas en condiciones de
invernadero. La línea indica el mínimo de producción
exigido (8 tallos/planta).
- Figura 4.3.20.** Efecto de las auxinas y su concentración durante el 165
enraizamiento *in* *vitro* sobre la longitud del tallo
(calidad de la producción) de las variedades en plantas
crecidas en condiciones de invernadero. La línea
indica la longitud mínima para calidad extra (60
centímetros).
- Figura 4.3.21.** Efecto de las auxinas y su concentración durante el 165
enraizamiento *in* *vitro* sobre el número de espigas por
tallos de las variedades en plantas crecidas en
condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo
exigido (6 espigas/tallos).
- Figura 4.3.22.** Efecto de las auxinas y su concentración durante el 166
enraizamiento *in* *vitro* sobre el número de
ramificaciones por tallos de las variedades en plantas
crecidas en condiciones de invernadero. La línea

- indica el mínimo exigido (3-4 ramas/tallo).
- Figura 4.3.23.** Plantas en producción, antes de corte, de *Limonium sinuatum* durante su cultivo bajo condiciones de invernadero. **(A)** SN8946. **(B)** SN9013. **(C)** SN9000. **(D)** SN9001. 167
- Figura 4.3.24.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de SN8946 sometidas a diferentes tratamientos en la fase de enraizamiento *in vitro*. El primer eje explica el 54.7 % de la variación y el segundo eje el 24.8 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8). 168
- Figura 4.3.25.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de SN8946 sometidas a diferentes tratamientos en la fase de enraizamiento *in vitro*. El primer eje explica el 42.2 % de la variación y el segundo eje el 23.3 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8). 169
- Figura 4.3.26.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de SN8946 sometidas a diferentes tratamientos en la fase de enraizamiento *in vitro*. El primer eje explica el 50.0 % de la variación y el segundo eje el 20.9 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8). 170
- Figura 4.3.27.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de SN8946 sometidas a diferentes tratamientos en la fase de enraizamiento *in vitro*. El primer eje explica el 39.2 % de la variación y el segundo eje el 20.8 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8). 171
- Figura 4.4.1.** Estado inicial de los explantes de SN9000 al ponerse en el primer subcultivo en el medio de establecimiento con TDZ. 173
- Figura 4.4.2.** Estado final de los explantes con brotes de SN9000 174

	tras dos subcultivos en el medio de establecimiento con TDZ.	
Figura 4.4.3.	Detalle de los brotes de SN9000 generadas a partir de los explantes de hojas jóvenes.	174
Figura 4.4.4.	Estado de las plantas del T.2 al finalizar un periodo de subcultivo.	180
Figura 4.4.5.	Estado de las plantas de T-3 al finalizar un periodo de subcultivo.	180
Figura 4.4.6.	Capacidad antioxidante en extractos de la variedad SN9000, determinada con el ensayo del ABTS y usando ácido gálico como estándar, durante la fase de multiplicación.	182
Figura 4.4.7.	Capacidad antioxidante en extractos de la variedad SN9000, determinada con ABTS y usando trolox como referencia, durante la fase de multiplicación.	183
Figura 4.4.8.	Capacidad antioxidante de la variedad SN9000, determinada con el método con FRAP, durante la fase de multiplicación.	183
Figura 4.4.9.	Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes durante la micropropagación sobre la producción de SN9000 en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo de producción exigido (8 tallos/planta).	184
Figura 4.4.10.	Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes durante la micropropagación sobre la longitud del tallo (calidad de la producción) de SN9000 en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica la longitud mínima para calidad extra (60 centímetros).	185
Figura 4.4.11.	Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes durante la micropropagación sobre el número de espigas por tallo de SN9000 en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo	185

- exigido (6 espigas/tallo).
- Figura 4.4.12.** Efecto del establecimiento a partir de hojas jóvenes durante la micropropagación sobre el número de ramificaciones por tallo de SN9000 en plantas crecidas en condiciones de invernadero. La línea indica el mínimo exigido (3-4 ramas/tallo). 186
- Figura 4.4.13.** Variedad SN9000 del T-2 establecida a partir de explantes de hojas jóvenes en producción bajo condiciones de cultivo en invernadero. 187
- Figura 4.4.14.** Variedad SN9000 del T-3 establecida a partir de explantes de hojas jóvenes en producción bajo condiciones de cultivo en invernadero. 187
- Figura 4.4.15.** Perspectiva general de las plantas de SN9000 obtenidas a partir del establecimiento de explantes de hojas jóvenes en producción bajo condiciones de invernadero 188
- Figura 4.4.16.** Detalle de la inflorescencia de plantas de SN9000 obtenida a partir del tratamiento de establecimiento T-2. 188
- Figura 4.4.17.** Detalle de la inflorescencia de plantas de SN9000 obtenida a partir del tratamiento de establecimiento T-3. 189
- Figura 4.4.18.** Análisis PCA de la respuesta de las plantas de *L. sinuatum* de SN9000 tanto en la fase de multiplicación *in vitro* como en el cultivo en invernadero tras haber sido expuestas a diferentes tratamientos de establecimiento. El primer eje explica el 45.7 % de la variación y el segundo eje el 21.9 %. Se utilizaron ocho pares de datos (n=8). 190

ANEXO

ANEXO: ESTUDIO ECONÓMICO Y VALORACIÓN DE LA PUESTA EN MARCHA DEL NUEVO SISTEMA DE CULTIVO *IN VITRO*

A. Reducción de la distancia entre baldas en las estanterías

La optimización del espacio en la cámara de cultivo se produciría debido a que hay una reducción en el espacio entre baldas cuando se pasa a utilizar el tratamiento T-3 en lugar de T-1 (Control). Se consigue un mejor aprovechamiento de la cámara de cultivo, ya que se aumenta la superficie útil destinada a la multiplicación, y en consecuencia, también sube la capacidad de la cámara de cultivo para albergar plantas (Tabla A.1).

Tabla A.1. Optimización de la utilización de la cámara de cultivo.

Tratamiento	Superficie de la cámara de cultivo (m ²)	Distancia entre baldas (cm)	Superficie útil de la cámara de cultivo (m ²)	Capacidad de la cámara de cultivo (Nº de plantas)
T-1 (Control)	56	34.5	97.5	63360
T-3	56	25.8	130.6	84480

El precio de un metro cuadrado de una cámara de cultivo *in vitro* rondaría los 153,80 euros, con una superficie de 56 metros cuadrados de cámara de cultivo, se puede pasar a tener un 25% más de superficie útil. Así, el coste del metro cuadrado de superficie útil pasaría a ser de 114,85 euros, lo cual bajaría el coste de metro cuadrado de la cámara en 38,9 euros/m². Se ahorrarían unos 2178,4 euros/año.

Para realizar los cálculos se han tenido en cuenta los siguientes datos:

- Superficie de la cámara de cultivo *in vitro* dedicada a *Limonium sinuatum*.
- Número de estanterías y de baldas de la cámara de cultivo.
- Distancia actual entre baldas.
- Distancia propuesta entre baldas.
- Número de plantas por balda de estantería.

B. Alargamiento de los periodos entre subcultivos

La elección de realizar los subcultivos de las plantas a la temperatura de la cámara Nº 2, que está a 12 °C, durante la fase de mantenimiento *in vitro* produciría un ahorro en mano de obra, pues se pasaría de realizar tres cultivos cada tres meses a un único subcultivo por trimestre por cada 100 tubos de cultivo de cualquiera de las variedades cuando se encontraran en esta etapa (Tabla B.1.).

Tabla B.1. Ahorro en horas de mano de obra por el alargamiento del tiempo entre subcultivos en la fase de multiplicación.

Tratamiento	Variedades en fase de mantenimiento (Nº tubos/año)	Tasa de propagación por persona (Nº tubos/8 horas)	Tiempo de subcultivo (Meses)	Número de subcultivos (Subcultivos/año)	Tiempo empleado para los subcultivos (h)
T-2	10000	300	3	4	1066.67
T-3 (Control)	10000	300	1.2	10	2666.67

Estimando que el sueldo de un trabajador que está multiplicando plantas *in vitro* sería de 900 euros/mes, que trabajaría un total de 22 días /mes y con una jornada de 8 horas/días, el coste de la hora sería de 5,11 euros/hora.

El tiempo empleado al año para multiplicar *Limonium sinuatum* pasaría de ser 2666,67 horas/año a 1066,67 horas/año, rebajándose en un total de 1600 horas por campaña. Por tanto, el ahorro económico en mano de obra dedicada a la multiplicación sería de 8176 euros/año.

Simultáneamente a la vez que se disminuye la mano de obra empleada en los subcultivos, también baja el número de horas empleadas en la preparación de medios de cultivo. Así, se pasaría de gastar 330 horas/año a 131 horas/año a emplear en la preparación de estos medios, con lo que se ahorrarían un total de 199 horas. Económicamente supondría un ahorro de 1017 euros/año (Tabla B.2).

Tabla B.2. Ahorro del tiempo de elaboración de los medios de cultivo para la fase de multiplicación.

Tratamiento	Variedades en fase de mantenimiento (Nº tubos/año)	Número de subcultivos (Subcultivos/año)	Número de recipientes (Tubos/año)	Medio necesario (L)	Tiempo empleado (h)
T-2	10000	4	40000	416	131
T-3 (Control)	10000	10	100000	1041	330

Teniendo en cuenta lo anterior, la suma del ahorro de mano de obra se cuantificaría en un total de 9193 euros/año.

Para realizar los cálculos se han tenido en cuenta los siguientes datos:

- Número de variedades y tubos (número de plantas) en fase de mantenimiento.
- Tiempo necesario para la multiplicación de 100 plantas, que se estima en 3 horas/trabajador.
- Número total de subcultivos anuales en la actualidad.
- Número total de subcultivos anuales en la propuesta realizada.
- Tiempo para preparar los stocks de macro y micronutrientes por cada 30 litros de medio (8 horas).
- Tiempo que se tarda en preparar 8 litros de medio: una hora en prepararlo (si están hechos los stocks) y una hora en repartirlo (la suma serían 2 horas).
- Mililitros lleva cada tubo de ensayo. 10,4 ml/tubo.
- Número de tubos de ensayo que se pueden llenar con 1 litro de medio (96 tubos).

C. Mejora de la fase de enraizamiento

La estandarización de un nuevo protocolo de enraizamiento donde solo se realizara un único medio de cultivo para enraizar las plantas produciría un ahorro en la mano de obra. Además, al aumentar el porcentaje de enraizamiento y aclimatación (Tabla C.1.), se debería realizar menos cantidad de medio de cultivo, lo que bajaría las horas dedicadas a este fin (Tabla C.2.). Finalmente, al hacer un solo tipo de medio de cultivo en lugar de dos, se reduciría el tiempo de elaboración de medios en un tercio del tiempo empleado actualmente (Tabla C.3.).

Tabla C.1. Volumen de plantas enraizadas en función de los porcentajes de enraizamiento y aclimatación.

Tratamiento	Plantas servidas a los productores (Plantas/año)	Aclimatación (Plantas/año)	Plantas enraizadas (Plantas/año)	Plantas aclimatadas (%)	Plantas con raíces (%)
T-1 (Control)	8000	9410	11070	85	85
T-4	8000	8890	9880	90	90

Tabla C.2. Ahorro en horas de mano de obra debido a la mejora del porcentaje de plantas enraizadas.

Tratamiento	Plantas servidas a los productores (Plantas/año)	Plantas enraizadas (Plantas/año)	Plantas con raíces (%)	Tasa de enraizamiento por persona (Nº plantas/ 8 horas)	Tiempo empleado para el enraizado (h)
T-1 (Control)	8000	11070	85	300	295
T-4	8000	9880	90	300	263

Tabla C.3. Ahorro del tiempo de elaboración de los medios de cultivo para la fase de enraizamiento.

Tratamiento	Plantas servidas a los productores (Plantas/año)	Plantas enraizadas (Plantas/año)	Nº de recipientes (Tarros/año)	Medio necesario (L)	Tiempo empleado (h)
T-1 (Control)	5500	7610	1268	105	54,25
T-2	2500	3640	607	50,6	25,44
T-4	8000	9880	1646	137,2	34,3

La optimización tendría en cuenta, por un lado el espacio aprovechable, serían 1190 plantas que no habría que enraizar (a 200 plantas enraizadas/balda), se quedarían libres 6 baldas (4 m²), valiendo 153.8 euros/m², tendríamos unos 615,2 euros/año. Se le añade la cantidad de medio que no se realizaría (en horas) unas cuatro horas 20,44 euros. A esto se le suma las horas no usadas en enraizamiento (32 horas) que supondrían 163.52 euros/año. Y, por último, el esfuerzo de no tener que preparar dos tipos de medios, y pasar a un único tipo, supondría un ahorro de 232,10 euros/año. El total ascendería a 1010,82 euros anuales.

Para realizar los cálculos se han tenido en cuenta los siguientes datos:

- Número de plantas enraizadas al año de *Limonium sinuatum*.
- Tiempo necesario para enraizar 100 plantas, que se estima en 3 horas/trabajador.
- Porcentaje de éxito de enraizamiento con el protocolo actual.
- Porcentaje de éxito de enraizamiento con el protocolo propuesto.
- Tiempo para preparar los stocks de macro y micronutrientes por cada 30 litros de medio (8 horas).
- Tiempo que se tarda en preparar 8 litros de medio: una hora en prepararlo (si están hechos los stocks) y una hora en repartirlo (la suma serían 2 horas).
- Mililitros lleva cada recipiente. (83,3 ml/tarrina).

- Número de recipientes que se pueden llenar con 1 litro de medio (12 tarrinas).
- Número de plantas por recipiente. (6 plantas).

D. Método alternativo de establecimiento para la variedad SN9000

El método de establecimiento para SN9000, variedad de flores de color amarillo, a partir de explantes foliares asegura una alternativa a la utilización de inflorescencia inmadura que presenta menor estabilidad genética dentro del proceso de micropropagación.

Tabla D.1. Comparación entre métodos de establecimiento a partir de inflorescencia inmadura u hoja joven de ≈ 2 cm.

Tratamiento	Tubos de ensayos con explantes (Nº de tubos)	Tubos contaminados (%)	Tubos con plantas (%)	Clones obtenidos (Nº clones/tubo)
T-1 (Control)	50	6	27	1-4
T-3	100	5.5	32	1-2

La diferencia entre los tratamientos no es significativa desde el punto de vista cuantitativo, con lo que no hay ninguna mejora económica. Sin embargo, las plantas obtenidas a partir de hojas jóvenes presentan menor variación somaclonal, lo que permite trabajar mejor el cultivo *in vitro* con esta variedad.

E. Ahorro económico total de la puesta en marcha del nuevo sistema de cultivo *in vitro*

Teniendo en cuenta las diferentes fases contempladas en el cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum* y la optimización en cada una de ellas, que además va acompañada de un ahorro económico, se puede calcular cual sería el ahorro global anual que se produciría (Tabla E.1.).

Tabla E.1. Ahorro económico global anual del nuevo sistema de producción *in vitro* de *Limonium sinuatum*.

Fase de cultivo <i>in vitro</i>	Tratamiento elegido en cada fase	Ahorro en cada fase (€/año)	Ahorro total (€/año)
Establecimiento	T-3	0	
Multiplicación (Iluminación)	T-3	2178,4	
Multiplicación (Temperatura)	T-2	9193	12328,22
Enraizamiento y aclimatación	T-4	1010,82	

