

universidad
de león



Biodiversidad y comportamiento agronómico en León de *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca*

**Biodiversity and agronomic performance of
Gentiana lutea L. var. *aurantiaca* in León**

Tesis Doctoral

Óscar González López

UNIVERSIDAD DE LEÓN

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

INSTITUTO DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y BIODIVERSIDAD



Biodiversidad y comportamiento agronómico en León de *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca*

**Biodiversity and agronomic performance of
Gentiana lutea L. var. *aurantiaca* from León**

Tesis Doctoral

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ingeniería de Biosistemas

Presenta:

Óscar González López

Director: *Dr. Pedro Antonio Casquero Luelmo*

UNIVERSIDAD DE LEÓN

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

INSTITUTO DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y BIODIVERSIDAD



UNIÓN EUROPEA
Fondo Social Europeo



León, julio de 2014

Esta memoria ha sido realizada gracias a la ayuda para la contratación de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria (PIRTU) cofinanciada por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europea Orden EDU/1867/2009, así como a la Consejería de Medio ambiente de la Junta de Castilla y León por financiar el proyecto (2008/00134/001).

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	I
RESUMEN.....	III
ABSTRACT	V
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
LOCALIZACIÓN.....	35
CAPITULO I: Estudio de la variabilidad genética de las poblaciones cantábricas de <i>Gentiana lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> (M. Lainz) M. Lainz. mediante marcadores moleculares	45
CAPITULO II: Obtención de plántulas de <i>Gentiana lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para su cultivo regular	89
CAPITULO III: Establecimiento, desarrollo y rendimiento de <i>Gentiana lutea</i> L.var. <i>aurantiaca</i> en cultivo regular en diferentes ambientes	137
CAPITULO IV: Compuestos amargos en la <i>Gentiana lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> silvestre y cultivada.....	213
CONCLUSIONES GLOBALES.....	301
CONCLUSIONES GLOBALES.....	301

RESUMEN

La *Gentiana lutea* L., denominada comúnmente genciana, se distribuye por los pastizales y laderas en las montañas del centro y sur de Europa y de Asia Menor. Sus compuestos amargos, principalmente secoiridoides-glicosidos, localizados de forma mayoritaria en las raíces, le otorgan unas cualidades farmacéuticas que hacen que sea utilizada en la medicina tradicional como estimulante del apetito, así como para el tratamiento de diferentes dolencias estomacales. Su característico sabor hace que sea igualmente, muy apreciada en la elaboración de bebidas aperitivas, tanto alcohólicas como no alcohólicas.

Sus propiedades, han hecho que las raíces de genciana hayan sido recolectada de forma generalizada, reduciendo, e incluso esquilmando las poblaciones silvestres, de modo que en la actualidad existen figuras de protección que regulan o prohíben su recolección en toda Europa.

En las montañas de León, donde igualmente sus poblaciones silvestres están amenazadas, se desarrolla la *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, variedad poco reconocida y estudiada, que destaca por la coloración de sus flores, anaranjadas e incluso rojizas, diferenciándose de la *G. lutea* L. subsp. *lutea*, con flores completamente amarillas.

La importancia de la protección de las poblaciones silvestres, así como la necesidad de dotar de nuevas actividades económicas a las zonas de montaña del noroeste de la provincia de León, establece el punto de partida de este estudio. Para llevarlas a cabo es necesario conocer más en profundidad la variedad *aurantiaca*, la variabilidad de las poblaciones silvestres, así como identificar las condiciones idóneas para la multiplicación y su cultivo.

Para ello, se han prospectado 32 poblaciones silvestres de la variedad *aurantiaca*, así como 15 poblaciones de la subsp. *lutea* en los Pirineos y 4 de la subsp. *vardjanii* en los Alpes Dolomitas, que han servido como control

La aplicación de los marcadores moleculares ISSR, han revelado diferencias genéticas entre la variedad *aurantiaca* y las demás subespecies, reforzando la entidad de la citada variedad. Igualmente, estos resultados han evidenciado signos de aislamiento genético de las poblaciones, así como una escasa diversidad genética dentro de las mismas, amenazando la supervivencia de estas en un futuro no muy lejano.

La búsqueda de un protocolo idóneo que permita romper la dormancia de las semillas, aunando altas tasas de germinación y plantas de calidad, para la variedad *aurantiaca*, ensayando tratamientos de frío y dosis de ácido giberélico, revelaron, que la dosis hormonal de 100 mg/l tras una estratificación a 4°C durante tres meses, logra dichos objetivos. De igual manera, se detectó una baja capacidad germinativa para aquellas poblaciones más aisladas, que habían mostrado baja variabilidad en el análisis con marcadores moleculares ISSR.

Para su cultivo, se establecieron cuatro ensayos en parcelas con diferentes características, dentro y fuera del hábitat natural de la *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, de modo que los resultados determinaron que el cultivo sostenible, en zonas de montaña con suelos ácidos y de baja pendiente permite obtener unos rendimientos superiores a las 15 toneladas de raíces frescas por hectárea.

El análisis de diferentes muestras de raíz de genciana mediante cromatografía HPLC, han evidenciado, como las concentraciones de compuestos amargos presentes en las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* son comparables, e incluso superiores, a las de la subsp. *lutea*, y que las concentraciones en las raíces cultivadas, principalmente para la amarogentina, son muy superiores a aquellas obtenidas de plantas silvestres, y aún más cuando son recolectadas en primavera.

El conocimiento de la variabilidad de las poblaciones estudiadas, así como la aplicación de los protocolos de multiplicación adecuados, permitirán obtener raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivadas de elevada calidad, tanto en rendimiento, como en compuestos amargos, convirtiéndose en una actividad económica rentable y sostenible. Esto a su vez posibilitará la recuperación de las poblaciones silvestres, conservando su biodiversidad, para lo cual, en algunos casos, serían necesarios algunos planes de recuperación específicos.

ABSTRACT

Gentiana lutea L., commonly known as yellow gentian, is distributed throughout the pastures and hillsides of Central and Southern Europe and Asia Minor. Its bitter compounds, mainly secoiridoid glycosides, localized mostly in the roots, give pharmaceutical qualities to the gentian roots. These qualities make the gentian roots suitable for traditional medicine as an appetite stimulant and for the treatment of different stomach problems. Also, the gentian roots are widely used in the manufacture of alcoholic and non-alcoholic bitter beverages.

Due to its good properties, gentian root has been collected indiscriminately, being the wild populations over-exploited or even decimated. Because of that, gentian has been protected by law throughout Europe.

G. lutea L. var. *aurantiaca* grows in the mountains of León, where wild populations are also threatened. It is an almost unknown cultivar, whose flowers range in colour from orange to almost red as compared to the yellow flowers of subspecies *lutea*.

The starting point of this study resides in the importance of protecting gentian wild populations and, moreover, provide new economic activities in the northwestern mountain areas of the province of León. To carry out that, it is necessary to know more about the *aurantiaca* variety, the variability of wild populations, and to identify the best conditions for the multiplication and cultivation. For this purpose, 32 wild populations of the *aurantiaca* variety have been prospected, as well as 15 populations of subsp. *Lutea* from the Pyrenees and 4 subsp. of *vardjanii* in the Dolomites, which served as a control.

ISSR molecular markers have revealed genetic differences between the *aurantiaca* variety and the other subspecies, reinforcing the identity of this variety. Also, these results showed evidence of genetic isolation of the populations and low genetic diversity within them, threatening the survival of these in a not distant future.

The search for a suitable protocol to break seed dormancy, which combines high germination rates and high quality plants for the *aurantiaca* variety, by testing cold treatments and different doses of gibberellic acid, revealed that 100 mg/l of this hormone after and stratification period of three months at 4°C, achieves these goals. It was also detected a low germination capacity for those isolated populations which had expressed low variability in the ISSR molecular marker analysis.

Four trials were established (for cultivation) in plots with different environmental characteristics, within and outside of the natural habitat of *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. The results revealed that, it is possible to obtain more than 15 tons of fresh roots using sustainable cultivation in mountainous areas with acid soils and low slope.

HPLC chromatography analysis of different gentian root samples showed that the concentrations of bitter compounds in the roots of *G. lutea* L. var. *aurantiaca* are comparable, or even higher, to those of subsp. *lutea*, and those concentrations in

cultivated roots, mainly for amarogentine, are much higher than those obtained from wild plants, and even more when they are collected in spring.

The knowledge of the variability of the studied populations, and the use of appropriate multiplication protocols, will enable to obtain high quality cultivated roots of *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, both in yield and bitter compounds, making it a profitable and sustainable business. This cultivation will allow to recover the wild populations, while conserving biodiversity.



INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE.....	3
II. ÍNDICE DE FIGURAS	5
III. ÍNDICE DE TABLAS.....	5
1. ANTECEDENTES	7
1.1. MARCO DE CREACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE LA GENCIANA.....	7
1.2. CONVENIO “GENCIANA”	9
1.3. APROGEN	11
1.4. ZONA DE ESTUDIO	12
1.5. SITUACIÓN SOCIOECONÓMICA	16
2. GENCIANA	17
2.1. GÉNERO <i>Gentiana</i> L	17
2.2. Sección <i>Gentiana</i>	18
2.3. <i>Gentiana lutea</i> L.....	18
2.3.1. Características principales (morfología y reproducción).....	18
2.3.2. Ecología	19
2.4. SUBESPECIES Y VARIEDADES.....	20
2.4.1. <i>Gentiana lutea</i> L. subsp. <i>lutea</i>	20
2.4.2. <i>Gentiana lutea</i> L. subsp. <i>symphyandra</i> Murbeck	21
2.4.3. <i>Gentiana lutea</i> L. subsp. <i>vardjanii</i> T. Wraber	21
2.4.4. <i>Gentiana lutea</i> L. subsp. <i>montserratii</i> (Vivant ex Greuter) Romo	21
2.4.5. <i>Gentiana lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> (M. Lainz) M. Lainz.....	21
2.5. USOS.....	23
2.6. PROPIEDADES.....	23
2.7. NORMATIVA	24
2.8. COMERCIO.....	25
3. BIBLIOGRAFIA	29

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Municipios de Castilla y León incluidos en el Plan 42.....	8
Figura 2: Parajes de la zona a estudio. (A) Valle Congosto (Babia) (B) Macizo de las Ubiñas (Babia) (C) Peña Chana.....	13
Figura 3: Ejemplar de oso pardo cantábrico <i>Ursus arctos</i>	13
Figura 4: Urogallo cantábrico (<i>Tetrao urogallus cantabricus</i>).	14
Figura 5: ZEPAs y LICs presentes en la zona a estudio.....	14
Figura 6: Extensión del Parque Natural de Babia y Luna.	15
Figura 7: Abejorros (<i>Bombus</i> sp.) sobre flores de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	19
Figura 8: Distribución de <i>G. lutea</i> L. en Europa.	20
Figura 9: (A) <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>lutea</i> . (B) <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>symphyandra</i> Murbeck: (C) <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>vardjanii</i> T. Wraber. (D) <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>montserratii</i> (Vivant ex Greuter) Romo. (E) <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> (M. Lainz) M. Lainz.....	22
Figura 10: Ejemplos de algunas de las bebidas elaboradas con <i>G. lutea</i> L.....	23
Figura 11: Cantidad de raíz fresca de <i>G. lutea</i> L. recolectada en la provincia de León desde el año 2001.....	26

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secciones del género <i>Gentiana</i> L: número de especies y distribución geográfica.....	17
---	----

1. ANTECEDENTES

1.1. MARCO DE CREACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE LA GENCIANA

Los estudios sobre la genciana surgen a través de la creación del Plan 42, plan cuyo fin último es la prevención de incendios forestales. Este plan nace como iniciativa de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León, aprobándose el 10 de enero de 2002, en Consejo de Gobierno de la Junta de Castilla y León.

El Plan 42 tiene una vigencia de ocho años a partir de su puesta en marcha, durante los cuales, se llevan a cabo diferentes actuaciones basadas en el establecimiento de una estrategia que contribuya a reducir los incendios en las comarcas más afectadas de la región. Buena parte de los esfuerzos se basan en la intervención social, promoviendo la educación, formación, comunicación y la participación (Junta de Castilla y León, 2006). Mientras, por otro lado se llevan a cabo otro tipo de medidas relacionadas con la prevención clásica, más orientadas al corto plazo, como son las infraestructuras, la creación de cortafuegos o las actuaciones silvícolas.

El Plan 42, parte de la idea de que, de manera mayoritaria, los incendios están relacionados con la actividad humana, y las áreas donde esto ocurre están claramente delimitadas. Y es que, entre los años 1995 y 1999, en únicamente 42 municipios, lo que supone el 1,9% de la superficie de la Comunidad Autónoma de Castilla y León, se producen el 40% de los incendios forestales. Estos municipios están localizados en zonas periféricas de montaña, especialmente en el noroeste de la comunidad (provincias de León y Zamora), y en núcleos puntuales al norte de Burgos y sur de Ávila. Además de estos 42 municipios, en dos fases sucesivas se añadieron más municipios con situaciones socioeconómicas y geográficas similares, por lo que eran susceptibles de convertirse en localizaciones con los mismos problemas. Finalmente el área de actuación del Plan afectó a un total de 154 términos municipales (Figura 1) (Junta de Castilla y León, 2006)

En general los incendios en estas zonas se deben a:

- Tradición de uso del fuego como herramienta de gestión del matorral, ya sea ligada a las actividades agroganaderas o únicamente como medida para la “limpieza del monte”.
- Falta de valor de los montes en las zonas rurales con problemas de incendios, ya sea para los propietarios o para la población en general. No existe una cultura forestal, de modo, que la única relación existente con el monte es la ligada al aprovechamiento ganadero extensivo.

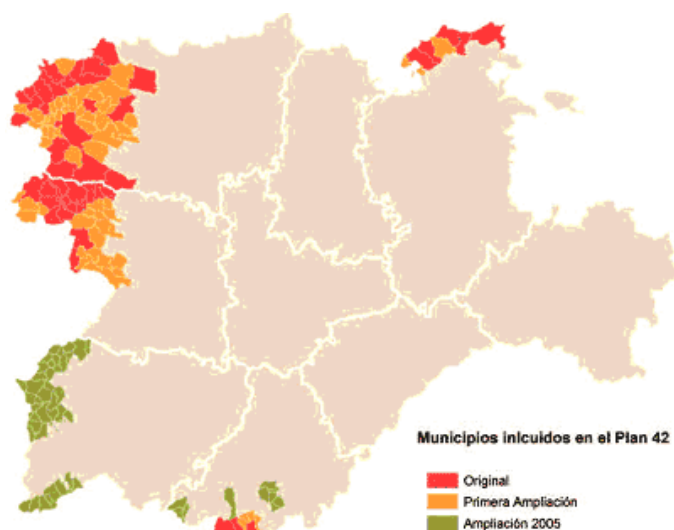


Figura 1: Municipios de Castilla y León incluidos en el Plan 42. Fuente: <http://goo.gl/f8Y0Bo>.

La base estructural que hace que esta situación se mantenga en la actualidad se fundamenta en el abandono del modelo agrario tradicional, lo que de forma generalizada ha supuesto problemas de desestructuración social, económica y de organización territorial debidos a:

- Emigración juvenil y envejecimiento de la población
- Actividad económica basada en el aprovechamiento de los recursos naturales con carácter marginal
- Escasa ordenación del territorio e inadecuada estructura de la propiedad
- Falta de tradición forestal
- Falta de comprensión de los valores ambientales del territorio
- Falta de expectativas de futuro

El hecho de que los incendios se produzcan de forma cíclica hace que los problemas de originales se solucionen, convirtiéndolos en endémicos e impidiendo el desarrollo de las zonas afectadas.

Como resumen, se puede decir, que el principio fundamental del Plan 42 es el desarrollo económico de las zonas afectadas repetidamente por incendios forestales como influencia para la disminución de los mismos.

Los objetivos del Plan 42 son (Junta de Castilla y León, 2006):

- Reducir el número de incendios intencionados tanto dentro de los municipios incluidos en el Plan 42 como en el conjunto de Castilla y León.

- Generar un cambio de hábitos en el uso del fuego como instrumento agroganadero para la creación de nuevos pastos. Para ello, se promueven formas alternativas de gestión de estos mediante formación y ayudas.
- Fomento de una nueva cultura forestal, que permita actualizar, diversificar y mejorar los aprovechamientos económicos que se obtienen de los terrenos forestales y, debido a ello, una mayor repercusión social y defensa de estos espacios forestales.
- Contribuir en la generación de proyectos e iniciativas de desarrollo rural sostenible que incidan favorablemente en la conservación y gestión de los montes, así como la valoración social de los mismos. Uno de estos proyectos es el estudio de las poblaciones silvestres de genciana y su adaptación agronómica.

Entre las diferentes líneas de actuación de que consta el Plan 42 está la puesta en valor y revalorización del monte. Esta línea de actuación tiene como objetivo el aumento del aprecio al monte por parte de la población rural y, para ello, se favorecen alternativas económicas viables relacionadas al aprovechamiento y disfrute de los recursos naturales. Dentro de estas actividades económicas está la mejora de la gestión de los productos y/o servicios.

Con ello se realizan actuaciones sobre el terreno, ya sea sobre recursos naturales o sobre las externalidades para la mejora de su gestión. Entre estas actuaciones están las medidas para la mejora de los terrenos pastables, gestión de fincas particulares, movilización de la propiedad, así como la realización de estudios específicos sobre recursos naturales, entre los que se encuentra el convenio para el estudio de la *G. lutea* L. y otros sobre plantas aromáticas, medicinales y de uso culinario. Dentro de estas líneas de actuación se encuentran otras medidas de apoyo a la planificación, medidas de formación y capacitación para la mejora de la gestión (Junta de Castilla y León, 2006).

1.2. CONVENIO “GENCIANA”

En torno a la mejora del aprovechamiento de los recursos naturales, el 15 de febrero de 2008 se firma un Convenio Específico de Colaboración entre la Universidad de León y la Consejería de Medio Ambiente, para la realización de estudios sobre la genciana (*G. lutea* L.) en la montaña occidental de León, con vistas a su gestión integral. En dicho Convenio, con una duración de cuatro años, se asignan un presupuesto y unos objetivos, los cuales han desarrollado a través de una labor de investigación la Universidad de León en colaboración con la Asociación Promotora de la Genciana y otras plantas de interés de la montaña occidental leonesa (APROGEN), el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y la Universidad Politécnica de Madrid (UPM).

En este convenio, se establecen los siguientes objetivos básicos por parte de la Consejería de Medio Ambiente, teniendo en cuenta que la conservación, la ordenación y la explotación forestal racional de los recursos naturales es compatible con el desarrollo

económico, y que todo ello tiene que estar respaldado por bases tanto científicas como técnicas:

- Contribuir a la mejora y conservación del medio natural, sus recursos y su diversidad biológica y paisajística.
- Contribuir al desarrollo rural sostenible.
- Potenciar la variedad de funciones del monte.
- Fomentar la participación de los protagonistas del sector y su vertebración.

El convenio, establece como punto de partida los estudios realizados entre julio de 2005 y julio de 2006 en el municipio de Villablino y en los colindantes de Cabrillanes, Murias de Paredes y Palacios del Sil (García et al., 2004). Estos estudios, apoyados por la Consejería de Medio Ambiente y la Consejería de Economía y Empleo de la Junta de Castilla y León tratan sobre el aprovechamiento y posibilidad de comercialización de la genciana y de otras plantas de interés económico de sus montes. Mediante la información obtenida se reconoce la necesidad de profundizar en estos estudios previos, en los que se llevan a cabo diferentes labores:

- Se inventarían 87 poblaciones de genciana, conociendo la existencia de otras poblaciones que no se identifican debido a que no alcanzan dicha entidad.
- Se reconoce la recogida de genciana como aprovechamiento tradicional de la montaña leonesa y se constata que aun estando regulada su recolección, esto no es suficiente para controlar el furtivismo sobre ella.
- La genciana es un producto valorado y demandado que genera ingresos catalogados como importantes tanto a propietarios de los montes como a recolectores, sirviendo en muchos casos como complemento de la economía familiar; pero también es verdad que los ingresos únicamente provienen de la venta de la materia prima, ya que su transformación se da fuera de la región y en muchos de los casos fuera de España. Además en estas transacciones es muy común la presencia de intermediarios que absorben parte del margen de los beneficios.
- Generalmente las zonas de recolección se encuentran dentro de zonas declaradas como Parque Natural, Lugar de Importancia Comunitaria (LIC), Zonas de Especial Protección para las Aves (ZEPA), Reserva de la Biosfera e incluidas en la Red de Espacios Naturales de la Junta de Castilla y León.
- Gran parte de los recolectores locales de genciana están asociados a APROGEN.
- Para mejorar el rendimiento económico de la genciana asegurando la conservación de las poblaciones silvestres se considera básico profundizar en el

estudio del desarrollo, rendimiento, aprovechamientos y cultivo. Además se debe plantear un plan de gestión del aprovechamiento silvestre.

En la redacción del Convenio se dividen los trabajos a realizar en tres objetivos principales:

- **Objetivo A:** estudio de la planta silvestre y su recolección, además de propuestas para su aprovechamiento.
- **Objetivo B:** estudio sobre las posibilidades de cultivo de *G. lutea* L.
- **Objetivo C:** Conservación del material genético, estudios químicos de la planta y estudios de calidad del producto de cara al mercado.

En la ejecución del convenio, se implica y fomenta la colaboración de los agentes sociales relacionados con el aprovechamiento de la genciana o interesados en el establecimiento de cultivos agronómicos, en la medida de sus posibilidades. Estos agentes sociales mayoritariamente están concentrados en torno a APROGEN.

1.3. APROGEN

La “Asociación Promotora de la Genciana y otras plantas de interés de la montaña occidental leonesa” es creada en marzo de 2006 en el municipio leonés de Villablino. Esta asociación nace a raíz los estudios expuestos realizados en años 2005 y 2006 sobre la genciana y otras plantas de interés (García et al., 2004). Esto es posible debido a una subvención de “Nuevos Yacimientos de Empleo”, otorgada por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León, y al apoyo, tanto técnico como humano, del Plan 42.

Los fines que persigue APROGEN (2006) son:

- Promover el aprovechamiento ordenado y sostenible de la genciana y de otras plantas de interés en los municipios citados anteriormente.
- Fomentar la conservación de la genciana y de otras plantas de interés de la montaña occidental leonesa.
- Fomentar el reconocimiento de la importancia económica y medioambiental de estos recursos naturales y potenciar el valor económico generado por ellos.
- Facilitar la puesta en común de ideas, intereses y recursos de todas las partes implicadas en la gestión y aprovechamiento de estos recursos naturales.
- Potenciar el cooperativismo en torno al aprovechamiento, la transformación y la comercialización de estos recursos.

Las actividades desarrolladas por la asociación son:

- Búsqueda de financiación para la puesta en marcha de los estudios y proyectos necesarios para la consecución de los objetivos.
- Puesta en marcha de actividades formativas y de divulgación.
- Colaboración con distintas entidades públicas y/o privadas que persigan objetivos afines.
- Conservación del material genético de las poblaciones silvestres de las plantas de interés.
- Fomento del Plan de gestión de la genciana.
- Promover estudios vinculados al aprovechamiento, transformación y comercialización de la genciana y de otras plantas de interés.
- Puesta en marcha del cultivo de la genciana y de otras plantas de interés.
- Promover la puesta en marcha de distintivos de calidad de los productos obtenidos de estas plantas de interés.
- La asistencia a certámenes y ferias que se consideren de interés suficiente para su promulgación y difusión.

Se trata de una asociación sin ánimo de lucro que se financia a partir de las aportaciones obligatorias de los socios, de las subvenciones y donaciones que reciba la asociación. Entre sus socios se encuentran ayuntamientos, juntas vecinales, propietarias de montes, recolectores, personal técnico y gente interesada en distintos cultivos.

1.4. ZONA DE ESTUDIO

La zona de estudio, que comprende los municipios de Villablino, Murias de Paredes, Palacios del Sil y Cabrillanes se extiende por las comarcas leonesas de Laciana, Omaña y Babia. Estas comarcas se encuentran situadas en la parte noroccidental de la provincia de León, en plena Cordillera Cantábrica, y donde el mayor municipio es Villablino, con 10003 habitantes a día 1 de enero de 2013 (INE, , 2013).

Esta zona está dominada por el paisaje montañoso (Figura 2), densos bosques y amplios valles. En la zona estudiada, destaca como pico más alto el Cornón con 2194 m, estando siempre presente la figura de Peña Ubiña como montaña más alta de la Cordillera Cantábrica Occidental. De entre las montañas de estas comarcas nacen como ríos más importantes el Sil, el Luna y Omaña.



Figura 2: Parajes de la zona a estudio. **(A)** Valle Congosto (Babia) **(B)** Macizo de las Ubiñas (Babia) **(C)** Peña Chana

Las comarcas de Laciana y Babia conforman dos límites fronterizos que permiten el paso hacia Asturias a través de los puertos de Leitariegos, Somiedo y Ventana principalmente. La unión del relieve, clima y su ubicación hacen que estas comarcas contengan una riqueza extraordinaria tanto florística como faunística, donde por encima de todos destacan el **oso pardo cantábrico** (*Ursus arctos*) (Figura 3) y el **urogallo cantábrico** (*Tetrao urogallus cantabricus*) (Figura 4), siendo las principales enseñas de su fauna. Igualmente en estas comarcas existen un gran número de endemismos florísticos.



Figura 3: Ejemplar de oso pardo cantábrico *Ursus arctos*. Autor: Daniel Tejedo

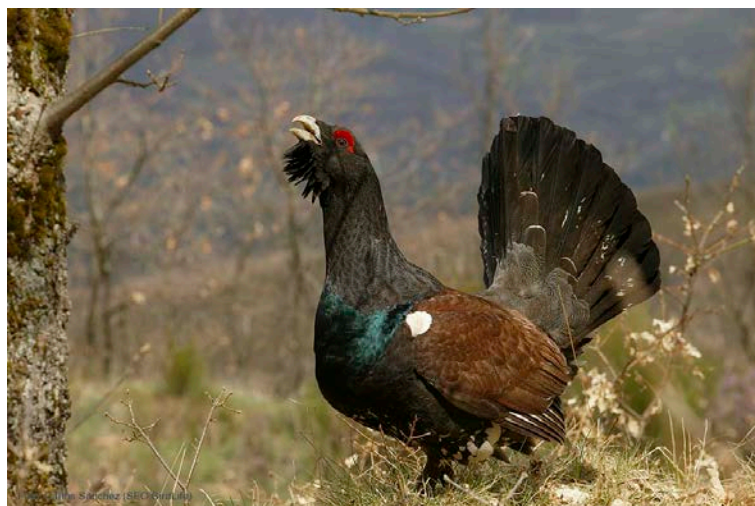


Figura 4: Urogallo cantábrico (*Tetrao urogallus cantabricus*). Autor: Carlos Sanchez-SEO/BirdLife
<http://goo.gl/gQCRGO>

Éste área se encuentra salpicado de espacios naturales protegidos como son las Reservas de la Biosfera del Valle de Laciana, del Valle de Omaña y Luna o la Reserva de la Biosfera de Babia; ZEPAs y LICs (Figura 5).



Figura 5: ZEPAs y LICs presentes en la zona a estudio. Imagen realizada a partir de <http://goo.gl/NFFfjS>

Durante años, se ha demandado que la figura de Parque Natural acogiese a gran parte del área, y por el Decreto 7/2014 de 20 de febrero publicado el 24 de febrero de 2014 en el Boletín Oficial de Castilla y León, (Castilla y León, 2014) fue aprobado el Plan de Ordenación de los Recursos Naturales del Espacio Natural Babia y Luna (León), por el que 57.628 hectáreas de las Comarcas de Babia y Luna van a entrar a formar de dicho Parque Natural, y donde en el 85% de su superficie la actividad va a estar limitada (Figura 6) . El punto noveno del Artículo 34 de este Decreto, trata sobre los aprovechamientos y gestión forestal, y se menciona específicamente a la *G. lutea* L. como aprovechamiento no maderero de interés, por cuya explotación la administración deberá velar para que se lleve a cabo de manera sostenible. Sin embargo, esta normativa no recoge Laciana ni Omaña como parte de dicho Parque Natural, algo que estas Comarcas, principales productoras de genciana han venido persiguiendo desde tiempo atrás sin respuesta positiva hasta la fecha.



Figura 6: Extensión del Parque Natural de Babia y Luna. Fuente: <http://goo.gl/5WULE2>

1.5. SITUACIÓN SOCIOECONÓMICA

En este entorno, aunque no únicamente, la minería del carbón ha supuesto fuente principal de economía y actividad dinamizadora para la mayoría de los municipios de la zona durante décadas. Con el paso del tiempo, el uso de este mineral ha cambiado su función, pero según el informe anual elaborado por la petrolera British Petroleum (BP) el carbón en el año 2012 era el segundo recurso energético más utilizado en el mundo (29,9%), únicamente por detrás del petróleo (33,1%)(British Petroleum, 2013). Los recursos carboníferos de León son relativamente importantes, siendo el único mineral energético autóctono, el cual se viene aprovechando desde hace siglo y medio (Hidalgo Morán, 2012). Hoy en día, debido a diferentes causas, esta actividad minera está cesando poco a poco. Causas como la apertura del mercado al carbón de importación, más competitivo y de mayor calidad, la irrupción del petróleo, pasar a formar parte de la CEE, lo que supuso adaptarse a la normativa comunitaria, y la política de la UE de no apoyar económicamente a este tipo de explotaciones, ha hecho que progresivamente el sector pierda integrantes. En 2013, en León según diversas fuentes sólo quedarían 1311 mineros, de los que una parte importante trabajan en el entorno de la zona a estudio. En 2005, eran poco más de 2600, mientras que en 1989 el número de mineros en León rondaba los 11800 (Sánchez Melado, 2007).

Desde aproximadamente el inicio de la segunda mitad del siglo XX, en las zonas rurales y montañosas españolas comenzó un despoblamiento generalizado, algo que no fue así en las zonas mineras, donde este fenómeno se vio retrasado y amortiguado. Las consecutivas crisis del sector y consecuente cese de la actividad, han supuesto, que de manera brusca, este proceso de despoblamiento se desencadene en las comarcas mineras leonesas, con el consiguiente envejecimiento de la población, debido a la falta de adopción de alternativas económicas que permitiesen retener a los jóvenes sin trabajo (Sánchez Melado, 2007). Actualmente en estas comarcas la base económica es la minería, turismo y ganadería.

Otras de las causas del progresivo despoblamiento son las duras condiciones climatológicas y un relativo aislamiento invernal (Sánchez Melado, 2007), unido a que otro de los sectores importantes de la zona, como es la ganadería, ha perdido igualmente mano de obra debido al cierre o modernización de explotaciones y a la disminución de la ganadería trashumante.

Por todo ello parece que el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales, que en esta zona son tan abundantes, el turismo y la explotación de los espacios naturales protegidos ligados a las actividades económicas tradicionales, pueden formar parte del conjunto de las actividades económicas dinamizadoras de esta zona de la montaña leonesa. Y uno de esos recursos naturales es sin duda alguna la genciana, tanto desde su punto de vista de atractivo turístico como por su uso y su transformación.

2. GENCIANA

2.1. GÉNERO *Gentiana* L

Perteneciendo a la familia *Gentianaceae*, el género *Gentiana* L. es el mayor de esta familia. Según la reciente clasificación propuesta Anchisi y Cattaneo (2010)(Tabla 1), derivada de la propuesta por Ho y Liu (2001), el género se compone de 363 especies, añadiendo a esta clasificación la especie *Gentiana brentae*, descubierta por Prosser y Bertolli (2008). Las especies pertenecientes al género *Gentiana* L. están caracterizadas por poseer una distribución cosmopolita, donde más de la mitad de las especies que conforman este género están concentradas en las regiones templadas de Asia (SW de China y NE de Myanmar) (Anchisi y Cattaneo, 2010). El resto de especies se distribuyen principalmente entre Europa, Norte y Centro América, de modo que sólo seis especies se distribuyen entre América del Sur, Norte de África y el Este de Australia (Ho y Liu, 2001).

Según la clasificación realizada por Anchisi y Cattaneo (2010), en Europa se encuentran 33 especies y 12 subespecies, lo que modifica sensiblemente la distribución realizada por Ho y Liu (2001) .

Tabla 1: Secciones del género *Gentiana* L: número de especies y distribución geográfica. Distribución propuesta por Anchisi y Cattaneo (2010) modificada de la propuesta por Ho y Liu (2001)

Sección	Sp	Distribución
<i>Gentiana</i> L.	5	Europe, Turkey
<i>Ciminalis</i> (Adans.) Dum	7	Europe
Calathianae Froel.	8	Europe, NE America, N y O Asia, NO Africa
Chondrophyllae Bunge	163	Europe, Asia, North y Central America, NO Africa, Australia
Cruciata Gaudin	21	Europe, Asia
<i>Kudoa</i> Masam.	28	Kashmir, China, E Asia, Malaysia, Indonesia
<i>Monopodiae</i> (Harry Sm.) T.N. Ho	10	
Otophora Kusn	12	Himalayas, India, China, Myanmar
Isomeria Kusn.	18	E y NE Asia, Himalayas, NO North America
Microsperma T.N. Ho	10	Nepal, Bhutan, SO China
Frigidae Kusn.	18	Europe, Asia, North America
Dolichocarpa T.N. Ho	14	SO China
Fimbricorona T.N. Ho	5	Europe, Asia, North, Central, y South America
Phyllocalyx T. N. Ho	1	Himalayas, SO China
<i>Pneumonanthe</i> (Gled.) Gaudin	42	Myanmar, China, Thailand

Sp: N° de especies que componen la sección

2.2. Sección *Gentiana*

La sección *Gentiana* comprende cinco especies (*G. lutea* L., *G. burseri* Lapeyrouse, *G. punctata* L., *G. purpurea* L. y *G. pannonica* Scopoli) y cinco subespecies además de las especies nominales: *G. lutea* subsp. *lutea*; *G. lutea* L. subsp. *symphyandra* Murbeck; *G. lutea* L. *monserratii* (Vivant ex Greuter) Romo; *G. lutea* L. subsp. *vardjanii* T. Wraber; *G. burseri* Lapeyr. subsp. *burseri*.

La sección *Gentiana* se puede considerar endémica de Europa, estando localizadas en las montañas del centro y sur del continente excepto *G. purpurea*, presente en un área inconexa en el sur de Noruega, y *G. lutea* subsp. *symphyandra* que alcanza Turquía (Anchisi y Cattaneo, 2010).

2.3. *Gentiana lutea* L.

Gentiana lutea L. es la especie tipo, descrita por Linneo (Von Linné y Salvius, 1753).

2.3.1. Características principales (morfología y reproducción)

G. lutea L. es una planta hemicriptofita, de lento desarrollo alcanzando una elevada longevidad. Cada planta puede presentar uno o varios tallos florales no ramificados, cilíndricos, huecos, erectos, lampiños, con estrías longitudinales, de entre 1 y 2 cm de grosor, o más en la base (Renobales, 2003), y de entre 0,5 y 1,5 m de altura pudiendo encontrarse ejemplares de hasta 2 m.

Las hojas basales son pecioladas, opuestas y ovaladas apuntadas. Las inferiores más grandes, de hasta 30 centímetros de longitud por 15 centímetros de anchura, y enteramente lampiñas. Cada hoja tiene de cinco a siete nervios bien marcados, que arrancan de la base, se arquean y confluyen en el extremo de la lámina. Las hojas de lo alto del tallo son mucho más cortas y abrazadoras (Font Quer, , 1999). Desde las axilas de las hojas de la mitad superior del tallo floral hasta el ápice del mismo se disponen las flores en verticilos.

Las flores son hermafroditas, pediceladas y de color amarillo excepto en *G. lutea* L. var. *aurantiaca* (de anaranjadas a rojizas). Cada flor presenta un cáliz dividido coronado por entre 2 y 7 dientes y una corola gamopétala formada por entre 3 y 9 lóbulos profundamente divididos. Las anteras generalmente son libres, excepto en *G. lutea* subsp. *symphyandra* (Rossi, 2011).

Las brácteas de las flores son de color verde y su longitud es similar a la de los verticilos, excepto para *G. lutea* subsp. *vardjanii*. El fruto es una cápsula que contiene un gran número de semillas (Struwe y Albert, 2002), estando compuesto este por dos carpelos que maduran y se separan entre finales de agosto y principios de septiembre.

Las semillas, de color marrón claro, tienen forma discoidal, son aplanadas y aladas, variando el peso de 1000 de ellas entre 0,7 y 1,7 g. Estas semillas poseen una dormancia

que dificulta su germinación, teniendo además una breve duración de su capacidad germinativa, (Aiello y Bezzi, 1998). De acuerdo con Struwe y Albert (2002), el viento (dispersión anemócora) es el principal vector de dispersión de las semillas, que sucede cuando los carpelos del fruto maduro se separan. La primera floración se puede dar a partir de los 5 o 6 años de edad de la planta, y ésta se produce entre junio y principios de agosto.

G. lutea es una especie autoincompatible, y por tanto depende principalmente de la polinización por insectos para producir semillas (Bucher, 1987, Hegi, 1927), siendo realizada esta polinización principalmente por abejas y avispa (Renobales, 2003, Kozuharova, 1997) y abejorros (*Bombus* sp.) (Figura 7). Además de la reproducción sexual, *G. lutea* L. se multiplica por vía vegetativa mediante la extensión de su sistema radicular asegurando el crecimiento y persistencia de las poblaciones (Hesse et al., 2007), por lo que incluso, grandes poblaciones pueden estar representados por pocos individuos. Su raíz, de hasta un metro de longitud, puede sobrepasar los 8 cm de grosor. Presenta unos entrenudos muy cortos. Su apariencia exterior varía con la edad teniendo un color que va pasando del amarillento al pardo. Su color interior es amarillento ocráceo. Posee un olor fuerte y un sabor especialmente amargo.



Figura 7: Abejorros (*Bombus* sp.) sobre flores de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

2.3.2. Ecología

La *G. lutea* se encuentra en los pastizales y laderas de la montaña en los pisos altimontano y subalpino del centro y sur de Europa y de Asia Menor. En Italia, se localiza en los Apeninos y los Alpes; en Francia en los montes del Jurá, en el Macizo Central (en poblaciones como Auvergne), y en los Alpes; en Alemania en Baviera; en la región de los Balcanes y en los Cárpatos. En España se encuentra en el Pirineo, desde Cataluña hasta el País Vasco; en la Cordillera Cantábrica hasta Galicia; en las montañas del Sistema Central; y en Portugal en la Serra da Estrêla (Aiello y Bezzi, 1998).

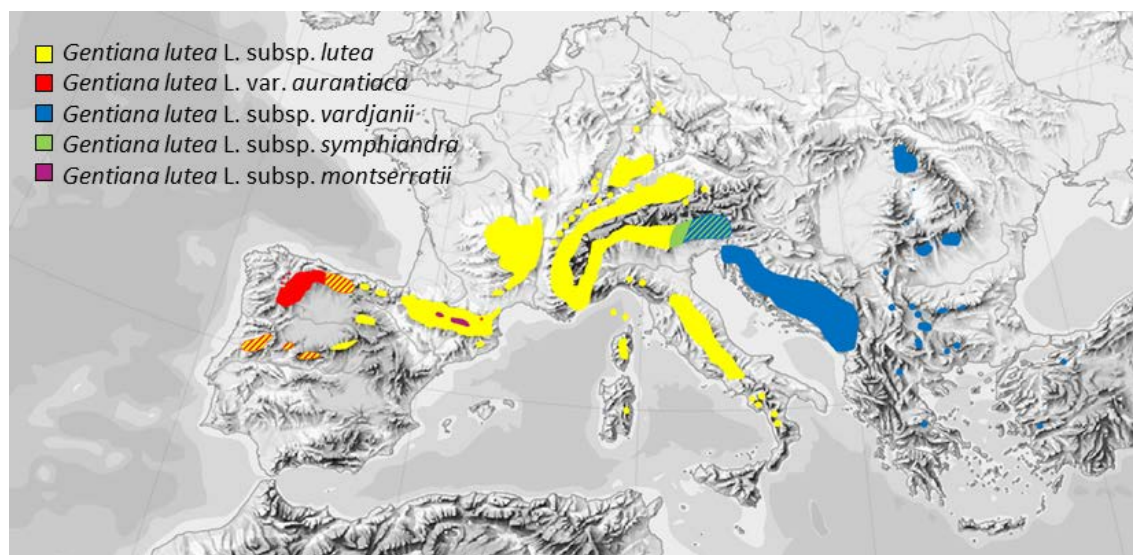


Figura 8: Distribución de *G. lutea* L. en Europa. Mapa modificado a partir del elaborado por Meusel et al.(1978)

Crece frecuentemente entre los 800 y 1800m: Alpes (1300-1900 m), Auvernia (1800 m) Cárpatos (900-2300m), Pirineos y otras regiones montañosas de elevada pluviosidad del Norte de España (Villar, 1980; Bolós et al., 1990). En León, en estado silvestre, no es frecuente encontrarla por debajo de los 1300 m. Precisa de suelos frescos con una climatología suficientemente lluviosa. Prefiere zonas soleadas y luminosas, ya que se trata de una planta heliófila. Por su fisiología y su hábitat está adaptada a periodos de sequía así como a estancias prolongadas debajo del manto de la nieve. Prefiere suelos profundos y francos, turbosos y ligeramente humíferos. Generalmente *G. lutea* L. crece sobre sustratos de origen calcáreo (Anchisi y Cattaneo, 2010) aunque es posible encontrarla en suelos cuya matriz es silíceo (Bezzi et al., 1987). Respecto de la variedad *aurantiaca* en este estudio únicamente ha sido observada creciendo sobre sustratos de origen silicio con valores de pH entre el 3,8 y el 4,7 (González et al., 2012), mientras que los valores de pH obtenidos por Bezzi, et al.(1987) (presumiblemente *G. lutea* L. subsp. *vardjanii*) varían entre 7 y 7,5.

En León suele estar acompañada de una importante flora asociada como escobas, piornos, arandaneras, carqueixas, pastizal y formando parte del sotobosque de robles, abedules y serbales.

2.4. SUBESPECIES Y VARIEDADES

2.4.1. *Gentiana lutea* L. subsp. *lutea*

Su descripción coincide con la especie tipo. Se extiende por toda el área de difusión excepto la península de los Balcanes (Tutin et al., 1972), los Alpes Orientales (Wraber, 1986) y el extremo noroccidental de la Península Ibérica (Figura 9A).

2.4.2. *Gentiana lutea* L. subsp. *symphyandra* Murbeck

La característica principal que diferencia a la subsp. *symphyandra* respecto de la subsp. *lutea* es la presencia de las anteras soldadas formando una estructura tubular (Figura 9B).

Esta subespecie se encuentra distribuida en las estribaciones surorientales de los Alpes, Alpes Dináricos, en los Montes Balcanes y en Grecia (Anchisi y Cattaneo, 2010).

2.4.3. *Gentiana lutea* L. subsp. *vardjanii* T. Wraber

Esta subespecie, de reciente individualización, difiere de la subsp. *lutea* por la presencia de las hojas superiores de color amarillo verdoso (en lugar de verde), y en las axilas de estas hojas se encuentran las inflorescencias, que llegan a ser mucho más cortas que dichas hojas (Figura 9C). Otra característica es la no presencia de internudos entre las hojas que conforman el tallo vegetativo no reproductivo, como muestra gráficamente Rossi (2011) en su tesis doctoral. Esta subespecie crece preferiblemente en prados, pastos y en zonas vegetadas de pedregales del sudeste de los Alpes italianos, Carintia (Austria) y Eslovenia (Anchisi y Cattaneo, 2010).

En los lugares que coexiste con la subsp. *symphyandra*, la subsp. *vardjanii* presenta una floración precoz, entre 2 y 3 semanas antes que la primera (Wraber, 1986, Vender et al., 2010). Tanto el tallo floral (80 cm) como las flores son de un tamaño inferior al de la subsp. *symphyandra* (Vender et al., 2010).

2.4.4. *Gentiana lutea* L. subsp. *montserratii* (Vivant ex Greuter) Romo

Dedicada al Prof. Dr. Pedro Monserrat Recorder, botánico y ecólogo, con numerosas publicaciones acerca de la flora y vegetación de los Pirineos. Esta subespecie, endémica de los pirineos, difiere de la subsp. *lutea* por poseer una talla menor (0,5-1m), flores largamente pedunculadas (2-3 cm), con una corola que presenta entre 6 y 7 lóbulos aovado-elípticos y con un tamaño mayor de los granos de polen (Vivant, 1975) (Figura 9D). Es posible encontrarla en varias zonas del prepirineo (Sierra de Leyre, San Juan de la Peña de Oroel hasta Cadí) y en algún punto del Pirineo Central (Ordesa, Vall de Boí y Vall Ferrera), en bosques abiertos de coníferas sobre suelos calcáreos entre 1100 y 2500 m de altitud (Anchisi y Cattaneo, 2010).

2.4.5. *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* (M. Lainz) M. Lainz

Catalogada por Renobales (2003) como variedad, anteriormente había sido catalogada por Laínz (1982) como *Gentiana lutea* subsp. *aurantiaca* M. Laínz, o como *Gentiana aurantiaca* (M. Laínz) (Silva et al., 2000). La variedad *aurantiaca* se caracteriza por la coloración de sus pétalos, que va desde el anaranjado al rojizo (Figura 9E).



Figura 9: (A) *G. lutea* L. subsp. *lutea*. (B) *G. lutea* L. subsp. *symphyandra* Murbeck; Autor: Dr Amatej Trnkoczy. <http://goo.gl/UjpdT0> (C) *G. lutea* L. subsp. *vardjanii* T. Wraber. Autor: Graziano Propetto. <http://goo.gl/WicGLO> (D) *G. lutea* L. subsp. *montserratii* (Vivant ex Greuter) Romo. Autor: José Carlos Alfranca. <http://goo.gl/olp7UZ> (E) *G. lutea* L. var. *aurantiaca* (M. Lainz) M. Lainz

Según Renobales (2003), aparte de la coloración de los pétalos no existen otras diferencias morfológicas significativas respecto de la subsp. *lutea*. Según observaciones (datos propios), la variedad *aurantiaca*, al igual que la subespecie *vardjanii* (Rossi, 2011), no presenta internudos entre las hojas que conforman el tallo vegetativo no reproductivo. La distribución geográfica de la variedad *aurantiaca* no está aún bien definida, pero se puede considerar que se reduce al noroeste de la Península Ibérica, siendo la Cordillera Cantábrica donde es más abundante y su color rojizo más intenso. Renobales (2003) cita como zona de distribución el área situada entre el extremo oeste de la Cordillera Cantábrica y el Sistema Central desde, la Serra da Estrela hasta el Macizo de Ayllon. También existen citas de plantas con las mismas características en el Lago Laurenti (Anchisi y Cattaneo, 2010), situado en el Pirineo Oriental.

2.5. USOS

Además de los citados usos medicinales, la raíz de genciana se utiliza sola o formando parte de los ingredientes en la elaboración de bebidas alcohólicas “bitters” y vermouths (bebidas aperitivas), bebidas no alcohólicas, en la elaboración de postres e infusiones (Leung, 1980). Existe una recopilación con innumerables bebidas que incluyen la genciana como ingrediente (Struwe, 2011). Otros usos son los de la elaboración de productos antitabaco (Leung, 1980) y en la elaboración de productos cosméticos. Sin duda alguna en Francia existe una larga tradición de este tipo de bebidas alcohólicas aperitivas (Figura 10).



Figura 10: Ejemplos de algunas de las bebidas elaboradas con *G. lutea* L.

La utilización de los extractos de raíz de genciana en bebidas amargas como sustituta de la corteza de quina (cuya utilización en la alimentación está limitada a la concentración final de quinina), ha llevado al desarrollo de varias patentes industriales (Piampiano, 1980, Molitoris, 1981, Busch-Stockfish y Domke, 1993).

En veterinaria se ha usado tradicionalmente como cicatrizante, antiparasitario y para estimular los animales a comer más, utilizándolo como aditivo en piensos. Como otros usos, podemos nombrar que era utilizada en la Edad Media como antídoto contra las picaduras de serpientes.

2.6. PROPIEDADES

El uso de la genciana se debe principalmente a los compuestos amargos (glucósidos secoiridoides) que contiene la planta. Estos compuestos se encuentran de forma mayoritaria en su raíz, la cual es la base de su uso farmacéutico “*Radix Gentianae*”.

La utilización de la genciana con fines medicinales proviene de la antigüedad, así como su nombre, ya que según la tradición, el Rey Gentio de Illiria (siglo II a.C.), fue el

primero en usarla con tales fines, en su caso frente a la peste (Tucakov, 1961), hecho atribuido por los autores clásicos Dioscórides y Plinio (Heltmann, 1967).

En la medicina tradicional, la raíz de genciana ha sido utilizada como estimulante del apetito, para mejorar las digestiones, y en el tratamiento de diversos problemas gastrointestinales (dolor de estómago, acidez, gastritis, diarrea, vómitos, etc) (Leung, 1980). Este uso es debido principalmente al sabor amargo que le aportan los glucósidos secoiridoides como son la amarogentina, (Korte, 1955, Inouye y Nakamura, 1971), gentiopicrosido (Inouye et al., 1970), swertiamarina (Inouye et al., 1970), o swerosido (EMA, 2009). Además de los mencionados anteriormente, estos y otros compuestos revelan propiedades antiinflamatorias, antitumorales y hepatoprotectivas (Ghisalberti, 1998), cicatrizantes (Ozturk et al., 2006), antifúngicas y antibacteria (Siler et al., 2010), así como actividad antioxidante (Jaishree y Badami, 2010). También se ha comprobado el efecto protector de la isogentisina xantona de la *G. lutea* L contra el daño endotelial causado por el consumo del tabaco (Schmieder et al., 2007). Además de estos, se atribuyen a los compuestos de la *G. lutea* L propiedades potenciales en el tratamiento de otras afecciones (EMA, 2009)

2.7. NORMATIVA

El incremento de la demanda de las plantas medicinales unido, en ocasiones, a otras circunstancias socioeconómicas y culturales, ha llevado en algunos casos a su recolección indiscriminada, cuyo resultado ha sido la regresión de la especie en algunas regiones, tanto de España como de Europa. Por ello, se encuentra legalmente protegida en toda Europa, aunque no existe una legislación uniforme, de modo que esta puede variar entre países, e incluso, como ocurre en el caso de España, entre las diferentes comunidades.

A nivel europeo, la *G. lutea* L. aparece citada en la Directiva 92/43 CEE de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales, de la fauna y flora silvestres (Unión Europea, 1992). Además, el Reglamento 338/97 CEE (modificado por multitud de reglamentos), relativo a la protección de especies de la fauna y flora silvestres mediante el control de su comercio, regula los aspectos de aprovechamiento y comercialización de la genciana entre otras plantas. En España, el aprovechamiento de la genciana está regulado, de igual manera que el de cualquier otra planta, tanto por la Ley 4/89 de Conservación de los Espacios Naturales y de la Flora y Fauna Silvestres, (derogada el 15 de diciembre de 2007 por la Ley 42/2007 del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad (España, 2007)), como por la Ley de Montes Ley 43/2003, de 21 de noviembre (Castilla, 2003).

A su vez, en Castilla y León, la genciana se encuentra en la categoría “con aprovechamiento regulado” (Castilla y León, 2007), donde se incluyen las especies cuyo uso, aprovechamiento o recolección incontrolados pueden poner en riesgo la supervivencia de sus poblaciones. Las especies incluidas en dicha categoría no podrán ser recolectadas sin la autorización administrativa previa de la Consejería de Medio Ambiente. Dicha autorización será emitida por la Dirección General de Medio Natural,

indicando las cantidades que se permite recolectar, el ámbito territorial y el periodo de tiempo para realizar el aprovechamiento.

2.8. COMERCIO

Según diferentes fuentes, existe un incremento en la demanda de raíz de genciana. En su estudio, Aiello y Bezzi (1998) citan datos de (Franz, 1982) donde se cuantifica en 5000 toneladas el consumo de raíz fresca anual, de las cuales 2500 toneladas se recolectaban en Francia a partir de poblaciones silvestres y con aproximadamente 100 hectáreas en cultivo. Mientras, Lange. (1998), cifraban este consumo en 6000 toneladas de raíz fresca al año, lo que supone en torno de las 1500 toneladas de raíz seca.

El origen actual de esta materia prima se centra en las montañas de los países de la antigua Yugoslavia, (principalmente Kosovo, Macedonia o Albania). Y es que, el mayor problema, tanto para la genciana como para otras plantas de interés, lo representa la recolección ilegal, debido a la falta de control e inspecciones para la recogida y comercialización de plantas silvestres, ya que es bien conocido que se siguen recolectando y comercializando a través de canales del mercado negro (Zora et al., 2012). El hecho de la regresión de grandes extensiones de genciana en esta parte de Europa ya fue constatado por Tucakov (1961) antes de poner en marcha planes de conservación. Si esta presión recolectora sigue la actual tendencia, a medio plazo las miras se podrían volver a otros lugares de Europa donde aún está permitida su recolección como son algunas partes de España, siendo León un tradicional exportador de raíz de genciana a distintas partes de Europa.

En la provincia de León la raíz de genciana ha sido comercializada desde hace décadas, siendo el noroeste de la provincia la zona donde se ha explotado con más intensidad. Según diferentes habitantes de la zona, en algunos de los municipios, la genciana llegaba a suponer el 70% de la renta familiar, e incluso los comerciantes y habitantes que cruzaban las montañas desde Asturias recolectaban estas raíces en su viaje hasta los valles, donde la utilizaban como moneda de cambio, o para obtener beneficios que invertir en otros bienes.

En la actualidad, y siempre a través de vías no oficiales, se puede constatar la opacidad de un mercado que funciona como un oligopolio en el que muy pocos intermediarios constituyen las únicas posibilidades de venta de la genciana a la industria transformadora, siendo por lo tanto estos intermediarios quienes marcan los precios de venta. En todos los casos conocer los márgenes que manejan estos intermediarios ha sido imposible.

Los precios de la genciana desde el inicio del siglo XXI han ido en franca regresión, con máximos en torno a los tres euros kilogramo de raíz seca (2006-2007), estando en la actualidad en torno a poco más de un euro por kilogramo, siempre según fuentes extraoficiales. La variabilidad de los precios ha supuesto que algunos recolectores, apostando por mayores precios en años venideros, hayan almacenado stocks de genciana, lo cual no ha sucedido, por lo que esta genciana permanece almacenada perdiendo calidad

año tras año. Esta genciana almacenada tampoco es fácil de ver, ya que los recolectores se muestran recelosos, dando idea de que posiblemente existan desfases entre las cantidades que la administración ha autorizado recolectar y las realmente almacenadas.

Según datos oficiales proporcionados por el servicio territorial de Medio Ambiente de León perteneciente a la Junta de Castilla y León ¹, en la provincia de León se continua recolectando genciana silvestre, como muestra la evolución de la recolección en la provincia de León desde inicio de siglo (Figura 11), donde coincidiendo con los precios más elevados se inició el incremento de la petición de licencias de recogida y la cantidad de raíz recolectada, y de igual manera, a medida que su precio descendió, las cantidades recolectadas han descendido en gran medida.

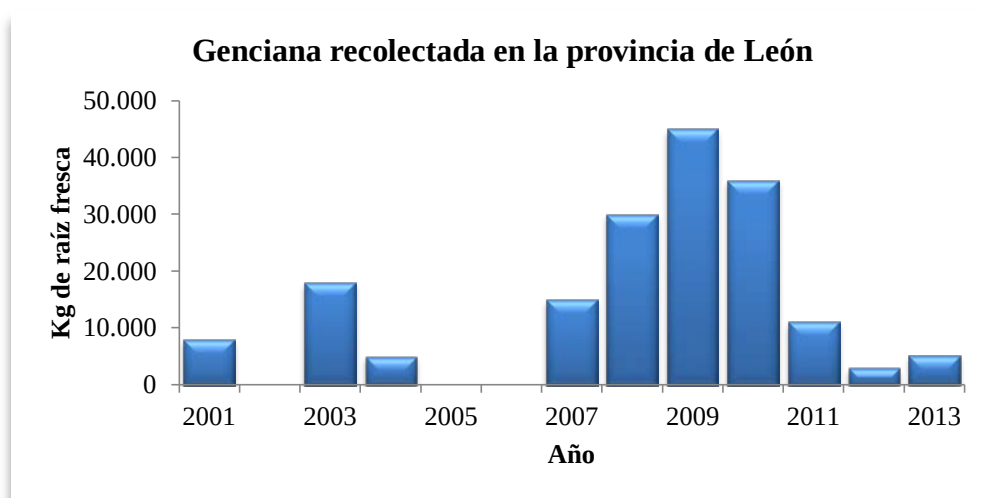


Figura 11: Cantidad de raíz fresca de *G. lutea* L. recolectada en la provincia de León desde el año 2001

En total se han recogido en los últimos catorce años 175601 kilogramos de raíz fresca, destacando que únicamente en el municipio de Llánaves de la Reina se permitió la extracción de 90000 kilogramos, más del 50% de lo recolectado. En este periodo se han expedido un total de 26 licencias, de las cuales 19 corresponden a las comarcas de Babia y Laciana, tres al valle del río Curueño y cuatro a la Montaña oriental, dejando claro que aún hoy permanece vigente la tradición recolectora en las comarcas occidentales.

Si según los datos la demanda global aumenta, pero los precios disminuyen, puede ser debido al origen de la oferta actual, donde los costes de mano de obra son menores, lo que permite un ligero respiro para las poblaciones silvestres de genciana de León en los últimos años.

Si la evolución de la demanda continua la actual tendencia, en algún momento no muy lejano, la recolección silvestre de la genciana no será posible en toda Europa, debido a la desaparición de la planta de algunas zonas o su limitación a pequeñas zonas no aprovechables, o por otro lado, por la adopción de medidas de conservación que impidan su recolección. Y es que, de las poblaciones de genciana localizadas en la provincia de

¹ Datos obtenidos a fecha 28/03/2014, enviados por el Servicio Territorial de Medio Ambiente de León

León, las de mayor superficie están localizadas en zonas alejadas de los cascos urbanos y de difícil acceso, por lo que el coste de extracción no ha hecho rentable su explotación en los últimos años, pero una nueva subida de los precios, al igual que ha sucedido con otras materias primas, podría significar un aumento significativo de su explotación.

3. BIBLIOGRAFIA

- AIELLO, N. & BEZZI, A. 1998. Genziana maggiore (*Gentiana lutea* L.): aspetti biologici, qualitativi e produttivi. *Agricoltura Ricerca* XX (176) : 8-17.
- ANCHISI, E. & CATTANEO, F. 2010. *Genziane d'Europa*, Verba&Scripta.
- APROGEN Véase Asociación Promotora de la Genciana y otras plantas de interés de la montaña occidental leonesa.
- ASOCIACIÓN PROMOTORA DE LA GENCIANA Y OTRAS PLANTAS DE INTERÉS DE LA MONTAÑA OCCIDENTAL LEONESA, A. 2006. *Estatutos de APROGEN* [Online]. Available: <http://goo.gl/5NbaSl> [Accessed 20/12/2013 2013].
- BEZZI, A., AIELLO, N. & M., T. 1987. La coltivazione di *Gentiana lutea* L. nell'ambito del progetto "Piante officinali" del Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste. *Atti del Convegno su "La coltivazione delle piante officinali"*. Trento.
- BRITISH PETROLEUM. 2013. *BP Statistical Review of World Energy 2013* [Online]. Available: <http://goo.gl/I0mGk2> [Accessed 10/01/2014 2014].
- BUCHER, T. 1987. *Biosystematische Untersuchungen an Gentiana lutea L., Gentiana purpurea L. und deren Hybriden* [Biosystematic investigations on *Gentiana lutea* L., *Gentiana purpurea* L. and their hybrids]. University of Zürich.
- BUSCH-STOCKFISCH, M. & DOMKE, A. 1993. Sensorische Beurteilung des Bittergeschmacks von Amarogentin und Austauschmöglichkeiten gegen Chinin in Erfrischungsgetränken 2. Einfluß von Saccharin Na/Fructose und Citronensäure. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 196, 255-258.
- CASTILLA 2003. Ley 43/2003, de 21 de noviembre, de Montes. *Boletín Oficial del Estado*, 280 (22/11/2003), 41422-41442.
- CASTILLA Y LEÓN 2007. Decreto 63/2007, de 14 de junio, por el que se crean el Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León y la figura de protección denominada Microrreserva de Flora. *Boletín Oficial de Castilla y León*, 119 (20/06/2007), 13197-13204.
- CASTILLA Y LEÓN 2014. Decreto 7/2014, de 20 de febrero, por el que se aprueba el Plan de Ordenación de los Recursos Naturales del Espacio Natural «Babia y Luna» (León). *Boletín Oficial de Castilla y León*, 37 (24/02/2014), 11945-12014.
- EMA Véase European Medicines Agency.
- ESPAÑA 2007. Ley 42/2007 del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad. *Boletín Oficial del Estado*, 299 (14/12/2007), 51275-51327.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS 2009. Assessment report on *Gentiana lutea* L., radix. (Doc. Ref.:EMA/HMPC/578322/2008). London, UK.
- FRANZ, C. 1982. Esperienze sulla coltivazione di *Gentiana lutea* L.. Convegno Internazionale "La coltivazione di piante aromatiche ed officinali nell'Appennino

- Settentrionale: possibilità e prospettive". *Atti del Convegno Internazionale*. Borgo Val di Taro, Italy.
- GARCÍA, M. J., HERNÁNDEZ, A., LIÑÁN, O. & MÉNDEZ, G. 2004. Estudio sobre el aprovechamiento de la genciana (*Gentiana lutea* subsp. *lutea*.) y otras plantas de interés económico en la montaña occidental leonesa.
- GHISALBERTI, E. L. 1998. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine*, 5, 147-163.
- GONZÁLEZ, O., MAYO, S., RODRÍGUEZ, A. & CASQUERO, P. A. 2012. Effect of soil in the growth of *Gentiana lutea* radical system in north mountain of León (Spain). *Acta Horticulturae*, 955, 281-285.
- HEGI, G. 1927. *Illustrierte Flora Von Mitteleuropa*, München, Germany, J.F. Lehmanns-Verlag
- HELTMANN, H. 1967. La gentiane (*Gentiana lutea*): une importante plante médicinaleet alimentaire.: Nature Série Biologie.
- HESSE, E., REES, M. & MÜLLER-SCHÄRER, H. 2007. Seed bank persistence of clonal weeds in contrasting habitats: implications for control. *Plant Ecology*, 190, 233-243.
- HIDALGO MORÁN, S. 2012. La montaña occidental leonesa: Entre el declive de la minería y la despoblación. La oportunidad de los espacios protegidos. XXXVIII Reunión de Estudios Regionales: The Challenge of Regional Development in a World of Changing Hegemonies: Knowledge, Competitiveness and Austerity. Bilbao.
- HO, T. & LIU, S. 2001. *A worldwide monograph of Gentiana*, Science Press.
- INE Véase Instituto Nacional de Estadística.
- INOUE, H. & NAKAMURA, Y. 1971. Monoterpene glucosides and related natural substances.14. Structure of 2 very bitter tasting glicosides amarogentin and amaroswerin from *Swertia Japonica*. *Tetrahedron*, 27, 1951-&.
- INOUE, H., UEDA, S. & NAKAMURA, Y. 1970. Monoterpene glucosides .10. Secoiridoid glucosides from *Swertia japonica* - Isolation of 5 secoiridoid glucosides and structural elucidation of swerisudem - swertiamarine and gentiopicroside. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 18, 1856-1865.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA. 2013. *Padrón. Población por municipios* [Online]. Available: <http://goo.gl/GTEK0x> [Accessed 9/01/2014 2014].
- JAISHREE, V. & BADAMI, S. 2010. Antioxidant and hepatoprotective effect of swertiamarin from *Enicostemma axillare* against D-galactosamine induced acute liver damage in rats. *J Ethnopharmacol*, 130, 103-6.
- JUNTA DE CASTILLA Y LEÓN, C. D. M. A. 2006. *Memoria del Plan 42: Un programa integral para la prevención de incendios forestales*. Available: <http://goo.gl/f8Y0Bo> [Accessed 03/01/2014].
- KORTE, F. 1955. Amarogentin, ein neuer bitterstoff au aus gentianaceen - charakteristische pflanzeninhaltsstoffe .9. *Chemische Berichte-Recueil*, 88, 704-707.
- KOZUHAROVA, E. 1997. Wild bees as pollinators of four *Gentiana* species on Mount Vito sa (Bulgaria). *Boccone*, 5, 619-623.

- LAINZ, M. Mis contribuciones al conocimiento de la flora de Asturias. 1982 Oviedo, Spain. Diputación Provincial de Asturias, Instituto de Estudios Asturianos (del C.S.I.C.), 61-62.
- LANGE, D. & NETWORK, I. T. 1998. *Europe's medicinal and aromatic plants: their use, trade and conservation*, Traffic International.
- LEUNG, A. Y. 1980. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*, Wiley.
- MEUSEL, H., JÄGER, E. J., RAUSCHERT, S. W. & WEINER, E. 1978. Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora vol 2. Jena, German Democratic Republic: VEB Fischer.
- MOLITORIS, K. 1981. Alternative für Chinin in Bittergetränken. *Branwelt*, 121, 323-335.
- OZTURK, N., KORKMAZ, S., OZTURK, Y. & BASER, K. H. C. 2006. Effects of gentiopicroside, sweroside and swertiamarine, secoiridoids from gentian (*Gentiana lutea* ssp. *symphyandra*), on cultured chicken embryonic fibroblasts. *Planta Medica*, 72, 289-294.
- PIAMPIANO, C. 1980. *Means and method improving taste of saccharine sweetened food products*. . Estados Unidos patent application 4219579.
- PROSSER, F. & BERTOLLI, A. 2008. A new species of *Gentiana* sect. Calathianae (Gentianaceae) from the Brenta Group, European Alps, Italy. *Willdenowia - Annals of the Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem*, 38, 423-431.
- QUER, P. F. 1999. *Plantas Medicinales: El Dioscórides Renovado*, Península.
- RENOBALES, G. 2003. Notas acerca del tratamiento de las Gentianaceae para "Flora Ibérica". 60 (2), 461-469.
- ROSSI, M. 2011. *Taxonomy, phylogeny and reproductive ecology of Gentiana lutea L.* PhD in Biodiversity and Evolution, University of Bologna.
- SCHMIEDER, A., SCHWAIGER, S., CSORDAS, A., BACKOVIC, A., MESSNER, B., WICK, G., STUPPNER, H. & BERNHARD, D. 2007. Isogentisin - A novel compound for the prevention of smoking-caused endothelial injury. *Atherosclerosis*, 194, 317-325.
- SILER, B., MISIC, D., NESTOROVIC, J., BANJANAC, T., GLAMOCLIIJA, J., SOKOVIC, M. & CIRIC, A. 2010. Antibacterial and Antifungal Screening of *Centaureum pulchellum* Crude Extracts and Main Secoiridoid Compounds. *Natural Product Communications*, 5, 1525-1530.
- SILVA, F. J., GÓMEZ, F., GARCÍA, X. R. & BLANCO-DIOS, J. B. 2000. Aportacions a flora de Galicia. *Nova Acta Científica Compostelana. Biología*, VI, 21-33.
- STRUWE, L. 2011. *Gentian Research Network* [Online]. 2013].
- STRUWE, L. & ALBERT, V. A. 2002. *Gentianaceae: Systematics and Natural History*, Cambridge University Press.
- SÁNCHEZ MELADO, J. 2007. La reestructuración de la minería leonesa. *Pecunia*. León: Universidad de León.
- TUCAKOV, J. 1961. *Gentiana lutea* L. in Yugoslavia. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, 8, 363-366.

- TUTIN, T. G., HEYWOOD, V. H., BURGESS, N. A., VALENTINE, D. H., WALTERS, S. M. & WEBB, D. A. 1972. *Flora Europaea*, Cambridge University Press.
- UNIÓN EUROPEA 1992. Directiva 92/43/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres *Diario Oficial de la Unión Europea L*, 206 (22/07/1992), 7-50.
- VENDER, C., AIELLO, N. & PIOVESANA, S. 2010. Survey of yellow gentian populations of the Central Alps and record of their main morphological and qualitative characteristics. *Acta Hort (ISHS)*, 860, 101-104.
- VIVANT, J. 1975. *Gentiana montserratii*, species nova, dans les Pyrenees occidentales de la province de Huesca (Espagne). *Bull. Soc. Bot. France*, 122(7-8), 331-337.
- VON LINNÉ, C. & SALVIUS, L. 1753. *Caroli Linnaei ... Species plantarum :exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*, Holmiae, Impensis Laurentii Salvii.
- WRABER, T. 1986. Košutnik, in to Vardjanov, *Gentiana lutea* ssp *vardjanii*. *Proteus* 48:341-348.
- ZORA, D. S. P., SVETLANA, A. B. & MILICA, P. S. 2012. Conservation of diversity of medicinal and aromatic plants in Southeast Europe: current state and future challenges. In: STEVANOVIĆ, Z. D. & RADANOVIĆ, D. (eds.) *Proceedings of the Seventh Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, (Proceedings of the 7th CMAPSEEC), Subotica, Serbia, 27-31 May, 2012*. Belgrade; Serbia: Institute for Medicinal Plant Research and Association for Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (AMAPSEEC).



CAPÍTULO I

**Estudio de la variabilidad genética de las
poblaciones cantábricas de
Gentiana lutea L. var. *aurantiaca*
(M. Lainz) M. Lainz.
mediante marcadores moleculares ISSR**

CAPÍTULO I

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE.....	47
II. ÍNDICE DE FIGURAS	49
III. ÍNDICE DE TABLAS.....	49
1. INTRODUCCIÓN.....	51
1.1. MARCADORES MOLECULARES.....	51
1.1.1. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)	53
1.1.2. RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA)	53
1.1.3. SSRs (Microsatélites o <i>Simple Sequence Repeats</i>)	54
1.1.4. ISSRs (Inter-simple sequence repeat polymorphisms).....	54
1.1.5. AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms)	55
2. OBJETIVOS.....	57
3. MATERIAL y MÉTODOS	59
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	59
3.2. EXTRACCIÓN DE DNA	63
3.3. AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES ISSR.....	64
3.4. ANÁLISIS DE DATOS	65
4. RESULTADOS	69
5. DISCUSIÓN.....	75
6. CONCLUSIONES.....	79
7. CONCLUSIONS.....	81
8. BIBLIOGRAFÍA.....	83

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Detalle del almacenamiento de las raíces de <i>G. lutea</i> L. desecadas.	59
Figura 2: Mapa de localización de las poblaciones de <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>lutea</i> ., <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>vardjanii</i> y <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> muestreadas.....	61
Figura 3: NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA) (A) y lícuotas de ADN homogeneizado a 100 ng/μl en tubos de PCR (B).....	64
Figura 4: Detalle del termociclador (A) y equipo de toma y procesamiento de imágenes de las electroforesis (B)	65
Figura 5: Análisis de bandas mediante el uso del software Total Lab 1.2 (TotalLab Ltd [®] , United Kingdom).....	66
Figura 6: Perfiles ISSR (marcador UBC 812) de varios individuos de <i>G. lutea</i> L. a estudio.....	69
Figura 7: Perfiles ISSR (marcador UBC 825) de varios individuos de <i>G. lutea</i> L. a estudio.....	69
Figura 8: Perfiles ISSR (marcador UBC 827) de varios individuos de <i>G. lutea</i> L. a estudio.....	70
Figura 9: Perfiles ISSR (marcador UBC 842) de varios individuos de <i>G. lutea</i> L. a estudio.....	70
Figura 10: Cladogramas obtenidos mediante el método de neighbour-joining para las poblaciones de <i>G. lutea</i> L. a partir de la distancia genética de Nei (A) y la distancia 1– Q_{xy} (B). P^*	72
Figura 11: Representación gráfica del análisis de coordenadas principales (PCoA)	73
Figura 12: Probabilidad de asignación a cada uno de los cinco grupos obtenidos mediante aproximación Bayesiana (<i>Structure</i> , versión 2. 3.4)	74

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de varios marcadores moleculares basados en ADN	53
Tabla 2: Poblaciones de <i>G. lutea</i> L. muestreadas.	60
Tabla 3: Secuencias de los cebadores ISSR de UBC (University of British Columbia) utilizados.....	64
Tabla 4: Variación genética detectada en las poblaciones de <i>G. lutea</i> L. mediante marcadores ISSR (inter-simple sequence repeat).	71

1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la diversidad y la estructura genética de las poblaciones es especialmente importante en especies de plantas amenazadas, ya que permite adoptar prácticas de conservación efectivas y eficientes, además de orientar en la toma de decisiones en cuanto a su manejo genético. Aunque existen diferentes estudios botánicos (Ho y Liu, 2001, Struwe et al., 2002) y fitoquímicos (Carnat et al., 2005) sobre *Gentiana lutea* L., la variabilidad genética a nivel de poblaciones continúa siendo desconocida hasta la fecha. Hoy en día, dado que es posible utilizar diferentes métodos moleculares para el análisis de la variabilidad genética en especies de plantas, tal y como se describe en los siguientes epígrafes, se abren nuevas posibilidades de estudio.

1.1. MARCADORES MOLECULARES

En diferentes publicaciones podemos encontrar diversas definiciones acerca de “marcadores moleculares” con matices distintos. Una de ellas los define como *“biomoléculas que son representativas de las diferencias a nivel del genoma, de manera que pueden o no correlacionarse con la expresión fenotípica de un rasgo”* (Agarwal et al., 2008).

Actualmente existe un amplio número de marcadores moleculares, pudiendo clasificarlos en dos grupos principales: los marcadores bioquímicos y los marcadores basados en ADN.

Entre **los marcadores bioquímicos**, se incluyen las proteínas sin actividad enzimática y las isoenzimas o aloenzimas, constituyendo este grupo la primera generación de marcadores moleculares. Las isoenzimas, descubiertas por Hunter y Markert en 1957, son diferentes variantes moleculares de una misma enzima presentes en una especie, las cuales desempeñan la misma actividad pero pueden tener diferentes propiedades. Estos marcadores tienen la ventaja de que la técnica es relativamente barata, accesible y no destructiva debido a que utiliza pequeñas cantidades de material vegetal.

Así mismo, es conocido o se puede establecer el control genético de la mayoría de las isoenzimas utilizadas, y por lo tanto es posible realizar inferencias genéticas a partir de los patrones de bandas observados en los geles de separación electroforética. Por otro lado, las isoenzimas tienen una base genética codominante, son selectivamente neutrales y están libres de efectos deletéreos, efectos pleiotrópicos y/o epistáticos.

Aunque han sido muy importantes en diferentes áreas, las isoenzimas han tenido un uso limitado debido a que presentan ciertos problemas técnicos, no permiten cubrir todo el genoma, y además solo permiten detectar variaciones de los genes codificantes que se expresan en un lugar y momento determinado, existiendo variaciones en los datos

obtenidos entre diferentes tejidos del mismo individuo. Así mismo existe polimorfismo ontogenético, lo que supone resultados diferentes al trabajar con material vegetal de un individuo joven y otro adulto.

Los **marcadores moleculares basados en ADN** constituyen la nueva generación de marcadores moleculares y con ellos se solucionaron en gran parte las carencias mostradas por las isoenzimas. Estos marcadores se pueden agrupar en tres categorías: los que emplean hibridación tipo “Southern” después del uso de endonucleasas, las basadas en la “reacción en cadena de la polimerasa” (*Polymerase Chain Reaction* (PCR)) y las que combinan PCR o sus productos con la hibridación tipo “Southern”.

La hibridación tipo “Southern” explora las variaciones en la longitud o tamaño de los fragmentos de ADN ocasionadas por la rotura del genoma mediada por una enzima de restricción particular (endonucleasa específica de secuencia). Dentro de esta técnica podemos encontrar los marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*).

La técnica de PCR fue desarrollada por Kary B Mullis, por cuya invención fue galardonada con el premio Nobel de Química en 1993. Esta técnica es utilizada para sintetizar in vitro fragmentos específicos de ADN, y con ello, detectar una secuencia o gen de interés en el genoma del individuo en estudio. Se basa en la amplificación de fragmentos de ADN a partir de secuencias de nucleótidos denominadas cebadores (*primers*), que son capaces de reconocer una secuencia blanco para la cual son complementarias.

Algunos de los marcadores que se incluyen dentro de esta metodología son los marcadores RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA* (Williams et al., 1990)), SSRs (Microsatélites o *Simple Sequence Repeats* (Tautz y Renz, 1984)) y, AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms* (Vos et al., 1995)).

En comparación con los bioquímicos, los marcadores de ADN presentan muchas ventajas ya que no están afectados por el ambiente, están presentes en cualquier estadio del individuo, permiten una detección temprana, son universales, muy abundantes, se requiere poca cantidad de ADN para los análisis y el ADN es muy estable y específico para cada individuo (huella génica). Sin embargo, son relativamente costosos, necesitando personal formado, equipos relativamente sofisticados y un estricto control de la contaminación.

En la Tabla 1 se muestran las características básicas que presentan algunos de los marcadores basados en ADN cuyo uso es frecuente.

Tabla 1: Características de varios marcadores moleculares basados en ADN

Marcador molecular	RFLP	RAPD	SSR	ISSR	AFLP
Abundancia	Alta	Alta	Media	Media	Alta
Reproducibilidad	Alta	Baja	Alta	Alta	Alta
Grado de polimorfismo	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio
Especificidad de locus	Si	No	No	No	No
Requerimientos técnicos	Altos	Bajos	Medios	Medios	Medios
DNA requerido	Mucho	Poco	Poco	Poco	Intermedio

1.1.1. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

Fue el primer marcador de ADN utilizado por biólogos poblacionales (Parker et al., 1998). Este método detecta polimorfismos producidos al ser digerido ADN por enzimas de restricción particulares (endonucleasas). Para la detección de RFLPs existen dos técnicas: “*southern blot*” e hibridación, y PCR, en este caso se denominan marcadores PCR-RFLP. El método de PCR es más barato y rápido, además de necesitar una cantidad de ADN inferior. Los RFLPs generalmente se han utilizado en la construcción de mapas genéticos, en la clonación de genes basados en mapas y para ayudar a resolver problemas taxonómicos o filogenéticos. El porcentaje de polimorfismo que detecta esta técnica difiere ampliamente entre especies en función de la sonda utilizada. Otras desventajas de esta técnica son la necesidad de grandes cantidades de ADN de buena calidad (*southern blot*), el requerimiento de muchas manipulaciones, además de que solamente se detecta una fracción de la variabilidad de las secuencias existentes en el genoma, por lo que su información es limitada (Rentarí Alcántara et al., 2007).

1.1.2. RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA)

Se trata de marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies basándose en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pares de bases (pb) a lo largo del genoma (Rentarí Alcántara et al., 2007). Los RAPDs son útiles en la elaboración de mapas genéticos, en el estudio del parentesco y en el análisis de la estructura poblacional, ya que ayudan a estimar tamaño efectivo, aislamiento reproductivo y niveles de fecundación cruzada (Parker et al., 1998). Los RAPDs amplifican regiones tanto codificantes del ADN como no codificantes. Es una técnica relativamente fácil y barata, no necesitando conocimiento previo de la secuencia de ADN, no requiere la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, el número de loci que puede ser examinado es ilimitado y no requiere de pruebas radiactivas (Phillips et al., 1994, Reiter et al., 1992). Por otro lado presenta problemas de bandas erróneas, una baja reproductibilidad de los resultados debido a su sensibilidad a las condiciones experimentales, y comigración de bandas. Se trata de marcadores dominantes por lo que ofrecen menos información que los codominantes.

1.1.3. SSRs (Microsatélites o *Simple Sequence Repeats*)

Los microsatélites (SSR) se producen como elementos intercalados repetitivos en todos los genomas eucarióticos (Tautz y Renz, 1984). La variación en el número de unidades repetidas en tándem se debe principalmente al deslizamiento de la hebra de ADN durante la replicación (Schlotterer y Tautz, 1992). Como los deslizamientos en la replicación son más probables que las mutaciones puntuales, los loci microsatélites tienden a ser hipervariables. El análisis de microsatélites muestra una extensa cantidad de polimorfismos en longitud durante el análisis PCR de loci únicos, utilizando combinaciones de cebadores discriminatorios.

Los microsatélites han tomado ventaja sobre otros marcadores moleculares como los AFLPs, RAPDs, RFLPs, debido a su mayor grado de polimorfismo, ser codominantes y segregar de manera mendeliana, presentar una lectura de bandas clara y sencilla, y ser selectivamente neutros (Goldstein y Pollock, 1994, Vendramin et al., 1996). Para trabajar con SSR es necesario conocer la secuencia de la región a analizar para contar con primers específicos, de modo que los microsatélites son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí (Vendramin et al., 1996).

La reproducibilidad de los microsatélites es tal, que pueden ser utilizados eficientemente por diferentes laboratorios de investigación para producir datos consistentes (Saghai Maroof et al., 1994).

1.1.4. ISSRs (Inter-simple sequence repeat polymorphisms)

Los marcadores ISSR (*inter-simple sequence repeat polymorphisms*) están basados en la amplificación de regiones situadas entre repeticiones de secuencias cortas (SSR, *simple sequence repeats*) por lo que no se necesitan conocimientos previos sobre la secuencia del genoma (Godwin et al., 1997). Se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un único cebador que está diseñado para que ancle en determinadas secuencias de tipo microsatélite. Generalmente, se utilizan los motivos repetidos de microsatélites como núcleo del cebador, como por ejemplo pueden ser (GA)_n o (CA)_n, donde “n” es el número de repeticiones. Para ganar especificidad y reproducibilidad, se añaden varios nucleótidos en los extremos 5' o 3' (Gupta et al., 1994, Zietkiewicz et al., 1994, Sánchez de la Hoz et al., 1996). La naturaleza hipervariable de los ISSR combinado con el uso de un equipamiento mínimo y su fácil utilización (Wolfe y Randle, 2001, Yang et al., 1996) son ventajas para su uso. Sin embargo, como desventajas se puede destacar que se trata de un marcador dominante (aunque se han descrito casos de codominancia por Wu & Tanksley (1993)) y que la resolución de las bandas obtenidas puede ser mínima, necesitándose de tecnologías más resolutivas que los geles de agarosa, como lo son los sistemas electroforéticos basados en poliacrilamida.

Este tipo de marcadores (ISSR) han sido utilizados de forma satisfactoria en el análisis genético de plantas medicinales, demostrando además ser útiles para el análisis de la diversidad genética tanto inter como intraespecífica en diferentes especies de la familia Gentianaceae (Ge et al., 2005, Zhang et al., 2007, Yang et al., 2011, Zheng et al., 2011).

1.1.5. AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms)

Estos marcadores fueron desarrollados a mediados de la década de los noventa (Vos et al., 1995), y se basan en la combinación de dos técnicas utilizadas en la generación de marcadores moleculares: la digestión mediante enzimas de restricción, propia de los RFLPs, y la PCR, utilizada en muchos marcadores moleculares.

Los AFLPs se basan en la amplificación vía PCR de fragmentos de ADN previamente digeridos por dos enzimas de restricción y ligados a dos adaptadores específicos a las enzimas utilizadas. Mediante esta técnica se detectan múltiples loci polimórficos, siendo de utilidad en la creación de huellas génicas así como en el mapeo. Otros ámbitos de uso han sido la caracterización de germoplasma, estudios filogenéticos en plantas, bacterias, hongos, y en estudios de genética de poblaciones.

Para el uso de AFLPs no es necesario tener conocimientos previos de la secuencia y se producen gran número de bandas polimórficas. Además la técnica es altamente reproducible existiendo kits estandarizados. Por otra parte, se trata de marcadores dominantes y basada en una metodología compleja y una técnica cara respecto de otras como pueden ser los RAPDs.

A la hora de decidir qué marcador molecular utilizar hay que tener en cuenta muchas variables. Cada uno de los marcadores tiene unas características propias que los hace idóneos para unas determinadas finalidades, y por lo tanto, el objetivo buscado es el primer y más importante aspecto a tener en cuenta a la hora de seleccionar el marcador a utilizar. Para ello tendremos en cuenta la calidad (polimorfismo, número, expresión dominante o codominante), coste, simplicidad y rapidez de la metodología, entre otras. Muy importante también es valorar el nivel de conocimiento de las diferentes técnicas así como el nivel de las infraestructuras y el presupuesto de funcionamiento disponibles.

Una forma de discriminar es utilizar marcadores basados en secuencias de ADN conocidas, en cuyo caso deberíamos seleccionar entre los microsatélites (SSR), CAPs, SCARs y SNPs; o si, por el contrario, emplear marcadores basados en secuencias de ADN no conocidas. En este último caso vamos a diferenciar entre marcadores esencialmente dominantes como son los RFLPs, en general excesivamente caros, y aquellos esencialmente dominantes (RAPDs, ISSRs, y AFLPs). En esta situación la pérdida de la codominancia está sustituida por un alto grado de polimorfismo, por lo que son especialmente indicados para estudios de variabilidad. El coste y simplicidad de RAPDs e ISSRs los hace recomendables para laboratorios con una infraestructura limitada. Por último los marcadores moleculares ISSRs muestran una mejor reproductibilidad que los RAPDs.

2. OBJETIVOS

El propósito de este estudio es investigar por primera vez:

- El grado de diversidad genética dentro de cada población de *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* de la Cordillera Cantábrica.
- El grado de diversidad genética entre las poblaciones de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la Cordillera Cantábrica.
- Las relaciones y las variaciones genéticas entre las poblaciones *G. lutea* L. var. *aurantiaca* respecto de otras poblaciones de *Gentiana lutea* L. subsp. *lutea* y *Gentiana lutea* L. subsp. *vardjanii* recolectadas en los Pirineos y Alpes Dolomitas, respectivamente.

El conocimiento detallado de la diversidad y variación genética dentro y entre estas poblaciones no sólo incrementa nuestro conocimiento de la dinámica de poblaciones, su adaptación y evolución, sino que además proporcionará una importante información para la conservación biológica de la especie amenazada *G. lutea* L.

3. MATERIAL y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Se han recogido muestras de raíz de 123 individuos, correspondiendo a tres regiones (Tabla 2 y Figura 2): ocho individuos de cada una de las diez poblaciones de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, provenientes de la Cordillera Cantábrica (noroeste de la Península Ibérica), una muestra correspondiente a *G. lutea* L. subsp. *lutea* de cada una de las 15 poblaciones que fueron muestreadas a lo largo de los Pirineos, y 5 individuos de cada una de las cuatro poblaciones de *G. lutea* subsp. *vardjanii* recolectadas en los Alpes Dolomitas (Italia), cercanas a la ciudad de Trento. Además, se han analizado ocho muestras de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* procedentes de una parcela de cultivo regular, establecida por nuestro grupo en 2009 en la Cordillera Cantábrica (Puerto de la Magdalena, Murias de Paredes (León)), donde las condiciones existentes permiten encontrar genciana creciendo de forma silvestre en las proximidades.

Respecto de las poblaciones estudiadas, hay que destacar que, a excepción de las alpinas, están caracterizadas por su escaso número de individuos, y todas ellas se encuentran protegidas, por lo que ha sido necesaria la petición de los permisos correspondientes para la recolección de las plantas a estudio.



Figura 1: Detalle del almacenamiento de las raíces de *G. lutea* L. desecadas.

Los individuos analizados pertenecen a poblaciones silvestres situadas en un amplio rango de altitudes, de modo que estas se encuentran entre los 1170 metros de la población más baja y los 1904 metros de la población más elevada. Las poblaciones silvestres se encuentran registradas por una pequeña cantidad de semillas en el Herbario Jaime Andrés

Rodríguez, de la Universidad de León, donde se otorgó un código (LEB-GERM (LG) a cada una de las poblaciones (Tabla 2). Las muestras de raíz se secaron en una estufa provista de ventilación forzada, a una temperatura de 38°C durante 72 horas. La moderada temperatura de secado impide la degradación del material genético y sus compuestos químicos. Una vez secas, las raíces fueron almacenadas a temperatura ambiente dentro de envases de vidrio con sílica gel para evitar su rehidratación, ya que la genciana es muy higroscópica (Figura 1).

Tabla 2: Poblaciones de *G. lutea* L. muestreadas.

Localización	Código de	Latitud (N)	Longitud	Altitud	Nº de
Matalavilla	LG16	42°52'13''	06°23'06''W	1794	8
Lumajo	LG17	42°59'14''	06°15'33''W	1396	8
Torre de Babia	LG18	43°00'47''	06°05'59''W	1801	8
Senra	LG19	42°50'07''	06°11'25''W	1724	8
Leitariegos	LG20	42°59'18''	06°25'26''W	1880	8
Pontón	LG21	43°06'02''	05°00'29''W	1278	8
Valdeteja	LG22	42°56'28''	05°27'34''W	1419	8
Tonín	LG23	43°00'15''	05°41'00''W	1294	8
Trevinca	LG24	42°09'30''	06°44'29''W	1727	8
Teleno	LG25	42°21'20''	06°25'22''W	1867	8
Campo de cultivo	CT1	42°52'09''	06°12'49''W	1439	8
Collada de Tosas 1	LG1	42°20'53''	01°59'08''E	1738	1
Collada de Tosas 2	LG2	42°20'29''	02°01'49''E	1654	1
La Molina	LG3	42°17'13''	02°02'07''E	1578	1
La Bonaigua	LG4	42°40'10''	00°58'11''E	1813	1
Salardu	LG5	42°40'20''	00°54'58''E	1516	1
Montgarri	LG6	42°45'27''	01°01'58''E	1602	1
Montgarri 2	LG7	42°45'33''	01°01'14''E	1588	1
Baqueira	LG8	42°43'31''	00°55'59''E	1764	1
Sant Maurici	LG9	42°39'28''	00°55'24''E	1516	1
Artiga de Lin	LG10	42°40'50''	00°42'24''E	1458	1
Senet	LG11	42°36'23''	00°46'01''E	1487	1
Cerler 1	LG12	42°33'55''	00°34'01''E	1902	1
Cerler 2	LG13	42°33'43''	00°34'03''E	1892	1
Garaioa	LG14	42°53'23''	01°13'51''W	1170	1
Formigal	LG15	42°47'45''	00°24'11''W	1701	1
Bondone	LG27	46°00'34''	11°02'50''E	1557	5
Peller	LG28	46°19'04''	10°57'34''E	1904	5
Tremalzo	LG29	45°50'15''	10°41'23''E	1694	5
Brentonico	LG30	45°47'16''	10°54'04''E	1482	5

LG: referencia LEB-GERM otorgada a las muestras depositadas en el Herbario Jaime Andrés Rodríguez, de la Universidad de León; CT: cultivo.

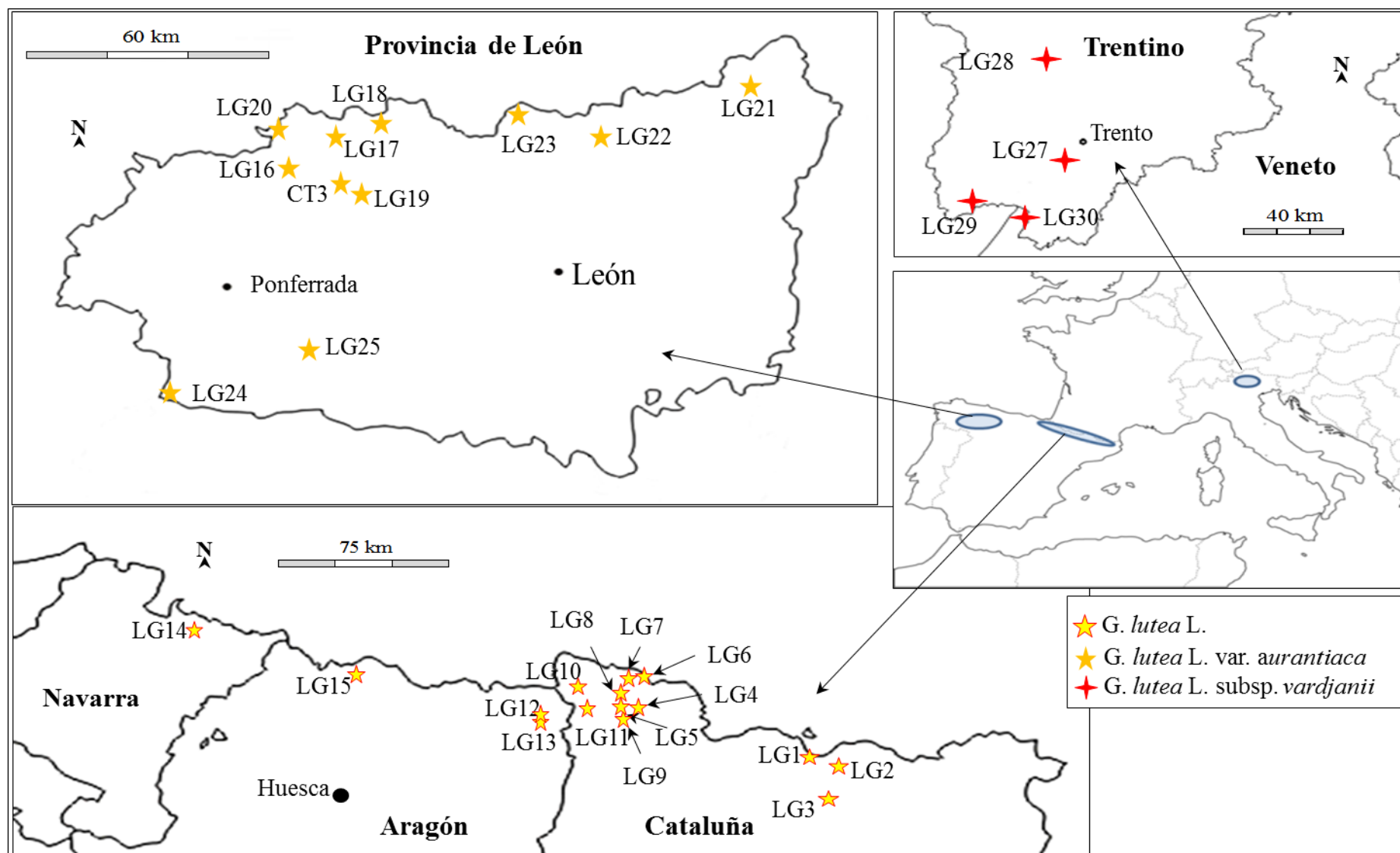


Figura 2: Mapa de localización de las poblaciones de *G. lutea* L. subsp. *lutea*., *G. lutea* L. subsp. *vardjanii* y *G. lutea* L. var. *aurantiaca* muestreadas. (Los códigos de las poblaciones corresponden con los asignados en la Tabla 2).

3.2. EXTRACCIÓN DE DNA

El DNA genómico de cada individuo se extrajo a partir de 0,2 g de raíz seca molida mediante un micromolino de martillos (Culatti), utilizando un tamiz de 1 mm de diámetro. El protocolo de extracción utilizado está basado en el método CTAB (Pirttilä et al., 2001). Inicialmente se añadieron 1,8 ml de tampón CTAB (50 mM Tris pH 9,5; 0,7 M NaCl; 10 mM EDTA; 1% CTAB) a un tubo de centrífuga al que se adicionaron 0,2 g de raíz de genciana molida, procediendo posteriormente al homogeneizado de ambos elementos). Estos tubos se incubaron durante 30 minutos a 65 °C en un baño termostático, con homogeneización por volteo cada diez minutos. En este proceso, el detergente (CTAB) provoca la lisis de las membranas celular y nuclear. Después de esta incubación, a cada tubo se le añadieron 1,2 ml de cloroformo-octanol (24:1 v/v) y se mezcló por volteo. El resultado se centrifugó durante 15 minutos a 4000 r.p.m. Después de la centrifugación se pasaron 600 µl del sobrenadante a un tubo de centrífuga tipo Eppendorf de 1,5 ml en el que también se añadieron 600 µl de fenol. El fenol es el encargado de eliminar tanto las proteínas como los lípidos presentes. Los tubos se centrifugaron a 14000 r.p.m durante cinco minutos, después de lo cual se traspasaron 500 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de centrífuga de 1,5 ml. Sobre estos 500 µl se añadieron otros 500 µl de cloroformo-isoamílico (24:1 v/v) mezclándolo todo por volteo, tras lo cual se añadieron otros 500 µl de fenol y volviéndose a mezclar todo. Se centrifugó nuevamente durante cinco minutos a 14000 r.p.m.), tras los que se tomaron 400 µl del sobrenadante que se añadieron a un nuevo tubo de centrífuga de 1,5 ml al que se agregaron 400 µl de cloroformo-isoamílico (24:1 v/v)) mezclando todo suavemente. El cloroformo-isoamílico tiene la función de eliminar de la muestra todos los restos de fenol presentes en la fase acuosa. Se centrifugó de nuevo durante dos minutos a 14000 r.p.m tras lo que se tomaron 300 µl del sobrenadante que se vertieron en un nuevo tubo de centrífuga de 1,5 ml al que se añadieron 200 µl de isopropanol a -20 °C. Los tubos se mantuvieron durante 30 minutos a -70 °C para facilitar la precipitación del DNA, después de lo que se centrifugaron durante 15 minutos a 14000 r.p.m. Una vez centrifugados, se desechó el sobrenadante, se añadieron 200 µl de etanol 70% (v/v) y se centrifugaron de nuevo durante cinco minutos a 14000 r.p.m., eliminándose de nuevo el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta para evitar cualquier resto alcohólico. Al precipitado obtenido se añadieron 100 µl de agua milli-Q estéril y 1 µl de RNasa (0,5 µg/µl) para resuspender el DNA mediante una suave agitación para evitar la rotura de las cadenas de DNA. Estas muestras de DNA se mantuvieron en un congelador a -20 °C para su conservación.

La concentración y la calidad del DNA se comprobó mediante un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA) (Figura 3A). y sobre gel de agarosa al 1%. Posteriormente, conocidas las concentraciones de DNA, cada muestra fue diluida en agua milli-Q estéril hasta homogenizarlas a una concentración aproximada de 100 ng/µl (Figura 3B).

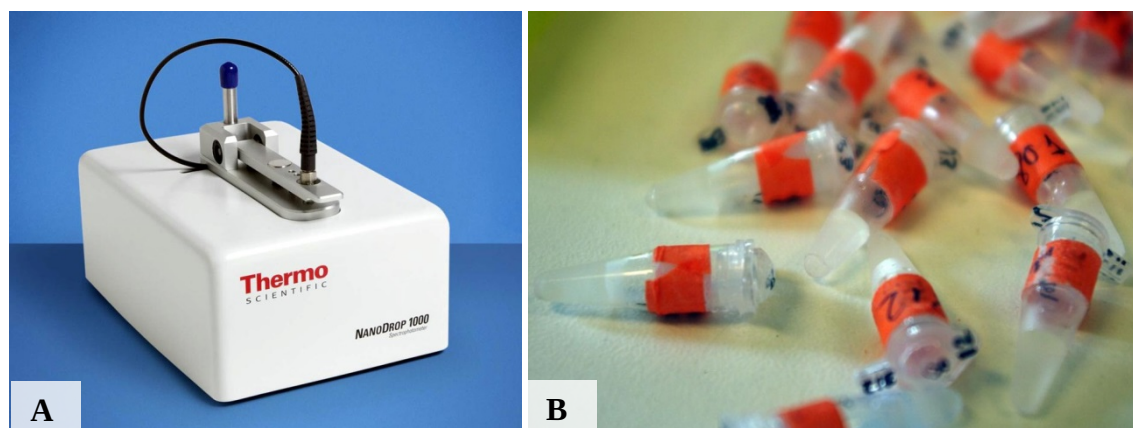


Figura 3: NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA) (A) y lícuotas de ADN homogeneizado a 100 ng/μl en tubos de PCR (B)

3.3. AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES ISSR

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen de 15 μl, conteniendo éste: 1,5 μl de DNA genómico (100 ng/μl), 1,5 μl de 10X DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific, USA), 0,5 μl de MgCl₂ 2,5 mM, 0,3 μl de dNTP mix 0,02 mM, 2 μl del cebador para ISSR correspondiente (5 μmol/μl), 0,05 μl de DreamTaq Green DNA Polymerase 5U/μl (Thermo Scientific, USA) y 9,15 μl de agua destilada estéril.

Se seleccionaron dieciséis cebadores ISSR del set N°.9 del UBC (Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Canadá) a partir de estudios previos publicados en otras gentianáceas (Ge et al., 2005, Zhang et al., 2007, He et al., 2011, Zheng et al., 2011, Gomez-Gomez et al., 2012). Estos dieciséis cebadores fueron probados en muestras de DNA correspondientes a diez individuos para comprobar su potencial utilización en *G. lutea* L. Como resultado de este estudio previo, se seleccionaron nueve de ellos (UBC 807, 809, 810, 812, 817, 825, 827, 842, y 857) (Tabla 3) que proporcionaron patrones de bandas claros y reproducibles. La amplificación de las bandas de ISSR se realizó en un termociclador Swift™ MaxPro (Esco Malaysia®) utilizado el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 minuto, seguida de 45 ciclos consistentes en: 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 2 minutos, y síntesis final durante 10 minutos a 72°C.

Tabla 3: Secuencias de los cebadores ISSR de UBC (University of British Columbia) utilizados.

ISSR	Secuencia 5' - 3'
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG

Los productos de la amplificación por PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa en cubetas horizontales con geles sumergidos. La concentración de agarosa utilizada fue del 1.5% (p/v), teñido con bromuro de etidio (0,5 μ l/100ml tampón). Como tampón de la electroforesis se ha utilizado TBE (Tris-borato-EDTA 1X; Tris 0,9 M pH 8,0; ácido bórico 0,9 M, EDTA 20 mM).

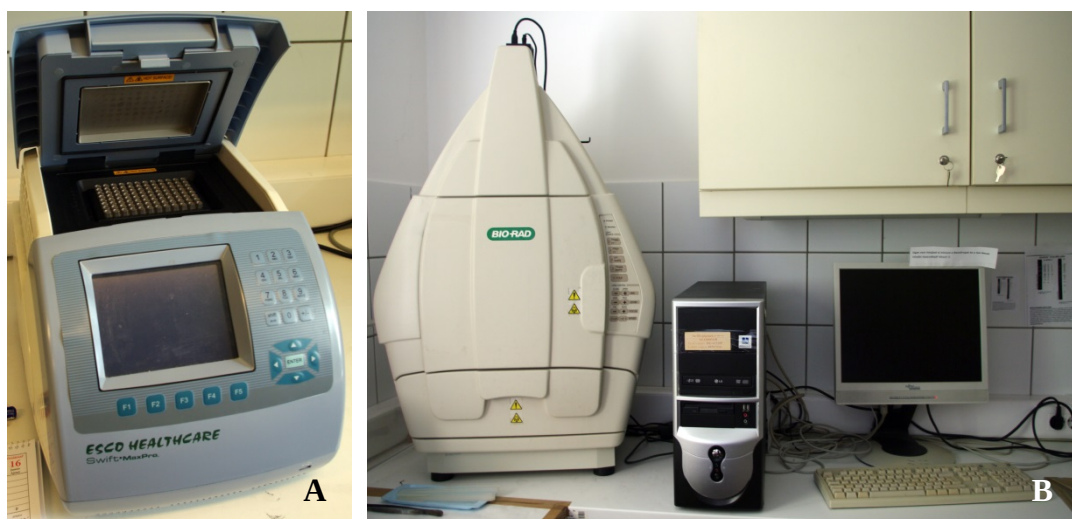


Figura 4: Detalle del termociclador (A) y equipo de toma y procesado de imágenes de las electroforesis (B)

Los productos de la amplificación fueron separados entre dos y tres horas (dependiendo del marcador ISSR utilizado) a una tensión continua de 100 V, impidiendo con ello las distorsiones causadas en las bandas por la aplicación de altos voltajes. Se utilizó para ello una fuente eléctrica Power Pac 200 comercializada por Bio-Rad Laboratories®. Como marcador de pesos moleculares conocidos se utilizó GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder de Fermentas®. Posteriormente, los geles se visualizaron y fotografiaron digitalmente con la ayuda de un equipo de adquisición de imágenes Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad Laboratories®).

3.4. ANÁLISIS DE DATOS

Las fotografías correspondientes a la separación de los fragmentos ISSR amplificados se han analizado con la ayuda del software Total Lab 1.2 (TotalLab Ltd®, United Kingdom) que permite obtener una estimación precisa del tamaño en pares de bases de cada una de las bandas obtenidas. Para el análisis solo se tuvieron en cuenta aquellas bandas bien definidas y que no han dado lugar a ningún tipo de ambigüedades (Figura 5).

Teniendo en cuenta el carácter dominante de los marcadores ISSR, cada una de las bandas fue tratada como un elemento binario, de modo que se consideró como presente (1) o ausente (0), suponiendo que cada banda observada corresponde al fenotipo en un solo locus bialélico. Asumiendo que se cumple el equilibrio Hardy-Weinberg, se utilizó el software Popgene versión 1.32 (Yeh y Boyle, 1997) para calcular los parámetros de diversidad genética de las poblaciones: porcentaje de loci polimórficos (PPL), número de

alelos observados (N_a), número efectivo de alelos (N_e) (Nei, 1973), diversidad genética (H_e), e índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972).

La estructura de las poblaciones se estudió mediante la aplicación de diferentes métodos. Primeramente, se obtuvo un cladograma no enraizado mediante el método de *neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987) basado en la matriz de distancias genéticas entre poblaciones (Nei, 1972). El cladograma se construyó utilizando el módulo NEIGHBOR del paquete informático PHYLIP versión 3.695 (Felsenstein, 2005). Además, se calculó la matriz de diversidad genética entre poblaciones Q_{xy} (Nei y Kumar, 2000), realizando un segundo cladograma a partir de las distancias genéticas (estimadas como $1 - Q_{xy}$). Para comprobar la fiabilidad de los nodos obtenidos, se realizó un remuestreo de 100 réplicas. El correspondiente árbol consenso se obtuvo utilizando el módulo CONSENSE del software PHYLIP.

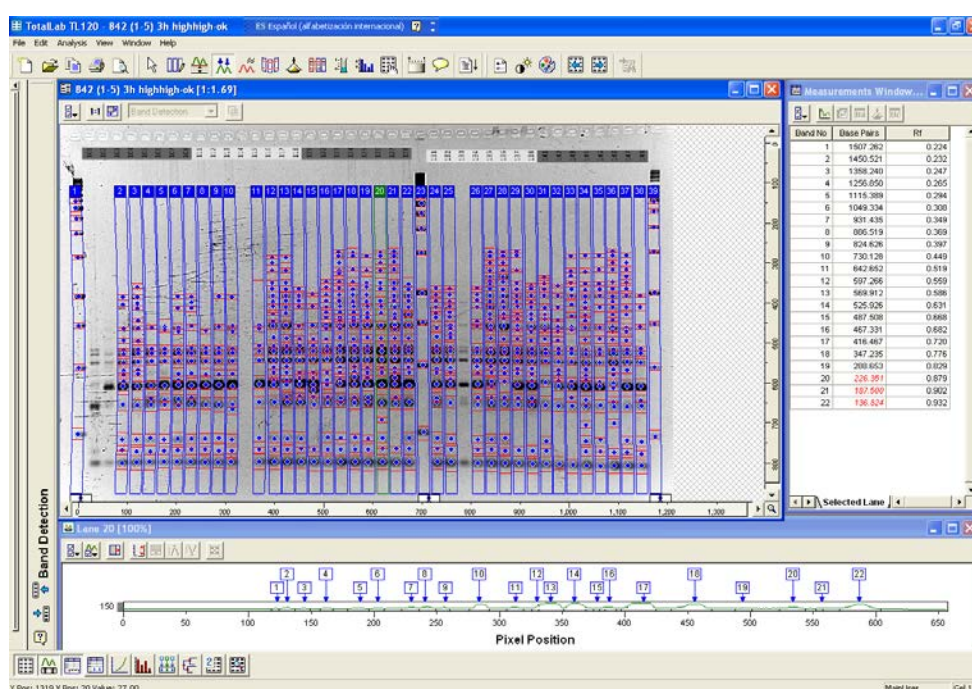


Figura 5: Análisis de bandas mediante el uso del software Total Lab 1.2 (TotalLab Ltd[®], United Kingdom)

El agrupamiento de las poblaciones se realizó también mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), basado en la matriz de distancias genéticas de Jaccard entre los individuos. Para este análisis se utilizó el software multiplataforma *Genetic Analysis in Excel* (GenAIEx) version 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

Por último, se utilizó el software *Structure* versión 2.3.4, el cual identifica grupos de individuos relacionados a partir de genotipos multilocus. Cada individuo fue asignado (probabilísticamente) a un grupo o conjuntamente a dos o más grupos si su haplotipo indica que es una mezcla. Cada grupo está caracterizado por el conjunto de frecuencias alélicas en cada locus (Pritchard et al., 2000). Para elegir el mejor número de grupos genéticos (K), se probaron múltiples valores (del 1 al 7). Para verificar la consistencia de las estimaciones el análisis fue repetido 10 veces para cada uno de los valores de K probados. Los resultados se analizaron utilizando la herramienta online *Structure*

Harvester (Earl y vonHoldt, 2012) que implementa el método de Evanno, Regnaut & Gaudet (2005) para detectar el verdadero número de grupos (K) en un conjunto no homogéneo de muestras.

Con el fin de comprobar la correlación existente entre las distancias genéticas y geográficas entre las diferentes poblaciones analizadas, se realizó el test de Mantel calculando 999 permutaciones mediante el uso del software GenAlEx (versión 6.5). (Peakall y Smouse, 2012).

4. RESULTADOS

La amplificación de los fragmentos ISSR (Figura 6 a Figura 9) en los 123 individuos analizados, utilizando nueve marcadores, produjo 106 bandas reproducibles e inequívocas. Se encontraron entre 5 y 17 bandas por cada uno de los marcadores utilizados, lo que supone una media de 11,7 bandas por marcador. De todas ellas, 95 bandas (89,6%) resultaron ser polimórficas (Tabla 4); 46 (43,4%) fueron encontradas en individuos de las tres zonas geográficas estudiadas, mientras que 21 (19,8%), 3 (2,8%), y 12 (11,3%) de las bandas fueron detectadas exclusivamente en las poblaciones correspondientes a la Cordillera Cantábrica (*G. lutea* L. var. *aurantiaca*), Pirineos (*G. lutea* L. subsp. *lutea*) y Alpes Dolomitas (*G. lutea* L. subsp. *vardjanii*), respectivamente. Respecto de las poblaciones de la variedad *aurantiaca*, las poblaciones silvestres LG16, LG22, y LG25, así como las muestras provenientes de la parcela de cultivo (CT3) mostraron uno, dos, uno y tres loci exclusivos para ellas respectivamente.

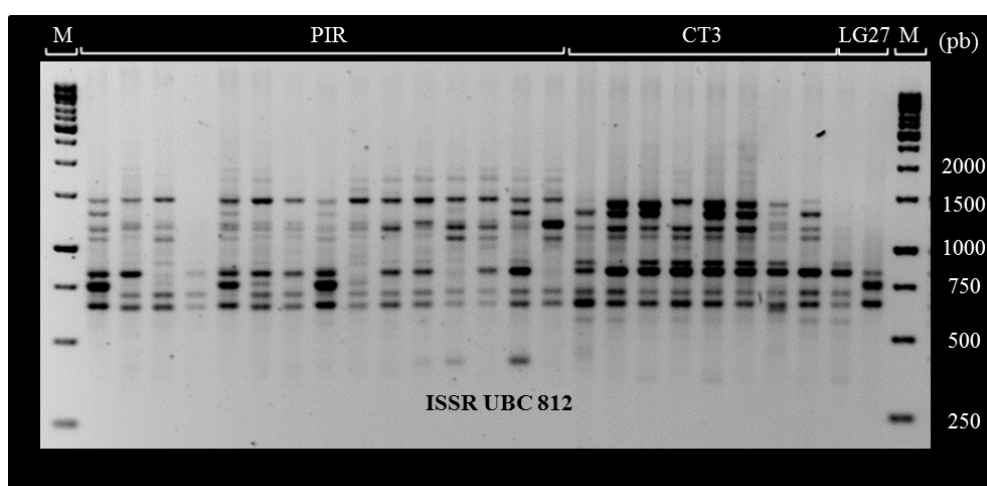


Figura 6: Perfiles ISSR (marcador UBC 812) de varios individuos de *G. lutea* L. a estudio. (M: Marcador de pesos moleculares).

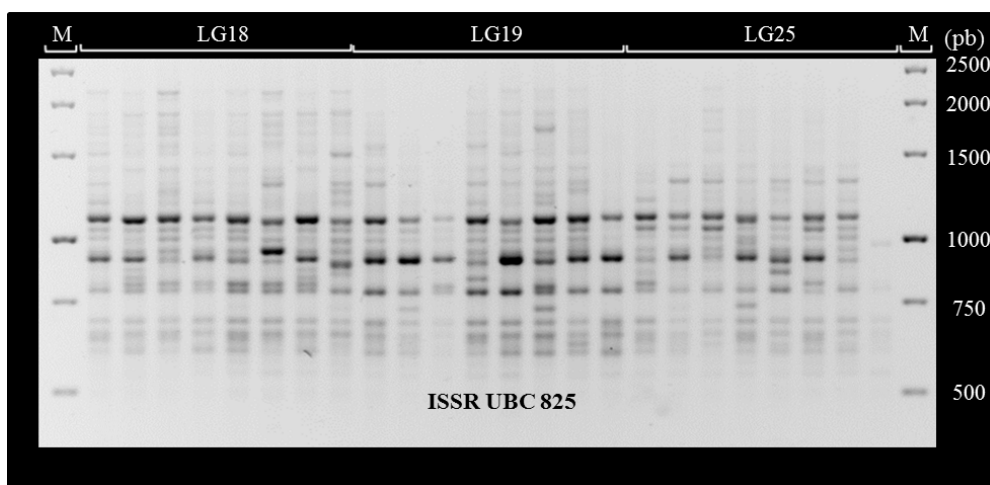


Figura 7: Perfiles ISSR (marcador UBC 825) de varios individuos de *G. lutea* L. a estudio. (M: Marcador de pesos moleculares).

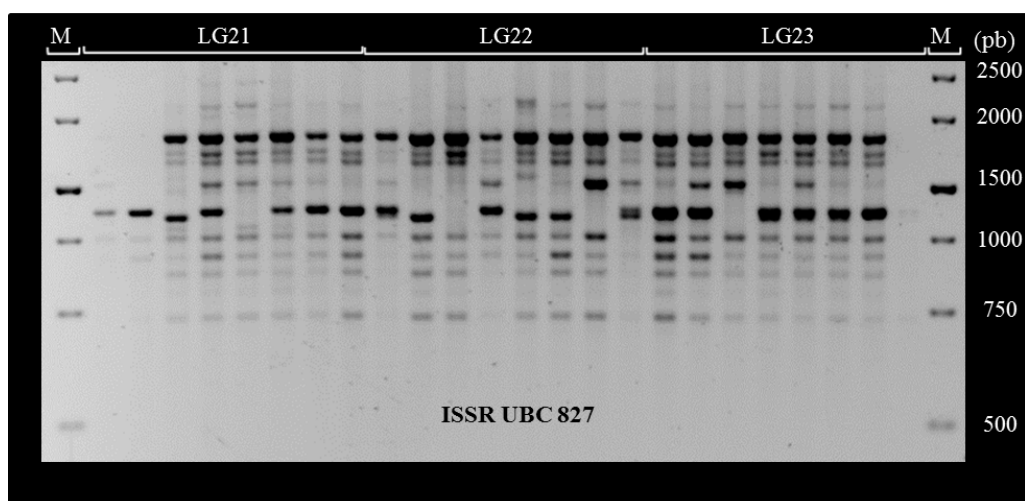


Figura 8: Perfiles ISSR (marcador UBC 827) de varios individuos de *G. lutea* L. a estudio. (M: Marcador de pesos moleculares).

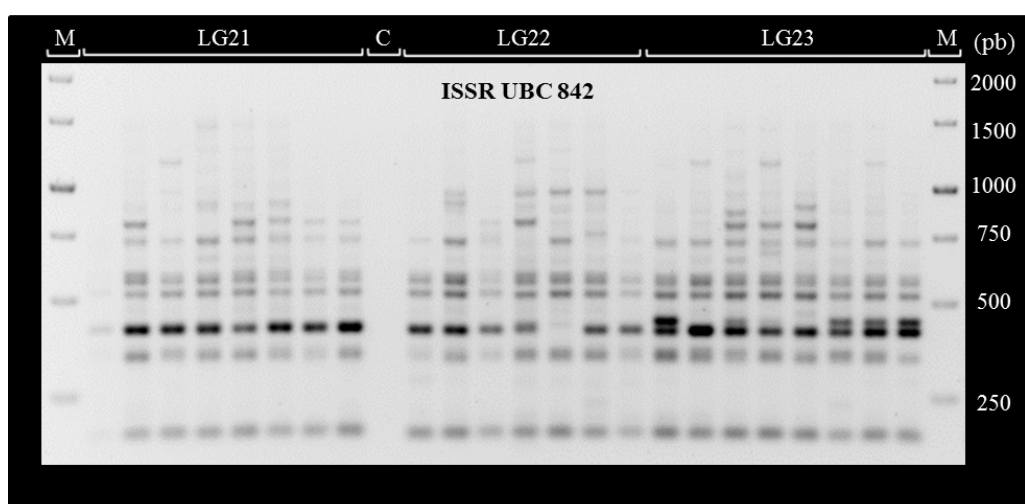


Figura 9: Perfiles ISSR (marcador UBC 842) de varios individuos de *G. lutea* L. a estudio. (M: Marcador de pesos moleculares. C: Control negativo).

Con el fin de estudiar la variabilidad genética inter e intrapoblacional (Tabla 4), las 15 muestras obtenidas de diferentes puntos de los Pirineos fueron consideradas como una única población. Los porcentajes de loci polimórficos para una única población están comprendidos entre el 14,2% (LG30) y el 38,7% (LG22), con un valor medio del 25,4%. Los valores medios más elevados obtenidos correspondieron a las poblaciones de los Pirineos (28,3%) y Cordillera Cantábrica (27,8%), mientras que para las provenientes de los Dolomitas el valor únicamente fue de un 18,2%. La diferencia en estos valores puede ser debida al distinto número de muestras analizadas para cada una de las poblaciones. La diversidad genética promedio estimada a nivel de población fue del 0,09, mientras que a nivel de especie el valor fue de 0,2168. La población LG22 mostró el valor más elevado de diversidad genética (0,1329) mientras que la población LG30 manifestó el valor inferior (0,0546). El valor promedio del índice de fue 0,1342 a nivel de población y de 0,3415 a nivel de especie.

Tabla 4: Variación genética detectada en las poblaciones de *G. lutea* L. mediante marcadores ISSR (inter-simple sequence repeat).

Región geográfica	Código población	N	n	PPL	Na	Ne	I	He
CORDILLERA CANTÁBRICA	LG16	8	33	31,13	13,113	11,743	0,1579	0,1042
	LG17	8	26	24,53	12,453	11,297	0,1192	0,078
	LG18	8	32	30,19	13,019	11,800	0,1568	0,1046
	LG19	8	27	25,47	12,547	11,361	0,1218	0,0801
	LG20	8	29	27,36	12,736	11,530	0,1398	0,0922
	LG21	8	35	33,02	13,302	12,033	0,1716	0,1152
	LG22	8	41	38,68	13,868	12,266	0,1993	0,1329
	LG23	8	32	30,19	13,019	11,878	0,1608	0,1081
	LG24	8	21	19,81	11,981	11,264	0,1066	0,0719
	LG25	8	20	18,87	11,887	11,290	0,1082	0,0736
	CT3	8	28	26,42	12,642	11,583	0,1363	0,0911
	Valores medios		29,45	27,79	12,779	11,640	0,1435	0,0956
	Grupo	88	70	66,04	16,604	12,346	0,2361	0,148
PIRINEOS	Grupo	15	30	28,3	1,283	11,883	0,1581	0,1074
ALPES DOLOMITAS	LG27	5	18	16,98	11,698	11,138	0,0964	0,0654
	LG28	5	24	22,64	12,264	11,502	0,1263	0,0856
	LG29	5	20	18,87	11,887	11,304	0,1078	0,0735
	LG30	5	15	14,15	11,415	10,978	0,0800	0,0546
	Valores medios		19,25	18,16	11,816	11,231	0,1026	0,0698
	Grupo	20	31	29,20	12,925	11,735	0,1499	0,1002
GLOBAL	Medias globales		26,9	25,40	12,541	11,553	0,1342	0,0900
	Total	123	95	89,60	18,962	13,446	0,3415	0,2168

N, nº de muestras; n, nº de loci polimórficos; PPL, porcentaje de loci polimórficos; Na, nº medio de alelos observado por locus; Ne, media efectiva de alelos por locus; I, índice de Shannon; He, diversidad genética de Nei. LG: referencia LEB-GERM otorgada a las muestras depositadas en el Herbario Jaime Andrés Rodríguez, de la Universidad de León. CT: cultivo

El análisis de la distancia genética por parejas de Nei, basado en la frecuencia de las bandas, varió entre el 0,0261 (entre las poblaciones LG18 y LG20) y el 0,3998 (entre las poblaciones LG24 y LG27), con un valor promedio del 0,1734. El cladograma realizado mediante el método de *neighbor-joining*, y basado en las distancias genéticas de Nei agrupó las poblaciones de acuerdo con las tres regiones geográficas de origen (Figura 10A). Se obtuvo un cladograma casi idéntico, cuando las distancias genéticas se obtuvieron basándose en el índice de diversidad genética para marcadores dominantes Q_{xy} (Figura 10B). Respecto de la variedad *aurantiaca* se diferenciaron dos grupos en ambos cladogramas, con elevados valores de significación en los remuestreos: el grupo formado por las poblaciones LG25 y LG24, ambas localizadas en el suroeste de la región Cantábrica, y el grupo formado por las poblaciones LG21, LG22, y LG23, localizadas en la zona oriental de la región estudiada de la Cordillera Cantábrica.

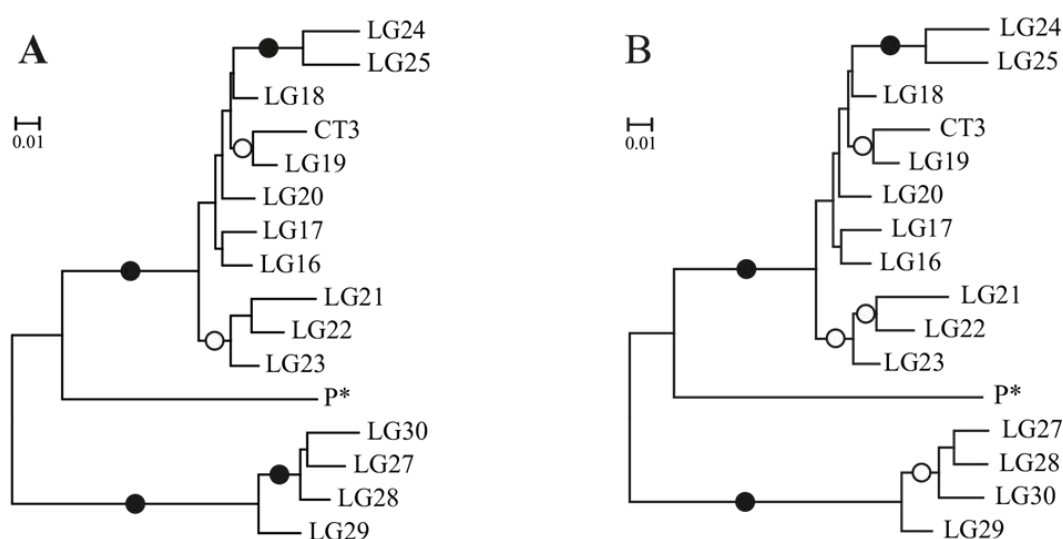


Figura 10: Cladogramas obtenidos mediante el método de neighbour-joining para las poblaciones de *G. lutea* L. a partir de la distancia genética de Nei (A) y la distancia $1 - Q_{xy}$ (B). P*: Las muestras de los Pirineos están agrupadas como una única población. Los círculos negros en los nodos indican que éstos estaban presentes entre el 90% y el 100% de los árboles generados en los remuestreos, mientras que los círculos vacíos indican que el nodo estaba presente entre el 70% y el 89% de esos árboles.

En los PCoA, utilizando la matriz de distancias genéticas de Jaccard para las 123 muestras, las dos primeras coordenadas, las cuales explican respectivamente, el 40,33% y el 24,95% del total de la variabilidad genética, claramente discriminan los tres grupos geográficos representados por los individuos (Figura 10A). Además, el análisis PCoA fue realizado utilizando únicamente las 88 muestras de la variedad *aurantiaca* (Cordillera Cantábrica), mostrando un grupo claramente separado formado por los individuos de las poblaciones LG25 y LG24 (Figura 10B). En este último caso, las coordenadas representadas explican el 29,21% y 22,69% de la variación genética respectivamente. El resto de los individuos representados, provenientes de las poblaciones situadas más al este del área estudiada (poblaciones LG21, LG22 y LG23), muestran de igual manera un agrupamiento, pero, en este caso no se aprecia un límite claro que los separe de los individuos de las poblaciones restantes.

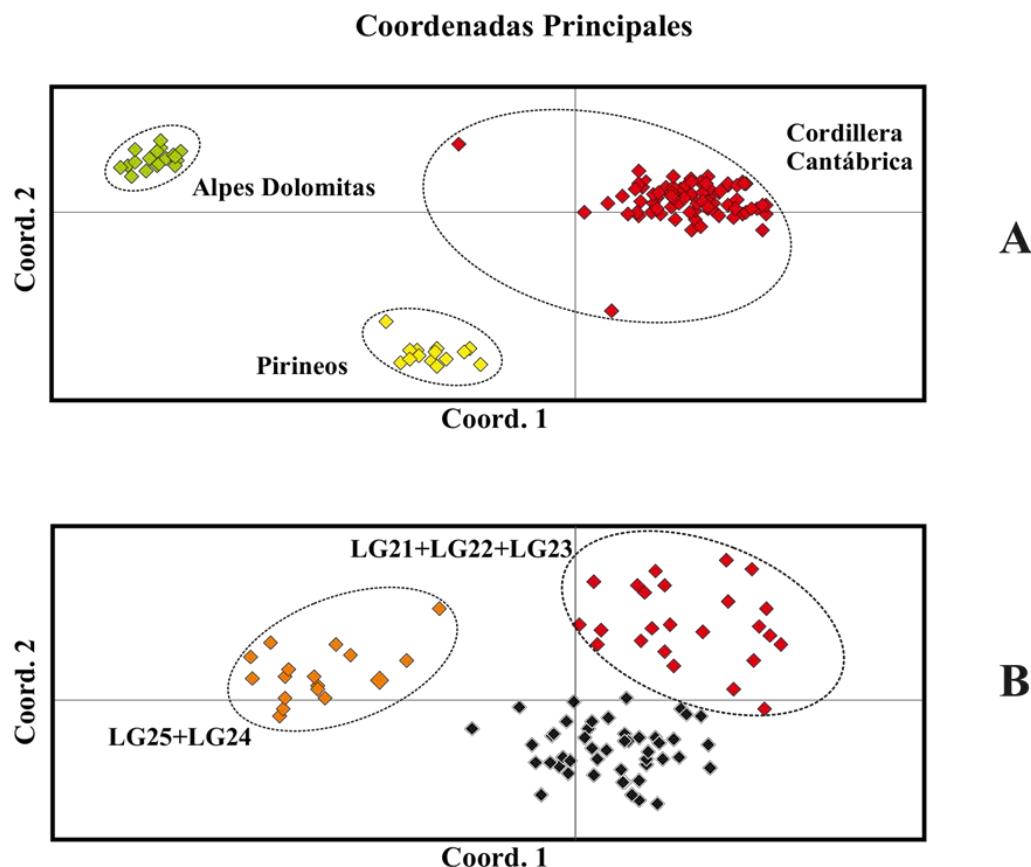


Figura 11: Representación gráfica del análisis de coordenadas principales (PCoA) para las dos coordenadas principales de los 123 individuos de *G. lutea* L. (A) y de los 88 individuos de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la Cordillera Cantábrica (B) utilizando las distancias genéticas de Jaccard entre las muestras observadas.

El análisis de los genotipos multilocus a nivel individual de cada una de las 123 muestras, utilizando el algoritmo del software Structure, mostró la mejor respuesta de agrupamiento para el valor de $K = 5$, con un valor de $\Delta K = 8,15$, siendo los valores obtenidos más cercanos $\Delta K = 4,69$ y $\Delta K = 3,10$ para $K = 4$ y $K = 7$, respectivamente (siendo K el número de grupos). La Figura 12 muestra los resultados obtenidos después de realizar el análisis Bayesiano para $K = 5$. Todos los individuos provenientes de los Pirineos y de los Alpes Dolomitas están claramente separados en dos grupos independientes. El resto, los 88 individuos de las poblaciones de la Cordillera Cantábrica se asignaron a los tres grupos restantes: (i) individuos provenientes de LG25 y LG24 (poblaciones del suroeste); (ii) individuos de las poblaciones LG21, LG22 (excepto un individuo), y LG23 (poblaciones del este); (iii) individuos de las poblaciones LG16, LG17, LG18, LG19, CT3 y LG20 (poblaciones del noroeste).

El test de Mantel detectó correlaciones significativas ($r = 0,945$; $P = 0,001$) entre la distancia de Nei y la distancia geográfica para las 16 poblaciones (las muestras de los Pirineos fueron agrupadas como una única población a la que se asignó las coordenadas geográficas de la población LG8). Esta correlación también resultó ser significativa cuando se analizaron las 11 poblaciones de la Cordillera Cantábrica ($r = 0,844$; $P = 0,001$) de manera independiente. No se observaron correlaciones significativas ($r = 0,457$; $P =$

0,159) cuando se analizaron únicamente las cuatro poblaciones provenientes de los Dolomitas. El test de Mantel realizado para las muestras de los Pirineos utilizando las distancias de Jaccard no detectó una correlación significativa respecto de las distancias geográficas ($r = 0,248$; $P = 0,062$) entre dichos individuos.

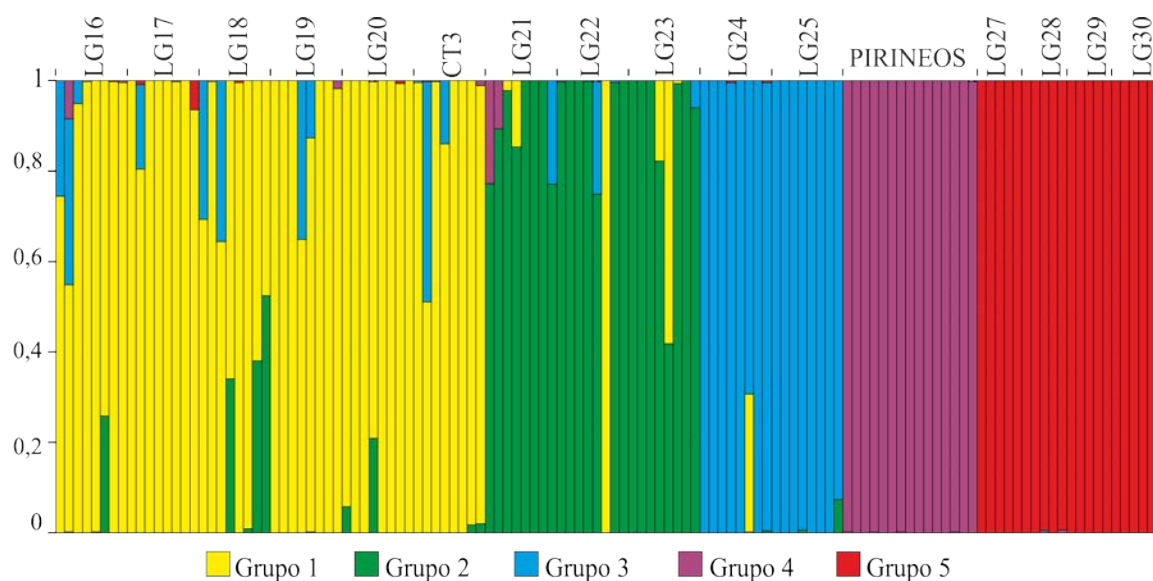


Figura 12: Probabilidad de asignación a cada uno de los cinco grupos obtenidos mediante aproximación Bayesiana (*Structure*, versión 2. 3.4) para cada uno de los 123 individuos de *G. lutea* L. analizados. PIR: Poblaciones de los Pirineos.

5. DISCUSIÓN

En este estudio se han aplicado, por primera vez, marcadores genéticos de tipo ISSR en poblaciones de *G. lutea* L. con el fin de analizar su variación genética. Existen diferentes trabajos en especies próximas en los que los marcadores genéticos suponen un elemento importante del estudio, como un extenso análisis publicado por Struwe & Albert (2002) acerca de la familia Gentianaceae y otros más específicos, como el estudio filogenético de las gencianas europeas, basado en el análisis de DNA cloroplastidial (Gielly y P., 1996). Además, el presente trabajo es el primero en el cual se incluyen muestras que corresponden a la descripción de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. Aunque los marcadores ISSR no han sido utilizados anteriormente en *G. lutea* L., este tipo de marcadores han sido utilizados de manera exitosa en diferentes estudios botánicos y de diversidad realizados en otras gentianaceas (Ge et al., 2005, Zhang et al., 2007, Zheng et al., 2011, Yang et al., 2011).

Utilizando diferentes estadísticos y métodos de análisis (distancia de Nei, diversidad genética Q_{xy} , distancia de Jaccard, y estructura de genotipos multilocus), se han observado claras diferencias genéticas entre las muestras recogidas en los Alpes Dolomitas (*G. lutea* L. subsp. *vardjanii*) y aquellas muestreadas en la Península Ibérica (*G. lutea* L. subsp. *lutea* y *G. lutea* L. var. *aurantiaca*), como era esperado debido a su clasificación taxonómica. Asimismo, los resultados de los análisis mostraron que los individuos de los Pirineos y de la Cordillera Cantábrica están claramente diferenciados (Figura 10, Figura 11A y Figura 12), apoyando las clasificaciones taxonómicas previas que establecían las poblaciones cantábricas en las que las flores tenían coloración rojiza, como pertenecientes a la subespecie *aurantiaca* (Lainz, 1982), o incluso a la especie *G. auranthiaca* (Silva et al., 2000).

Renobales (2003) indicó que el color naranja o rojizo de la corola en las plantas de estas poblaciones era la única característica morfológica significativa que las diferenciaba cuando eran comparada con la genciana amarilla (*G. lutea* L.), y, por lo tanto, propuso su clasificación como variedad. Sin embargo, este estudio revela que un elevado número de bandas ISSR (21 de 106, 19,8%) fueron detectadas únicamente en las plantas con flores rojizas de la Cordillera Cantábrica. Este porcentaje es, en torno al doble del obtenido en el estudio comparativo entre las especies *Gentiana atunsiensis* (8,5%) y *Gentiana striolata* (11,3%), en el cual se comparaban 129 bandas ISSR (Zhang et al., 2007).

Renobales (2003) estableció la existencia de la variedad *aurantiaca* a lo largo de la Cordillera Cantábrica, pero marcó el Puerto de Ventana, situado aproximadamente en el centro de la Cordillera (43° 03' 20,86" N; 6° 00' 28,03" W), como el punto más oriental a partir del cual las poblaciones con esta coloración eran menos comunes y las plantas mostraban esta característica identificativa más atenuada. Anchisi (2008) también describió una población en el lago Laurenti, en los Pirineos, en la cual las plantas mostraban esa corola rojiza. En el presente estudio se ha identificado la presencia de

poblaciones que se corresponden con la descripción de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, localizada fuera del límite establecido por Renobales (2003) en la Cordillera Cantábrica.

El análisis de las poblaciones cantábricas reveló que se pueden establecer tres grupos diferentes existiendo además una correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas. El análisis de las distancias genéticas, utilizando los métodos tanto de agrupamiento en cladograma por *neighbor-joining* como el análisis de coordenadas principales (PCoA), mostraron un grupo bien definido en el cual se incluyen las dos poblaciones localizadas al suroeste de la región a estudio (LG25 y LG24). El análisis Bayesiano de los genotipos individuales multilocus también mostró esta agrupación para las poblaciones LG25 y LG24, pero además, las poblaciones situadas en la zona oriental de la región estudiada (LG21, LG22 y LG23) se asociaron en un grupo definido diferente. Esta estructura de las poblaciones puede ser explicada por la falta de continuidad del hábitat montañoso típico donde crece la genciana, lo que puede haber generado un aislamiento parcial de las poblaciones LG25 y LG24.

G. lutea L. es una especie autoincompatible, y por tanto depende principalmente de la polinización por insectos para producir semillas (Bucher, 1987, Hegi, 1927). A partir de las observaciones en campo se sugiere que las plantas con flores atraen a los abejorros para posibilitar el cruzamiento, sabiendo además que estos son los principales polinizadores de muchas especies de gencianas alpinas como son la *G. lutea* L. (Kozuharova, 1997), *Gentiana cruciata* L. (Kozuharova et al., 2003), y *Gentiana uliginosa* Willd. (Petanidou et al., 1998). Los largos y frecuentes vuelos de estos abejorros para alimentarse y recolectar néctar pueden dar lugar a una dispersión del polen a una distancia relativamente amplia, siendo frecuente en *G. lutea* L. ya que las poblaciones silvestres suelen estar separadas varios kilómetros entre ellas. La forma, así como la ligereza de sus semillas permite que puedan ser dispersadas por el viento de modo que se pueda producir un flujo genético entre poblaciones cercanas. Por lo tanto, este potencial para dispersar tanto polen como semillas puede ayudar a explicar el flujo genético entre poblaciones vecinas y el aislamiento genético entre las poblaciones ampliamente separadas.

Zhang et al. (2007) obtuvo altos niveles de diversidad utilizando marcadores ISSR en *G. striolata* (PPL= 80,5% a nivel de especie, y entre el 40,42% y el 52,57% a nivel de poblaciones) y *G. atunsiensis* (PPL= 70,2% a nivel de especie, y de entre el 33,41% y el 46,58% a nivel de población). Varias gencianas originarias de China y en peligro de extinción (*Gentiana macrophylla* Pall., *Gentiana dahurica* Fisch., *Gentiana straminea* Maxim., y *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk) mostraron niveles más bajos de diversidad genética a nivel de especie utilizando marcadores ISSR, con valores comprendidos en el intervalo PPL= 43,75-67,71% (Zheng et al., 2011). La diversidad genética estimada en *G. lutea* L. var. *aurantiaca* demuestra un nivel notable de variación entre poblaciones (PPL= 66,04%, H_e = 0,1480) y un nivel de variación genética entre bajo y medio a nivel intrapoblacional (PPL para una sola población oscila entre el 18,87% y el 38,68%, con un nivel de diversidad genética medio a nivel de población de H_e =0,0956). La mayoría de los taxones amenazados tienen niveles de diversidad genética inferiores

que aquellos taxones no amenazados que están estrechamente relacionados con ellos, indicando con ello una baja capacidad reproductiva y un elevado riesgo de extinción (Spielman et al., 2004). *G. lutea* L. var. *aurantiaca* es una planta herbácea perenne con una distribución irregular. Las poblaciones están localizadas con frecuencia en montañas lejanas unas de otras, y aisladas por medio de mesetas o valles. Las poblaciones del suroeste (LG25 y LG24, parcialmente aisladas del resto) mostraron el valor más bajo de diversidad genética (PPL=18,87% y 19,81%; H_e =0,0719 y 0,736, respectivamente), debido al mayor aislamiento genético de estas dos poblaciones.

Las especies denominadas “raras” son generalmente consideradas menos variables genéticamente respecto de las especies más comunes y por tanto más ampliamente extendidas (Spielman et al., 2004). Esto indica que el nivel de variación genética podría estar menos intensamente asociado con el tamaño de la población en las plantas “raras”, en comparación con las plantas consideradas comunes. Ello es debido a que la variación genética es probablemente inferior en todas las poblaciones de plantas “raras” y mayor en todas las poblaciones de plantas comunes, independientemente del tamaño de esas poblaciones (Leimu et al., 2006). Se observa de forma generalizada la existencia de una relación directa entre el tamaño de la población, la capacidad adaptativa de la planta y la diversidad genética, lo cual implica que la fragmentación del hábitat ejerce un efecto negativo sobre la capacidad de adaptación de las plantas y su nivel de variación genética. Asimismo, dicha relación se ha mostrado con mayor intensidad cuando las especies analizadas son autoincompatibles (Kery et al., 2000) y en cierta medida en especies “raras”, como es el caso de *G. lutea* L., siendo estas especies más propensas al efecto negativo de la fragmentación del hábitat (Leimu et al., 2006). Kery et al. (2000) estudiaron la reproducción y la capacidad de generar descendencia en relación al tamaño de la población en *G. lutea* L. La reproducción se vio fuertemente mermada en pequeñas poblaciones, donde las plantas produjeron menos semillas por fruto y por planta. Esta reproducción se vio aún más reducida en poblaciones con menos de 500 plantas, lo cual ocurre en las poblaciones de genciana estudiadas en el presente trabajo (con menos de 150 plantas por población). Por lo tanto, estas pequeñas poblaciones de *G. lutea* L. se enfrentan a un elevado riesgo de extinción: a corto plazo debido a su reducida capacidad de reproducción y también a largo plazo debido a que estas poblaciones poseen una menor capacidad de adaptación a cambios ambientales como consecuencia de su baja variabilidad genética. Sin embargo, conviene recordar que existe controversia en cuanto al impacto de los factores genéticos en el riesgo de extinción de poblaciones y especies amenazadas en la naturaleza (Frankham et al., 2002). El tamaño de las poblaciones se ve reducido por la pérdida de hábitat, la sobreexplotación, el impacto de especies introducidas y la contaminación, de modo que se alcanza un punto en el que los factores estocásticos elevan aún más el riesgo de extinción (Shaffer, 1981).

La estructura genética de las poblaciones vegetales refleja las interacciones de varios procesos evolutivos incluyendo la evolución histórica a largo plazo, tales como cambios en su distribución, la fragmentación del hábitat, el aislamiento poblacional, la mutación, la deriva genética, el sistema de cruzamiento, el flujo genético y la selección (Schaal et

al., 1998). Un elevado nivel de diferenciación poblacional puede estar explicado por la deriva genética y una fragmentación del hábitat, lo cual conduce al aislamiento genético de las poblaciones (Hogbin y Peakall, 1999). La estructura genética observada en las poblaciones de *G. lutea* L. analizadas en la Cordillera Cantábrica implica, que se debería considerar prácticas de conservación para el mayor número de poblaciones posible, de modo, que permitiese aumentar tanto el número de individuos de cada una de ellas como la variabilidad genética existente.

6. CONCLUSIONES

- Las diferencias genéticas observadas entre las poblaciones estudiadas en la Cordillera Cantábrica respecto de *G. lutea* L. subsp. *lutea* y de *G. lutea* L. subsp. *vardjanii* refuerzan la tesis de su clasificación como *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca*.
- Independientemente de la intensidad de la coloración de las flores observada, todas las poblaciones estudiadas en la Cordillera Cantábrica pertenecen a *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca* de acuerdo con su agrupamiento en el análisis genético realizado.
- El análisis de las poblaciones cantábricas de *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca* permite establecer tres grupos geográficamente diferenciados: noroeste, este y suroeste; existiendo además, una correlación significativa entre sus distancias genéticas y geográficas.
- Las poblaciones de la subespecie *aurantiaca* muestran signos de aislamiento genético, siendo estos más evidentes en las poblaciones localizadas en el suroeste de la región Cantábrica, donde se observan los menores valores de variabilidad genética. Este aislamiento se debe a la sobreexplotación y a la fragmentación de su hábitat por la existencia de barreras tanto geográficas como geológicas.
- *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca* muestra niveles de diversidad genética inferiores a taxones no amenazados estrechamente relacionados con ella, lo que indica una baja capacidad reproductiva y un elevado riesgo de extinción, acentuándose éste por tratarse de una especie autoincompatible y “rara”, y por tanto más propensa al efecto negativo de la fragmentación del hábitat. Por ello existe un elevado riesgo de extinción a corto plazo debido a su reducida capacidad de reproducción, y a largo plazo, ya que estas poblaciones poseen una menor capacidad de adaptación a cambios ambientales como consecuencia de su baja variabilidad genética.
- La estructura genética observada en *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca* indica que se debería establecer un plan de conservación que implicara el mayor número de poblaciones posible, de modo que permitiese aumentar tanto el número de individuos de cada una de ellas, como la variabilidad genética existente, con el fin de evitar la pérdida de biodiversidad en este importante recurso medicinal.

7. CONCLUSIONS

- The genetic differences observed between studied populations in Cantabrian Mountains regarding *G. lutea* L. subsp. *lutea* and *G. lutea* L. subsp. *Vardjanii*, reinforce the classification as *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca*.
- Regardless of the flowers colour intensity observed, all populations studied in the Cantabrian Mountains belong to *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca* according to their clustering in the genetic analysis.
- El análisis de las poblaciones cantábricas de *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca* permite establecer tres grupos geográficamente diferenciados: noroeste, este y suroeste; existiendo además, una correlación significativa entre sus distancias genéticas y geográficas.
- The analysis of the Cantabrian populations of *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca* allows to establish three geographically distinct clusters: north, east, and west; furthermore there is a significant correlation between genetic and geographic distances.
- Aurantiaca populations show signs of genetic isolation, being most evident in populations located in the southwest part of the Cantabrian Mountains, where the lowest values of genetic variability have been observed. This isolation is due to overexploitation and habitat fragmentation by the existence of both geographical and geological barriers.
- *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca* shows lower levels of genetic diversity when compared with not threatened taxa closely related to it, suggesting a low reproductive capacity and a high extinction risk. This risk is higher because it's a self-incompatible and "rare" species, and therefore more prone to the negative effect of habitat fragmentation. Thus, there is a high risk of extinction in the short term due to its low reproductive capacity, and long-term, as these populations have a lower capacity to adapt to environmental changes because of its low genetic variability.
- The genetic structure observed in *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca* suggests to establish a conservation plan which should involve the largest number of populations as possible. This would enable increase both, the number of plants in each, as well as the genetic variability, avoiding the biodiversity losing of this important medicinal resource.

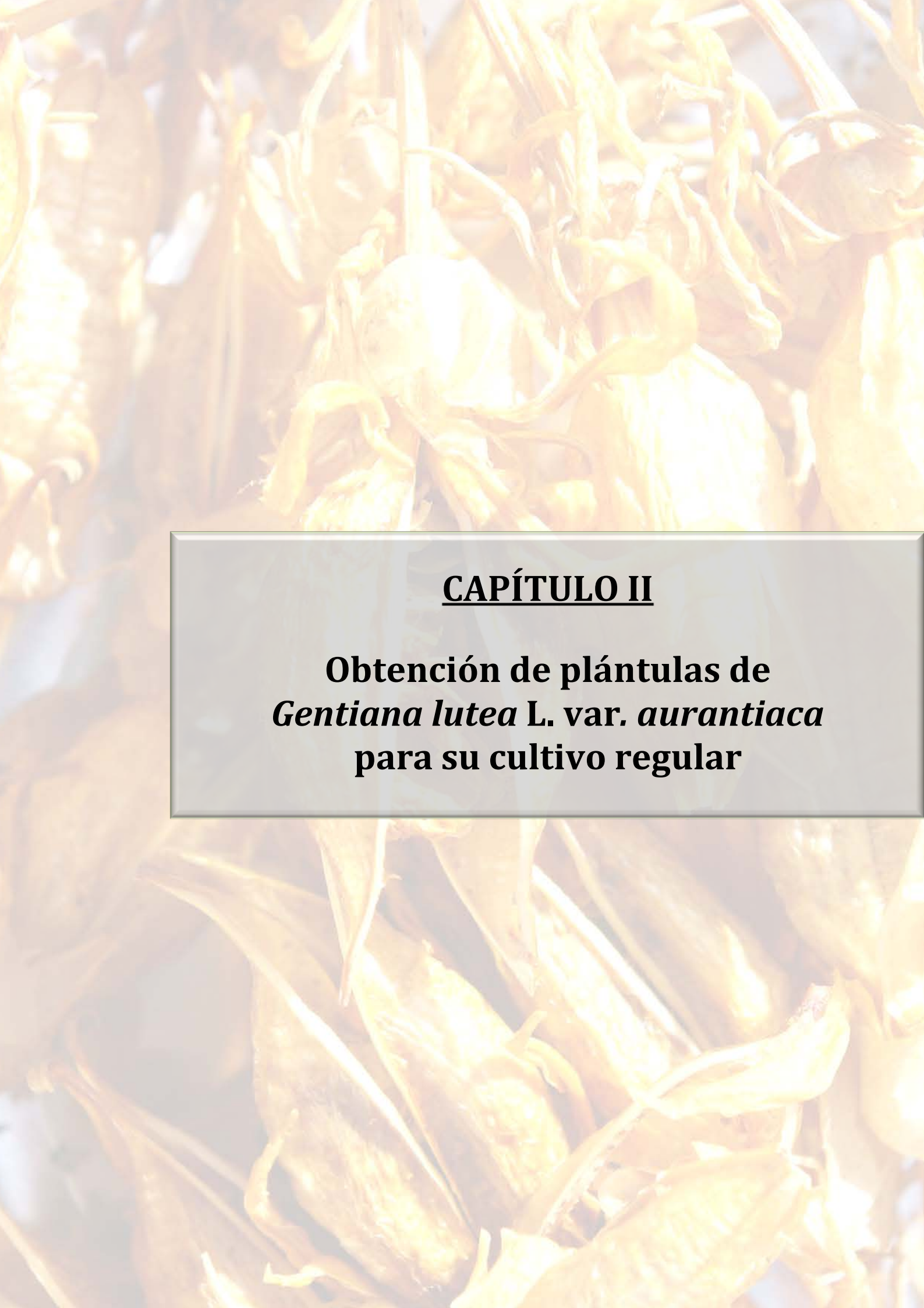
8. BIBLIOGRAFÍA

- AGARWAL, M., SHRIVASTAVA, N. & PADH, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27, 617-631.
- ANCHISI, E. 2008. *Gentiana lutea* L., la variabilità morfologica e le sue ibridazioni interspecifiche. *A.I.G.B.A Congress*. Parque Naturale Adamello Brenta.
- BUCHER, T. 1987. *Biosystematische Untersuchungen an Gentiana lutea L., Gentiana purpurea L. und deren Hybriden [Biosystematic investigations on Gentiana lutea L., Gentiana purpurea L. and their hybrids]*. University of Zürich.
- CARNAT, A., FRAISSE, D., CARNAT, A. P., FELGINES, C., CHAUD, D. & LAMAISON, J. L. 2005. Influence of drying mode on iridoid bitter constituent levels in gentian root. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 598-602.
- EARL, D. & VONHOLDT, B. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359-361.
- EVANNO, G., REGNAUT, S. & GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
- FELSENSTEIN, J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Seattle: Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington.
- FRANKHAM, R., BRISCOE, D. A. & BALLOU, J. D. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- GE, X. J., ZHANG, L. B., YUAN, Y. M., HAO, G. & CHIANG, T. Y. 2005. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR). *Biodiversity and Conservation*, 14, 849-861.
- GIELLY, L. & P., T. 1996. A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast trnL (UAA) intron sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 120, 57-75.
- GODWIN, I. D., AITKEN, E. A. & SMITH, L. W. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18, 1524-1528.
- GOLDSTEIN, D. B. & POLLOCK, D. D. 1994. Least squares estimation of molecular distance-noise abatement in phylogenetic reconstruction. *Theoretical Population Biology*, 45, 219-226.
- GOMEZ-GOMEZ, L., AHRAZEM, O., HERRANZ, J. M. & FERRANDIS, P. 2012. Genetic characterization and variation within and among populations of *Anthyllis rupestris* Coss., and endangered endemism of southern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45, 138-147.

- GUPTA, M., CHYI, Y. S., ROMERO-SEVERSON, J. & OWEN, J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 998-1006.
- HE, T., YANG, L. & ZHAO, Z. 2011. Embryogenesis of *Gentiana straminea* and assessment of genetic stability of regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *African Journal of Biotechnology*, 10, 7604-7610.
- HEGI, G. 1927. *Illustrierte Flora Von Mitteleuropa*, München, Germany, J.F. Lehmanns-Verlag
- HO, T. & LIU, S. 2001. *A worldwide monograph of Gentiana*, Science Press.
- HOGGIN, P. M. & PEAKALL, R. 1999. Evaluation of the Contribution of Genetic Research to the Management of the Endangered Plant *Zieria prostrata*. *Conservation Biology*, 13, 514-522.
- KERY, M., MATTHIES, D. & SPILLMANN, H. H. 2000. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. *Journal of Ecology*, 88.
- KOZUHAROVA, E. 1997. Wild bees as pollinators of four *Gentiana* species on Mount Vitosha (Bulgaria). *Bocconea*, 5, 619-623.
- KOZUHAROVA, E. K., ANCHEV, M. E. & POPOV, P. 2003. The pollination ecology of *Gentiana cruciata* (Gentianaceae) -specifics of a Bulgarian population in comparison to Dutch populations. *Nordic Journal of Botany*, 23, 365-372.
- LAINZ, M. Mis contribuciones al conocimiento de la flora de Asturias. 1982 Oviedo, Spain. Diputación Provincial de Asturias, Instituto de Estudios Asturianos (del C.S.I.C.), 61-62.
- LEIMU, R., MUTIKAINEN, P. I. A., KORICHEVA, J. & FISCHER, M. 2006. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology*, 94, 942-952.
- LEWONTIN, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary biology*, 6, 381-398.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106, 283-292.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 3321-3.
- NEI, M. & KUMAR, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford, New York, Oxford University Press.
- PARKER, P. G., SNOW, A. A., SCHUG, M. D., BOOTON, G. C. & FUERST, P. A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79, 361-382.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
- PETANIDOU, T., ELLIS-ADAM, A. C., DEN NJJS, J. C. M. & OOSTERMEIJER, J. G. B. 1998. Pollination ecology of *Gentianella uliginosa*, a rare annual of the Dutch coastal dunes. *Nordic Journal of Botany*, 18, 537-548.

- PHILLIPS, R., VASIL, I., WHITKUS, R., DOEBLEY, J. & WENDEL, J. 1994. Nuclear DNA markers in systematics and evolution. *DNA-based markers in plants*. Springer Netherlands.
- PIRTTILÄ, A., HIRSIKORPI, M., KÄMÄRÄINEN, T., JAAKOLA, L. & HOHTOLA, A. 2001. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 273-273.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- REITER, R. S., WILLIAMS, J. G., FELDMANN, K. A., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. & SCOLNIK, P. A. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 1477-81.
- RENOBALES, G. 2003. Notas acerca del tratamiento de las Gentianaceae para "Flora Ibérica". 60 (2), 461-469.
- RENTARÍA ALCÁNTARA, M., EGUIARTE, L., SOUZA, V., AGUIRRE, X. & INE 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*. 2007.
- SAGHAI MAROOF, M. A., BIYASHEV, R. M., YANG, G. P., ZHANG, Q. & ALLARD, R. W. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 5466-5470.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- SCHAAL, B. A., HAYWORTH, D. A., OLSEN, K. M., RAUSCHER, J. T. & SMITH, W. A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7, 465-474.
- SCHLOTTERER, C. & TAUTZ, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20, 211-215.
- SHAFFER, M. L. 1981. Minimum population sizes for species conservation. *BioScience*, 31, 131-134.
- SILVA, F. J., GÓMEZ, F., GARCÍA, X. R. & BLANCO-DIOS, J. B. 2000. Aportacions a flora de Galicia. *Nova Acta Científica Compostelana. Biología*, VI, 21-33.
- SPIELMAN, D., BROOK, B. W. & FRANKHAM, R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15261-15264.
- STRUWE, L. & ALBERT, V. A. 2002. *Gentianaceae: Systematics and Natural History*, Cambridge University Press.
- STRUWE, L., KADEREIT, J. W., KLACKENBERG, J., NILSSON, S., THIV, M., VON HAGEN, K. B. & ALBERT, V. A. 2002. Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification. In: STRUWE, L. & ALBERT, V. A. (eds.) *Gentianaceae: Systematics and Natural History*. Cambridge University Press.

- SÁNCHEZ DE LA HOZ, M. P., DÁVILA, J. A., LOARCE, Y. & FERRER, E. 1996. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome*, 39, 112-7.
- TAUTZ, D. & RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12, 4127-4138.
- VENDRAMIN, G. G., LELLI, L., ROSSI, P. & MORGANTE, M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5, 595-598.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. & ET AL. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.
- WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- WOLFE, A. D. & RANDLE, C. P. 2001. Relationships Within and Among Species of the Holoparasitic Genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) Inferred from ISSR Banding Patterns and Nucleotide Sequences. *Systematic Botany*, 26, 120-130.
- WU, K.-S. & TANKSLEY, S. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular and General Genetics MGG*, 241, 225-235.
- YANG, L. C., ZHOU, G. Y. & CHEN, G. C. 2011. Genetic diversity and population structure of *Swertia tetraptera* (Gentianaceae), an endemic species of Qinghai-Tibetan Plateau. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 302-308.
- YANG, W., DE OLIVEIRA, A. C., GODWIN, I., SCHERTZ, K. & BENNETZEN, J. L. 1996. Comparison of DNA Marker Technologies in Characterizing Plant Genome Diversity: Variability in Chinese Sorghums. *Crop Science*, 36, 1669-1676.
- YEH, F. C. & BOYLE, T. J. B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129-157.
- ZHANG, X. L., YUAN, Y. M. & GE, X. J. 2007. Genetic structure and differentiation of *Gentiana atunsiensis* W.W. Smith and *G.striolata* T. N. Ho (Gentianaceae) as revealed by ISSR markers. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 154, 225-232.
- ZHENG, P., ZHANG, K. & WANG, Z. 2011. Genetic diversity and gentiopicoside content of four *Gentiana* species in China revealed by ISSR and HPLC methods. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 704-710.
- ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A. & LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.



CAPÍTULO II

**Obtención de plántulas de
Gentiana lutea L. var. *aurantiaca*
para su cultivo regular**

CAPÍTULO II

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE.....	91
II. ÍNDICE DE FIGURAS	93
III. ÍNDICE DE TABLAS	95
1. INTRODUCCIÓN.....	97
2. OBJETIVOS.....	99
3. MATERIAL Y MÉTODOS	101
3.1. RECOLECCIÓN DE LAS SEMILLAS	101
3.2. ESTRATIFICACIÓN EN FRÍO Y REFRIGERACIÓN	102
3.3. TRATAMIENTO HORMONAL.....	103
3.4. GERMINACIÓN <i>in vitro</i>	103
3.5. EMERGENCIA Y DESARROLLO EN SUSTRATO	104
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	106
4. RESULTADOS	107
4.1. GERMINACIÓN <i>in vitro</i>	107
4.1.1. Ensayos 2011	107
4.1.2. Comparativa ensayo in vitro 2011-2012.....	110
4.1.3. Curvas de Germinación.....	114
4.2. EMERGENCIA Y DESARROLLO EN SUSTRATO	117
4.2.1. Número de hojas (N_HOJAS)	118
4.2.2. Número de hojas (A_HOJAS)	119
4.2.3. Longitud del tallo (L_TALLO).....	119
4.2.4. Longitud de las hojas L_HOJAS	120
4.2.5. Hábitos de las plántulas	120
5. DISCUSIÓN.....	123
6. CONCLUSIONES.....	127
7. CONCLUSIONS.....	129
8. BIBLIOGRAFÍA.....	131

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cápsulas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> conteniendo semillas maduras y desarrolladas.	101
Figura 2: (A) Detalle del tratamiento fungicida de semillas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> y (B) preparación para la estratificación en frío con arena de sílice.	102
Figura 3: Aplicación de los diferentes tratamientos de ácido giberélico (AG ₃) a cada uno de los lotes de semillas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	103
Figura 4: Ensayo de germinación para semillas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> : (A) cámara de cultivo; (B) distribución del ensayo; (C) semillas germinadas.....	104
Figura 5: Detalle del sistema de riego para el ensayo de emergencia y desarrollo en sustrato.	105
Figura 6: Comparación de medias entre tratamientos de frío para el porcentaje de germinación en semillas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> del análisis de varianza combinado del año 2011.....	107
Figura 7: Comparación de medias entre dosis de ácido giberélico (AG ₃) para el porcentaje de germinación en semillas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> del análisis de varianza combinado del año 2011.....	108
Figura 8: Comparación de medias entre poblaciones para el porcentaje de germinación en semillas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> del análisis de varianza combinado del año 2011.	108
Figura 9: Comparación de medias entre tratamientos de frío y dosis de ácido giberélico (AG ₃) para porcentaje de germinación en semillas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en el análisis combinado de ambos para el año 2011.	109
Figura 10: Comparación de medias entre tratamientos de frío y entre poblaciones para porcentaje de germinación en semillas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en el análisis combinado de tratamientos de frío y poblaciones en el año 2011.	110
Figura 11: Comparación de medias para el análisis de varianza combinado de los años 2011 y 2012 entre tratamientos de frío para el porcentaje de germinación en semillas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	110
Figura 12: Comparación de medias para el análisis de varianza combinado de los años 2011 y 2012 entre dosis de ácido giberélico (AG ₃) para el porcentaje de germinación en semillas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	111
Figura 13: Comparación de medias para el análisis de varianza combinado de los años 2011 y 2012 y entre poblaciones para el porcentaje de germinación en semillas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	112

Figura 14: Comparación de medias para el análisis de varianza combinado de los años 2011 y 2012 entre dosis de ácido giberélico (AG ₃) para el porcentaje de germinación en semillas en cada población (LG18, LG19, LG22, LG33 y LG35) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	113
Figura 15: Curva de germinación acumulada para las semillas refrigeradas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> tratadas con diferentes dosis de ácido giberélico (AG ₃), para el ensayo de germinación in vitro 2011.	114
Figura 16: Curva de germinación acumulada para las semillas estratificadas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> tratadas con diferentes dosis de ácido giberélico (AG ₃), para el ensayo de germinación in vitro 2011.	115
Figura 17: Curva de germinación acumulada para las semillas estratificadas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> tratadas con diferentes dosis de ácido giberélico (AG ₃), para las poblaciones LG18 y LG19 en el ensayo de germinación in vitro 2011.	116
Figura 18: Comparación de medias entre tratamientos de frío para los caracteres medidos en plántulas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la población LG18.	117
Figura 19: Comparación de medias entre dosis de ácido giberélico (AG ₃) (1000, 500, 100 y 50 ppm), para los caracteres medidos en plántulas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la población LG18.....	118
Figura 20: Comparación de medias entre dosis de ácido giberélico (AG ₃) para el número de hojas por plántula (N_HOJAS) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> tras seis meses de desarrollo.....	118
Figura 21: Comparación de medias entre dosis de ácido giberélico (AG ₃) para la longitud de la parte más ancha de la hoja más desarrollada del tercer par de hojas comenzando por la base (A_HOJAS) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> tras seis meses de ensayo.	119
Figura 22: Representación gráfica de la recta de regresión lineal obtenida para la longitud del tallo (L_TALLO) en plántulas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en función de las dosis de ácido giberélico (AG ₃) aplicadas.....	119
Figura 23: Representación gráfica de la recta de regresión lineal obtenida para L_HOJAS: Longitud (mm) de la hoja más desarrollada en el tercer par de hojas comenzando por la base, en plántulas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en función de las dosis de ácido giberélico (AG ₃) aplicadas.	120
Figura 24: Hábitos de crecimiento de las plántulas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> (H1-H5).....	121
Figura 25: Comparación de medias entre el porcentaje de hábitos (H1-H5) de las plántulas de LG18 para cada dosis de AG ₃	122

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Localización de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.....102

Tabla 2: Tiempo medio de germinación (TMG) para las semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*116

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han tenido un uso creciente en los últimos tiempos, y con ello un aumento en la demanda de materias primas con las que elaborar las distintas fórmulas comercializadas. En muchos de estos formulados de la medicina natural está presente la raíz de genciana (*Radix Gentianae*) (Leung, 1980), lo que unido al aumento de la demanda ha provocado que se cifre el consumo de la industria en más de 1500 toneladas de raíz seca, lo que supone unas 6000 toneladas de raíz fresca (Ando et al., 2007). El aumento del consumo de raíces de genciana, y que esta planta presente figuras de protección en la mayor parte de Europa, hace que su cultivo sea cada vez más necesario, y para ello, teniendo en cuenta las peculiaridades de las semillas, es necesario conocer protocolos eficientes en la obtención de nuevas plantas, tanto en cantidad como en calidad, asegurando con ello el éxito en el trasplante para su cultivo.

La multiplicación de la *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* tiene lugar principalmente a través de la reproducción sexual. En la naturaleza, el éxito de la reproducción depende de numerosas variables, donde quizás las más importantes son las condiciones climatológicas. Para la multiplicación de la genciana así como de otras plantas alpinas estas condiciones son muy extremas, especialmente en los hábitats que la genciana ocupa en la Península Ibérica, ya que a los fríos invernales les suelen suceder veranos calurosos y sobre todo secos, lo cual hace que muy pocas plántulas sobrevivan al primer año.

Sólo aquellas lo suficientemente vigorosas lograrán la supervivencia, siendo capaces de generar un sistema radicular profundo en poco tiempo, y no desarrollando una masa foliar excesiva, compuesta por una roseta basal de hojas compacta, y permitiendo así recoger la humedad que se genera por condensación en las frías noches estivales. Aunque la genciana es una planta heliófila, otro de los factores importantes para la supervivencia el primer año es la presencia de otras plantas herbáceas o arbustivas de pequeño porte que las protejan de insolaciones prolongadas. Aquellas plántulas que superen el primer año de vida tienen muchas posibilidades de llegar a su edad adulta.

Debido a estas dificultades para su supervivencia en el primer año, una de las respuestas adaptativas de la planta para asegurar la descendencia es la generación de un alto número de frutos y por tanto de semillas, y aunque el porcentaje de germinación de éstas es bajo, el número de semillas germinadas seguirá siendo elevado, aumentando con ello las posibilidades de que alguna de ellas de lugar a una planta adulta.

Las semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, al igual que las de muchas plantas alpinas poseen dormancia, siendo ésta principalmente fisiológica (Baskin y Baskin, 2004, Schwienbacher et al., 2011). Esta dormancia puede ser eliminada mediante tratamientos hormonales con ácido giberélico (Struwe y Albert, 2002, Barralis y Chadoeuf, 1973), refrigeración en seco (Favarger, 1953, Franz y Fritz, 1978) o mediante estratificación en

frío (Fritz et al., 1980). Algunos de estos tratamientos para la eliminar la dormancia, como es el uso de ácido giberélico, pueden producir plántulas débiles y/o ahiladas (Bezzi et al., 1987).

Las giberelinas son unas fitohormonas, de las cuales el ácido giberélico (AG₃) es la que tiene un uso más extendido. El AG₃ juega un papel importante en muchos de los procesos de desarrollo y crecimiento de la planta (Teszálák et al., 2013). De forma exógena el ácido giberélico es utilizado para la germinación de semillas, siendo capaz de romper la dormancia de semillas de plantas de familias muy diversas, ya sea por la utilización única de la fitohormona o de forma complementaria a otros tratamientos químicos, físicos o mecánicos. Pérez-García et al. (2012) en *G. lutea* L., Rubio Neto et al. (2014) en la Palmera de Cascabel (*Acrocomia aculeata* Jacq.), o Dissanayake et al. (2010) en el Guayule (*Parthenium argentatum* Gray.). De forma generalizada, las giberelinas están directamente implicadas en el control y promoción de la germinación, en la que se dan lugar diversas transformaciones químicas. Una de las reacciones bioquímicas que se ven afectadas por el ácido giberélico es la síntesis de hidrolasas (especialmente la α -amilasa) en el endospermo de los granos de cereal. Su rotura es asumido como un proceso esencial en la germinación (Mrva et al., 2006), por lo tanto el ácido giberélico estimula la germinación vía la síntesis de la amilasa (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En el cultivo de plantas es también utilizado para la estimulación del crecimiento de los tallos con resultados diversos (McKenzie y Deyholos, 2011, Amooaghaie y Valivand, 2011, Akça et al., 2001), ya que en ocasiones la utilización del ácido giberélico tiene efectos no deseados.

Respecto de las semillas de *G. lutea* L., diferentes autores han profundizado en el estudio de su comportamiento germinativo (Aiello et al., 1998, Barralis y Chadoeuf, 1973, Franz y Fritz, 1978), pero sin duda el estudio de Pérez-García et al. (2012) es el más extenso en el que se trata la rotura de su dormancia y, por tanto, del porcentaje de germinación mediante diferentes tratamientos pregerminativos, entre los que se encuentran la estratificación en frío y la aplicación de ácido giberélico.

2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental es la obtención de plántulas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para su uso en cultivo regular en el entorno de su hábitat natural. Debido a la dormancia que presentan sus semillas, para alcanzar este fin se establecen dos objetivos parciales pero dependientes entre sí:

- Optimizar la capacidad germinativa de las semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* mediante diferentes tratamientos de frío y el empleo de ácido giberélico para la rotura de la dormancia.
- Optimizar la morfología de las plántulas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, regulando los tratamientos pregerminativos que mayor eficacia presenten en la rotura de la dormancia, para que sus características proporcionen garantías de establecimiento y desarrollo en el cultivo en ambientes de montaña.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. RECOLECCIÓN DE LAS SEMILLAS

Las semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* utilizadas en los ensayos fueron recolectadas en septiembre de 2010 a partir de cinco poblaciones silvestres localizadas en diferentes puntos de la Cordillera Cantábrica dentro de la provincia de León (España) (Tabla 1). Estas semillas fueron tomadas de cápsulas que las contuviesen bien desarrolladas y maduras (Figura 1). Igualmente, las semillas se recogieron para cada población de al menos diez plantas seleccionadas de manera aleatoria, estando estas separadas al menos cinco metros entre ellas para evitar muestrear la misma planta, ya que debido al desarrollo de la raíz de genciana es posible que varios tallos florales correspondan a la misma planta.



Figura 1: Cápsulas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* conteniendo semillas maduras y desarrolladas.

Recogidas las semillas, estas fueron identificadas y empaquetadas mediante un código alfanumérico (Tabla 1). A la llegada al laboratorio, las semillas fueron sometidas a un periodo de seis horas a -18°C con el fin de eliminar los pequeños insectos y/o larvas presentes en las cápsulas recogidas, así como para evitar la eclosión de posibles ovoposiciones que pudiesen localizarse sobre la superficie de las semillas. Tras este periodo de “higienización”, las semillas se limpiaron manualmente eliminando aquellas que estuviesen dañadas, vacías o visualmente malformadas y, almacenando las sanas en bolsas de papel bien identificadas y en refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$), dentro de botes de cristal opacos con sílica gel para ser utilizadas posteriormente. Una pequeña cantidad de semillas de cada una de las poblaciones fue entregada en el Herbario Jaime Andrés Rodríguez, de la Universidad de León, donde se otorgó un código a cada una de las poblaciones (Tabla 1).

Tabla 1: Localización de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

Localización	Código población	Latitud (N)	Longitud	Altitud (m)
Torre de Babia	LG18	43°00'47''	06°05'59''O	1801
Senra	LG19	42°50'07''	06°11'25''O	1724
Señales	LG33	43°04'37''	05°14'33''O	1639
Respina	LG35	43°00'57''	05°21'19''O	1561
Valdeteja	LG22	42°56'28''	05°27'34''O	1419

. LG: referencia LEB-GERM otorgada a las muestras depositadas en el Herbario Jaime Andrés Rodríguez, de la Universidad de León.

3.2. ESTRATIFICACIÓN EN FRÍO Y REFRIGERACIÓN

El tratamiento de refrigeración consistió en mantener las semillas en las condiciones de conservación descritas anteriormente hasta su uso.

Mientras, para la estratificación en frío durante tres meses y un año, se tomó un gramo de semillas, lo que supone más de mil de ellas, para cada una de las cinco poblaciones.

Para llevar a cabo la estratificación, se utilizaron bandejas de aluminio desechables, situando las semillas sobre una base de arena de sílice de entre 0,3 y 0,9 mm de tamaño de partícula.

Antes de iniciar la estratificación, las semillas sufrieron un tratamiento fungicida preventivo para controlar la proliferación de hongos durante la estratificación o al menos reducirla. Para ello las semillas fueron sumergidas en una dilución de TIRAM 80% (PM) p/p (TISAR PM; exclusivas SARABIA S.A.) (González, 2003) durante diez minutos, en los que se mantuvo la dilución en agitación (Figura 2A).

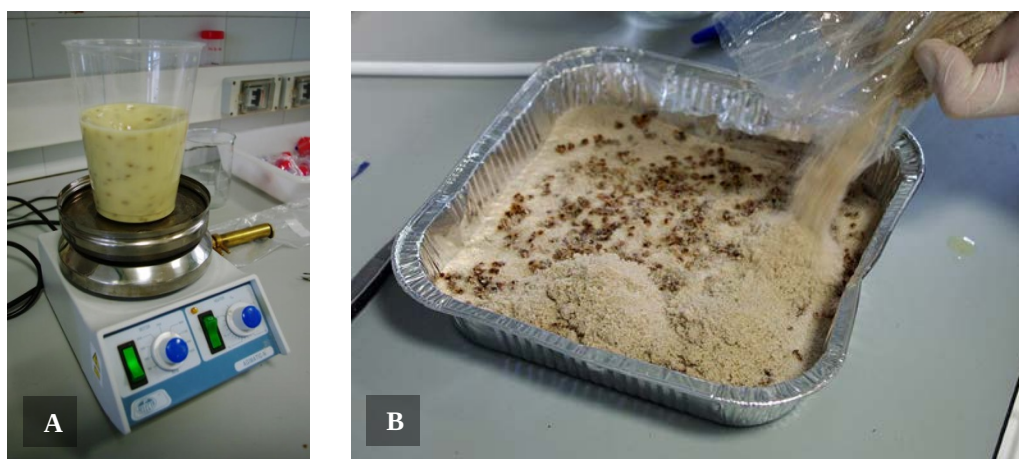


Figura 2: (A) Detalle del tratamiento fungicida de semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* con TIRAM 80% (PM) p/p (TISAR PM; exclusivas SARABIA S.A.) y (B) su posterior preparación para la estratificación en frío con arena de sílice.

Tanto las bandejas como la arena de sílice fueron esterilizadas mediante autoclavado a una presión de $1,0 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ y 120°C durante una hora en cada uno de los siguientes tres días (Larena et al., 2002). Una vez realizado esto, las semillas se distribuyeron homogéneamente sobre toda la superficie de la bandeja y se cubrieron con otra capa de arena de sílice de aproximadamente un centímetro de espesor (Figura 2B). Tras ello, la

arena se humedeció con agua esterilizada evitando que ésta estuviese saturada, y se colocaron las bandejas en refrigeración a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Las bandejas se revisaron semanalmente durante los siguientes 90 días para comprobar que el contenido de humedad era el adecuado, añadiendo agua igualmente esterilizada cuando fuese necesario durante el desarrollo del ensayo. Una vez transcurridos los 90 días, se tomó una parte de las semillas para realizar los ensayos de germinación correspondientes a 2011, mientras que, el resto se mantuvo durante nueve meses más en condiciones de estratificación para comprobar la capacidad germinativa después de un año, correspondiéndose con los ensayos denominados 2012.

3.3. TRATAMIENTO HORMONAL

Trascurridos tres meses, las semillas estratificadas fueron separadas de la arena, y por tanto limpiadas. Para ello se utilizó un tamiz metálico con una luz de 1,5 mm, lo que permite eliminar la arena evitando que pasen las semillas de genciana a través, ya que estas tienen un diámetro mayor. Para facilitar la limpieza se utilizó un chorro de agua, permitiendo con ello eliminar cualquier resto de arena presente en la superficie de las semillas. Las semillas fueron agrupadas en lotes de 50 y 120 semillas para ser utilizadas en los ensayos *in vitro* y en sustrato comercial.

En el tratamiento de las semillas se ha utilizado AG_3 (Sigma-Aldrich®). Antes de su siembra las semillas se mantuvieron a remojo durante 24 horas a 25°C en agua destilada o en una de las cuatro diluciones de ácido giberélico (50, 100, 500 o 1000 ppm) que se testaron para este ensayo (Figura 3). Una vez transcurrido este tiempo, las semillas fueron lavadas con agua destilada para eliminar los residuos de AG_3 .



Figura 3: Aplicación de los diferentes tratamientos de ácido giberélico (AG_3) a cada uno de los lotes de semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

3.4. GERMINACIÓN *in vitro*

Para cada tratamiento, en cada una de las poblaciones se realizaron dos repeticiones con 50 semillas cada una de ellas, de modo que a su vez se testaron las cuatro dosis de AG_3 y su correspondiente control. Sobre un papel de filtro, en una placa Petri de plástico

aséptica de 9 cm de diámetro, se situaron las semillas añadiendo 4 ml de agua esterilizada. Periódicamente se añadió agua destilada para evitar que el papel se secase. Para ello, y para realizar el conteo de las semillas germinadas se revisó el ensayo dos veces por semana durante los siguientes 90 días. Las semillas se consideraron germinadas cuando la longitud de la radícula superó en al menos 1 mm la cubierta de la semilla (Pérez-García et al., 2012).

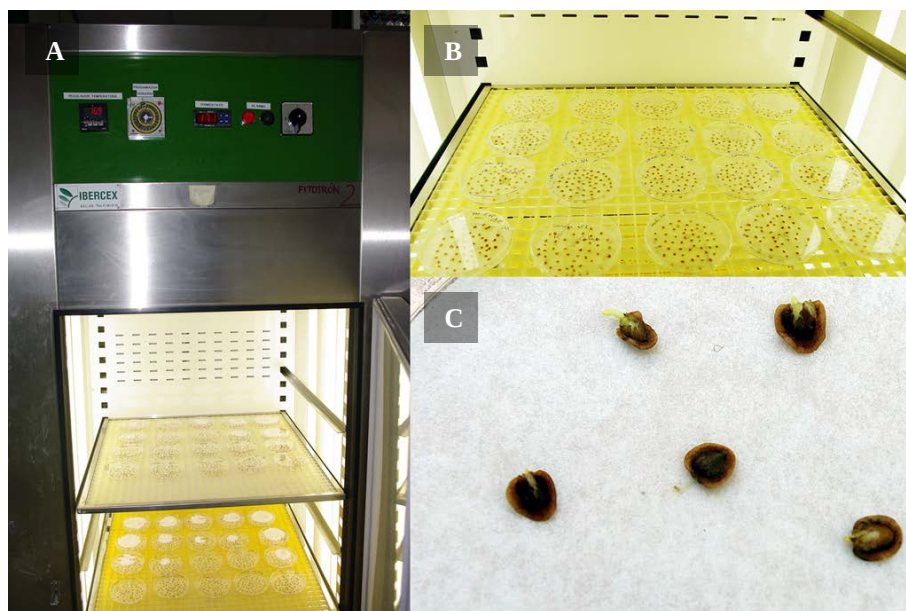


Figura 4: Ensayo de germinación para semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*: (A) cámara de cultivo; (B) distribución del ensayo; (C) semillas germinadas.

Las placas se colocaron en una cámara de cultivo utilizando para su distribución un diseño totalmente aleatorizado. En el tiempo que permanecieron las semillas en el ensayo, las condiciones de la cámara de cultivo fueron constantes. Temperatura de 15°C y fotoperiodo de 16 h de luz (proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca con una irradiación de $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Pérez-García et al., 2012) (Figura 4).

3.5. EMERGENCIA Y DESARROLLO EN SUSTRATO

En la siembra se utilizaron contenedores para la multiplicación de plantas forestales modelo 67C (PLÁSTICOS SOLANAS S.L.). Cada uno de los contenedores está provisto de 67 alveolos, con un volumen de 200 cm^3 y 15 cm de altura. Antes de ser usadas, las bandejas se lavaron con jabón y agua a presión para eliminar cualquier residuo. El sustrato utilizado en las bandejas fue el sustrato comercial n°28 de PINDSTRUP MOSEBRUG SAE. Este sustrato está compuesto de una mezcla de turba rubia (70%) y turba negra (30%), con un pH entre 5,5 y 6, siendo uno de los sustratos comerciales con unos de los valores de pH más bajos, y por tanto más cercanos a los valores donde se desarrolla de forma silvestre la variedad *aurantiaca*. El sustrato fue esterilizado antes de ser utilizado mediante el autoclavado a $1,0 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ y 120°C durante una hora en tres días consecutivos (Larena et al., 2002). Con ello se pretende eliminar cualquier espora de hongos o semillas que pudiesen encontrarse en él. Una vez se rellenaron los contenedores

con el sustrato, este se humedeció y se compactó con una herramienta manual para asegurar idéntico volumen en cada alveolo.

Dicho ensayo se realizó en 2011, en paralelo al de germinación *in vitro*. Se emplearon 120 semillas de la población LG18 para cada una de las dosis de ácido giberélico y tratamiento de frío (estratificación durante tres meses y refrigeración), con un diseño en bloque totalmente aleatorizado con cuatro repeticiones. Cada semilla fue recubierta con 15 cm³ de arena de sílice esterilizada, lo que supone aproximadamente 1 cm de espesor, de modo que todas las semillas se encontrasen en las mismas condiciones a la hora de germinar.

El ensayo se situó en condiciones naturales bajo una malla de sombreo, donde se instaló un sistema de riego por nebulización automatizado, evitando con ello que el tamaño de gota pudiese modificar las condiciones del mismo. Durante el periodo del ensayo la temperatura media diaria se situó entre los 12,6°C y los 27,3°C, mientras que la humedad relativa estuvo entre el 31% y el 71%. Tras 90 días de su siembra se contabilizó el número de plantas emergidas.



Figura 5: Detalle del sistema de riego para el ensayo de emergencia y desarrollo en sustrato.

Después de 180 días tras la siembra, mediante el empleo de un calibre digital de la Serie 500 (Mitutoyo[®]) se determinaron los caracteres que se describen a continuación:

- N_HOJAS: Número de hojas desarrolladas por planta contadas en 20 plantas elegidas al azar para cada unidad experimental.
- L_TALLO: Longitud del tallo de la planta, contadas en 20 plantas elegidas al azar para cada unidad experimental.
- A_HOJA: Longitud de la parte más ancha de la hoja más desarrollada del tercer par de hojas comenzando por la base medida para 20 plantas elegidas al azar de cada unidad experimental.
- L_HOJA: Longitud (mm) de la hoja más desarrollada en el tercer par de hojas comenzando por la base medida para 20 plantas elegidas al azar de cada unidad experimental.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada uno de los experimentos llevados a cabo, los datos fueron analizados utilizando el Modelo Lineal Generalizado (GLM), de modo que cuando el análisis mostró diferencias significativas entre tratamientos, se realizó la comparación de medias mediante el método de Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fischer con un grado de significancia $\alpha=0,05$. El software utilizado fue el SAS 9.1. (SAS Institute Inc, 2004)

El tiempo medio de germinación (TMG) se determinó después de los 90 días de ensayo mediante la siguiente fórmula (Ellis y Roberts, 1981): $TMG = \sum DN / \sum N$; donde D es el número de días desde la siembra y N el número de semillas germinadas en el día D.

Se utilizó el modelo de regresión lineal simple para analizar la relación existente entre las variables morfológicas (variables independientes) de las plántulas en relación a las concentraciones de AG₃ aplicadas (variable dependiente), utilizando para ello la hoja de cálculo Excel (Microsoft, 2010)

4. RESULTADOS

4.1. GERMINACIÓN *in vitro*

4.1.1. Ensayos 2011

El análisis de varianza combinando para ensayo realizado en 2011 muestra diferencias significativas en los tres factores analizados: tratamiento en frío, dosis AG₃ y poblaciones.

En la Figura 6 se muestra la comparación de medias para el tratamiento de frío, existiendo diferencias significativas entre ambos tratamientos, siendo significativamente mayor el porcentaje medio de germinación de las semillas estratificadas (44,04%) que el de las semillas refrigeradas (37,96%).

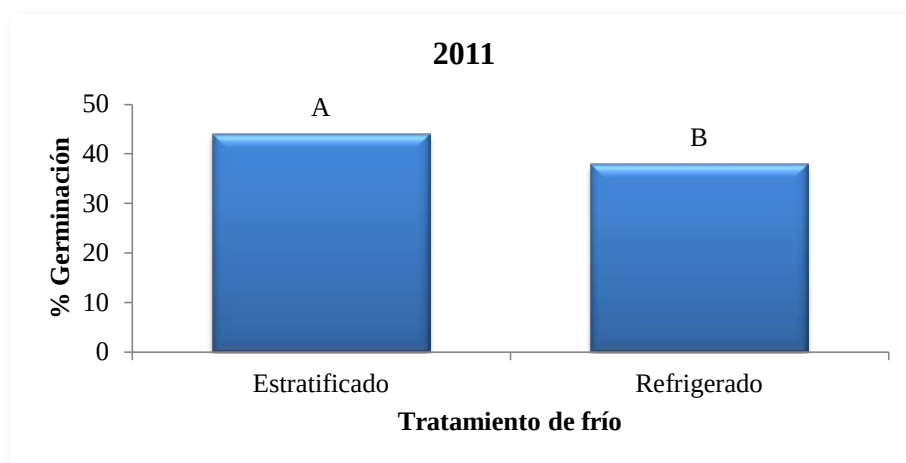


Figura 6: Comparación de medias entre tratamientos de frío para el porcentaje de germinación en semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* del análisis de varianza combinado del año 2011. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

En la Figura 7, se muestra la comparación de medias entre las diferentes dosis de AG₃ aplicadas para el porcentaje de germinación de las semillas, existiendo diferencias significativas entre las dosis 1000 ppm (57,6%) y 500 ppm (56,5%) respecto del resto de dosis, así como del control. Tanto las dosis de 100 ppm (50,3%), 50 ppm (38,6%) y el Control (1,9%) son significativamente diferentes entre sí.

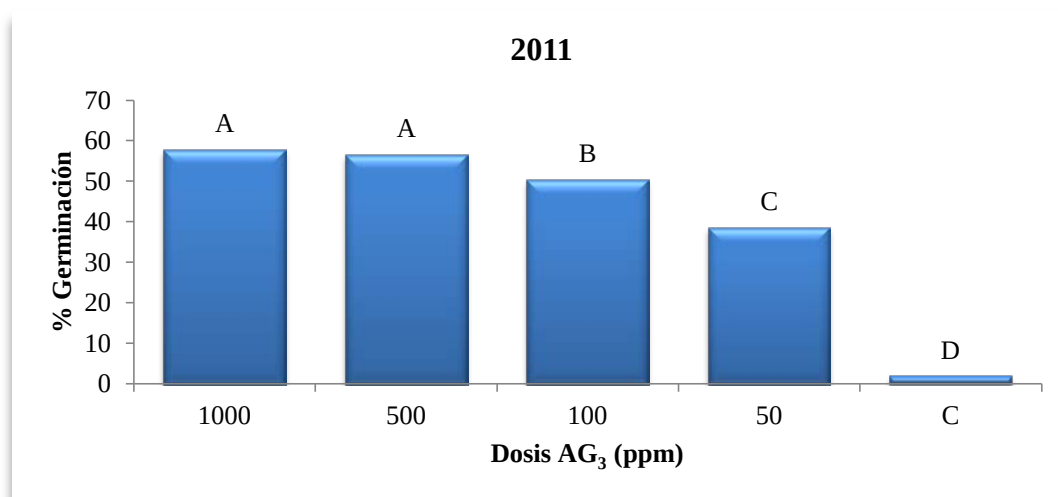


Figura 7: Comparación de medias entre dosis de ácido giberélico (AG₃) para el porcentaje de germinación en semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* del análisis de varianza combinado del año 2011. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes (P=0,05) de acuerdo con DMS.

La comparación de medias entre las poblaciones ensayadas (Figura 8) muestra un porcentaje de germinación superior para las poblaciones LG19 y LG18, con el 68,30% y el 57,80% respectivamente, sin significativamente diferencias entre sí y respecto del resto de poblaciones. Tanto la población LG22 (36,40%) como LG35 (32,90%) no son significativamente diferentes entre ellas, pero sí respecto de LG33 (9,6%).

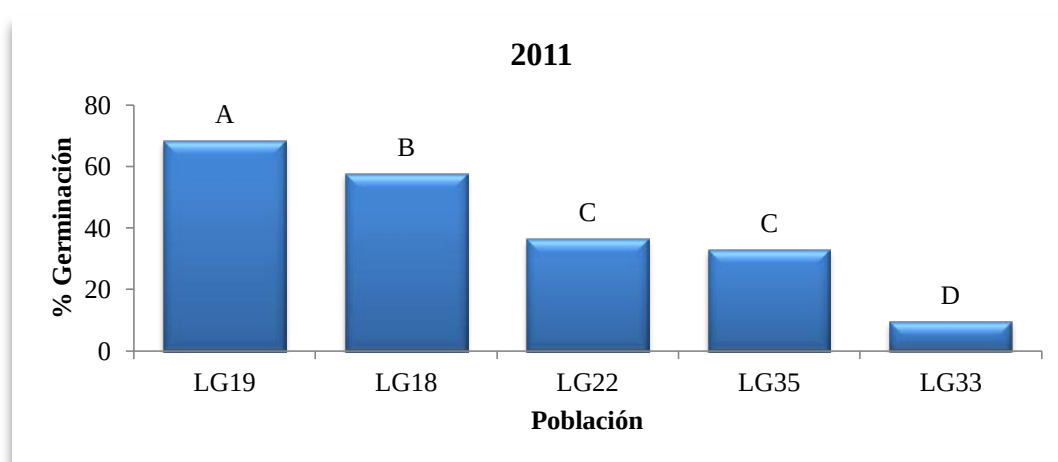


Figura 8: Comparación de medias entre poblaciones para el porcentaje de germinación en semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* del análisis de varianza combinado del año 2011. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes (P=0,05) de acuerdo con DMS.

En el análisis de varianza combinado de los factores “dosis AG₃” y “tratamiento de frío”, se observa que existen diferencias significativas en ambos tratamientos (Figura 9).

En la comparación de medias entre las dosis de AG₃ para cada tratamiento de frío, la aplicación de las dosis hormonales más elevadas (1000 ppm y 500 ppm) para las semillas que sufrieron el tratamiento de estratificación (barras azules), tiene como respuesta los porcentajes de germinación más altos (67,2% y 65,8% respectivamente), no existiendo

diferencias significativas entre ambas, pero sí respecto del resto de las dosis de AG₃. A medida que la dosis hormonal es menor el porcentaje de germinación disminuye significativamente, siendo 53,8% y 33,2% los porcentajes para 100 y 50 ppm respectivamente. Para el control el porcentaje de germinación es únicamente del 0,2%.

Por otro lado, las semillas que únicamente estuvieron refrigeradas (barras rojas) antes de ser sometidas al tratamiento con AG₃ tienen un comportamiento muy homogéneo. La diferencia en el porcentaje de germinación entre la dosis más alta (1000 ppm, 48,2%) y la más baja (50 ppm, 44,0%) apenas es de un 4,2 %, no existiendo diferencias significativas entre las diferentes dosis hormonales aplicadas, pero si respecto al Control (3,6%).

La comparación de medias (Figura 9, letras minúsculas) no muestra diferencias significativas entre los tratamientos de frío en cada nivel de AG₃, excepto para el Control.

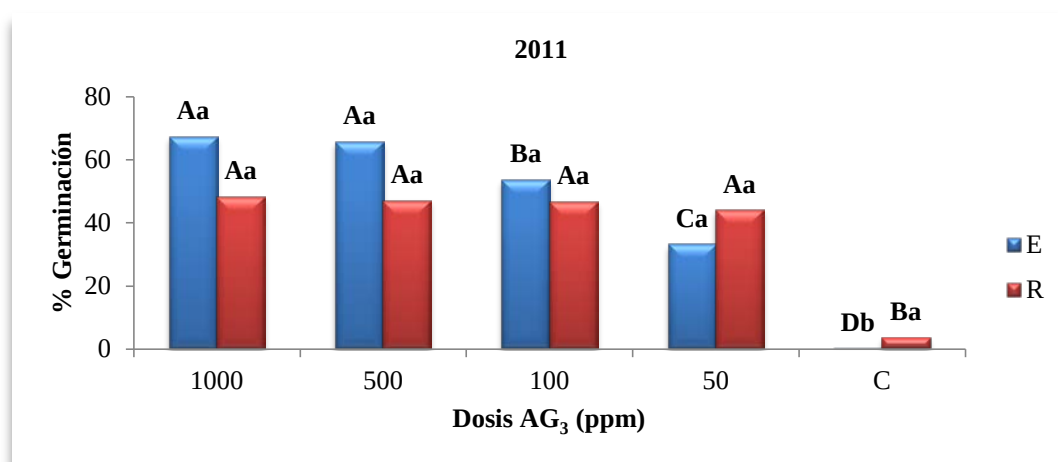


Figura 9: Comparación de medias entre tratamientos de frío y dosis de ácido giberélico (AG₃) para porcentaje de germinación en semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en el análisis combinado de ambos para el año 2011. Columnas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes entre dosis de AG₃ para cada tratamiento de frío. Columnas con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes entre tratamientos de frío para cada dosis de AG₃ (P=0,05) de acuerdo con DMS. E: estratificado; R: refrigerado.

Al combinar en el análisis los factores “población” y “tratamiento de frío”, se observan diferencias significativas entre poblaciones para las semillas estratificadas (Figura 10, barras azules). Al igual que para el porcentaje de germinación para las diferentes poblaciones (Figura 8), existen diferencias significativas entre LG18, LG19 y el resto, con porcentajes de germinación para éstas del 69,4% y 67,4% respectivamente. Las poblaciones LG35 (39,6%) y LG22 (36,6%) también son significativamente diferentes respecto de la población LG33, con un porcentaje de germinación de únicamente el 7,2%.

Al comparar las semillas refrigeradas (Figura 10, barras rojas), todas las poblaciones resultan ser significativamente diferentes, siendo el mayor porcentaje de germinación el de la población LG19 (69,2 %) y el menor, nuevamente, el de la población LG33 (12%).

Al comparar para cada población las diferencias entre los tratamientos de frío (Figura 10, letras minúsculas) tanto LG18 como LG35 muestran diferencias significativas entre las semillas refrigeradas y estratificadas. En ambos casos es superior el porcentaje de

germinación en el tratamiento estratificado al refrigerado. Los valores para LG18 son del 69,4% y 46,2% para los tratamientos estratificado y refrigerado. Mientras, para la población LG35 son del 39,6% y 26,2% respectivamente.

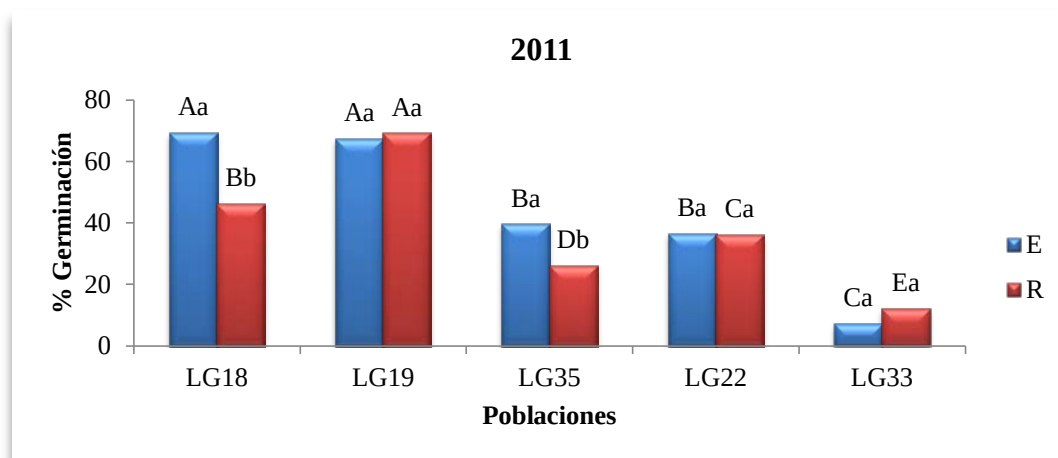


Figura 10: Comparación de medias entre tratamientos de frío y entre poblaciones para porcentaje de germinación en semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en el análisis combinado de tratamientos de frío y poblaciones en el año 2011. Columnas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes entre poblaciones para cada tratamiento de frío. Columnas con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes entre tratamientos de frío para cada nivel de población ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. E: estratificado; R: refrigerado.

4.1.2. Comparativa ensayo in vitro 2011-2012

El ensayo iniciado en 2011, para el cual se utilizaron semillas estratificadas durante 3 meses, se completó ensayando la capacidad germinativa de las semillas del mismo lote después de estar estratificadas durante nueve meses más, es decir para un año en total.

El análisis de varianza combinando los ensayos realizados el año 2011 y 2012 para el tratamiento de frío (Figura 11), muestra que el porcentaje de germinación de las semillas el año 2011 (44,04%) es significativamente superior al registrado en 2012 (10,76%).

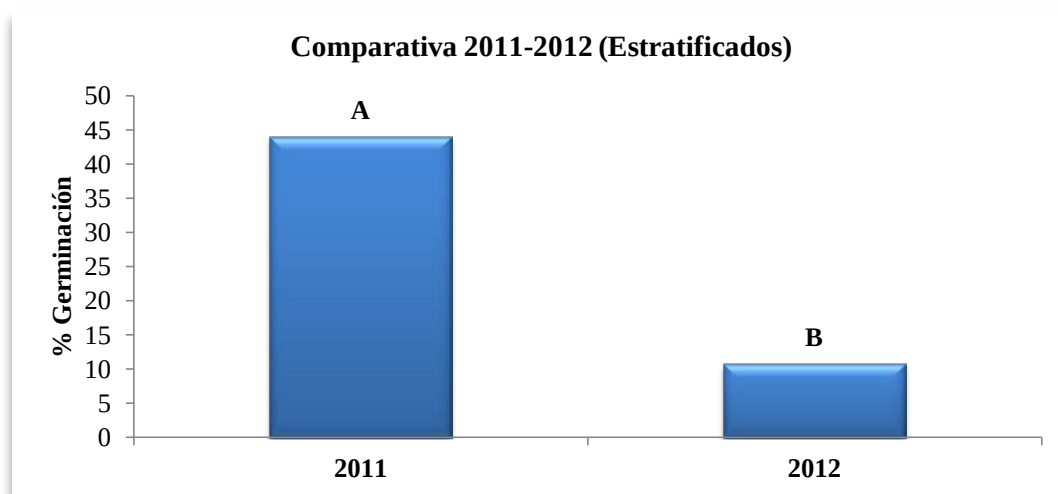


Figura 11: Comparación de medias para el análisis de varianza combinado de los años 2011 y 2012 entre tratamientos de frío para el porcentaje de germinación en semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

El análisis combinando los ensayos realizados el año 2011 y 2012 para las dosis de AG₃ (Figura 12) muestra como para ambos años los porcentajes de germinación disminuyen a medida que se reduce la concentración de AG₃ empleada, manteniéndose la tendencia ya detectada en 2011.

Para el año 2012 los porcentajes son menores que los registrados en 2011. El mayor valor es para la dosis de AG₃ de 1000 ppm (37,2%), significativamente superior al del resto de las dosis, al igual que la dosis de 500 ppm (13,8%). Las dosis de 100 ppm y 50 ppm no muestran diferencias significativas entre ellas, con valores del 2,2% y 0,6%, siendo nula la germinación de las semillas no tratadas con AG₃.

Excepto para la dosis Control, en la que para ambos años el porcentaje de germinación registrado es cero, para el resto de las dosis las tasas de germinación son significativamente superiores para 2011 (Figura 12, letras minúsculas). Los mayores descensos en el porcentaje de germinación se dan a dosis bajas de AG₃, siendo el descenso para la dosis de 1000 ppm del 44,6%. El aumento de la pérdida de la capacidad germinativa es más acusado cuando la dosis de AG₃ aplicada es de 500 ppm, donde el descenso es del 79%, y así sucesivamente, de modo que para la dosis de 100 ppm el descenso es del 95,9% y del 98,2% para 50 ppm.

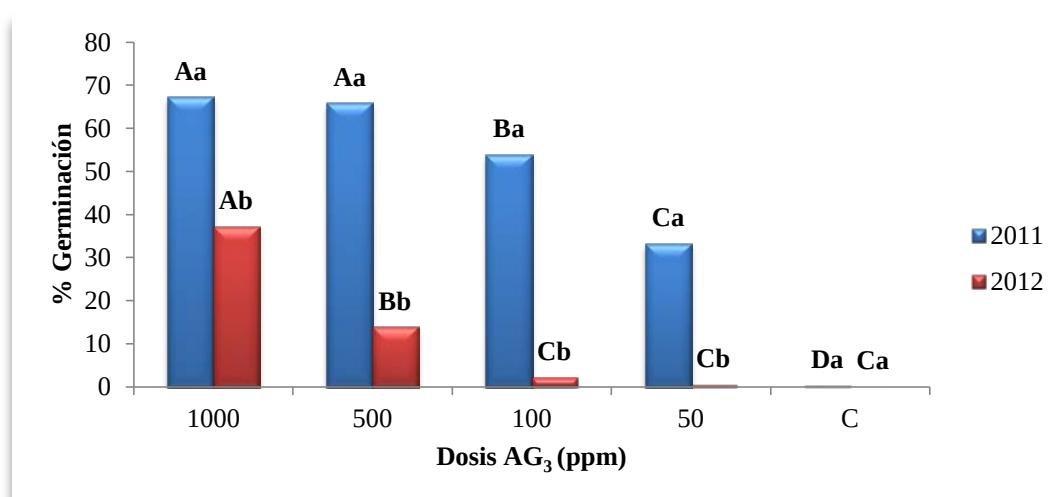


Figura 12: Comparación de medias para el análisis de varianza combinado de los años 2011 y 2012 entre dosis de ácido giberélico (AG₃) para el porcentaje de germinación en semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. Columnas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes entre dosis de AG₃ para cada año. Columnas con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes entre años para cada dosis de AG₃. (P=0,05) de acuerdo con DMS.

El análisis combinando los ensayos realizados el año 2011 y 2012 para las diferentes poblaciones (Figura 13, letras mayúsculas), muestra que para el año 2012 el mayor porcentaje de germinación obtenido es para la población LG18 (25,8%), significativamente superior al resto de las poblaciones, al igual que LG19, que con una capacidad germinativa del 18,2% es significativamente superior a las tres poblaciones restantes. Para LG33 (7,2%), el porcentaje de germinación es significativamente superior a la población LG35 (0,2%), pero no de la población LG22 (2,4%).

Al comparar los porcentajes de germinación de 2011 respecto de los de 2012 para cada una de las dosis aplicadas (Figura 13, letras minúsculas), los resultados obtenidos en 2012 se muestran significativamente inferiores excepto para LG33, con un porcentaje de germinación igual a la obtenida en 2011 (7,2%).

Mientras que en el caso de la población LG33 no existe variación para su capacidad germinativa media, para el resto de poblaciones los datos de 2012 son significativamente inferiores, con descensos para las poblaciones LG18 y LG19 del 63% y del 73% respectivamente, mientras que para LG35 y LG22 son superiores al 90%, siendo sus capacidades germinativas residuales (Figura 13).

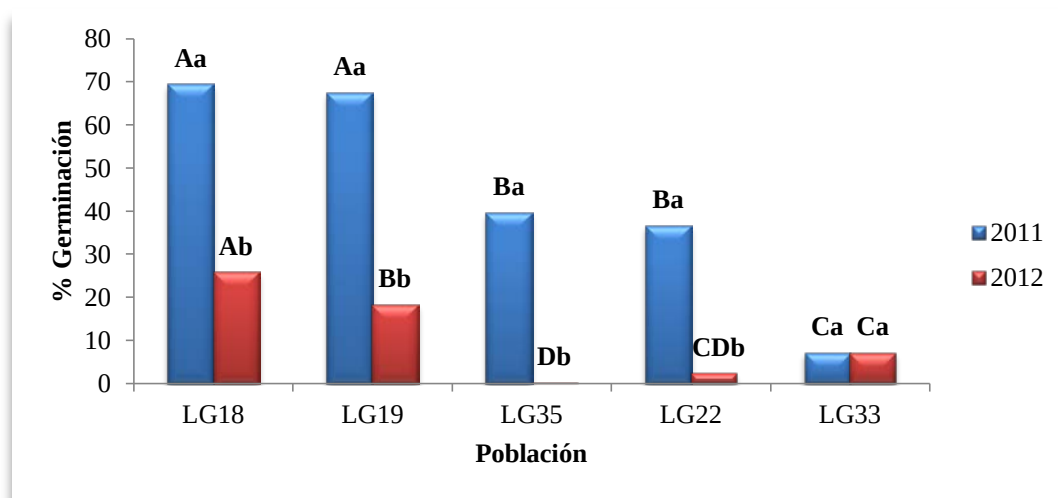


Figura 13: Comparación de medias para el análisis de varianza combinado de los años 2011 y 2012 y entre poblaciones para el porcentaje de germinación en semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. Columnas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes para cada año. Columnas con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes para cada población ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

El análisis combinando los años para cada dosis de AG_3 en cada población muestra cómo, en general, se observan descensos significativos en la capacidad germinativa de las semillas en el ensayo de 2012 respecto del realizado en 2011 (Figura 14).

Tanto LG18 como LG19 muestran descensos significativos de la capacidad germinativa el segundo año de ensayo (Figura 14, letras minúsculas) para todas las dosis excepto para la de 1000 ppm, donde el descenso no es tan acusado, bajando del 93% al 86% para LG18 y desde el 97% al 64% en LG19. A su vez, para estas dos poblaciones, en el año 2011 no existen diferencias significativas para el valor de germinación a dosis de 1000, 500 y 100 ppm, pero sí respecto de 50 ppm, cuyo rendimiento germinativo desciende significativamente, lo mismo que para la dosis Control, para la cual la germinación es residual. En cambio, para el año 2012 en estas dos poblaciones las diferencias son significativas para todas las dosis excepto para 100 ppm, 50 ppm y el Control, para el que el porcentaje de germinación es casi nulo (Figura 14, letras mayúsculas).

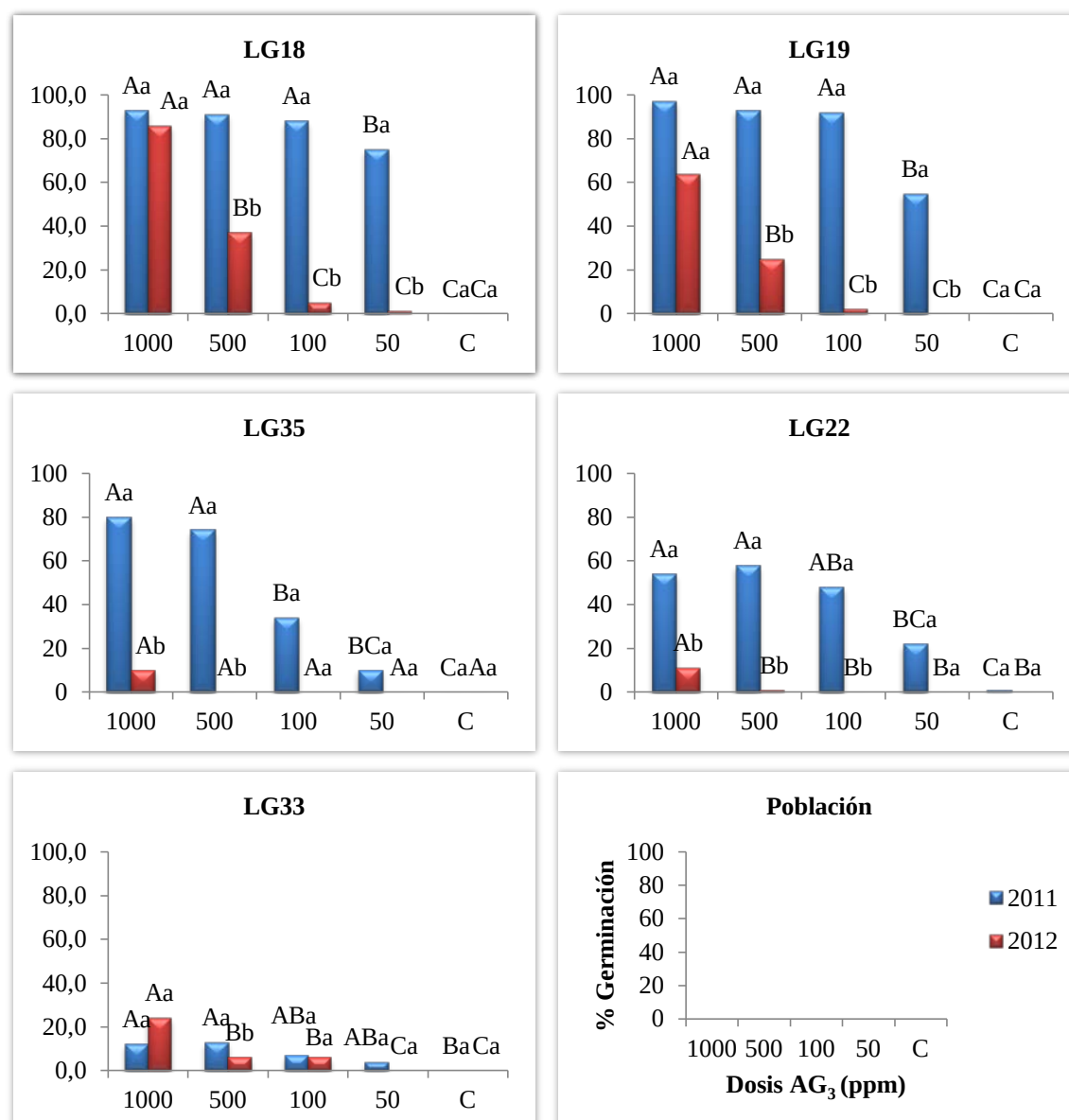


Figura 14: Comparación de medias para el análisis de varianza combinado de los años 2011 y 2012 entre dosis de ácido giberélico (AG₃) para el porcentaje de germinación en semillas en cada población (LG18, LG19, LG22, LG33 y LG35) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. Columnas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes entre dosis de AG₃ para cada año. Columnas con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes entre años para cada dosis de AG₃. (P=0,05) de acuerdo con DMS.

Para las poblaciones LG22 y LG35, la capacidad germinativa de sus semillas en 2012 prácticamente ha desaparecido, de modo que excepto para la dosis 1000 ppm en la población LG22, donde existen diferencias significativas respecto del resto de dosis (Figura 14, letras mayúsculas), en el resto no hay diferencias significativas, con valores de germinación casi nulos. En ambas poblaciones, las germinaciones en el año 2011 fueron significativamente superiores a las de 2012 (Figura 14, letras minúsculas).

Por último, la población LG33, cuyos valores para 2011 son realmente bajos para todas las dosis de AG₃ aplicadas, no existiendo diferencias significativas entre ellas, a excepción del Control. Mientras, para 2012 son similares apreciándose únicamente diferencias significativas para la dosis de 1000 ppm respecto del resto de dosis.

Comparando ambos años (Figura 14, letras minúsculas), únicamente existen diferencias significativas para la dosis de 500 ppm donde los valores de 2012 son inferiores.

4.1.3. Curvas de Germinación

La representación gráfica del porcentaje de germinación acumulado en el tiempo de las semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para el ensayo *in vitro*, muestra diferentes comportamientos para semillas refrigeradas (Figura 15) y estratificadas (Figura 16).

En el análisis de varianza combinado de los factores dosis de AG₃ y día de germinación para las semillas refrigeradas, se observan diferencias significativas respecto del porcentaje de semillas germinadas (Figura 15). En el día 20, para las dosis de 1000, 500 y 100 ppm, el porcentaje de germinación es significativamente superior a la de 50 ppm y de ésta sobre el Control. Tanto para el día 42 como para el día 90, día final del ensayo, ya no se observan diferencias significativas entre los porcentajes de germinación para cada una de las cuatro dosis de AG₃ utilizadas, pero sí de estas respecto del Control.

Por lo tanto, como se puede observar en la Figura 15, para la dosis de 50 ppm la germinación es más lenta que para el resto de dosis de AG₃, equiparándose estos valores con el tiempo, no siendo significativamente diferentes los porcentajes de germinación en el día 90 entre la dosis máxima (1000 ppm), con un valor final de 48,2%, y la dosis mínima (50 ppm), donde el porcentaje es del 44%.

Los tiempos medios de germinación (TMG) observados para las diferentes dosis de AG₃ (Tabla 2) son similares para las dosis 1000, 500 y 100 ppm, con unos valores de 27,4, 26,2 y 26,5 días respectivamente. Para la dosis de 50 ppm el valor es de 31,8 días y, por último, para el Control de 49,9 días.

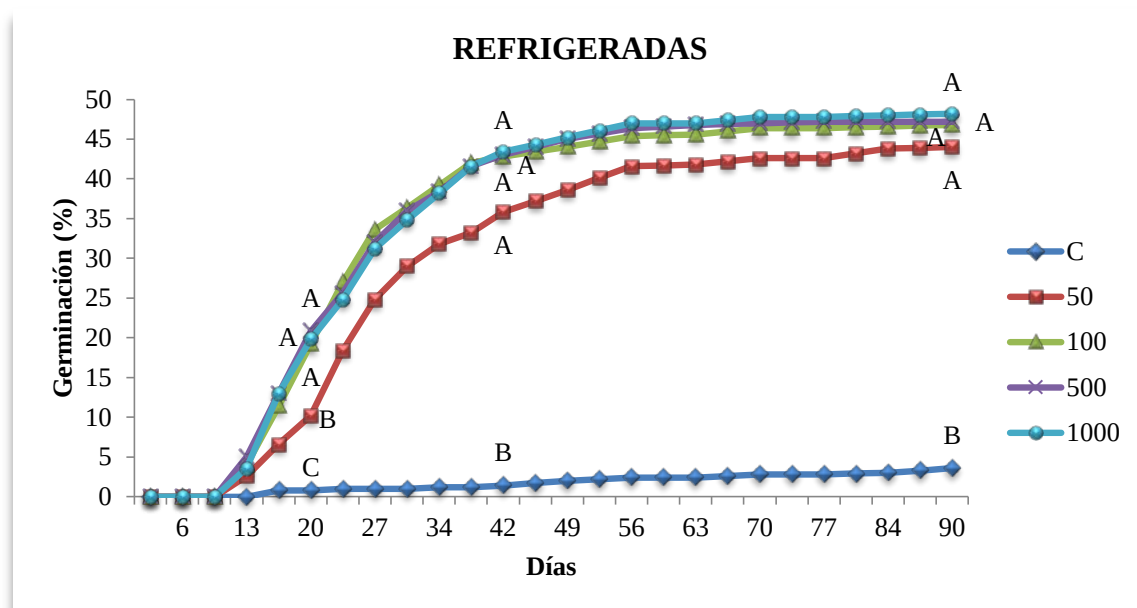


Figura 15: Curva de germinación acumulada para las semillas refrigeradas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* tratadas con diferentes dosis de ácido giberélico (AG₃), para el ensayo de germinación *in vitro* 2011. Diferentes letras mayúsculas indican porcentajes de germinación significativamente diferentes para cada día de germinación.

El comportamiento observado en las curvas de germinación para las semillas estratificadas es diferente respecto de las refrigeradas, como se puede comprobar al observar la Figura 15 y la Figura 16. Para el tratamiento estratificado, los porcentajes de germinación son significativamente superiores al tratamiento refrigerado. Para el día 24 ya se aprecian diferencias significativas en la tasa de germinación entre las mayores dosis de AG₃ (500 y 1000 ppm) y el resto. La germinación para 100 ppm es significativamente superior a 50 ppm, y ésta respecto del Control. Estas diferencias establecidas durante las primeras semanas se mantienen hasta el final del ensayo (Figura 16).

Los TMG (Tabla 2) para las diferentes dosis se encuentran entre los 25,6 días para 500 ppm, y los 45,8 de la dosis 50 ppm, no germinando ninguna semilla para el Control.

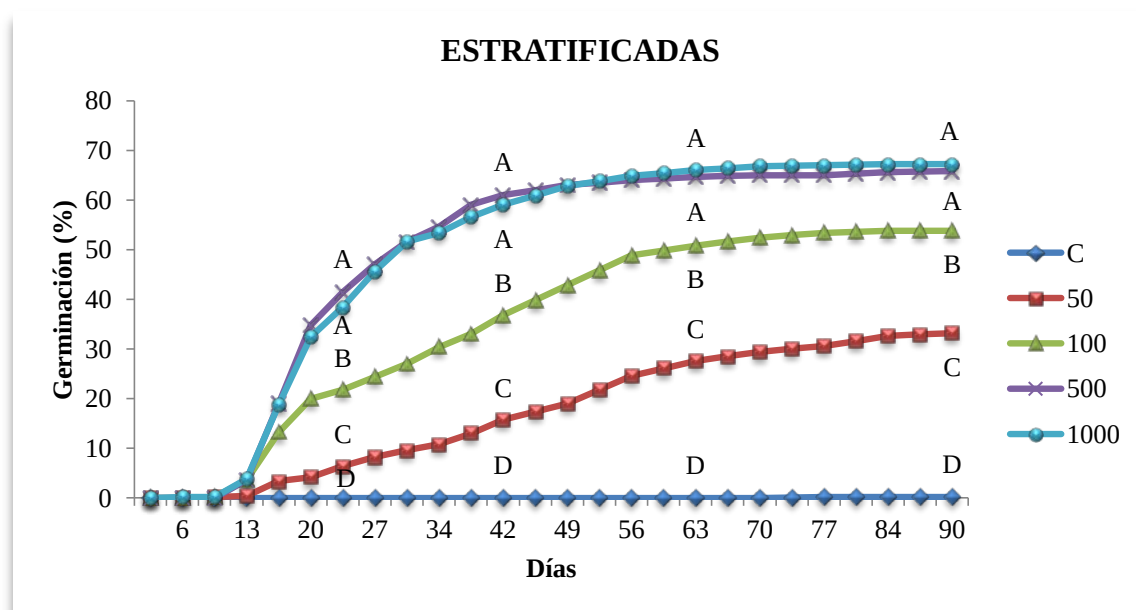


Figura 16: Curva de germinación acumulada para las semillas estratificadas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* tratadas con diferentes dosis de ácido giberélico (AG₃), para el ensayo de germinación in vitro 2011. Diferentes letras mayúsculas indican porcentajes de germinación significativamente diferentes para cada día de germinación.

Las curvas de germinación para las poblaciones LG18 y LG19 de forma conjunta, para el tratamiento estratificado, siendo estas poblaciones las que obtienen mayores porcentajes de germinación final, revelan un mayor efecto agrupado de la germinación para las mayores dosis (500 y 1000 ppm), (Figura 17).

El día 20 del ensayo, para las dosis 1000 y 500 ppm el comportamiento es prácticamente idéntico y, por lo tanto, no se aprecian diferencias significativas entre ambas, ni de estas respecto de la dosis 100 ppm, pero sí sobre el resto (50 ppm y Control), que no muestran diferencias significativas entre ellas (Figura 17).

Para el día 24 de ensayo, esta situación cambia, existiendo diferencias significativas entre las dos mayores dosis y la siguiente (100 ppm), que a su vez no presenta diferencias significativas sobre la dosis 50 ppm, pero sí sobre el Control. Para la dosis 1000 ppm, ese día 24 ya han tenido lugar el 77,89% de todas las germinaciones que se van a producir.

Algo semejante ocurre para la dosis de 500 ppm, donde ese porcentaje alcanza el 79,35%. Mientras, para la dosis 100 ppm este comportamiento es menos marcado al inicio del ensayo, pero significativamente superior al de 50 ppm, y esta sobre el control (Figura 17).

El día 42, más del 99% de las germinaciones se han producido para las dosis 1000 ppm y 500 ppm. Para 100 ppm la germinación se produce de forma escalonada, y para el día 42 de ensayo ya no existen diferencias significativas respecto de las dosis superiores de AG₃. Esto no sucede ni en el caso de 50 ppm ni para el Control, significativamente menores al resto (Figura 17). Este comportamiento se mantiene hasta el final del ensayo, donde los porcentajes de germinación de las tres dosis superiores son muy similares (94,5%, 92% y 85,5% para 1000, 500 100 ppm, respectivamente). Para 50 ppm el porcentaje es únicamente del 51,50% y para el Control cero. Para estas dos poblaciones el TMG (Tabla 2) se encuentra entre los 19,2 días para la dosis de 500 ppm y los 42,4 para 50 ppm.

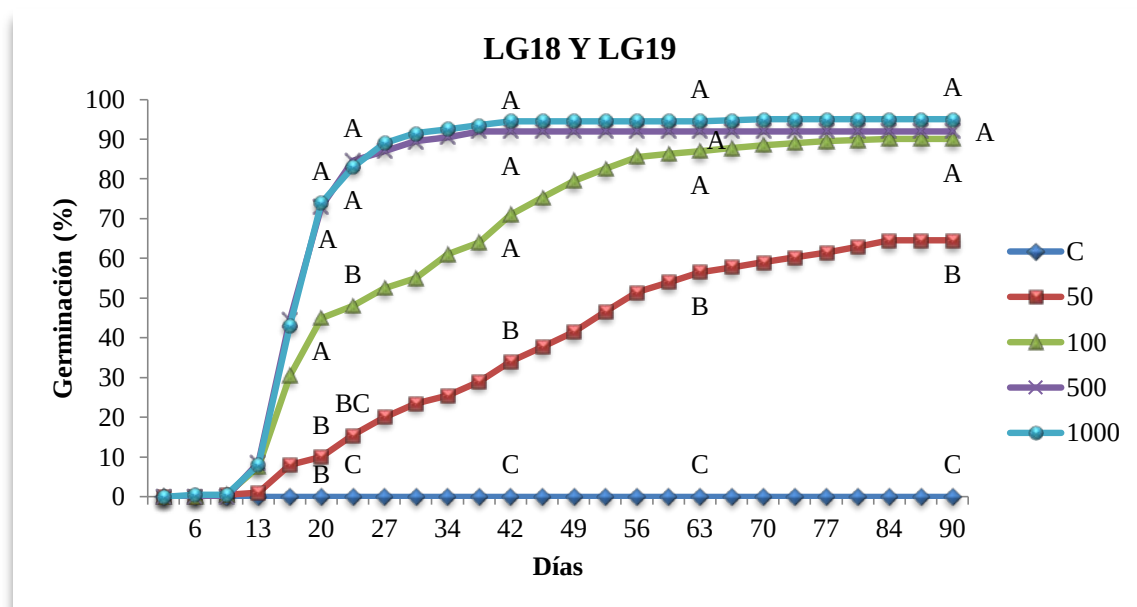


Figura 17: Curva de germinación acumulada para las semillas estratificadas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* tratadas con diferentes dosis de ácido giberélico (AG₃), para las poblaciones LG18 y LG19 en el ensayo de germinación in vitro 2011. Diferentes letras mayúsculas indican porcentajes de germinación significativamente diferentes para cada día de germinación.

Tabla 2: Tiempo medio de germinación (TMG) para las semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de las Figura 15, Figura 16 y Figura 17 respectivamente.

TMG	R (2011) Figura 15	E (2011) Figura 16	LG18 y LG19 Figura 17
AG ₃	(Días)	(Días)	(Días)
C	49,9±4,46	75,5±1,50	-
50	31,8±2,65	45,8±3,22	42,4±2,33
100	26,5±1,49	34,3±2,33	29,6±1,70
500	26,2±1,59	25,6±1,22	19,2±2,57
1000	27,4±1,55	26,9±1,47	19,8±0,51

. R: refrigeradas; E:estratificadas

4.2. EMERGENCIA Y DESARROLLO EN SUSTRATO

Transcurridos los 180 días desde la siembra de las semillas para la población de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* LG18, el análisis de varianza para el factor “tratamiento de frío” en cada uno de los caracteres medidos (Figura 18), únicamente presentan diferencias significativas dos de ellos. El primero es el número de hojas (N_HOJAS), donde las plántulas que han sufrido el tratamiento estratificado tienen un número significativamente superior (11,08 hojas) al de las refrigeradas (8,09 hojas); y el otro carácter es la anchura de las hojas (A_HOJAS), de modo que también las plántulas provenientes de semillas estratificadas muestran una anchura de sus hojas significativamente superior a las refrigeradas, con un valor medio de 8,35 mm para las primeras y 6,36 mm para las segundas. Tanto para la longitud del tallo (L_TALLO) como para longitud de las hojas (L_HOJAS) no existen diferencias significativas.

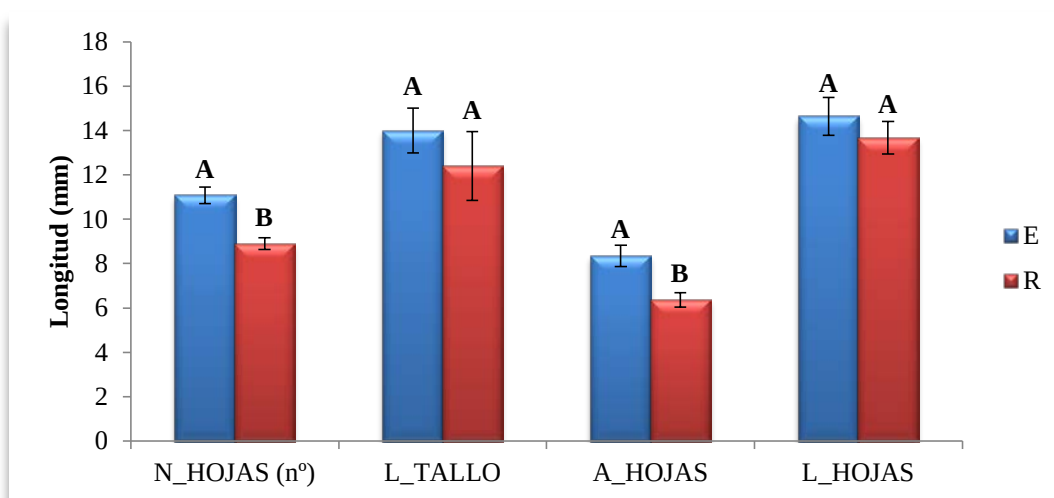


Figura 18: Comparación de medias entre tratamientos de frío para los caracteres medidos en plántulas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la población LG18. Columnas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes a nivel de tratamiento de frío ($P=0,05$), de acuerdo con DMS. N_HOJAS: Número de hojas desarrolladas; L_TALLO: Longitud del tallo; A_HOJA: Longitud de la parte más ancha de la hoja más desarrollada del tercer par de hojas comenzando por la base; L_HOJA: Longitud (mm) de la hoja más desarrollada en el tercer par de hojas comenzando por la base. E: estratificado; R: refrigerado.

El análisis de varianza para el factor “dosis de AG₃” en cada uno de los caracteres medidos sobre las plántulas de genciana, muestra la existencia de diferencias significativas para todos excepto para la anchura de las hojas (Figura 19).

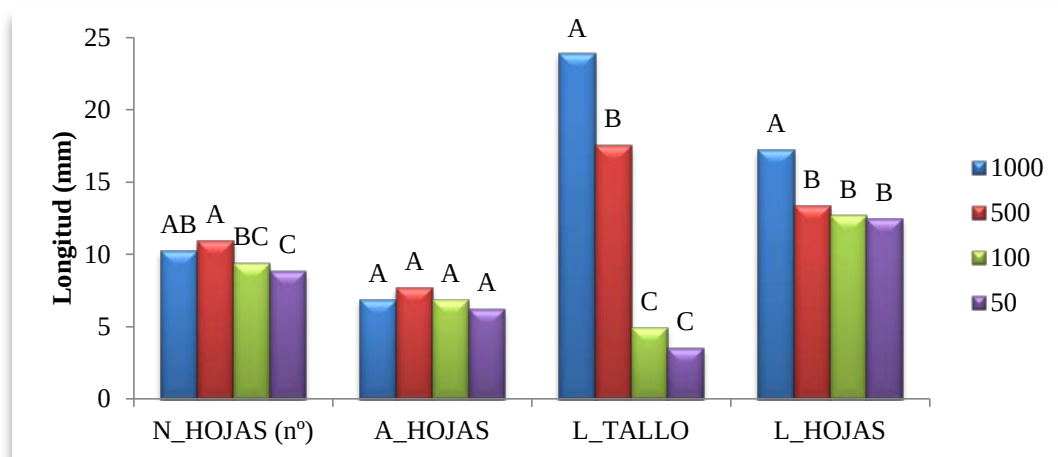


Figura 19: Comparación de medias entre dosis de ácido giberélico (AG_3) (1000, 500, 100 y 50 ppm), para los caracteres medidos en plántulas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la población LG18. Columnas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes para cada caracter. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. N_HOJAS: Número de hojas desarrolladas; L_TALLO: Longitud del tallo; A_HOJA: Longitud de la parte más ancha de la hoja más desarrollada del tercer par de hojas comenzando por la base; L_HOJAS: Longitud (mm) de la hoja más desarrollada en el tercer par de hojas comenzando por la base.

Cada uno de los caracteres se analiza por separado a continuación:

4.2.1. Número de hojas (N_HOJAS)

El análisis de varianza del factor N_HOJAS para las diferentes dosis de AG_3 utilizadas muestra la existencia de diferencias significativas entre las dosis aplicadas, de modo que el mayor número de hojas se observa para la dosis de 500 ppm, con 10,97 hojas, valor significativamente superior al resto, excepto para 1000 ppm (10,25 hojas). A su vez, la dosis de 100 ppm (9,42 hojas) presenta diferencias significativas respecto de la dosis 500 ppm, pero no así del resto. Por último, la dosis de 50 ppm con el menor valor (8,88 hojas), es significativamente inferior al resto de dosis, excepto para 100 ppm (Figura 20).

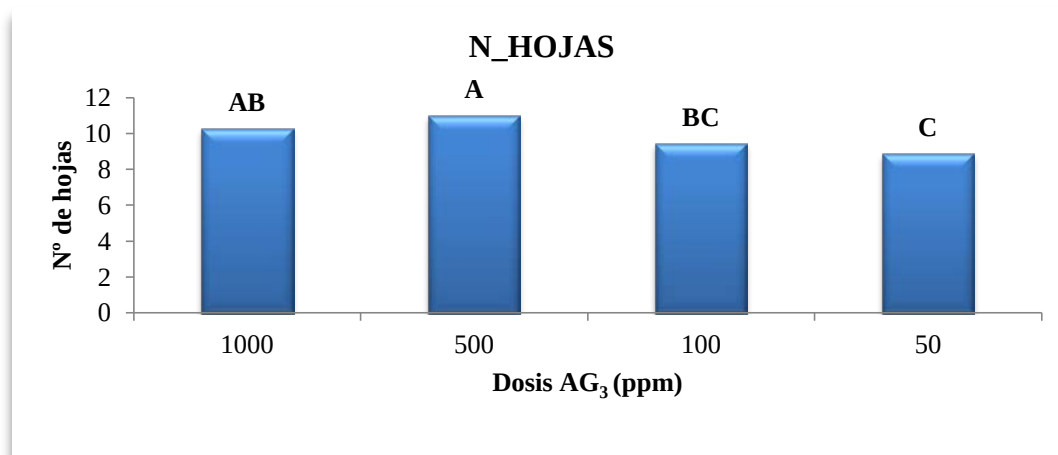


Figura 20: Comparación de medias entre dosis de ácido giberélico (AG_3) para el número de hojas por plántula (N_HOJAS) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* tras seis meses de desarrollo. Columnas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

4.2.2. Número de hojas (A_HOJAS)

En cuanto al carácter A_HOJAS, una vez realizado el análisis de varianza para las diferentes dosis hormonales aplicadas no se observan diferencias significativas (Figura 21). La anchura de estas hojas varía desde los 6,45 mm de las plántulas cuyas semillas fueron tratadas con la dosis de 50 ppm de ácido giberélico, hasta los 7,91 mm para la dosis de 500 ppm, para la cual los valores de anchura son los mayores analizados.

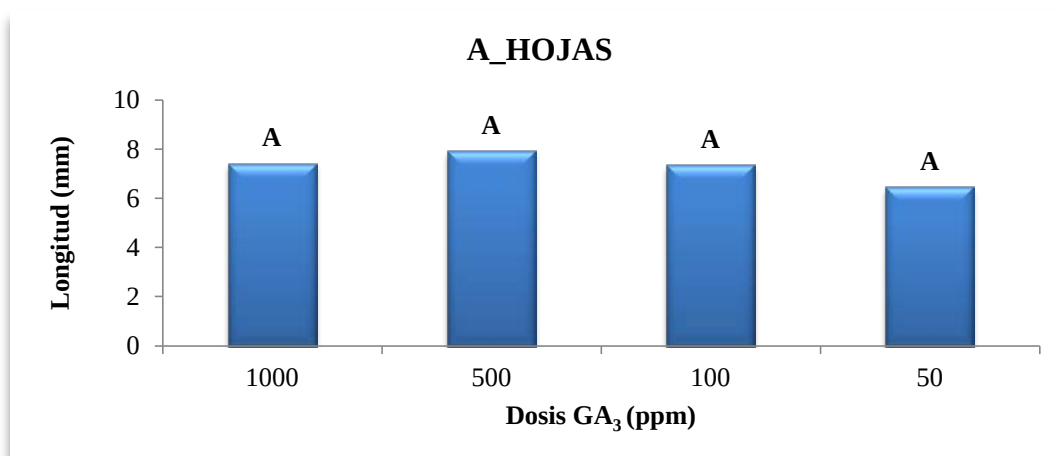


Figura 21: Comparación de medias entre dosis de ácido giberélico (AG₃) para la longitud de la parte más ancha de la hoja más desarrollada del tercer par de hojas comenzando por la base (A_HOJAS) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* tras seis meses de ensayo. Columnas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS.

4.2.3. Longitud del tallo (L_TALLO)

Para la longitud del tallo, el análisis de varianza muestra diferencias significativas para la dosis de 1000 ppm (23,93 mm), siendo significativamente superior al del resto de dosis. Para la dosis 500 ppm (17,58 mm), la longitud es significativamente mayor a las de 100 ppm y 50 ppm, con una longitud media de 4,94 y 3,53 mm respectivamente (Figura 19).

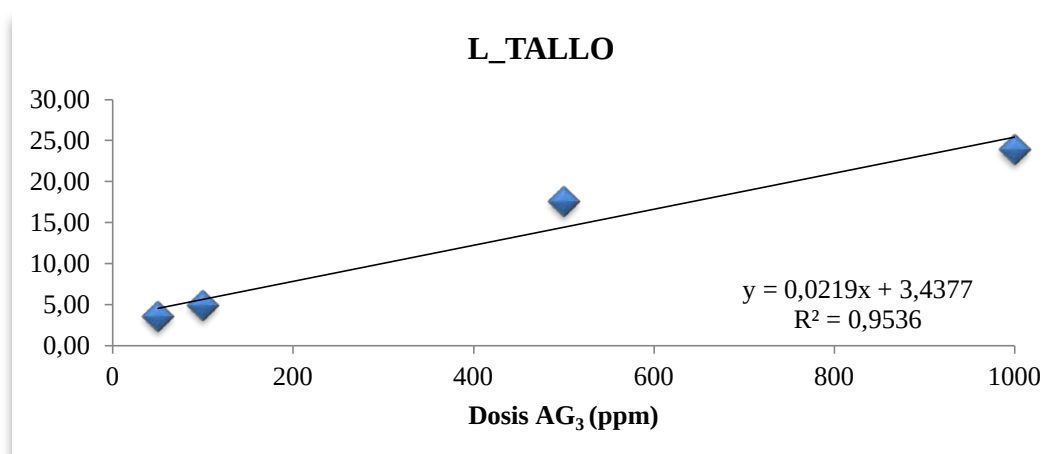


Figura 22: Representación gráfica de la recta de regresión lineal obtenida para la longitud del tallo (L_TALLO) en plántulas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en función de las dosis de ácido giberélico (AG₃) aplicadas.

Los resultados del desarrollo del tallo en función de la dosis se ajustan a una recta de regresión con un valor para el coeficiente de determinación R^2 de 0,9536. Esto significa que la longitud del tallo aumenta a medida que aumenta la dosis de AG₃ aplicada en el tratamiento pregerminativo para el rango de dosis aplicadas (Figura 22).

4.2.4. Longitud de las hojas L_HOJAS

El análisis de varianza para la longitud de las hojas muestra diferencias significativas únicamente para la dosis de 1000 ppm, que es significativamente mayor, con 17,24 mm. El resto de dosis no son significativamente diferentes entre ellas, con valores de 13,38, 12,69 y 12,48 mm para 500, 100 y 50 ppm de AG₃ respectivamente (Figura 19).

Los resultados obtenidos para el desarrollo de las hojas se ajustan a una recta de regresión con un valor para el coeficiente de determinación R^2 de 0,9097, de modo que el aumento de esta dosis produce un incremento en la longitud de las hojas descritas (Figura 23).

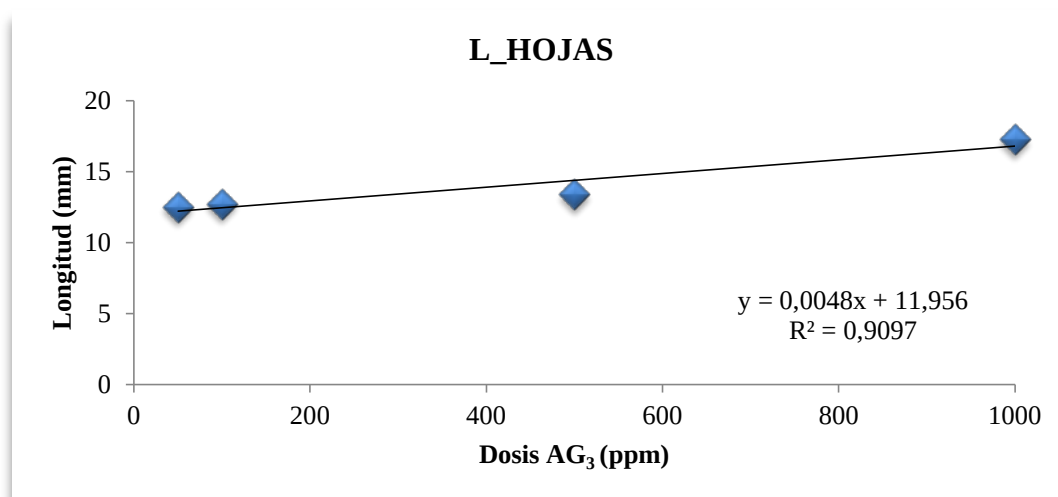


Figura 23: Representación gráfica de la recta de regresión lineal obtenida para L_HOJAS: Longitud (mm) de la hoja más desarrollada en el tercer par de hojas comenzando por la base, en plántulas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en función de las dosis de ácido giberélico (AG₃) aplicadas.

4.2.5. Hábitos de las plántulas

En función de la dosis de AG₃ aplicado se observaron diferentes hábitos de crecimiento o desarrollo en las plántulas, de modo que estos hábitos fueron divididos en cinco diferentes (Figura 24) que se describen a continuación:

- **H1:** Las plántulas de este hábito presentan una parte aérea formada por una roseta basal de hojas bien desarrolladas, con un tallo fuerte y muy corto, casi inexistente.
- **H2:** La parte aérea de la planta está formada por una roseta de hojas bien desarrolladas. En este caso la longitud del tallo es superior de modo que la roseta aparece separada del suelo. El tallo se muestra robusto.
- **H3:** Las plántulas muestran hojas bien desarrolladas, pero aparecen alargadas, y además se encuentran distribuidas a lo largo del tallo, con unos entrenudos cortos.

- **H4:** Para este hábito las plántulas muestran hojas poco desarrolladas y de aspecto ligeramente clorótico dispuestas a lo largo de un tallo largo y débil. Los entrenudos son largos.
- **H5:** Las plántulas se muestran muy débiles, con hojas muy poco desarrolladas, cloróticas y de aspecto filiforme dispuestas en un tallo igualmente ahilado y débil. Los entrenudos son largos.

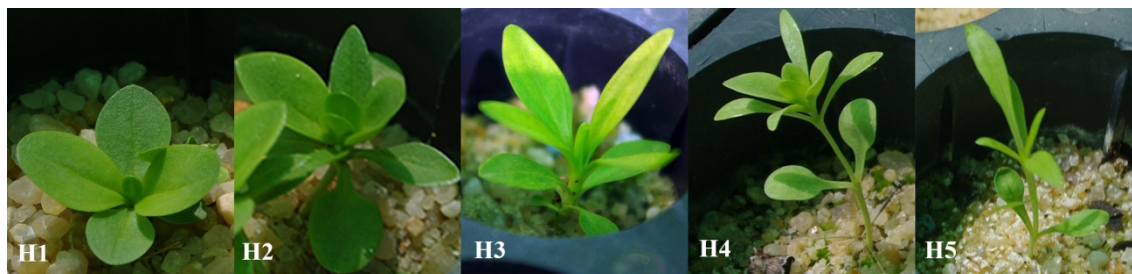


Figura 24: Hábitos de crecimiento de las plántulas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* (H1-H5)

Considerando los cinco hábitos de crecimiento se contabilizó el número de plántulas que mostraban cada uno de los hábitos para las diferentes dosis de ácido giberélico.

El análisis de varianza del porcentaje de plántulas obtenida para cada dosis de AG₃ muestra diferencias significativas en los hábitos de crecimiento para cada dosis de AG₃ (Figura 25).

El hábito mostrado de forma mayoritaria por las plántulas cuyas semillas fueron tratadas con las dosis más bajas de AG₃ (50 y 100 ppm) es el H1, apareciendo este en el 96,88% y el 90,32% de las plántulas respectivamente. En ambos casos la presencia del hábito H1 es significativamente mayor al resto. Para la dosis de 500 ppm se puede apreciar una mayor variabilidad de hábitos de desarrollo. En este caso no se observan plántulas H1 y sí del resto de los hábitos, siendo el número de plántulas para cada hábito significativamente diferente al resto. El porcentaje mayor de plántulas corresponde a H2 (45,45%), mientras que el menor corresponde a H5 con el 3,03 % de las plántulas (Figura 25).

Para la dosis de 1000 ppm de AG₃ la mayoría de las plántulas muestra el hábito H3, siendo este significativamente superior al resto de los hábitos, y al que corresponden el 56,41% de las plántulas contabilizadas para esta dosis. El resto de los hábitos han sido observados para esta dosis excepto el H1. H4 con el 20,51% de las plántulas es el segundo más abundante y significativamente superior al H2 (17,95%) y éste sobre el H5 (5,13%) (Figura 25).

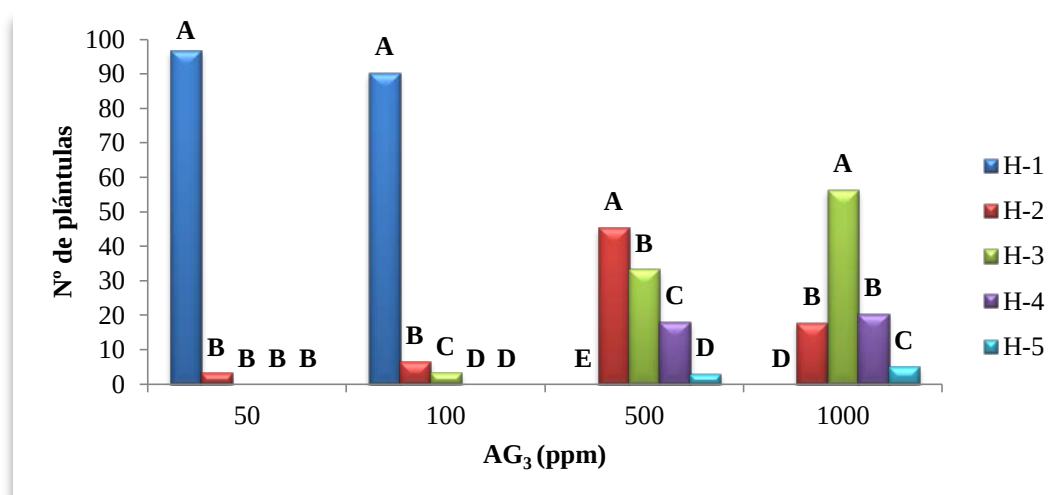


Figura 25: Comparación de medias entre el porcentaje de hábitos (H1-H5) de las plántulas de LG18 para cada dosis de AG₃. Columnas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes dentro de cada dosis de ácido giberélico (AG₃) (P=0,05) de acuerdo con DMS.

5. DISCUSIÓN

La aplicación de ácido giberélico (AG_3) como pretratamiento para la rotura de la dormancia en semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* ha incrementado los valores de germinación respecto de los obtenidos para las semillas no tratadas hormonalmente, que varían entre el 0% y el 7,2%. Según Baskin & Baskin (1998) la rotura de la dormancia mediante el uso de AG_3 es típica en semillas con una dormancia fisiológica no muy profunda.

Además de la ya tratada rotura de la dormancia, el aumento de la respuesta germinativa muestra una relación directa con la dosis hormonal utilizada, de modo que estos aumentos son significativos hasta una dosis máxima de 500 ppm, dosis a partir de la cual el incremento de la dosis no produce diferencias significativas en el porcentaje de germinación (Figura 7). En ensayos similares en *G. lutea* L. Pérez-García et al. (2012), utilizando semillas de una procedencia similar a la del actual trabajo y ácido giberélico como medio para romper la dormancia a dosis máximas de 1000 ppm, obtuvieron porcentajes de germinación superiores al 90% a partir de dosis de 100 ppm para las accesiones estudiadas, sin observar diferencias significativas para los resultados a dosis intermedias. Este mismo resultado es observado en el actual estudio para las poblaciones LG18 y LG19, localizadas en dicha zona, para las que habiendo sufrido el mismo tratamiento no existen diferencias significativas a dosis de 100, 500 y 1000 ppm (Figura 14). Los porcentajes de germinación obtenidos para dosis máxima (1000 ppm) en las diferentes poblaciones, para el tratamiento estratificado, van desde el 12% hasta el 97% (Figura 14), mientras, Pérez-García et al. (2012) obtuvieron valores entre el 66% y el 99%.

Aiello et al.(1998), igualmente para *G. lutea* L., consiguieron incrementos significativos en los valores de germinación para cada una de las dosis aplicadas (dosis máxima 150 ppm). En su trabajo, a dosis de 100 ppm, comparable con el actual estudio, el valor medio de germinación obtenido fue del 43,8%. En su caso, el modo de conservación de las semillas hasta su tratamiento fue la refrigeración y los datos mostrados eran para una sola accesión denominada “Giura”. Para el mismo tipo de conservación y dosis, el valor de germinación medio obtenido para las cinco poblaciones ha sido del 46,8%, valor muy similar al citado (Figura 9).

Teniendo en cuenta las diferentes localizaciones de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, los porcentajes de germinación máximos obtenidos para la dosis de 1000 ppm son variables, como se puede comprobar en los resultados, observando una relación entre los valores de germinación, el tamaño de las poblaciones y la presencia de otras en las inmediaciones. De este modo, la población LG33 es la más aislada y la de menor tamaño, mientras LG18 y LG19, además de ser mayores, cuentan con la presencia de otras poblaciones de genciana en sus alrededores.

El pequeño tamaño, así como el aislamiento, dan lugar a numerosos efectos negativos sobre las poblaciones (Landolt, 1991, Korneck et al., 1996). En la naturaleza se observa de forma generalizada la relación directa entre el tamaño de la población, la capacidad adaptativa de la planta y la diversidad genética, haciéndose esta relación más intensa cuando se trata de plantas autoincompatibles y, en cierta medida, para especies “raras”, como es la *G. lutea* L. (Kery et al., 2000). Por lo tanto, estas especies son más propensas al efecto de la fragmentación del hábitat (Leimu et al., 2006). Kery *et al.* (2000) en un estudio sobre la reproducción y la capacidad de generar descendencia en relación al tamaño de la población en *G. lutea* L. y *Primula veris* observaron cómo en *G. lutea* L. la reproducción se ve fuertemente mermada en pequeñas poblaciones, donde las plantas producen menos semillas por fruto y por planta, algo que aún se ve agravado para poblaciones de menos de 500 plantas, como ocurre en la mayoría de las poblaciones evaluadas en este estudio. Sin embargo, Kery *et al.* (2000) no encontraron una relación significativa entre el tamaño de la población y el porcentaje de germinación, pero si entre diferentes poblaciones de *G. lutea* L., lo que abre la posibilidad, ya que en su estudio no se valora, de estudiar la capacidad germinativa respecto del tamaño de las poblaciones y su aislamiento.

En cuanto a los tratamientos de frío aplicados, la conservación a 4°C en ambiente seco y estratificación, muestran diferencias significativas en el análisis estadístico global, pero no en particular para cada una de las dosis de AG₃ aplicadas. De este modo se puede decir que se obtienen datos que concuerdan con lo expuesto por Favarger (1953), para el que el método de estratificación mejora significativamente los porcentajes de germinación respecto de la refrigeración, al contrario que Pérez-García, et al. (2012), quienes exponen la ausencia de esa mejora significativa, aunque en su caso se aplica sólo la dosis hormonal de 1000 ppm. En este aspecto Aiello et al. (1998), realizaron unas pruebas preliminares de refrigeración y estratificación tras las cuales el resultado fue que las semillas únicamente refrigeradas no germinaban después de dos meses de almacenamiento, pero si las estratificadas, por lo que la refrigeración por sí sola, como medida de tratamiento, fue desechada. Sin embargo, sin el uso de AG₃ Aiello et al. (1998) obtuvieron una germinación media, tras una estratificación de 40 días, del 76,6%, que contrasta con el 0,2% del actual estudio tras tres meses de estratificación (Figura 9). Por lo tanto, con los datos actuales y los mostrados por los diferentes autores se observan diferentes respuestas a estos tratamientos de conservación; posiblemente esta diversidad de resultados pueda ser explicada por diferencias genéticas, tamaño y aislamiento de las poblaciones.

En semillas estratificadas durante un año, los tratamientos hormonales con ácido giberélico únicamente permitieron obtener valores de germinación significativos para dosis altas de ácido giberélico (1000 ppm), para poblaciones que mostraron elevada capacidad germinativa en el año 2011. En las poblaciones donde los resultados obtenidos para el año 2011 fueron bajos, para la anualidad 2012 los porcentajes de germinación son residuales, siendo estos inferiores al 15% o nulos (Figura 6). En relación a estos resultados Aiello et al. (1998), tras la conservación de la semilla a temperatura ambiente,

estas mostraron un descenso de su capacidad de germinación desde el 75,5% a los 6 meses, al 43,7% a los 18 meses. Del mismo modo a los 30 meses ninguna de las semillas germinó, siendo estos resultados similares a los obtenidos por Barralis y Chadoeuf (1973) y Galambosi (1996).

En las curvas de germinación (Figura 15, Figura 16 y Figura 17) se observan diferencias significativas cuando se utilizan distintas dosis de AG₃ en el pretratamiento de las semillas. Estas diferencias, aunque no significativas en algunos casos, también se muestran en cuanto a los tratamientos de frío y las diferentes poblaciones. En un ensayo en condiciones muy similares (Pérez-García et al., 2012), se pueden observar los diferentes valores de tiempo medio de germinación (TMG) para dos accesiones de *G. lutea* L. y diferentes dosis de ácido giberélico. Estos valores para la accesión denominada 41 estuvieron entre los 16,65 días para la dosis de 100 ppm y los 27,05 días para 50 ppm, estando dentro de este intervalo los valores medios para dosis de 500 y 1000 ppm. Para la segunda accesión, denominada 52 los TMG fueron de entre 15,85 días para 1000 ppm y los 24,30 días para 50 ppm. Los valores obtenidos en este estudio (Tabla 2) son significativamente superiores, pero se observa la misma tendencia en cuanto a que se disminuye el TMG cuando se aumenta la dosis de AG₃ aplicada.

Millaku et al. (2012) también realizaron un ensayo prácticamente idéntico donde analizan los efectos de la estratificación en frío y el uso del ácido giberélico sobre semillas obtenidas de plantas de *G. lutea* L. de los Alpes Dináricos (Albania), pero en este caso los valores de TMG no son comparables ya que los tiempos son medidos a partir del inicio de la germinación y no de la siembra.

Las plántulas desarrolladas durante seis meses se vieron afectadas por la dosis de AG₃ aplicada a las semillas, de modo que se aprecian diferencias significativas para los caracteres longitudinales, como son la longitud de la hoja más desarrollada del tercer par de hojas comenzando por la base (L_HOJA) y la longitud del tallo (L_TALLO), existiendo una relación directa entre el valor de dichos caracteres y la dosis hormonal.

Este efecto negativo sobre el desarrollo de las plántulas de *G. lutea* L. debido a la aplicación de ácido giberélico como tratamiento pregerminativo ya había sido mencionado por Bezzi et al. (1987), pero sin especificar las condiciones bajo las cuales observaba esta respuesta negativa. En el presente estudio, teniendo en cuenta las diferentes dosis utilizadas, esta reacción adversa sólo se observa cuando se aplican dosis de AG₃ o superiores. Para estas dosis, de forma mayoritaria las plántulas presentan hábitos de crecimiento fuera de tipo, es decir, que su desarrollo no es semejante al que muestran las plantas que se desarrollan de forma silvestre, mostrándose muy débiles, pobremente desarrolladas y con una apariencia ahilada y, por lo tanto, son más susceptibles a bajas temperaturas, al ataque de insectos, a su rotura o desecación. Mientras, para las dosis bajas de AG₃ (50 ppm y 100 ppm) la morfología predominante en las plántulas es muy similar a la observada en la naturaleza, donde estas están formadas por una roseta basal, al igual que otras plantas perennes cuyo hábitat natural es la montaña, protegiéndose así de las condiciones climáticas adversas.

Respuestas similares debidas a la aplicación de ácido giberélico se pueden observar en diferentes estudios. Akça et al (2001) aplicando ácido giberélico directamente sobre las plántulas de nogal (*Juglans regia*) a dosis bajas (50-200 ppm), observaron efectos no deseados como son hojas estrechas, clorosis e internudos elongados, eliminando con ellos todas las ventajas que ofrece el uso de esta hormona. Esta sintomatología es la misma observada por las plántulas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. Resultados similares son los descritos por Souza et al. (2010), donde tras la aplicación de AG₃ sobre las semillas de alubia (*Phaseolus vulgaris*) observaron una reducción del área foliar, del diámetro del tallo y un incremento de la altura de la planta.

En un trabajo sobre papaya (*Carica papaya* L.) Dhinesh Babu et al. (2010), sin describir diferentes hábitos de crecimiento, determinaron que la mejor dosis de ácido giberélico como tratamiento pregerminativo para incrementar el porcentaje de germinación, así como para obtener un mejor desarrollo y vigor de las plántulas de papaya, es de 100 ppm, teniendo en cuenta que se aplicaron dosis de hasta 150 ppm, donde se empiezan a observar efectos negativos del tratamiento hormonal.

En muchos otros cultivos los resultados obtenidos mediante la utilización del ácido giberélico como tratamiento pregerminativo evidencian efectos positivos, como los realizados sobre maracuyá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg) (Couto dos Santos et al., 2013), *Kelussia odoratissima* Mozaff (Amooaghaie y Valivand, 2011), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Balaguera-López et al., 2009) o en lino (*Linum usitatissimum* L.) (McKenzie y Deyholos, 2011), donde la aplicación de ácido giberélico permite regular positivamente el grosor y longitud del tallo, así como la formación del xilema y la expansión de las fibras del mismo.

Con todo ello, parece lógico pensar que aunque la respuesta que se obtiene cuando se tratan semillas o plántulas de diferentes especies con ácido giberélico es muy similar, las dosis que promueven esta respuesta son variables, y por lo tanto en algunas de estas especies el umbral a partir del cual se obtienen respuestas negativas son bajos, mientras, en otras especies no se han llegado a observar estos efectos negativos debido a que su tolerancia es superior a la dosis máxima testada.

6. CONCLUSIONES

- La aplicación de ácido giberélico como tratamiento pregerminativo durante 24 horas en semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* rompe la dormancia de éstas y favorece el incremento del porcentaje de germinación, el cual es mayor a medida que se incrementa la concentración de dicha hormona en el tratamiento.
- Las semillas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* pierden su capacidad germinativa rápidamente a partir del primer año, de modo que para su multiplicación, la utilización de semillas dentro del primer año aumenta el porcentaje de éxito y reduce los costes de producción.
- La estratificación de las semillas, así como la aplicación de dosis de ácido giberélico de 100 ppm o superiores (500 o 1000 ppm) promueven una germinación rápida y agrupada de las semillas *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en el primer mes.
- La germinación de las semillas se ve afectada por el tamaño de la población, de modo que las semillas recogidas de poblaciones grandes y no aisladas tienen una capacidad germinativa elevada. Por otro lado, la capacidad germinativa de las semillas de poblaciones aisladas y/o de tamaño reducido es menor, pudiendo afectar a la supervivencia de estas poblaciones.
- La aplicación de ácido giberélico como tratamiento pregerminativo promueve el aumento de la longitud del tallo, así como de las hojas de las plántulas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, y este efecto es mayor cuando se incrementa la dosis de la hormona, provocando el desarrollo de plántulas fuera de tipo con escasas posibilidades de sobrevivir.
- La aplicación de dosis bajas de ácido giberélico como tratamiento pregerminativo durante 24h (50-100 ppm) proporciona plántulas con buenas características para su trasplante en ambientes de montaña,
- La aplicación de 100 ppm de ácido giberélico como tratamiento pregerminativo durante 24 h sobre semillas del año produce una germinación agrupada y el mayor porcentaje de plántulas con adecuada morfología para su trasplante en ambientes de montaña.

7. CONCLUSIONS

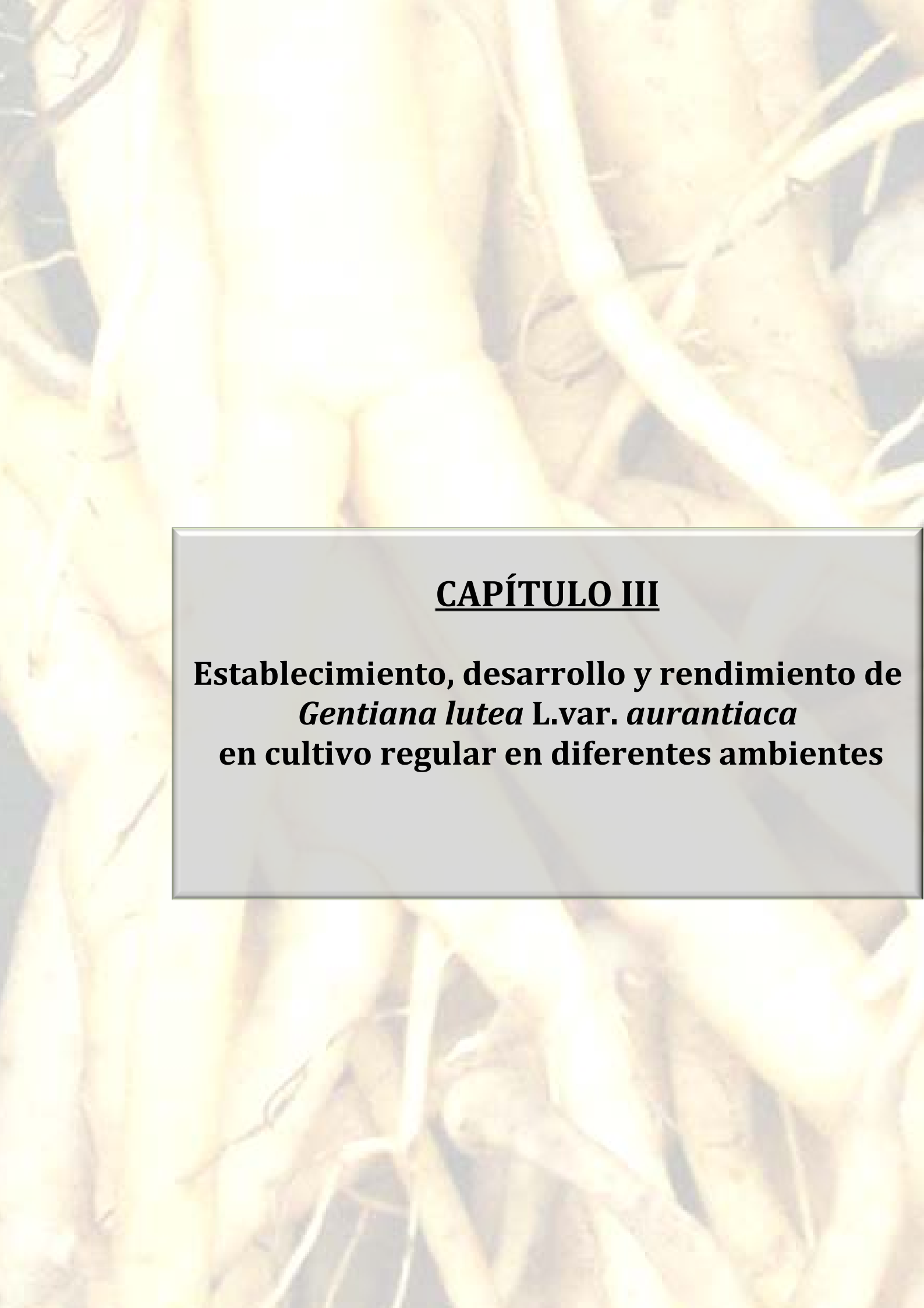
- The use of gibberellic acid for 24 hours on *G. lutea* L. var. *aurantiaca* seeds as pregerminative treatment breaks its dormancy and promotes an increase in the germination rate. The germination percentages are higher as the concentration of this hormone increases.
- The seeds of *G. lutea* L. var. *aurantiaca* lose their germinative capacity quickly after one year, so the use of seeds within the first year for multiplication purposes, increases the success rate and reduces production costs.
- The seeds stratification, and the use of 100 ppm or higher doses (500 or 1000 ppm) of gibberellic acid, promote a fast and grouped seed germination of *G. lutea* L. var. *aurantiaca* in the first month .
- The germinative capacity of *G. lutea* L. var. *aurantiaca* seeds is affected by the population size, so those seeds collected from large and not isolated populations have a higher germination capacity. Furthermore, the lower germination capacity of seeds from isolated and/or small size populations may endanger the survival of these populations.
- The use of gibberellic acid as a pregerminative treatment promotes a length increase on stem and leaves of *G. lutea* L. var. *aurantiaca* seedlings. This effect is greater when the hormonal dose is higher, resulting in the development of off-type seedlings with little chance of survival.
- The application of gibberellic acid low doses as pregerminative treatment for 24 hours (50-100 ppm) provides good quality *G. lutea* L. var. *aurantiaca* seedlings for transplantation in mountain environments.
- The application of 100 ppm of gibberellic acid as pregerminative treatment for 24 hours on gentian seeds stocked less than one year, promotes a grouped germination and the highest percentage of seedlings with adequate morphology for transplantation in mountain environments

8. BIBLIOGRAFÍA

- AIELLO, N., D'ANDREA, L., SCARTEZZINI, F. & VENDER, C. 1998. Rimozione della dormienza dei semi di *Gentiana lutea* L. attraverso la prerefrigerazione e le gibberelline e durata dell'effetto stimolante. *Agricoltura ricerca*, 176, 18-22.
- AKÇA, Y., SIRMA, M. & KESKIN, S. 2001. A study on the effects of gibberellic acid application on shoot growth and morphological characteristics of *Juglans regia* L. seedlings. *Acta Horticulturae*, 544, 335-337.
- AMOOAGHAIE, R. & VALIVAND, M. 2011. The combined effect of gibberellic acid and long time osmopriming on seed germination and subsequent seedling growth of *Klussia odoratissima* Mozaff. *African Journal of Biotechnology*, 10, 14873-14880.
- ANDO, H., HIRAI, Y., FUJII, M., HORI, Y., FUKUMURA, M., NIIHO, Y., NAKAJIMA, Y., SHIBATA, T., TORIIZUKA, K. & IDA, Y. 2007. The chemical constituents of fresh Gentian root. *Journal of Natural Medicines*, 61, 269-279.
- BALAGUERA-LÓPEZ, H. E., CÁRDENAS-HERNÁNDEZ, J. F. & ÁLVAREZ-HERRERA, J. G. 2009. Effect of Gibberellic Acid (GA^3) on Seed Germination and Growth of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Symposium on Tomato in the Tropics*, 821, 141-147.
- BARRALIS, G. & CHADOEUF, R. 1973. La germination des graines de *Gentiana lutea* L.: Académie d'Agriculture de France.
- BASKIN, C. C. & BASKIN, J. M. 1998. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*, Academic Press.
- BASKIN, J. M. & BASKIN, C. C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14, 1-16.
- BEZZI, A., AIELLO, N. & M., T. 1987. La coltivazione di *Gentiana lutea* L. nell'ambito del progetto "Piante officinali" del Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste. *Atti del Convegno su "La coltivazione delle piante officinali"*. Trento.
- COUTO DOS SANTOS, C. A., VIEIRA, E. L., PEIXOTO, C. P. & DA SILVA LEDO, C. A. 2013. Seed germination and seedling vigor of passion fruit submitted to the action of gibberellic acid. *Bioscience Journal*, 29, 400-407.
- DHINESH BABU, K., PATEL, R. K., SINGH, D. S., SINGH, A., YADAV, D. S., DE, L. C. & DEKA, B. C. 2010. Seed germination, seedling growth and vigour of Papaya under north east Indian condition. *Acta Horticulturae*, 851, 299-306.
- DISSANAYAKE, P., GEORGE, D. L. & GUPTA, M. L. 2010. Effect of light, gibberellic acid and abscisic acid on germination of guayule (*Parthenium argentatum* Gray) seed. *Industrial Crops and Products*, 32, 111-117.
- ELLIS, R. H. & ROBERTS, E. H. 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology. Seed Science and Technology*, 9, 373-409.
- FAVARGER, C. 1953. Sur la germination des gentianes. *Phyton*, 4.

- FINCH-SAVAGE, W. E. & LEUBNER-METZGER, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171, 501-23.
- FRANZ, C. H. & FRITZ, D. 1978. Cultivation aspects of *Gentiana lutea* L. *Acta Horticulturae*, 73, 307-314.
- FRITZ, D., FRANZ, C. & KRETSCHMER, M. 1980. Keimung, Saatgutlagerung und Jungpflanzenanzucht von gelbem Enzian. *Deutscher Gartenbau*.
- GALAMBOSI, B. 1996. Experiences of cultivating *Gentiana lutea* L. in Finland. *Atti del convegno "Genziana e specie amaro-aromatiche. Recherche ed Applicazioni"*.
- GONZÁLEZ, A. J. 2003. Desinfección de semilla de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo granja asturiana con antifúngicos y antibacterianos. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas*, 29, 461-470.
- KERY, M., MATTHIES, D. & SPILLMANN, H. H. 2000. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. *Journal of Ecology*, 88.
- KORNECK, D., SCHNITTLER, M. & VOLLMER, I. 1996. Rote Liste der Farn- und Blütenpflanzen (Pteridophyta et Spermatophyta) Deutschlands. *Schriftenreihe für Vegetationskunde*, 28, 21-187.
- LANDOLT, E. 1991. *Rote Liste - Gefährdung der Farn- und Blütenpflanzen der Schweiz*.
- LARENA, I., MELGAREJO, P. & DE CAL, A. 2002. Production, Survival, and Evaluation of Solid-Substrate Inocula of *Penicillium oxalicum*, a Biocontrol Agent Against Fusarium Wilt of Tomato. *Phytopathology*, 92, 863-9.
- LEIMU, R., MUTIKAINEN, P. I. A., KORICHEVA, J. & FISCHER, M. 2006. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology*, 94, 942-952.
- LEUNG, A. Y. 1980. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*, Wiley.
- MCKENZIE, R. R. & DEYHOLOS, M. K. 2011. Effects of plant growth regulator treatments on stem vascular tissue development in linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Industrial Crops and Products*, 34, 1119-1127.
- MICROSOFT 2010. Microsoft Excel 2010. Redmond, Washington: Microsoft.
- MILLAKU, F., GASHI, B., ABDULLAI, K., ALIU, S., OSMANI, M., KRASNIQI, E., MATA, V. & RYSHA, A. 2012. Effects of cold-stratification, gibberellic acid and potassium nitrate on seed germination of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.). *African Journal of Biotechnology* 11 (68), 13173-13178.
- MRVA, K., WALLWORK, M. & MARES, D. J. 2006. α -Amylase and programmed cell death in aleurone of ripening wheat grains. *Journal of Experimental Botany*, 57, 877-85.
- PÉREZ-GARCÍA, F., VARELA, F. & GONZÁLEZ-BENITO, M. E. 2012. Morphological and germination response variability in seeds of wild yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) accessions from northwest Spain. *Botany-Botanique*, 90.
- RUBIO NETO, A., SILVA, F. G., SALES, J. D. F., DOS REIS, E. F., SILVA, L. Q. & CAMPOS, R. C. 2014. Dormancy breaking in macaw palm *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges ex Mart. seeds. *Acta Scientiarum-Agronomy*, 36, 43-50.

- SAS INSTITUTE INC 2004. SAS/STAT 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SCHWIENBACHER, E., NAVARRO-CANO, J. A., NEUNER, G. & ERSCHBAMER, B. 2011. Seed dormancy in alpine species. *Flora*, 206, 845-856.
- SOUZA, C. A., COELHO, C. M. M., GUIDOLIN, A. F., ENGELSING, M. J. & BORDIN, L. C. 2010. Influência do ácido giberélico sobre a arquitetura de plantas de feijão no início de desenvolvimento. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 32, 325-332.
- STRUWE, L. & ALBERT, V. A. 2002. *Gentianaceae: Systematics and Natural History*, Cambridge University Press.
- TESZLÁK, P., KOCSIS, M., GAÁL, K. & NIKFARDJAM, M. P. 2013. Regulatory effects of exogenous gibberellic acid (GA³) on water relations and CO₂ assimilation among grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 159, 41-51.

The background of the entire page is a close-up photograph of numerous thick, yellowish, fibrous roots, likely from a medicinal plant, arranged in a dense, overlapping pattern. The roots have a slightly rough, textured surface and are illuminated with soft, warm light, creating a natural and organic feel.

CAPÍTULO III

**Establecimiento, desarrollo y rendimiento de
Gentiana lutea L.var. *aurantiaca*
en cultivo regular en diferentes ambientes**

CAPÍTULO III

I. ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	147
2. OBJETIVOS.....	149
3. MATERIAL Y MÉTODOS	151
3.1. SELECCIÓN DE PARCELAS	151
3.2. ANÁLISIS DE SUELO	156
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	159
3.4. MATERIAL VEGETAL.....	159
3.5. TRASPLANTE	160
3.6. ESTABLECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE LA PLANTAS	160
3.7. FERTILIZACIÓN.....	160
3.8. MANTENIMIENTO.....	161
3.9. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	162
3.10. PROCESADO DE MUESTRAS	163
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	164
4. RESULTADOS	165
4.1. SUPERVIVENCIA DE LAS PLANTAS	165
4.2. PARCELA CT1 (ORALLO).....	168
4.3. PARCELA CT2 (ORALLO).....	172
4.4. PARCELA CT3 (PTO DE LA MAGDALENA).....	177
4.5. PARCELA CT4 (ESTIA).....	183
4.6. ANÁLISIS COMBINADO DE LOS CUATRO AMBIENTES ENSAYADOS 191	
5. DISCUSIÓN.....	199
6. CONCLUSIONES.....	205
7. CONCLUSIONS.....	207
8. BIBLIOGRAFÍA.....	209

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Detalle de la parcela CT1.....	152
Figura 2: Detalle de la parcela CT2.....	152
Figura 3: Detalle de la parcela CT3.....	152
Figura 4: Detalle de la parcela CT4.....	153
Figura 5: Detalle de las grietas características del terreno en CT4 debido a la contracción de las arcillas	155
Figura 6: Imagen de una población de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en una ladera con una pendiente superior al 40% en el municipio de La Cueta (Babia, León)	155
Figura 7: Localización y entorno de las diferentes parcelas en de cultivo de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	157
Figura 8: Detalle de las plantas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de dos savias listas para su trasplante.....	159
Figura 9: Detalle de la parcela CT3 tras laboreo y primer trasplante.....	160
Figura 10: Detalle de la aportación de fertilizante realizada anualmente.....	161
Figura 11: Detalle de la limpieza de la parcela de cultivo de genciana mediante el uso de una desbrozadora.....	161
Figura 12: Detalle de la parcela CT3 previamente a la siega de malas hierbas en primavera.	161
Figura 13: Detalle de la parcela CT3 después de la siega de malas hierbas en primavera.	162
Figura 14: Planta de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> después de ser lavada	163
Figura 15: Detalle del troceado de las raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	163
Figura 16: Conservación de las muestras de raíz de genciana una vez desecadas	164
Figura 17: Comparación de medias para el porcentaje de supervivencia de las plantas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> trasplantadas a las parcelas CT1, CT2, CT3 y CT4. En primavera, otoño, y valores medios.	166
Figura 18: Fenómeno de descalce sufrido por una planta de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	166
Figura 19: Planta de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> muerta debido a la afección por enfermedades criptogámicas.....	167
Figura 20: <i>Aphis (Aphis) orocantabrica</i> sp. Nov. (Prieto and Nafría, 2005) sobre <i>G.</i> <i>lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	167
Figura 21: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección para: peso húmedo (PHUM), peso seco (PSEC) y porcentaje de peso seco de la raíces (%PSEC) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT1.....	168

Figura 22: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso húmedo de las raíces (PHUM) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT1.	169
Figura 23: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso seco de las raíces (PSEC) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT1.	169
Figura 24: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del porcentaje de materia seca de las raíces (%PSEC) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT1.....	170
Figura 25: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT1.	170
Figura 26: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT1.	171
Figura 27: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT1.....	171
Figura 28: Comparación de medias para el tratamiento época de trasplante (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre parte aérea de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT1.....	172
Figura 29: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012o, 2013p y 2013o) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT2.....	173
Figura 30: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso húmedo de las raíces (PHUM) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT2.	173
Figura 31: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso seco de las raíces (PSEC) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT2.	174
Figura 32: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del porcentaje de materia seca de las raíces (%PSEC) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT2.....	175
Figura 33: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT2. Columnas con diferentes letras para cada carácter, son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. NF: no fertilizado; F: fertilizado.....	175
Figura 34: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT2.	176
Figura 35: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT2.....	176

Figura 36: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012p, 2012o, 2013p y 2013o) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT3.....	177
Figura 37: Comparación de medias para el análisis de varianza combinado épocas de plantación (P2009 y O2009) y recolecciones (12p y 13p) de primavera para diferentes caracteres de la parte aérea de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT3.	178
Figura 38: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso húmedo de las raíces (PHUM) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT3.	179
Figura 39: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso seco de las raíces (PSEC) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT1.	179
Figura 40: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del porcentaje de materia seca (%PSEC) de las raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT3.....	180
Figura 41: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT3.	181
Figura 42: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT3..	181
Figura 43: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT3.....	182
Figura 44: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT1.....	182
Figura 45: Planta de <i>Gentiana lutea</i> L. con claros síntomas cloróticos.	183
Figura 46: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012p, 2012o, 2013p y 2013o) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT4. C.....	184
Figura 47: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012p, 2013p) para diferentes caracteres medidos sobre parte aérea de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT4.....	184
Figura 48: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso húmedo de las raíces (PHUM) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para la parcela CT4.	185
Figura 49: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso seco de las raíces (PSEC) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para la parcela CT1.	186
Figura 50: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del porcentaje de materia seca de las raíces (%PSEC) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT4.....	186
Figura 51: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT4.	187

Figura 52: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT4.	187
Figura 53: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT4.....	188
Figura 54: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> de la parcela CT4.....	188
Figura 55: Comparación de medias para el peso húmedo (PHUM) de las raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> respecto de las diferentes recolecciones para la plantación P2009 en la parcela CT4.....	189
Figura 56: Comparación de medias para el peso seco (PSEC) de las raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> respecto de las diferentes recolecciones para la plantación P2009 en la parcela CT4.....	189
Figura 57: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación (P2008 y P2009) para cada recolección (2010p, 2010o, 2011p, 2011o, 2012p, 2012o, 2013p, 2013o) para el peso húmedo de las raíces (PHUM) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en la parcela CT4.	190
Figura 58: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación (P2008 y P2009) para cada recolección (2010p, 2010o, 2011p, 2011o, 2012p, 2012o, 2013p, 2013o) para el peso seco de las raíces (PHUM) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en la parcela CT4.....	190
Figura 59: Comparación de medias para el tratamiento parcelas para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para todas las parcelas.....	191
Figura 60: Comparación de medias para el tratamiento parcelas para diferentes caracteres medidos parte aérea de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para todas las parcelas...	192
Figura 61: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012o, 2013p, 2013o) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para todas las parcelas.	193
Figura 62: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012p, 2013p) para diferentes caracteres medidos sobre parte aérea <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para todas las parcelas.	193
Figura 63: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección para el peso húmedo de las raíces (PHUM) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para todas las parcelas.....	194
Figura 64: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección en relación al peso seco de las raíces (PSEC) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para todas las parcelas.....	195
Figura 65: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección en relación al porcentaje de materia seca de las raíces (%PSEC) de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para todas las parcelas.	195

Figura 66: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación para diferentes caracteres medidos sobre raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para todas las parcelas.	196
Figura 67: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> para todas las parcelas.....	196
Figura 68: Representación gráfica de la recta de regresión lineal obtenida para la relación peso húmedo de la raíz (PHUM) y peso húmedo de la parte aérea (PHUMH) de las muestras provenientes de todas las parcelas.....	197

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores climáticos medios para las parcelas de cultivo http://atlas.itacyl.es/visor	154
Tabla 2: Localización de las parcelas experimentales de cultivo de <i>G. lutea</i> L.var. <i>aurantiaca</i> . Sistema geodésico de referencia. ETRS89.....	155
Tabla 3: Análisis de suelos de las diferentes parcelas experimentales de cultivo de <i>G. lutea</i> L.var. <i>aurantiaca</i> y de 42 poblaciones silvestres.....	156
Tabla 4: Supervivencia de las plantaciones de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	165
Tabla 5: Estimación de producciones de raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> fresca para cada una de las parcelas ensayadas, épocas de plantación y tratamiento fertilizado.....	192

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, diferentes especies de plantas y animales han sido domesticadas, permitiendo en el caso de las plantas su cultivo. Un claro ejemplo de ello es el tomate, originario del oeste de Sudamérica, a lo largo de su costa y los Andes, desde el centro de Ecuador, atravesando Perú hasta el norte de Chile, incluyendo las Islas Galápagos (Bergougnoux, 2014). Hoy en día el tomate es uno de los vegetales más consumido en todo el mundo. Con ello, las diferentes especies, a través de la selección y mejora genética han permitido que esta presión positiva dé como resultado mayores productividades, calidades, e incluso plantas con nuevas características, convirtiéndose entonces en actividades que generan empleo y riqueza. Pero esto no ha sucedido con todas las especies.

Existen especies de plantas no utilizadas de forma masiva, o cuyo valor económico no ha supuesto la búsqueda del desarrollo de su cultivo. En general, estas plantas son aquellas no consideradas como alimentos, con usos más reducidos, como pueden ser usos medicinales, aromáticos, etc. Estas utilizaciones, menores o residuales, han desembocado en que dichas especies hayan sido recolectadas allá donde crecen de forma silvestre, de modo que no se han cultivado o su cultivo se ha dado de forma localizada y reducida.

Aparte de la cuestión económica, existen otras causas que hacen que una planta no haya sido cultivada hasta el momento, y estas causas, son debidas a las propias características de la planta, como pueden ser la dificultad de su multiplicación y manejo, lento desarrollo de las partes aprovechables, necesidades especiales de tipo edáfico o climático para su cultivo, etc.

El aprovechamiento de los recursos naturales es posible cuando se hace de forma sostenible, de modo que estos recursos no disminuyen, o al menos, no a números peligrosos que pongan en riesgo su sustentabilidad. La modificación de alguno de los factores puede aumentar su demanda. Estos factores son: el aumento de la presión demográfica del ser humano, el descubrimiento de nuevos usos para el recurso, aumento de su valor económico o falta de otras actividades productivas más rentables. El incremento de la demanda puede romper este frágil equilibrio conllevando, en general, nefastos desenlaces si no se pone remedio a tiempo. Estas actuaciones pasan primero, por la protección del recurso, y segundo, por la producción del mismo, ya sea a través de su cultivo, en el caso de las plantas, o su cría para los animales.

En el caso de la *Gentiana lutea* L. se cumplen casi todas las premisas, ya que se trata de una planta de alta montaña cuyo hábitat es ciertamente específico, requiriendo unas condiciones edafoclimáticas exigentes, que en el caso de alguna variedad, como es la *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca*, de forma natural sólo crece sobre suelos de origen silíceo con valores de pH entre 3,8 y 4,7 (González et al., 2012). Además, es de una planta de difícil manejo hasta su establecimiento y, en la que producir nuevas plántulas a

partir de semilla necesita de diferentes procesos sobre ellas, ya que presentan dormancia (Aiello et al., 1998).

Con todo ello, el crecimiento de las raíces, su parte aprovechada, es muy lento (Kurian and Sankar, 2007, Sand et al., 2013), necesitando de al menos cinco o seis años para poder recolectarla obteniendo unos rendimientos aceptables. Algunos autores hablan de hasta diez años para poder ser recolectada.

Para la *G. lutea* L., su cultivo no es desconocido aunque si local. En uno de los trabajos sobre el cultivo de la genciana (Bezzi et al., 1987) se nombra a Tukanov (1976), por sus trabajos en la antigua Yugoslavia, y a Franz (Franz, 1981) en Alemania; haciendo hincapié como los más activos promotores del cultivo de la genciana tanto en el *Institut national de la recherche agronomique* (I.N.R.A) y la empresa Pernod en Francia así como la Universidad de Mónaco en Alemania.

Además de ellos, Barralis et al. (1978), realizaron estudios en *Gentiana lutea* L. sobre germinación, cultivo y técnicas culturales, mientras Franz y Fritz (1978) elaboraron un amplio trabajo sobre el desarrollo de una metodología de cultivo actualizada desde el punto de vista hortícola, económico y tecnológico. Posteriormente, Bezzi et al. (1987), dentro del extenso proyecto “Piante Officinali” inscribieron el cultivo de la *Gentiana lutea* L., realizando estudios para su cultivo efectivo, seleccionando ecotipos, así como cultivando el resultado de sus cruces y difundiendo el uso de esta planta en las haciendas de montaña. Otros autores han realizado algún estudio sobre el cultivo de la *Gentiana lutea* L. (Galambosi, 1996, Kusar and Baricevic, 2006), *Gentiana lutea* L. subsp. *symphiandra* (Radanovic et al., 2012), pero hasta ahora nadie lo ha realizado utilizando la *Gentiana lutea* L. var *aurantiaca*.

El cultivo de la genciana permite adaptar, de una manera más o menos flexible, la producción a la demanda, siendo esta producción regular y homogénea en cuanto a cantidad y calidad, ya que la edad de la raíz influye en la concentración final de los compuestos, como la amarogentina, la cual presenta mayores concentraciones en raíces jóvenes (Aiello and Bezzi, 1998), y se distribuye principalmente en el córtex de la raíz, por lo que ésta es más abundante igualmente en raíces jóvenes (Leiton, 1996).

Si el cultivo regular se convirtiera en la principal fuente de obtención de la raíz de genciana, debido a su mayor calidad frente a raíces obtenidas de poblaciones silvestres, supondría el aumento de la riqueza para las zonas productoras, las cuales, como se ha comentado anteriormente se restringen a ciertas zonas montañosas donde la planta se adapta, permitiendo en ellos la obtención de buenos rendimientos.

Por todo ello el cultivo de la genciana, además de una nueva actividad económica, sería una de las soluciones para que, de forma natural, esta volviese a poblar en mayor medida los hábitats montañosos donde históricamente se ha podido encontrar y, debido a la recolección indiscriminada, se ha visto reducida a pequeñas manchas aisladas.

2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental es conocer la respuesta al cultivo de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, estableciendo para ello parcelas en diferentes localizaciones, dentro y fuera del hábitat natural de la planta,

Los objetivos concretos son:

- Conocer el efecto de diferentes épocas de plantación (primavera y otoño) sobre el establecimiento, el desarrollo, el rendimiento y la calidad del cultivo.
- Conocer el efecto de la fertilización sobre el desarrollo, el rendimiento y la calidad del cultivo.
- Conocer el efecto de diferentes épocas de recolección (primavera y otoño) sobre el rendimiento y la calidad del cultivo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SELECCIÓN DE PARCELAS

A la hora de seleccionar las parcelas en las cuales establecer los diferentes ensayos de cultivo de *G. lutea* L.var. *aurantiaca*, se han tenido en cuenta diferentes factores, de modo que dichas localizaciones proporcionasen variabilidad respecto a ubicación, pendiente del terreno, características edáficas y exposición al sol, teniendo en cuenta que *G. lutea* L. es una planta heliófila y que la variedad *aurantiaca* se desarrolla en suelos con valores de pH muy bajos (González et al., 2012). En total, se seleccionaron cuatro parcelas diferentes, con diferentes características, que permitieran analizar cómo estos factores afectan al establecimiento y desarrollo de la genciana (Tabla 2), encontrándose tres de ellas en zonas montañosas, donde la genciana crece de forma silvestre, mientras que la cuarta fue ubicada fuera de su hábitat natural, con unas condiciones, tanto climáticas como edáficas, alejadas de los valores en los que habitualmente se desarrolla la genciana.

En la selección de todas ellas, un requisito imprescindible fue que dichas parcelas pudiesen estar, en la medida de lo posible, vigiladas y protegidas de la entrada de ganado u otros animales, como los jabalíes, que pueden dañar las plantas, así como de los recolectores furtivos, por lo que se manejaron varias propuestas de miembros de APROGEN, particulares o Juntas Vecinales.

Finalmente, dos de las parcelas seleccionadas se situaron en el municipio de Orallo (Figura 1 y Figura 2), estando estas localizadas en la misma “braña” pero en vertientes contrapuestas, de modo, que la primera (CT1) se trata de una parcela con una ligera pendiente, la cual recibe sol durante gran parte del día, mientras que CT2 es una parcela que únicamente recibe el sol hasta primera hora de la tarde y presenta una pendiente pronunciada (Tabla 2). La última parcela situada en el entorno montañoso (CT3, Figura 3), se localiza en el Puerto de la Magdalena, en el Término Municipal de Murias de Paredes, con unas características intermedias en cuanto a su exposición y pendiente respecto de las dos primeras (Tabla 2). Todas ellas fueron valladas utilizando postes de madera y malla de alambre. Desde cada una de estas tres parcelas es posible visualizar plantas de genciana creciendo de forma silvestre, por lo que las condiciones edáficas son adecuadas para su desarrollo (Tabla 3).



Figura 1: Detalle de la parcela CT1



Figura 2: Detalle de la parcela CT2



Figura 3: Detalle de la parcela CT3



Figura 4: Detalle de la parcela CT4

Por último, la parcela fuera del hábitat natural de la *G. lutea* L. var. *aurantiaca* fue ubicada dentro del recinto de la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria (Figura 4), localizada a las afueras de la ciudad de León (Tabla 2), donde las condiciones edáficas, con mayor pH y arcilla (Tabla 3, Figura 5), difieren en gran medida de lo encontrado allí donde crece la genciana de manera espontánea.

La climatología para las diferentes parcelas (Tabla 1) difiere en gran medida de las tres parcelas situadas en zonas montañosas a CT4. Los dos datos a tener en cuenta principalmente son las temperaturas y las precipitaciones.

Para las parcelas situadas en zonas de montaña (CT1, CT2 y CT3), los inviernos son fríos, mientras que los veranos son suaves y se consideran secos, pese a recibir, sobre todo CT1 y CT2 más del doble de las precipitaciones que CT4. Estas zonas reciben frecuentes nevadas en invierno que cesan a partir de abril. Las precipitaciones se reparten de una forma más o menos homogénea entre otoño, invierno y primavera, aunque CT3, más al sur recibe en torno a 500 mm de precipitaciones menos, con una reducción de estas precipitaciones más marcada en primavera. Según la “Clasificación climática de Köppen” la climatología para las tres parcelas es “oceánico verano seco” (Tabla 1).

La parcela CT4 se caracteriza por un clima seco, con inviernos fríos y veranos calurosos y secos, concentrándose la mayor parte de las precipitaciones en otoño e invierno, siendo el total de las mismas de 513 mm, un valor escaso para permitir el desarrollo silvestre de la genciana. Según la “Clasificación climática de Köppen” la climatología para esta parcela es “Atlántico” (Tabla 1).

Tabla 1: Valores climáticos medios para las parcelas de cultivo <http://atlas.itacyl.es/visor>.

Variable	CT1 (Orallo)	CT2 (Orallo)	CT3 (Murias de Paredes)	CT4 (ESTIA (León))
Temp. media anual (°C)	7,5	8,4	7,3	11,3
Temp. media enero (°C)	2,2	2,4	0,2	3,5
Temp. media febrero (°C)	2,4	2,8	1,7	5
Temp. media marzo (°C)	4,6	5,3	3,6	7,8
Temp. media abril (°C)	4,5	5,2	4,8	9
Temp. media mayo (°C)	7,9	8,8	7,4	12,4
Temp. media junio (°C)	12,8	13,8	11,7	17,5
Temp. media julio (°C)	14,6	15,8	14	20,2
Temp. media agosto (°C)	14,3	15,2	14,6	19,9
Temp. media septiembre (°C)	12,4	13,1	11,3	16,6
Temp. media octubre (°C)	8,6	9,2	7,2	12
Temp. media noviembre (°C)	4,5	4,9	4,3	7,3
Temp. media diciembre (°C)	2,9	3,1	1,2	4,4
Temp. media min enero (°C)	-1,7	-1,3	-3,2	-0,9
Temp. media max julio (°C)	22	23	24,1	28,3
Día última helada primavera	20 mayo	17 mayo	29 de mayo	26 de abril
Día primera helada de otoño	10 octubre	12 octubre	1 de octubre	30 de octubre
Prec. media anual (mm)	1574	1603	1052	513
Prec. media primavera (mm)	407	414	260	130
Prec. media verano (mm)	175	177	128	72
Prec. media otoño (mm)	479	486	336	156
Prec. media invierno (mm)	401	449	325	154
Nº días sin precipitación	126	128	114	73
Prec. media enero (mm)	154	163	105	51
Prec. media febrero (mm)	131	134	83	35
Prec. media marzo (mm)	122	128	84	30
Prec. media abril (mm)	134	141	88	43
Prec. media mayo (mm)	126	131	98	53
Prec. media junio (mm)	75	74	61	32
Prec. media julio (mm)	48	50	37	17
Prec. media agosto (mm)	48	49	34	21
Prec. Media septiembre (mm)	85	89	70	36
Prec. Media octubre (mm)	172	186	143	60
Prec. Media noviembre (mm)	191	199	140	56
Prec. Media diciembre (mm)	191	205	138	56
Clasificación climática de Köppen	Csb	Csb	Csb	Cfb

Temp: Temperatura media mínima anual; Prec: Precipitación; Csb: oceánico, verano seco; Cfb: atlántico. Datos obtenidos



Figura 5: Detalle de las grietas características del terreno en CT4 debido a la contracción de las arcillas

Tabla 2: Localización de las parcelas experimentales de cultivo de *G. lutea* L.var. *aurantiaca*. Sistema geodésico de referencia. ETRS89.

Parcela	Longitud (O)	Latitud (N)	Altitud (m)	Exposición	Pendiente
CT1	6°21'21,64''	43°00'46,62''	1418	O-SO	5,4%
CT2	6°21'37,41''	42°59'27,14''	1291	E-NE	19,0%
CT3	6°12'57,37''	42°52'12,37''	1437	N-NE	8,4%
CT4	5°37'24,64''	42°34'59,64''	819	4 vientos (O)	0%

La elección de la localización CT2, responde a la existencia de un número considerable de poblaciones de genciana que se desarrollan en este tipo de condiciones, como se puede observar en la Figura 6.



Figura 6: Imagen de una población de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en una ladera con una pendiente superior al 40% en el municipio de La Cueta (Babia, León)

3.2. ANÁLISIS DE SUELO

El análisis de los suelos ha sido realizado por el Laboratorio de técnicas Instrumentales de la Universidad de León. Para el análisis de las muestras de suelo se utilizaron los métodos oficiales de análisis propuestos por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1994).

Tabla 3: Análisis de suelos de las diferentes parcelas experimentales de cultivo de *G. lutea* L.var. *aurantiaca* y de 42 poblaciones silvestres.

Variable	CT1	CT2	CT3	CT4	<i>G. lutea</i> L.var. <i>aurantiaca</i> (silvestre)	
					Media	Intervalo (ppm)
Textura (%)	F-A	F-A	F-L/F-A	F	F/F-A/F-L	
Arena (%)	56	68	48	30	55,1	38,00-74,00
Limo (%)	42	30	50	46	41,05	20,00-56,00
Arcilla (%)	2	2	2	24	3,81	2,00-12,00
pH (Extracción en agua)	5,70	6,20	4,46	7,34	4,18	3,57-4,99
Carbonatos (% caliza)	Ip	Ip	Ip	<0,87	Ip	
Materia orgánica (%)	8,16	9,06	11,86	4,69	17,90	9,14-36,24
Nitrogeno Total (%)	0,45	0,47	0,63	0,42	0,65	0,33-1,90
Relación C/N	10,59	11,29	10,93	6,43	13,11	10,09-17,07
P (Olsen) (ppm)	8,34	5,64	16,71	8,62	5,81	0,56-34,18
Ca (cmol(+))kg ⁻¹	9,11	14,07	1,09	20,42	1,75	0,17-6,02
Mg (cmol(+))kg ⁻¹	2,66	1,83	0,30	3,15	0,46	0,18-0,76
K (cmol(+))kg ⁻¹	0,14	0,06	0,35	0,20	0,79	0,13-2,20
Na (cmol(+))kg ⁻¹	0,04	0,08	0,02	0,12	0,07	0,00-0,21
CIC (cmol(+))kg ⁻¹	13,15	18,31	4,95	26,52	6,79	3,56-15,43
Mn (ppm)	44,57	9,53	35,48	12,88	0,42	0,11-1,40
Fe (ppm)	115,90	86,13	216,83	85,79	416,89	0,32-1175
Cu (ppm)	1,31	0,76	0,65	5,13	65,11	0,35-371,90
Zn (ppm)	1,18	0,44	2,97	1,13	5,62	0,02-21,91
B (ppm)	0,36	0,36	0,56	1,62	0,41	0,15-0,87
Conductividad (dS/m)	0,07	0,12	0,08	0,11	0,05	0,01-0,30

Texturas: F: Franca; F-L: Franco-Limosa; F-A: Franco-Arcillosa

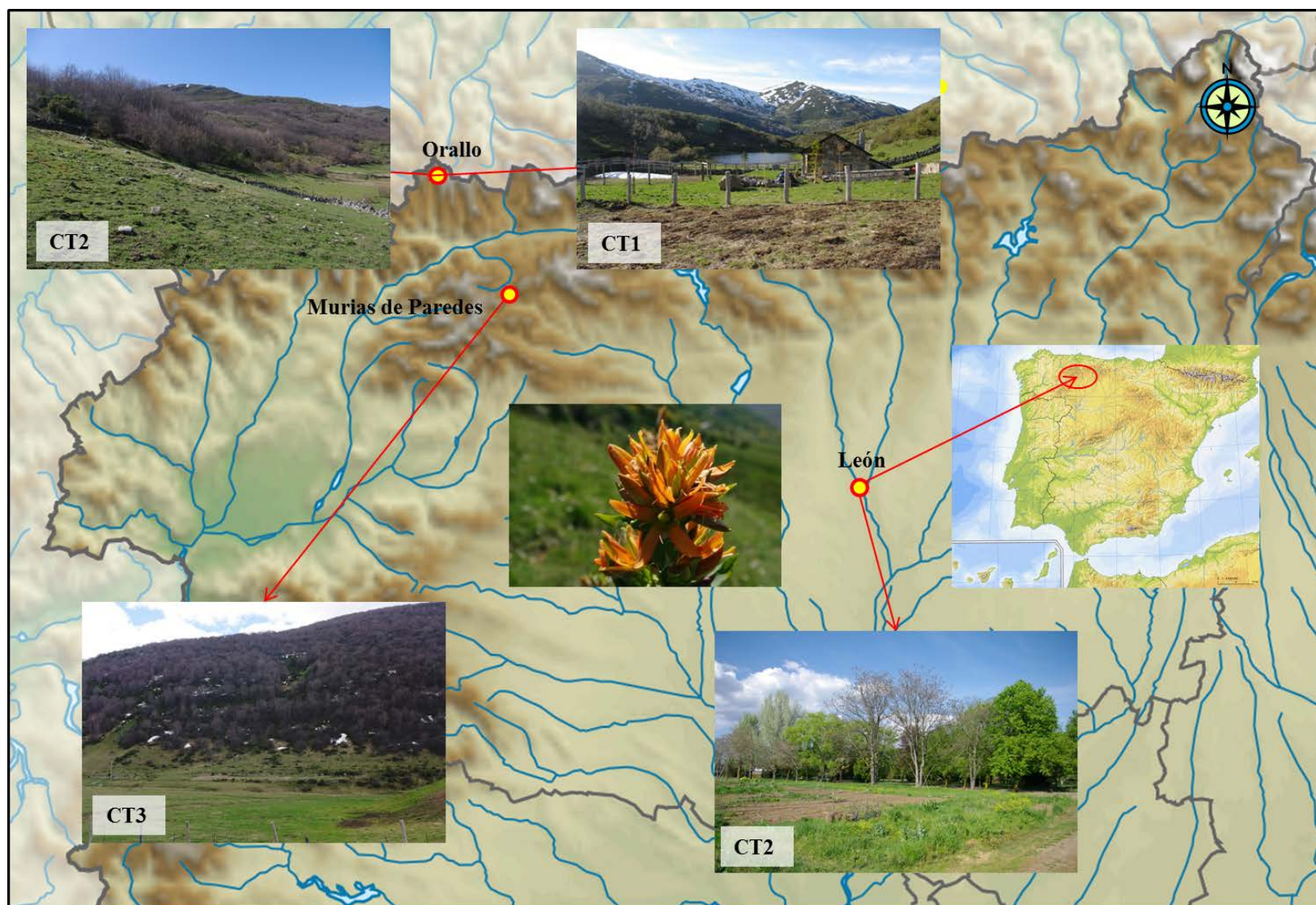


Figura 7: Localización y entorno de las diferentes parcelas en de cultivo de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el establecimiento de las diferentes parcelas de cultivo, el marco de plantación utilizado fue de 0,6 x 0,3 m siendo 0,3 m la distancia entre plantas, siendo la densidad de plantación de 55555 plantas por hectárea.

Los factores a evaluar han sido la fertilización (o ausencia de la misma), época de trasplante (primavera y otoño), llevando a cabo un diseño factorial de 2x2 en bloques al azar, con cuatro repeticiones.

3.4. MATERIAL VEGETAL

Previamente a la elección de la ubicación definitiva de las parcelas experimentales, se realizó una labor de multiplicación con el fin de producir la planta necesaria para los consecutivos trasplantes (Figura 8), ya que la genciana es una planta de muy lento desarrollo. Teniendo en cuenta, que su vía de reproducción es principalmente sexual, en 2006 Federico Varela Nieto (INIA), con la colaboración de miembros de APROGEN, recolectaron semillas provenientes de cápsulas maduras en diferentes localizaciones.

En las poblaciones en las cuales se recogió la semilla, ésta fue obtenida de al menos diez plantas seleccionadas de manera aleatoria. Las plantas seleccionadas estaban separadas al menos cinco metros unas de otras para evitar muestrear la misma planta, ya que debido al desarrollo de la raíz de genciana, es posible que varios tallos florales, distantes unos de otros, correspondan a la misma planta. Las plantas utilizadas en los ensayos agronómicos fueron obtenidas de una población silvestre situada en el Puerto de la Magdalena, en el término municipal de Murias de Paredes. Esta población se extiende por los alrededores de la parcela de cultivo CT3 cuyas coordenadas se pueden observar en la Tabla 2.

La multiplicación de estas plantas comenzó en primavera de 2007 y se realizó en el Vivero Forestal de la Junta de Castilla y León (Valladolid). Esta multiplicación se llevó a cabo en bandejas forestales, en una mezcla de turba rubia y turba negra.



Figura 8: Detalle de las plantas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de dos savias listas para su trasplante

3.5. TRASPLANTE

La primera partida de plantas de genciana, fue utilizada para establecer un primer trasplante en primavera de 2008 para la parcela de la ESTIA. En 2009, las plantas de genciana, ya con dos savias, se trasplantaron a cada una de las cuatro parcelas (Figura 9), realizando dos trasplantes, uno en primavera (primera semana de junio) y otro en otoño (última semana de septiembre).

Cada uno de esos trasplantes consistió la implantación de 240 plantas distribuidas en cuatro filas de 60 plantas cada una. Previamente al trasplante, las parcelas se acondicionaron adecuadamente mediante una labor de volteo, con arado de vertedera, y posterior pase de rotavator.



Figura 9: Detalle de la parcela CT3 tras laboreo y primer trasplante

3.6. ESTABLECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE LA PLANTAS

Al inicio de cada año, después del deshielo se llevó a cabo un recuento de las plantas supervivientes en cada unidad experimental

3.7. FERTILIZACIÓN

La genciana es una planta poco exigente a nivel de nutrientes y además suele presentarse en suelos con las características adecuadas para su desarrollo, siendo la dosis anual más utilizada la que consiste en 40-100 kg/ha de N, 60-80 kg/ha de P_2O_5 y 120-150 kg/ha de K_2O . (Aiello and Bezzi, 1998)

Para conocer las diferencias en el desarrollo de las raíces, en la mitad de cada una las repeticiones para las diferentes parcelas, se ha utilizado un fertilizante compuesto comercial. Este fertilizante ha sido el NITROFLOWER de la empresa PRODUCTOS FLOWER S.A., el cual tiene la siguiente formulación: N: 12%; P_2O_5 : 12%, K_2O : 18%, MgO: 2%; SO_3 : 22%, B: 0,1%. La aportación de este fertilizante se realizó anualmente al inicio de la actividad vegetativa (aproximadamente mayo), añadiendo 12 g de dicho compuesto alrededor de cada una de las plantas, evitando en todo momento que el fertilizante estuviese en contacto con cualquier parte de la planta, impidiendo las quemaduras químicas por contacto (Figura 10).



Figura 10: Detalle de la aportación de fertilizante realizada anualmente

3.8. MANTENIMIENTO

Anualmente, las parcelas fueron limpiadas de malas hierbas mediante la utilización de una desbrozadora (Figura 11), para demostrar la viabilidad de cultivo de la genciana con un mínimo laboreo y mínimo coste. En el caso de la parcela CT4 el número de desbroces fue de tres debido al mayor desarrollo de malas hierbas.



Figura 11: Detalle de la limpieza de la parcela de cultivo de genciana mediante el uso de una desbrozadora.



Figura 12: Detalle de la parcela CT3 previamente a la siega de malas hierbas en primavera.



Figura 13: Detalle de la parcela CT3 después de la siega de malas hierbas en primavera.

De igual manera en las diferentes visitas a las parcelas se observaron detenidamente las plantas en búsqueda de posibles afecciones ya fuese por insectos, hongos, bacterias, etc. Cuando se recogieron muestras de plantas de genciana enfermas o insectos que pudiesen constituir una amenaza para ellas, para su identificación, se ha contado con la ayuda del Laboratorio de Plagas y Enfermedades Vegetales de la Universidad de León presente en la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria (ESTIA).

3.9. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Para la realización de las recolecciones, se seleccionaron dos momentos claves del ciclo vegetativo de la genciana. El primero, es el inicio de la actividad vegetativa (primavera), cuando las plantas de genciana movilizan las reservas de las raíces para que las yemas, en estado latente, empiecen a desarrollarse de nuevo, dando lugar a nuevas hojas. El segundo, se da lugar entre el fin del verano y el inicio del otoño, cuando la genciana inicia su parada vegetativa, perdiendo su parte aérea, la cual se va secando poco a poco a partir de la finalización de la floración, periodo en el cual la planta envía todas las reservas a las raíces, engrosándose y preparándose para el paso del invierno.

Conocido el número de las plantas supervivientes cada año, previamente a su recolección, en gabinete se seleccionaron aquellas que iban a ser extraídas mediante sorteos al azar, de modo, que ningún factor pudiese influir a la hora de seleccionar dichas plantas. Las recolecciones se plantearon de tal modo, que en cada una de ellas se extrajeran un número similar, si no idéntico de plantas.

Para la extracción de las raíces ha sido necesario contar con azadas, picos y palas, debido al desarrollo que alcanzan, sobre todo a partir del quinto año. Las plantas se recogieron completas, evitando dejar trozos de raíz en el suelo, para lo cual se extraía toda la tierra que rodeaba el sistema radicular. Una vez extraídas, se retiró la mayor parte de la tierra y se almacenaron en bolsas herméticas individuales identificadas.

3.10. PROCESADO DE MUESTRAS

Una vez en el laboratorio, se procedió a la limpieza de las raíces con agua fría a presión, eliminando con ello cualquier resto de tierra e impurezas (raíces de otras plantas).

Una vez lavadas, las plantas se dispusieron en una habitación aireada sobre papel absorbente donde permanecieron alrededor de dos horas, tiempo durante el cual fue eliminada la humedad superficial. Tras este periodo cada una de las plantas fue fotografiada, pesándose por separado su parte aérea y radicular, obteniendo con ello el peso húmedo de ambas partes. Así mismo se contabilizó el número de yemas que presentaba cada planta a fin de establecer la relación entre el desarrollo y el número de yemas.

El pesado de la parte aérea únicamente se realizó en la recolección primaveral, ya que al final del verano, estando esta parte total o parcialmente seca, el valor obtenido no es representativo.



Figura 14: Planta de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* después de ser lavada



Figura 15: Detalle del troceado de las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*



Figura 16: Conservación de las muestras de raíz de genciana una vez desecadas

Posteriormente, las raíces se fragmentaron para conseguir un secado rápido y uniforme, evitando con ello el inicio de procesos fermentativos y/o la proliferación de hongos. En este caso, el secado se realizó en estufa provista de ventilación forzada, a una temperatura de 38°C durante 48-96 horas para las raíces, ya que para la realización de otros estudios como la cuantificación de sus compuestos amargos mediante HPLC, la utilización de temperaturas superiores puede degradar algunos de los compuestos presentes en las mismas. En el caso de la parte aérea, debido a la no realización de análisis posteriores, se aplicó una temperatura de 70°C reduciendo el tiempo de secado a 24-48 horas.

El periodo de secado de las raíces finaliza cuando el peso ya no disminuye, las raíces son quebradizas, comprobándose perfectamente este hecho mediante la rotura de trozos gruesos de rizoma, verificándose que están completamente secos en su interior y que no presenta una estructura plástica. En este punto, se pesaron todas las muestras, tanto de la parte aérea como de las raíces, obteniendo con ello el peso seco. Tras el pesado para su posterior uso en diferentes estudios las muestras se guardaron en bolsas de plástico herméticas e introduciendo estas en bolsas con sílica gel, para evitar la rehidratación del material vegetal. Por último se almacenaron en un lugar oscuro y seco.

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada uno de los experimentos llevados a cabo, los datos fueron analizados utilizando el Modelo Lineal Generalizado (GLM), de modo que cuando el análisis mostró significancia se realizó la comparación de medias mediante el método de Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fischer con un grado de significancia $\alpha=0,05$. El software utilizado fue el SAS 9.1. (SAS Institute Inc, 2004)

Se utilizó el modelo de regresión lineal simple para analizar la relación existente entre los pesos de las partes aéreas y el desarrollo de las raíces de las plantas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, utilizando para ello la hoja de cálculo Excel (Microsoft, 2010). Esta misma hoja de cálculo se utilizó para establecer, mediante el modelo de regresión no lineal, del tipo exponencial, la relación existente entre la edad de las raíces (variable independiente) y el incremento de su peso (variable dependiente).

4. RESULTADOS

4.1. SUPERVIVENCIA DE LAS PLANTAS

El análisis de varianza para los porcentajes de supervivencia en las diferentes parcelas ensayadas (CT1 a CT4) para el cultivo de la genciana (Tabla 4), muestra diferencias significativas para cada una de las parcelas.

En la comparación de medias entre épocas de plantación para cada una de las parcelas (Tabla 4, letras mayúsculas), se observan porcentajes de supervivencia significativamente superiores para las plantaciones de primavera en las tres parcelas de montaña (CT1, CT2 y CT3) respecto de las plantaciones otoñales. Los valores medios de supervivencia para la plantación primaveral en las parcelas CT1, CT2 y CT3 son 67,1, 42,2 y 66,0% respectivamente, mientras que en el mismo orden para la plantación otoñal son de 42,1, 7,7 y 19,6%. Para CT4, situada en las inmediaciones de la ciudad de León, no se observan diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia de las plantaciones realizadas en 2009, con un porcentaje medio de supervivencia del 45,1% para el trasplante primaveral y un 53,2% para el otoñal, pero si existen diferencias significativas entre el realizado en la primavera de 2008 (38,0%) respecto del realizado en primavera de 2009.

En lo que respecta a la comparación de medias para la supervivencia de las plantas de genciana en relación al tratamiento de fertilización, en cada una de las plantaciones y cada una de las parcelas (Tabla 4, letras minúsculas), se observan diferencias significativas en algunos casos, siendo en éstos la supervivencia de las plantas para el tratamiento fertilizado significativamente inferior a las no fertilizadas.

Tabla 4: Supervivencia de las plantaciones de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

Plantación	Fertilización	Parcela (% éxito)			
		CT1	CT2	CT3	CT4
P2008	F				29,2% b
	NF				46,7% a B
P2009	F	62,0% a A	28% b A	58,0% a A	28,3% b AB
	NF	68,0% a	57% a	73,0% a	61,7% a
O2009	F	43,0% a B	6,7% a B	15,8% b B	44,2% a A
	NF	41,0% a	9,2% a	23,3% a	62,5% a

Distintas letras mayúsculas para la misma parcela, muestran diferencias significativas para cada plantación (P2008, P2009 y O2009). Distintas letras minúsculas para cada plantación muestran diferencias significativas para el tratamiento de fertilización (F: fertilizado; NF: no fertilizado). (P=0,05) de acuerdo con DMS. P: primavera; O: otoño.

En la comparación de medias para el porcentaje de supervivencia (Figura 17), separando parcelas y fechas de plantación, tanto CT1 como CT3 (67,1 y 66,0%) muestran porcentajes de supervivencia significativamente superiores a los de CT4 y CT2 (45,1 y 42,2% respectivamente) para la plantación primaveral. Para la plantación otoñal, son CT4 (53,2%) y CT1 (42,1%), las que presentan un valor de supervivencia significativamente mayor al resto, con valores para CT y CT2 del 19,6 y 7,7% respectivamente.

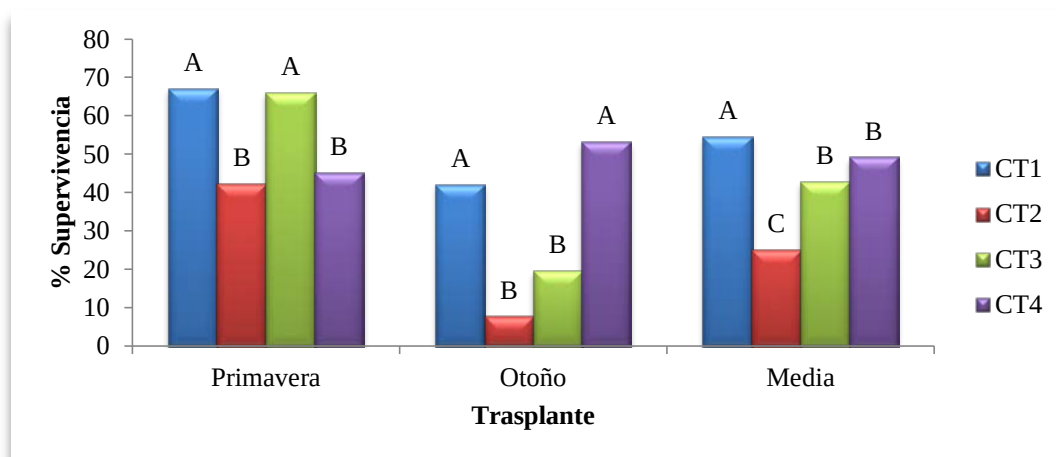


Figura 17: Comparación de medias para el porcentaje de supervivencia de las plantas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* trasplantadas a las parcelas CT1, CT2, CT3 y CT4. En primavera, otoño, y valores medios. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

Los resultados para CT2 son significativamente inferiores al resto de las parcelas (Tabla 4), aun reuniendo las condiciones para el desarrollo silvestre de la *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, pero con una pendiente elevada (19%), no lográndose establecer adecuadamente. Para la plantación otoñal los resultados de CT2 son incluso peores.

Como se puede observar en la Figura 18, la muerte de las plantas de genciana se debe principalmente al descalce. Este es debido a la erosión causada por la escorrentía, de forma mayoritaria debida a la lluvia, pero también al deshielo. Otra de las causas del descalce es la compactación del terreno labrado por la acumulación de nieve.

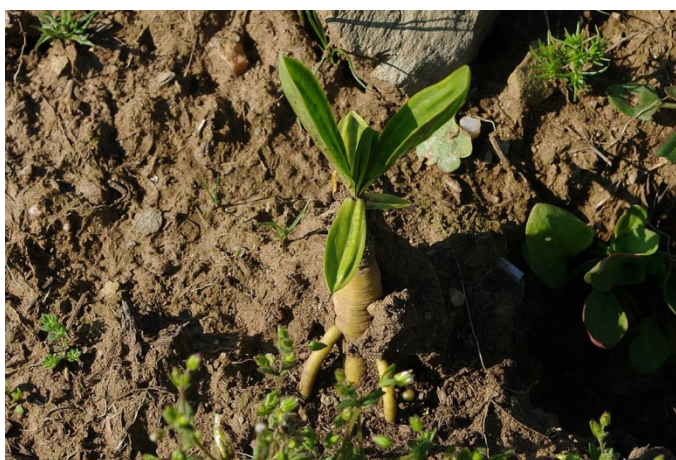


Figura 18: Fenómeno de descalce sufrido por una planta de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*



Figura 19: Planta de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* muerta debido a la afección por enfermedades criptogámicas

Además aquellas plantas que se aprecian descalzadas, si no mueren durante el invierno, al poco de volver a reiniciar la actividad vegetativa mueren, esta vez debido al desarrollo de enfermedades criptogámicas (Figura 19) a partir de las lesiones sufridas por la acción del hielo. Los hongos presentes en estas zonas lesionadas, al aislarse fueron determinadas como *Botrytis cinerea* y *Fusarium* sp.

Sobre las plantas de genciana han sido observados áfidos (Figura 20), siendo estos identificados como como *Aphis (Aphis) orocantabrica* sp. Nov. (Prieto and Nafría, 2005), especie de áfido descrita sobre *G. lutea* L. en la zona de estudio. Además se han visualizado otros insectos como la comúnmente llamada tijereta (*Forficula auricularia*) y algunas otras especies de hemípteros.



Figura 20: *Aphis (Aphis) orocantabrica* sp. Nov. (Prieto and Nafría, 2005) sobre *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

4.2. PARCELA CT1 (ORALLO)

El análisis de varianza para los diferentes caracteres medidos sobre la raíz de genciana en la parcela CT1 (Tabla 2), muestra diferencias significativas para cada uno de ellos teniendo en cuenta en cuenta las distintas recolecciones.

En la Figura 21 se muestra el análisis de varianza combinando las épocas de plantación (primavera 2009 (P2009) y otoño 2009 (O2009)). La comparación de medias para el peso húmedo de las raíces de genciana recolectadas (PHUM), el peso seco de las mismas (PSEC) y su porcentaje de materia seca (%PSEC). Para PHUM, existen diferencias significativas entre la recolección de otoño de 2013 (2013o) y el resto, siendo el peso medio de las raíces de 146,16 g. Para primavera de 2013 (2013p) y otoño de 2012 (2012o) los pesos son 88,75 y 69,82 g respectivamente. Esta significancia es la misma observada para PSEC, donde en el mismo orden los pesos son 18,77, 17,80 y 38,52 g respectivamente. Para %PSEC, los valores para las dos recolecciones realizadas en otoño (2013o y 2012o) con el 26,45 y 26,35% respectivamente, son significativamente superiores al de 2013p (20,80%).

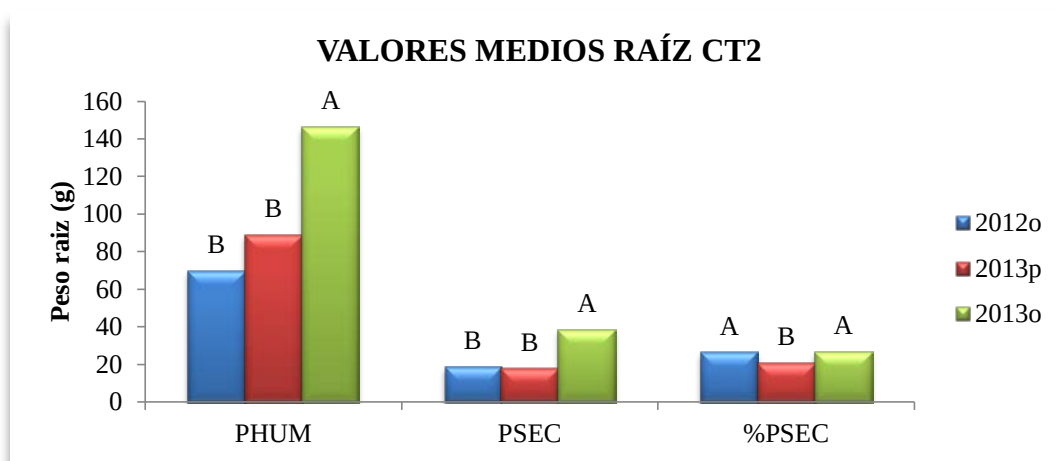


Figura 21: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección para: peso húmedo (PHUM), peso seco (PSEC) y porcentaje de peso seco de la raíces (%PSEC) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT1. Columnas con diferentes letras para el mismo carácter son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca; o: otoño; p: primavera.

El análisis de varianza analizando las épocas de plantación para cada fecha de recolección para PHUM muestra diferencias significativas para ambos tratamientos.

En la comparación de medias entre recolecciones (Figura 22, letras mayúsculas) existe, para ambas plantaciones, un aumento significativo del peso de la raíz de 2013o respecto de 2013p, pero no de ésta respecto de 2012o. En ese orden los pesos de las raíces para P2009 son de 181,38, 113,95 y 80,32 g, mientras que para O2009 son de 96,03, 46,38 y 54,06 g respectivamente.

Para los valores de PHUM señalados, en la comparación de medias para cada recolección (Figura 22, letras minúsculas), existen diferencias significativas para todas las recolecciones excepto 2012o, y para todas mayor el valor para el trasplante primaveral.

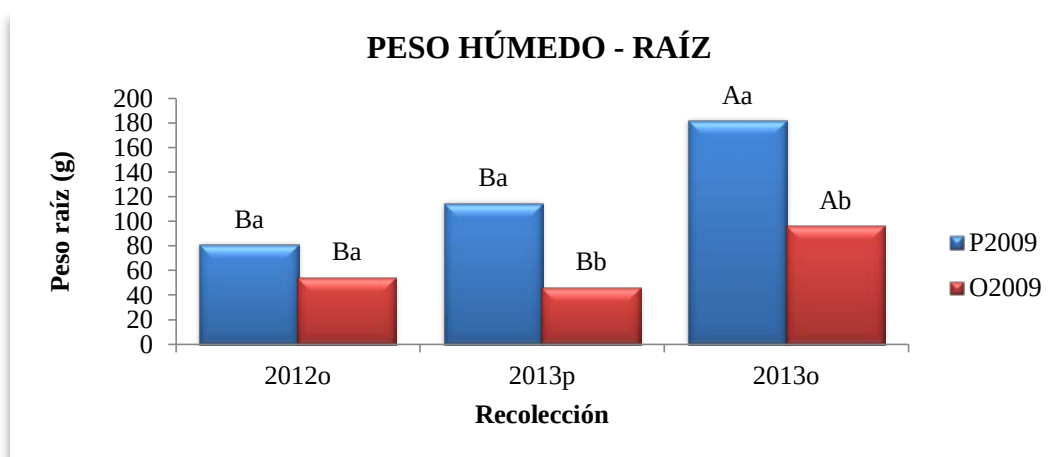


Figura 22: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso húmedo de las raíces (PHUM) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT1. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación son significativamente diferentes entre épocas de recolección (2012o, 2013p y 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas para la misma época de recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS; O/o: otoño; P/p: primavera.

Para el mismo análisis de varianza pero para PSEC, en la comparación de medias entre recolecciones (Figura 23, letras mayúsculas), se observa un aumento significativo del peso seco de la raíz de 2013o respecto del resto. Por lo tanto, cuando hablamos de P2009 los valores de PSEC para 2012o, 2013p y 2013o son de 21,51, 22,79 y 47,36 g respectivamente, mientras que para O2009 son de 14,66, 9,40 y 25,94 g respectivamente.

En la comparación de medias para cada recolección (Figura 23, letras minúsculas), al igual que para PHUM (Figura 22) se observan diferencias significativas entre épocas de plantación para todas las recolecciones excepto la primera, siendo siempre los valores superiores para P2009.

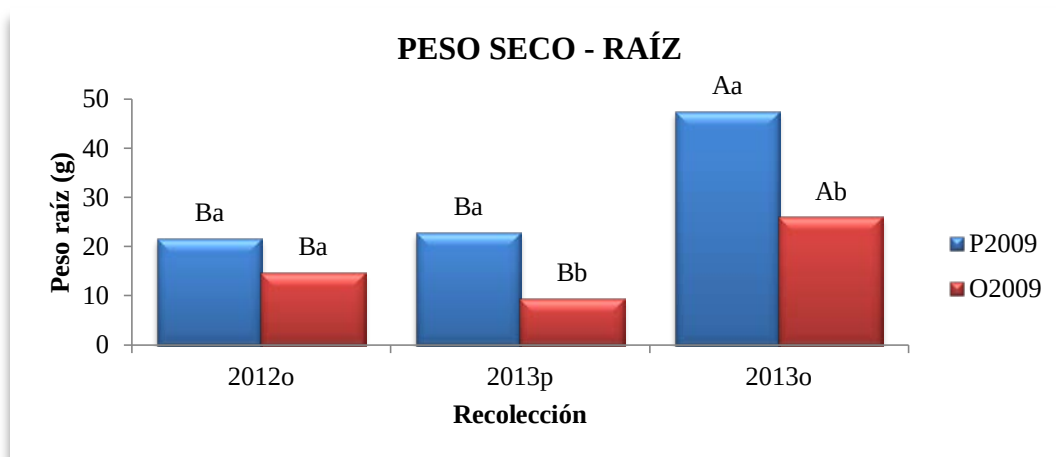


Figura 23: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso seco de las raíces (PSEC) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT1. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación son significativamente diferentes entre épocas de recolección (2012o, 2013p y 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas para la misma época de recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS; O/o: otoño; P/p: primavera.

Para %PSEC, al separar los factores épocas de plantación para cada fecha de recolección (Figura 23, letras mayúsculas), para el valor otoño es significativamente superior al de las recolectadas en primavera. Esto es así tanto para ambos trasplantes, siendo para el primaveral los valores de 26,29, 20,25 y 26,21% para las sucesivas recolecciones, mientras que para el de otoño son del 26,48, 21,72 y del 26,82% respectivamente. Para la comparación de medias entre épocas de plantación (Figura 23, letras minúsculas) sólo se observan diferencias significativas para 2013p, donde %PSEC para las raíces de genciana trasplantadas en otoño, es significativamente mayor que las trasplantadas en primavera.

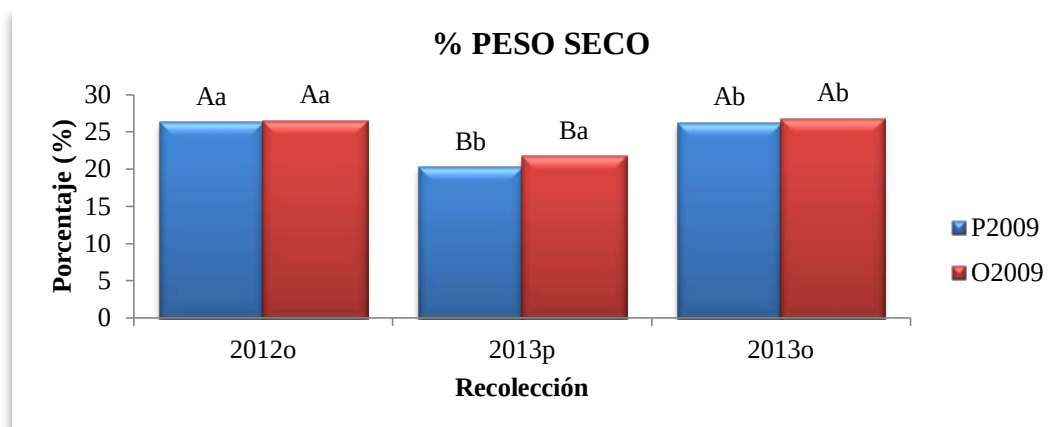


Figura 24: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del porcentaje de materia seca de las raíces (%PSEC) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT1. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación son significativamente diferentes entre épocas de recolección (2012o, 2013p y 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas para la misma época de recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS; O/o: otoño; P/p: primavera.

La comparación de medias (Figura 25) para PHUM y PSEC en relación al tratamiento fertilizado (F) o no fertilizado (NF), muestra diferencias significativas para ambos, siendo significativamente superiores para el tratamiento NF, con 152,59 y 37,52 g para PHUM y PSEC, mientras que para F son de 62,12 y 14,49 respectivamente. Para %PSEC no existen diferencias significativas. Los valores para NF y F son 24,77 y 24,44%.

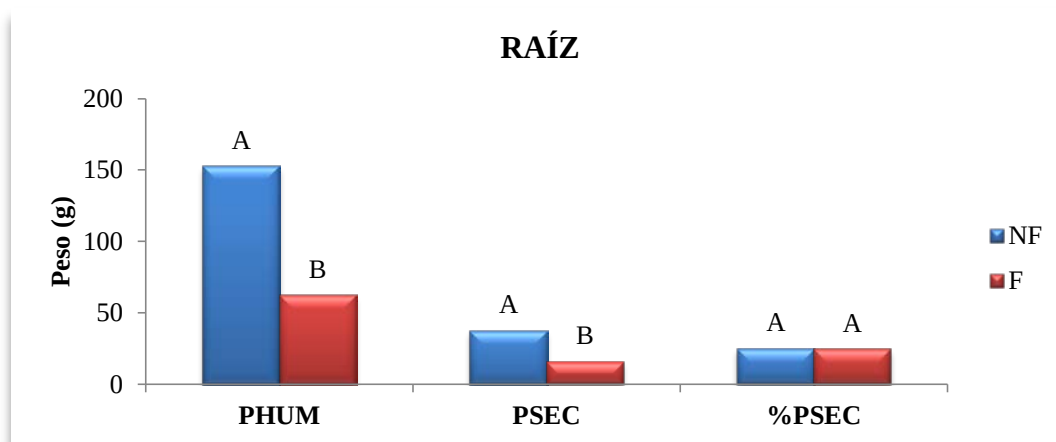


Figura 25: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT1. Columnas con diferentes letras para cada carácter, son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. NF: no fertilizado; F: fertilizado.

La comparación de medias (Figura 26) para diferentes caracteres de la parte aérea en relación al tratamiento fertilización muestra diferencias significativas para el número de yemas (YEMAS), peso húmedo y peso seco de las hojas (PHUMH y PSECH), siendo los valores significativamente mayores para NF. El número de yemas por planta para NF es de 4,25, por 2,87 de F. Los pesos húmedo y seco de las raíces para NF son de 49,07 y 8,54 g. Para F 16,47 y 2,96 g. Para el porcentaje de peso seco de las hojas (%PSECH) no existen diferencias significativas, siendo para NF el 19,70%, y 18,42% para F.

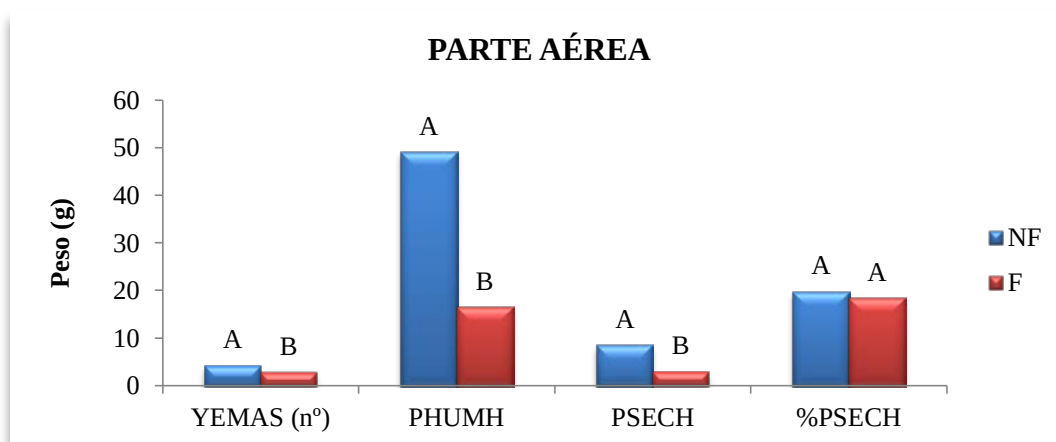


Figura 26: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT1. Columnas con diferentes letras para cada carácter, son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. PHUMH: peso húmedo parte aérea; PSECH: peso seco parte aérea; %PSECH: porcentaje de materia seca parte aérea; YEMAS: n° de yemas desarrolladas. NF: no fertilizado; F: fertilizado.

La comparación de medias (Figura 27) para diferentes caracteres en relación a la fecha de trasplante (P2009 y O2009), se observan diferencias significativas tanto para PHUM como PSEC, siendo en ambos casos los valores significativamente superiores para P2009. Para P2009 los valores para PHUM y PSEC son de 125,63 y 30,63 g respectivamente, mientras que para O2009 son de 30,63 y 17,13 g. Para %PSEC también existen diferencias significativas. Los porcentajes para P2009 y O2009 son del 25,13 y 24,23%.

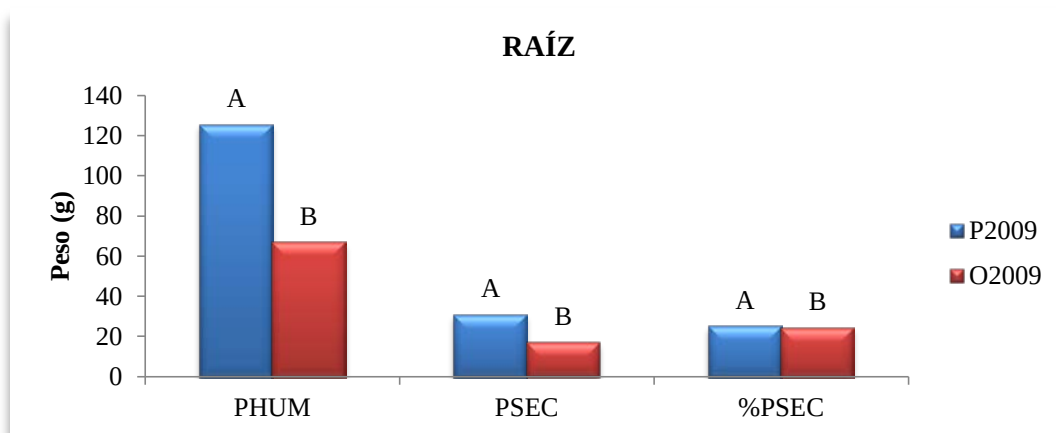


Figura 27: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT1. Columnas con diferentes letras para cada carácter, son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. P: primavera; O: otoño.

Analizando los caracteres tomados para la parte aérea en relación al momento de su trasplante (Figura 28), en la comparación de medias se aprecian diferencias significativas para PHUMH y PSECH, siendo significativamente mayores los valores para P2009, de modo que para estos caracteres los valores son de 38,13 y 6,55 g mientras que para O2009 son 20,06 y 3,77 g respectivamente.

Para los caracteres YEMAS y %PSECH no existen diferencias significativas.

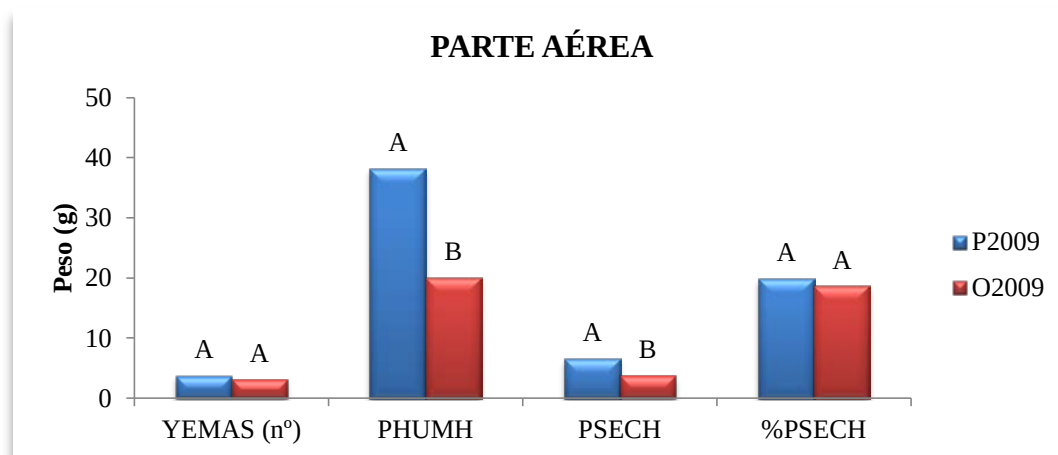


Figura 28: Comparación de medias para el tratamiento época de trasplante (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre parte aérea de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT1. Columnas con diferentes letras para cada carácter, son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUMH: peso húmedo parte aérea; PSECH: peso seco parte aérea; %PSECH: porcentaje de materia seca parte aérea; YEMAS: n° de yemas desarrolladas. P: primavera; O: otoño.

4.3. PARCELA CT2 (ORALLO)

El análisis de varianza para las diferentes variables medidas para la raíz de genciana en la parcela CT2 (Tabla 2), muestra diferencias significativas para cada uno de los caracteres estudiados cuando el factor a tener en cuenta son las distintas recolecciones.

En la Figura 29 se muestra la comparación de medias combinando las épocas de trasplante, para el PHUM, PSEC y %PSEC. Para la primera de las variables, PHUM, la recolección 2013o (42,86 g) es significativamente mayor que para 2012o (25,92 g), pero no así de la 2013p (31,87 g), y esta, a su vez no presenta un peso medio de raíz significativamente superior al de la primera recolección.

Para PSEC, el valor para 2013o (11,63 g) vuelve a ser significativamente superior a los valores obtenidos para las otras dos recolecciones que no presentan diferencias significativas entre ellas, siendo los valores 7,26 y 6,43 g para 2012o y 2013p respectivamente.

Por último, para %PSEC tanto las dos recolecciones realizadas en otoño presentan porcentajes significativamente superiores a los de la recolección de primavera, de modo que los valores para otoño de 2012 y 2013 son 28,28 y 27,26% respectivamente mientras que para primavera de 2013 el porcentaje es de únicamente el 20,47% de materia seca.

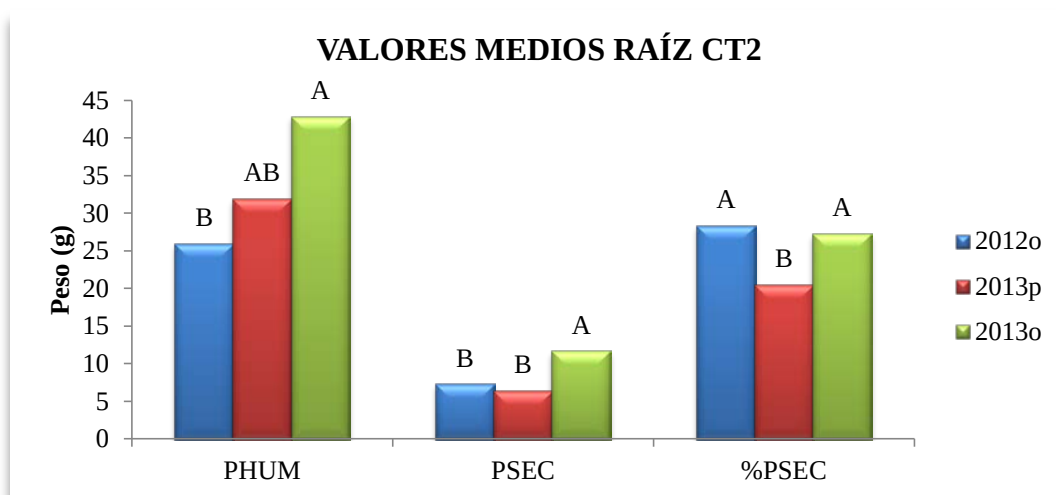


Figura 29: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012o, 2013p y 2013o) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT2. Columnas con diferentes letras para cada carácter, son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. p: primavera; o: otoño.

Para el análisis de varianza separado por fecha de plantación para cada fecha de recolección (Figura 30), en la plantación O2009 sólo se obtiene un valor de PHUM, el de 2012o, debido a que las plantas de genciana no lograron establecerse satisfactoriamente, no pudiendo realizar más recolecciones con un número de plantas suficiente. La comparación de medias entre recolecciones para P2009 (Figura 30, letras mayúsculas) se observa como no existen diferencias significativas entre los valores de PHUM para las sucesivas recolecciones, siendo estos 25,92, 31,87 y 42,86 g respectivamente.

Cuando la comparación de medias se realiza para cada recolección (Figura 30, letras minúsculas) únicamente es posible una comparación, para 2012, donde el valor para P2009 (31,29 g) es significativamente superior al de O2009 (18,00 g).

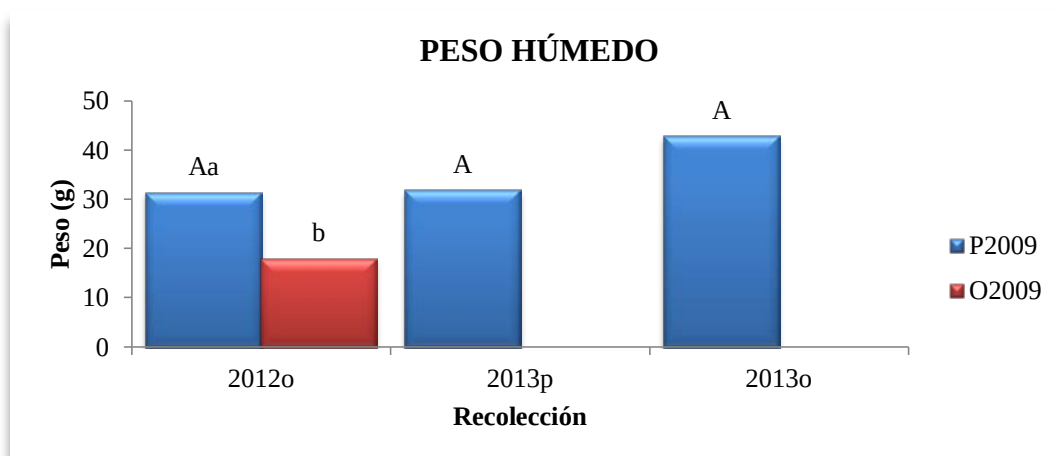


Figura 30: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso húmedo de las raíces (PHUM) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT2. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación, son significativamente diferentes entre recolección (2012o, 2013p y 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas para la misma época de recolección, son significativamente diferentes entre época de plantación (P2009 y O2009). (P=0,05) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

En el análisis para PSEC, para la comparación de medias entre recolecciones (Figura 31, letras mayúsculas), se observa un aumento significativo del peso seco de la raíz de 2013o (11,63 g) respecto de 2013p (6,43 g) pero no así respecto de 2012o (8,75 g), siendo la significancia diferente a la observada para (Figura 30, letras mayúsculas).

En lo que se refiere a la comparación para cada recolección (Figura 31, letras minúsculas), en la única comparación posible se observa que el valor para P2009 es significativamente mayor, siendo el valor para O2009 de 5,07 g.

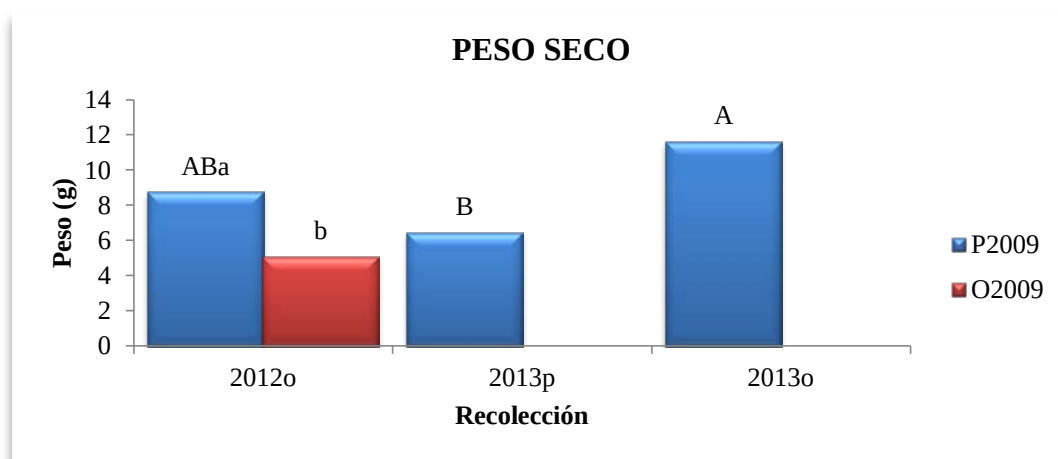


Figura 31: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso seco de las raíces (PSEC) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT2. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación, son significativamente diferentes entre recolección (2012o, 2013p y 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas para la misma época de recolección, son significativamente diferentes entre época de plantación (P2009 y O2009). (P=0,05) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

Al separar en el análisis de varianza las épocas de plantación para cada fecha de recolección, existen diferencias significativas para %PSEC al comparar las diferentes recolecciones (Figura 32, letras mayúsculas). 2013p (20,47%) es significativamente menor al resto de las recolecciones para P2009, donde los valores de las recolecciones otoñales para 2012 y 2013 son de 28,1% y 27,27% respectivamente.

En la comparación para diferentes épocas de plantación no se observan diferencias significativas (Figura 32, letras minúsculas). El único valor para O2009 es de 28,56%.

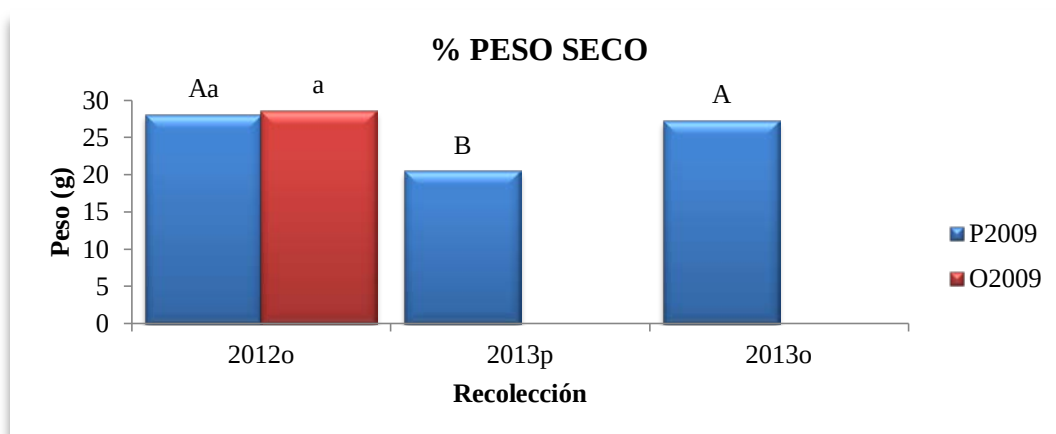


Figura 32: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del porcentaje de materia seca de las raíces (%PSEC) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT2. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación, son significativamente diferentes entre recolección (2012o, 2013p y 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas para la misma época de recolección, son significativamente diferentes entre época de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

Para diferentes caracteres medidos sobre la raíz de genciana en relación al tratamiento fertilizado (F o NF) (Figura 33), no existen diferencias significativas para ninguno de ellos, siendo los valores de PHUM y PSEC para NF de 35,69 y 9,09 g respectivamente. Para F, estos valores son de 30,37 y 7,96 g. Mientras, para %PSEC, los porcentajes de materia seca son del 26,46 y 25,85% para NF y F respectivamente.

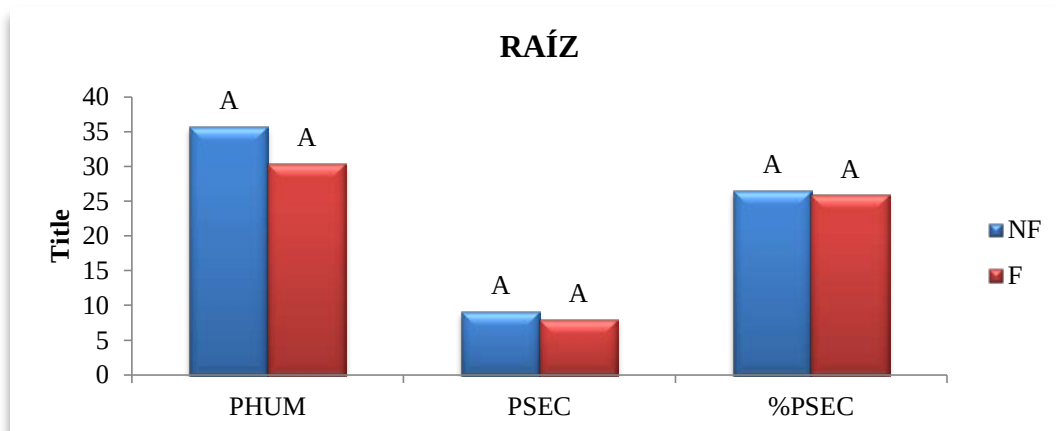


Figura 33: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT2. Columnas con diferentes letras para cada carácter, son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. NF: no fertilizado; F: fertilizado.

Cuando la comparación de medias se hace para los diferentes caracteres medidos en la parte aérea en relación al tratamiento fertilizado (F) o no fertilizado (NF) (Figura 34), los resultados al igual que para la raíz (Figura 33) tampoco muestran diferencias significativas para ninguno de las variables tenidas en cuenta. Los valores de PHUMH y PSECH para el tratamiento NF son de 7,26 y 1,23 g respectivamente, mientras que para F estos valores son de 6,10 y 1,06 g. Para la variable %PSEC los valores son de 17,66 y

16,77 para NF y F respectivamente mientras que el número de yemas en este orden es de 1,93 y 1,78 yemas.

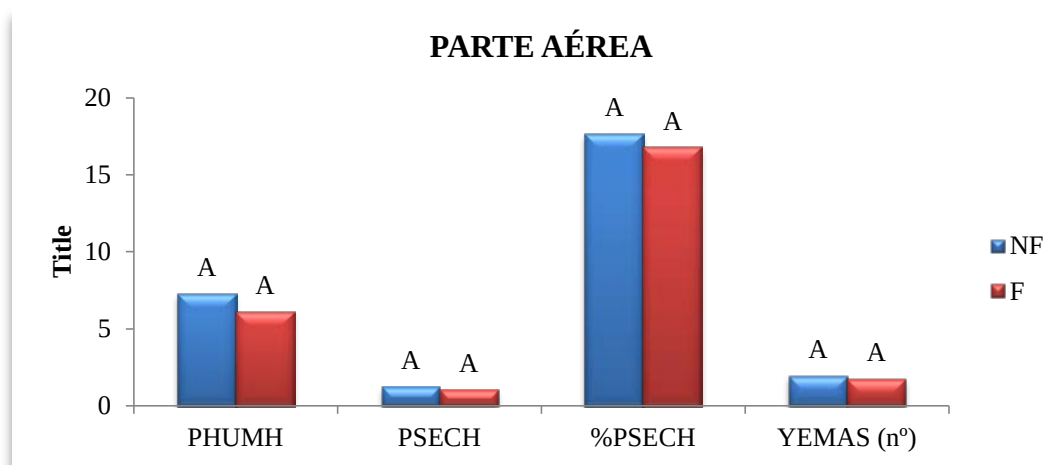


Figura 34: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT2. Columnas con diferentes letras para cada carácter, son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUMH: peso húmedo parte aérea; PSECH: peso seco parte aérea; %PSECH: porcentaje de materia seca parte aérea; YEMAS: n° de yemas desarrolladas. NF: no fertilizado; F: fertilizado.

Cuando la comparación para las variables tenidas en cuentas sobre la raíz se realiza en relación a la fecha de trasplante (P2009 o O2009) (Figura 35), se observan diferencias significativas para PHUM y PSEC, siendo en ambos casos los valores significativamente superiores para P2009. En este caso para P2009 los valores son de 35,56 y 9,13 g, mientras que para O2009 los valores son de 18,00 y 5,07 g respectivamente.

Para %PSEC también existen diferencias significativas, siendo en este caso el valor para O2009 (28,56%) significativamente mayor que para P2009 (25,67%). Para los datos obtenidos a partir de las raíces hay que tener que para esta parcela solo se pudo realizar una recolección para O2009 y esta fue en otoño.

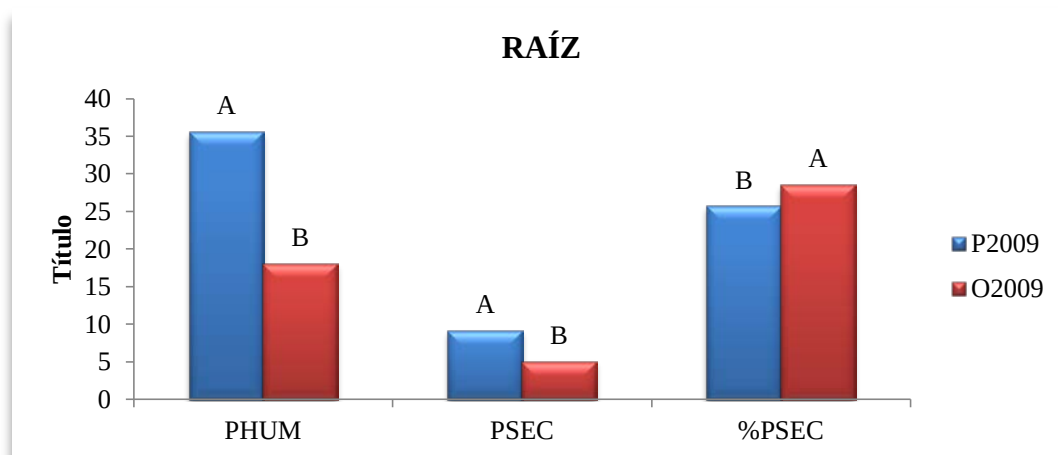


Figura 35: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT2. Columnas con diferentes letras para cada carácter, son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo la Prueba del rango múltiple de Duncan. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. P/p: primavera; O/o: otoño.

4.4. PARCELA CT3 (PTO DE LA MAGDALENA)

El análisis de varianza para las diferentes variables medidas para la raíz de genciana en la parcela CT3 situada en el Puerto de la Magdalena (Tabla 2), muestra diferencias significativas para cada uno de los caracteres estudiados cuando el factor a tener en cuenta son las distintas recolecciones llevadas a cabo.

En la comparación de medias combinando las épocas de transplante para PHUM, PSEC y %PSEC (Figura 36) se puede observar como para PHUM, la recolección 2013o (167,44 g) es significativamente mayor al resto de ellas, siendo los valores para 2012p 2012o, 2013p de 62,04, 87,05 y 75,28 g respectivamente. Para PSEC, el valor para 2013o (40,50 g) es también significativamente mayor al resto, pero en este caso el valor para 2012o (21,91 g) es también significativamente mayor que 2012p (12,02 g) pero no así sobre 2013p (13,57 g).

De las dos anteriores variables se deriva %PSEC para la cual los porcentajes de materia seca obtenidos para las recolecciones otoñales, 26,14 y 25,30% para 2012 y 2013, son significativamente mayores que los valores obtenidos para las recolecciones primaverales para las que los porcentajes de materia seca fueron de tan solo el 19,75 y 18,64% para los años 2012 y 2013 respectivamente.

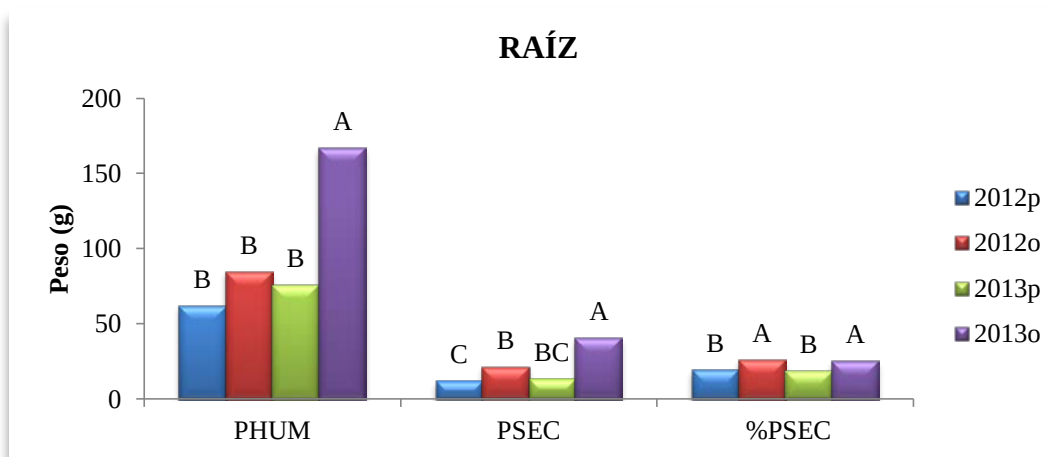


Figura 36: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012p, 2012o, 2013p y 2013o) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT3. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. p: primavera; o: otoño.

En la comparación de medias para los caracteres obtenidos de la parte aérea, PHUMH, PSECH, %PSECH y YEMAS (Figura 37) se puede observar como la significancia para PHUMH es idéntica a la vista anteriormente para PHUM (Figura 36). De este modo el valor de PHUMH para 2013o (29,87 g) es significativamente superior al resto de modo que los valores para 2012p 2012o, 2013p, son de 4,68, 8,29 y 12,32 g respectivamente. Para PSECH la significancia observada es la misma siendo el valor para 2013o de 4,16 g resto de modo que los valores para 2012p 2012o, 2013p, son de 0,74, 1,34 y 1,63 g de parte aérea seca.

Por tanto para %PSECH los valores obtenidos para 2012 son significativamente mayores que para 2013 de modo que para 2012 los porcentajes son del 16,75 y 18,01% para la recolección de primavera y otoño respectivamente mientras que para 2013 estos valores son únicamente del 13,61 y 14,85%.

Por último para YEMAS, no existe significancia alguna para el número de yemas obtenido para cada una de las recolecciones encontrándose los valores entre 2,44 y 2,59 yemas por planta.

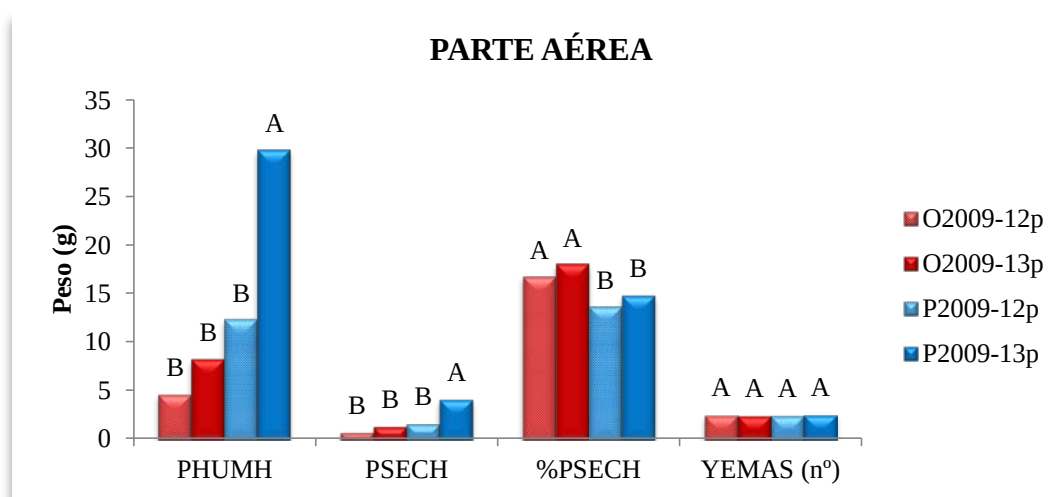


Figura 37: Comparación de medias para el análisis de varianza combinado épocas de plantación (P2009 y O2009) y recolecciones (12p y 13p) de primavera para diferentes caracteres de la parte aérea de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT3. Columnas con diferentes letras mayúsculas para cada carácter son significativamente diferentes para cada recolección. Columnas con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes para cada época de plantación. (P=0,05) de acuerdo con DMS. PHUMH: peso húmedo parte aérea; PSECH: peso seco parte aérea; %PSECH: porcentaje de materia seca parte aérea; YEMAS: nº de yemas desarrolladas. p: primavera; o: otoño.

En el análisis de varianza separando la fecha de plantación para cada fecha de recolección (Figura 38), se observan diferencias significativas, para PHUM, en ambos factores

Cuando se comparan las diferentes recolecciones (Figura 38, letras mayúsculas), tanto para P2009 como O2009 los valores para la recolección 2013O resultan ser significativamente mayores al resto para cada una de las plantaciones, siendo los valores 167,44 y 41,85 g respectivamente, mientras que para 2012p, 2012o y 2013p los valores son 62,04, 85,07 y 75,88 g para P2009 y 12,10, 17,99 y 19,05 g para O2009.

Cuando la comparación de medias se realiza para cada recolección (Figura 38, letras minúsculas) para todas las recolecciones los valores para P2009 se muestran significativamente superiores.

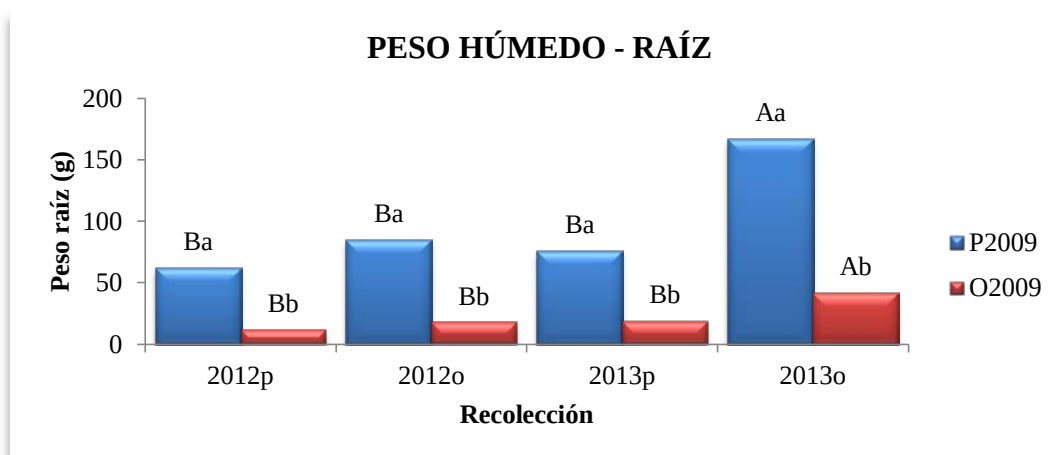


Figura 38: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso húmedo de las raíces (PHUM) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT3. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación, son significativamente diferentes entre recolecciones (2012p, 2012o, 2013p, 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas en la misma recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

Cuando el análisis de varianza separando la fecha de plantación para cada fecha de recolección se hace en relación a PSEC, en la comparación de medias para las diferentes recolecciones (Figura 39, letras mayúsculas), al igual que para PHUM (Figura 38) los valores para la recolección 2013o en ambas plantaciones son significativamente mayores al resto, siendo los valores 40,60 y 10,66 g respectivamente, mientras que para 2012p, 2012o y 2013p los valores son 12,02, 21,91 y 13,57 g para P2009 y 2,31, 4,97 y 3,69 g para O2009.

Cuando la comparación de medias se realiza para cada recolección (Figura 39, letras minúsculas) para todas las recolecciones los valores para P2009 se muestran significativamente superiores.

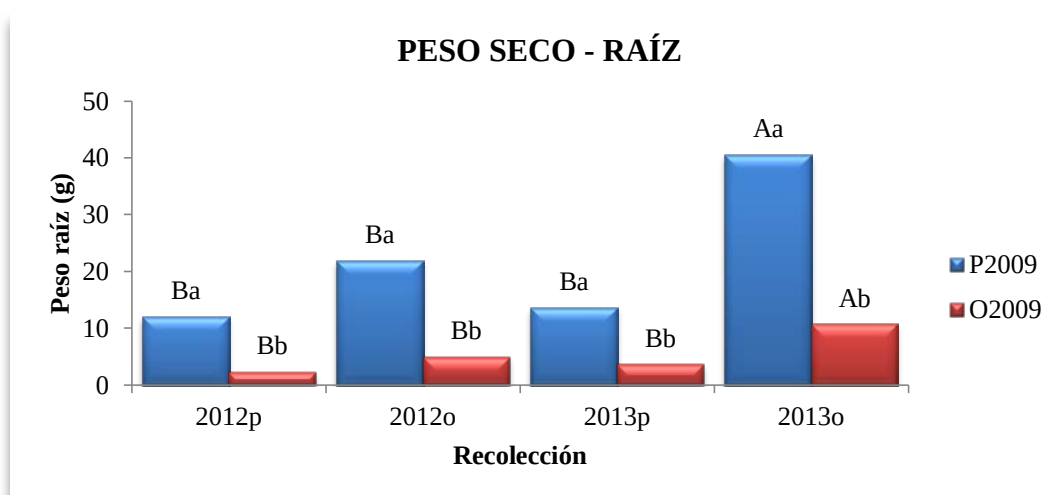


Figura 39: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso seco de las raíces (PSEC) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT1. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación, son significativamente diferentes entre recolecciones (2012p, 2012o, 2013p, 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas en la misma recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

Al separar los factores épocas de plantación para cada fecha de recolección respecto de %PSEC, si observamos la comparación de medias para las diferentes recolecciones (Figura 40, letras mayúsculas) se observa como para ambas épocas de plantación el porcentaje de materia seca es significativamente superior en las raíces recolectadas en otoño respecto de las recolectadas en primavera. De este modo, los porcentajes para P2009 son del 19,75, 26,14, 18,64 y 25,30% para las sucesivas recolecciones, mientras que para O2009 son del 19,52, 27,76, 20,93 y 25,17% respectivamente.

Cuando se realiza la comparación de medias entre épocas de plantación no se observan diferencias significativas para ninguna de las recolecciones excepto para 2013p donde %PSEC para las raíces de genciana trasplantadas en otoño es significativamente mayor que las trasplantadas en primavera.

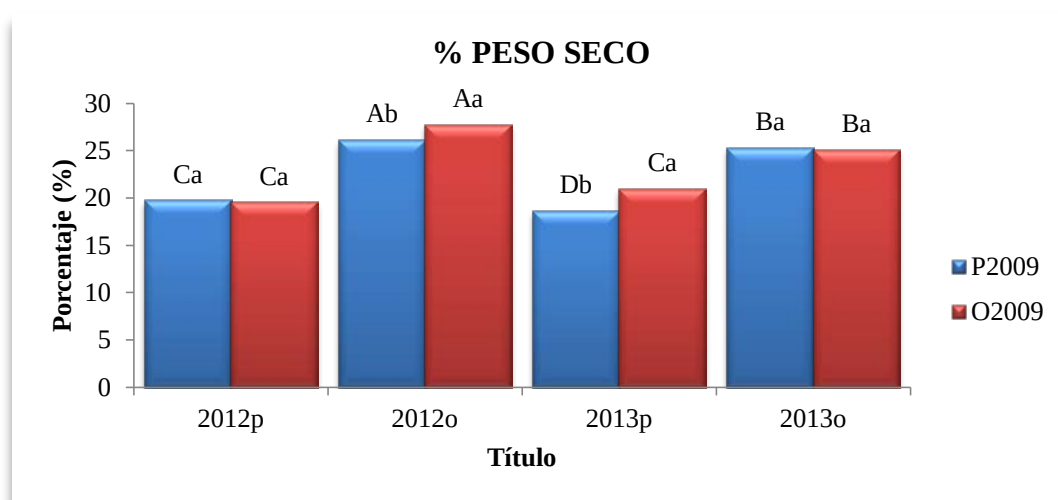


Figura 40: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del porcentaje de materia seca (%PSEC) de las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT3. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación, son significativamente diferentes entre recolecciones (2012p, 2012o, 2013p, 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas en la misma recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). (P=0,05) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o : otoño.

En la comparación de medias para los diferentes caracteres medidos en la parte aérea en relación al tratamiento fertilizado (F) o no fertilizado (NF) (Figura 41), los resultados únicamente muestran diferencias significativas para %PSEC donde el porcentaje de materia seca de las raíces no fertilizadas (22,98%) es significativamente mayor que para las fertilizadas (22,13%). Para PHUM y PSEC los valores son de 72,92 y 11,62 g para NF y de 78,57 y 17,64 g para F.

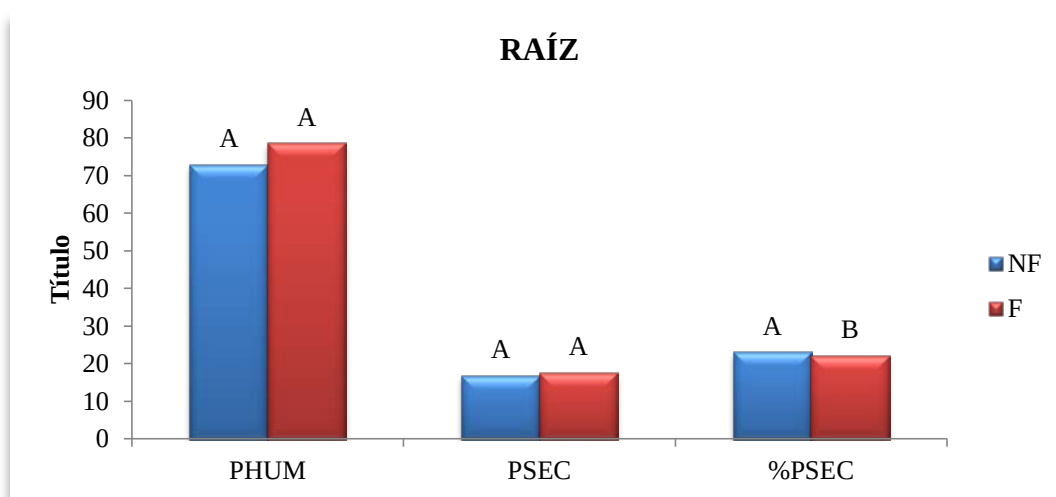


Figura 41: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT3. Columnas con diferentes letras para cada caracter son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. NF: no fertilizado; F: fertilizado.

Cuando la comparación de medias se hace para los diferentes caracteres medidos en la parte aérea en relación al tratamiento fertilizado (F) o no fertilizado (NF) (Figura 42), los resultados no muestran diferencias significativas para ninguno de las variables.

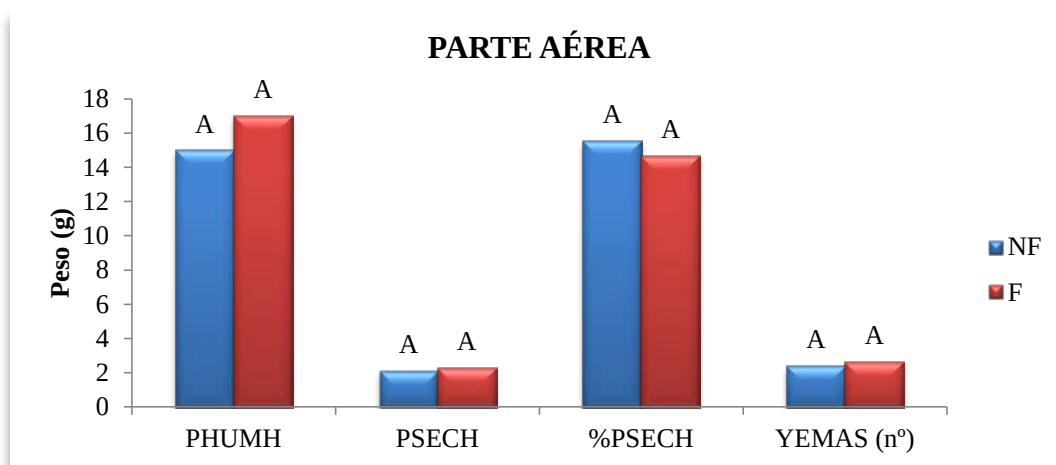


Figura 42: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT3. Columnas con diferentes letras para cada caracter son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUMH: peso húmedo parte aérea; PSECH: peso seco parte aérea; %PSECH: porcentaje de materia seca parte aérea; YEMAS: n° de yemas desarrolladas. NF: no fertilizado; F: fertilizado.

Cuando la comparación de medias se realiza en función de la época de trasplante (Figura 43), se observan diferencias significativas para las variables PHUM y PSEC, de modo que los valores para P2009 son de 96,86 y 21,31 g respectivamente mientras que para O2009 son de 21,92 y 4,97 g.

Para %PSEC no existe diferencias significativas, siendo los valores 22,52 y 22,80% para P2009 y O2009.

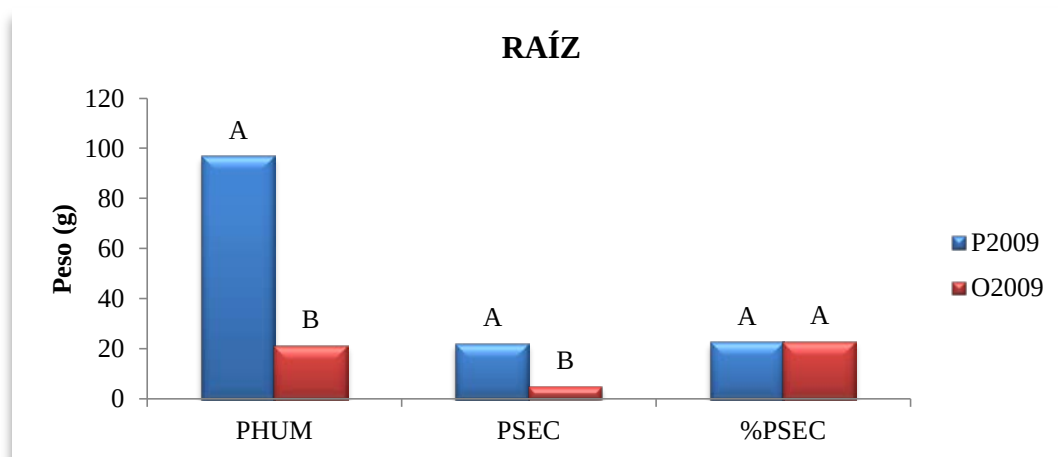


Figura 43: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT3. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. P: primavera; O: otoño.

Para los caracteres tomados para la parte aérea en relación al momento de su trasplante (Figura 44), en los resultados se observan diferencias significativas para todos ellos, siendo en todos los casos los valores significativamente mayores para la plantación P2009.

Para PHUMH y PSECH, los valores para P2009 son de 20,35 y 6,15 g respectivamente mientras que para O2009 estos valores son 2,79 y 0,98 g.

Para %PSECH el porcentaje para P2009 es de 17,26% mientras que para O2009 es tan solo del 14,18%.

Por último, en relación al carácter YEMAS, para P2009 el valor es de 2,91 frente a las 1,49 yemas observadas sobre la parte aérea de las plantas para O2009.

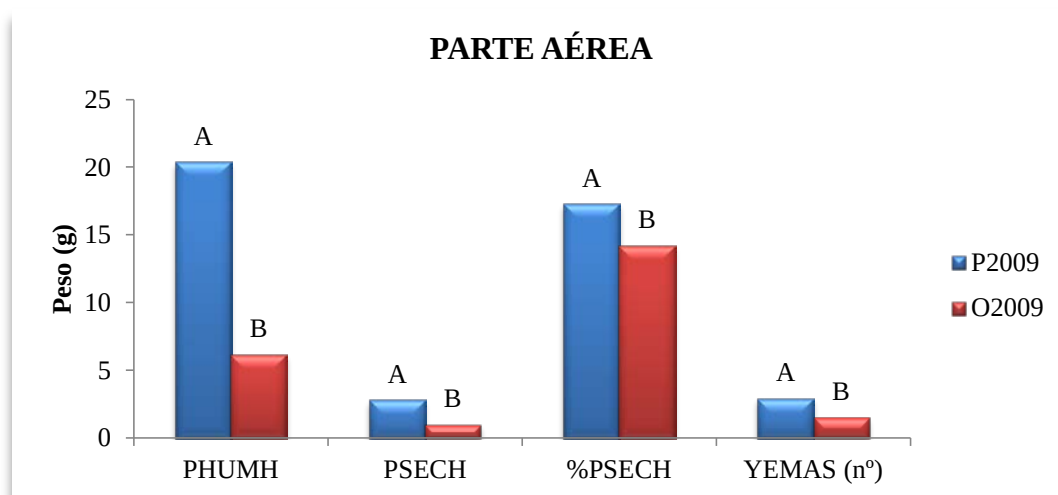


Figura 44: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT1. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUMH: peso húmedo parte aérea; PSECH: peso seco parte aérea; %PSECH: porcentaje de materia seca parte aérea; YEMAS: n° de yemas desarrolladas. P: primavera; O: otoño.

4.5. PARCELA CT4 (ESTIA)

Uno de los aspectos reconocibles a simple vista en esta parcela, ha sido la desecación precoz de la parte aérea a partir de julio, con las temperaturas estivales, así como la clorosis mostrada por las plantas cultivadas en estas condiciones (Figura 1



Figura 45: Planta de *Gentiana lutea* L. con claros síntomas cloróticos.

En el análisis de varianza para las diferentes variables medidas para la raíz de genciana en la parcela CT4 situada en la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria, en la ciudad de León (Tabla 2), se observan diferencias significativas para cada uno de los caracteres estudiados cuando el factor a tener en cuenta son las distintas recolecciones.

Realizada la comparación de medias combinando las épocas de trasplante para PHUM, PSEC y %PSEC (Figura 46) se puede observar como para PHUM, la recolección 2013o (79,80 g) es significativamente mayor al resto, siendo para 2012p, 2012o, 2013p los valores de 20,11, 30,27 y 27,51 g respectivamente. Para PSEC, el valor para 2013o (19,23 g) es igualmente significativamente mayor al resto, y para 2012p, 2012o, 2013p los valores son 4,23, 8,14 y 6,03 g.

Para %PSEC cada uno de los porcentajes de materia seca obtenidos es significativamente diferente al resto de modo que los valores 26,97, 24,12, 22,97 y 21,86% corresponden sucesivamente a 2012o, 2013o 2013p y 2012p siendo por lo tanto superiores los porcentajes de materia seca para las recolecciones otoñales respecto de las primaverales.

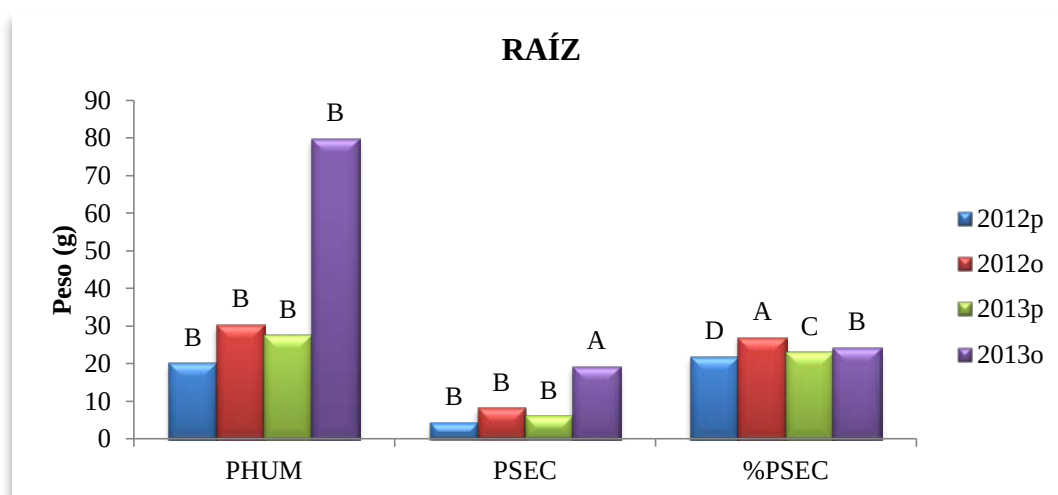


Figura 46: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012p, 2012o, 2013p y 2013o) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT4. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. p: primavera; o: otoño.

Cuando la comparación de medias se realiza para los caracteres PHUMH, PSECH y %PSECH, solamente recogidos en la recolección primaveral (Figura 47) se aprecian diferencias significativas entre el valor para 2012 (5,46 g) y 2013 (8,09), pero estas diferencias no se aprecian para PSECH con valores de 1,11 y 1,49 g respectivamente. De este modo es %PSECH donde se existen diferencias significativas, siendo en este caso el valor para 2013 (20,85%) significativamente superior al de 2012 (18,49%).

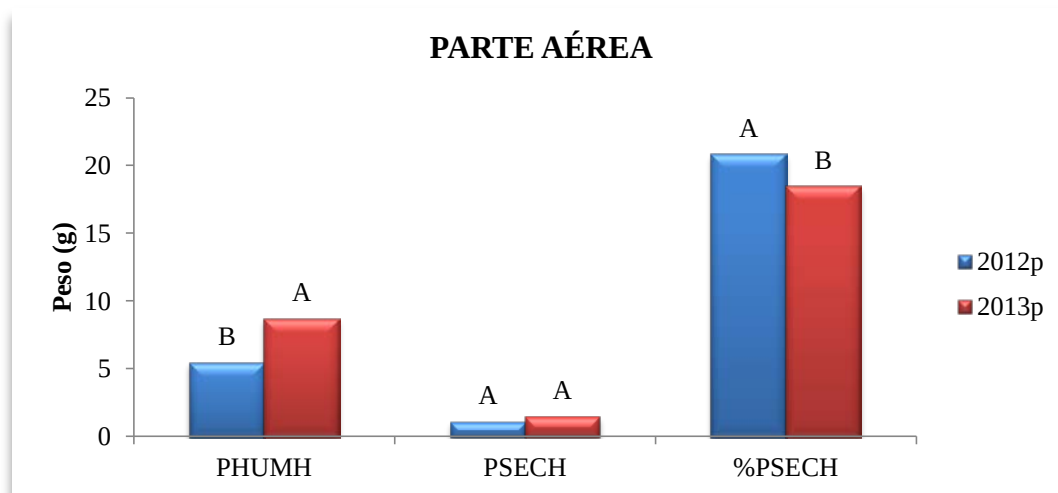


Figura 47: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012p, 2013p) para diferentes caracteres medidos sobre parte aérea de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT4. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUMH: peso húmedo parte aérea; PSECH: peso seco parte aérea; %PSECH: porcentaje de materia seca parte aérea; p: primavera; o: otoño.

Cuando se realiza el análisis de varianza separando fecha de plantación para cada fecha de recolección (Figura 48) para PHUM, se observan diferencias significativas para ambos factores.

Comparando las diferentes recolecciones (Figura 48, letras mayúsculas), tanto para P2009 como O2009 los valores para la recolección 2013o (67,13 y 88,43 g respectivamente) resultan ser significativamente mayores al resto para cada una de las plantaciones, excepto para la plantación primaveral donde el valor para 2012o (41,92 g) no es significativamente diferente a ninguno de los otros correspondientes a la misma plantación.

Cuando la comparación de medias se realiza para cada recolección (Figura 48, letras minúsculas) únicamente se aprecian diferencias significativas para 2012o donde el valor de P2009 (41,92 g) es significativamente superior al de O2009 (20,69 g).

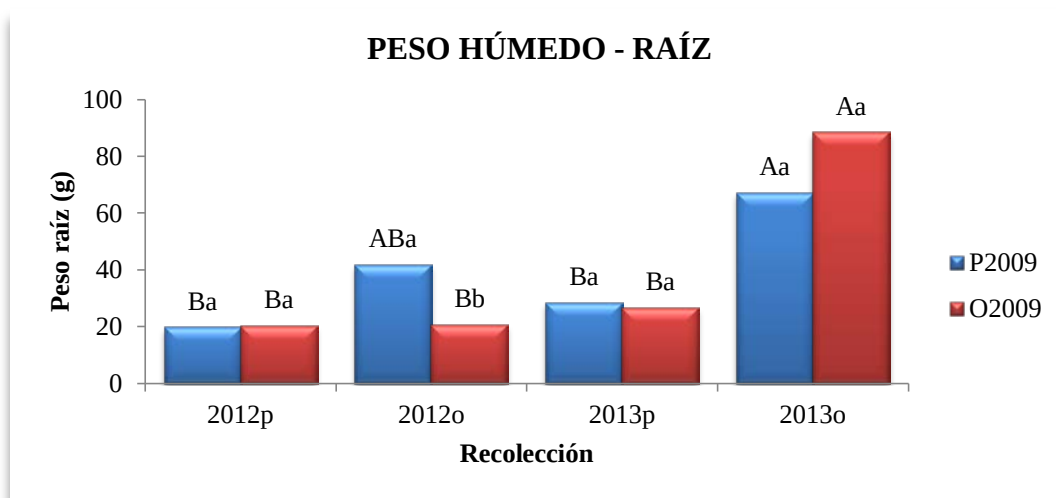


Figura 48: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso húmedo de las raíces (PHUM) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para la parcela CT4. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación, son significativamente diferentes entre recolecciones (2012p, 2012o, 2013p, 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas en la misma recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

Para el análisis de varianza separando fecha de plantación para cada fecha de recolección en relación a PSEC, en la comparación de medias para las diferentes recolecciones (Figura 49, letras mayúsculas), al igual que para HUM (Figura 49), los valores de 2013o para P2009 (11,28 g) y O2009 (5,56 g) en ambas plantaciones son significativamente mayores al resto con excepción del valor para 2012o de la plantación P2009, siendo que de 2012p, 2012o y 2013p para P2009 19,83 y 2,31, 4,97 y 3,69 g para O2009. Cuando la comparación de medias se realiza para cada recolección (Figura 49, letras minúsculas), únicamente se aprecian diferencias significativas para 2012o donde el valor de P2009 es significativamente superior al de O2009.

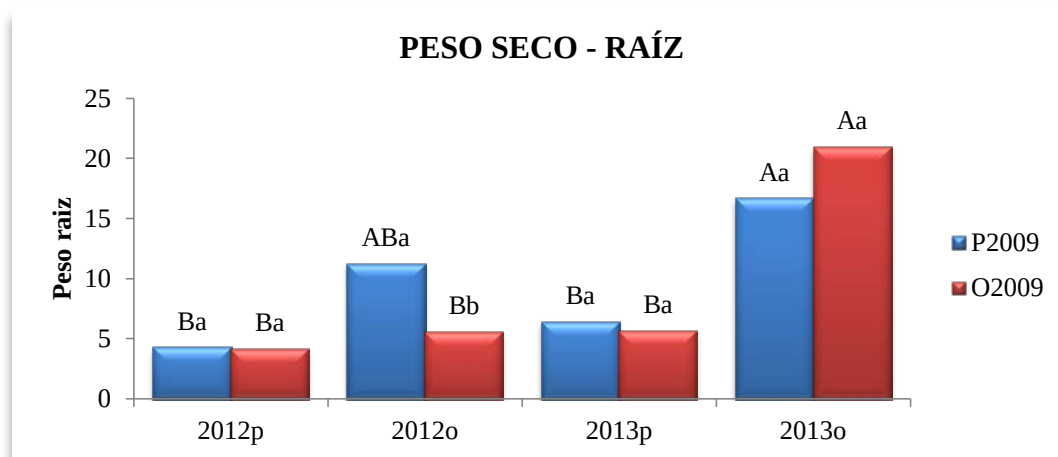


Figura 49: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del peso seco de las raíces (PSEC) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para la parcela CT1. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación, son significativamente diferentes entre recolecciones (2012p, 2012o, 2013p, 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas en la misma recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

Al separar los factores épocas de plantación para cada fecha de recolección en relación a %PSEC, si observamos la comparación de medias para las diferentes recolecciones (Figura 50, letras mayúsculas) se observan diferencias significativas para cada una de las recolecciones siendo significativamente mayores los porcentajes para las recolecciones otoñales respecto de las primaverales. De este modo los porcentajes para P2009 son del 22,60, 27,47, 23,92 y 24,79% para las sucesivas recolecciones, mientras que para O2009 los porcentajes son del 21,41, 26,55, 22,21 y 23,67% respectivamente.

Cuando se realiza la comparación de medias entre épocas de plantación no se observan diferencias significativas para ninguna de las recolecciones.

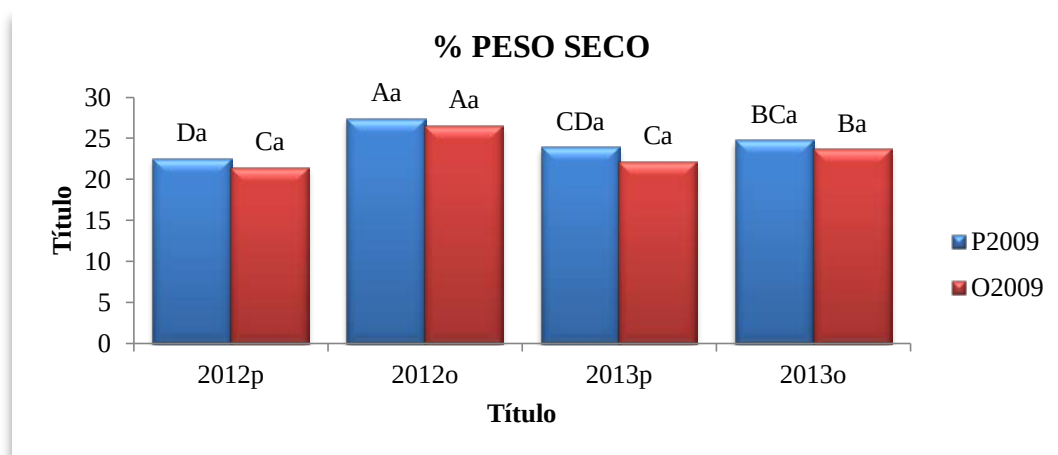


Figura 50: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección respecto del porcentaje de materia seca de las raíces (%PSEC) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT4. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma época de plantación, son significativamente diferentes entre recolecciones (2012p, 2012o, 2013p, 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas en la misma recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o : otoño.

La comparación de medias para los caracteres medidos sobre la raíz de genciana en relación al tratamiento fertilizado (F) o no fertilizado (NF) (Figura 51), no muestra la existencia de diferencias significativas para ninguno de las variables, siendo los valores para el tratamiento NF de 43,46 y 10,32 g para PHUM y PSEC respectivamente, mientras, para F estos valores son de 45,18 y 10,97 g. Los porcentajes de materia seca son del 23,98 y 24,16% para NF y F respectivamente.

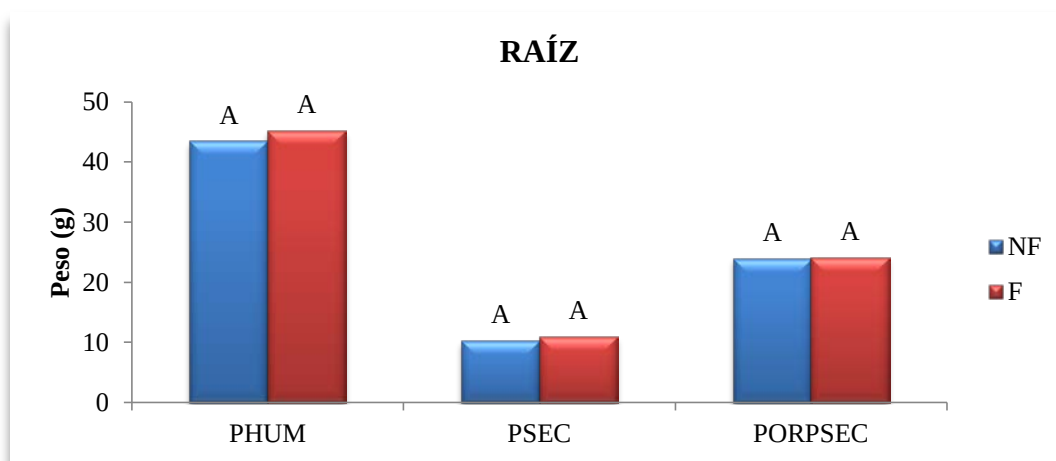


Figura 51: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT4. Columnas con diferentes letras para cada caracter son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. NF: no fertilizado; F: fertilizado.

Para la comparación de medias utilizando diferentes caracteres medidos en la parte aérea en relación al tratamiento fertilizado (F) o no fertilizado (NF) (Figura 52), los resultados no muestran diferencias significativas para ninguno de las variables tenidas en cuenta.

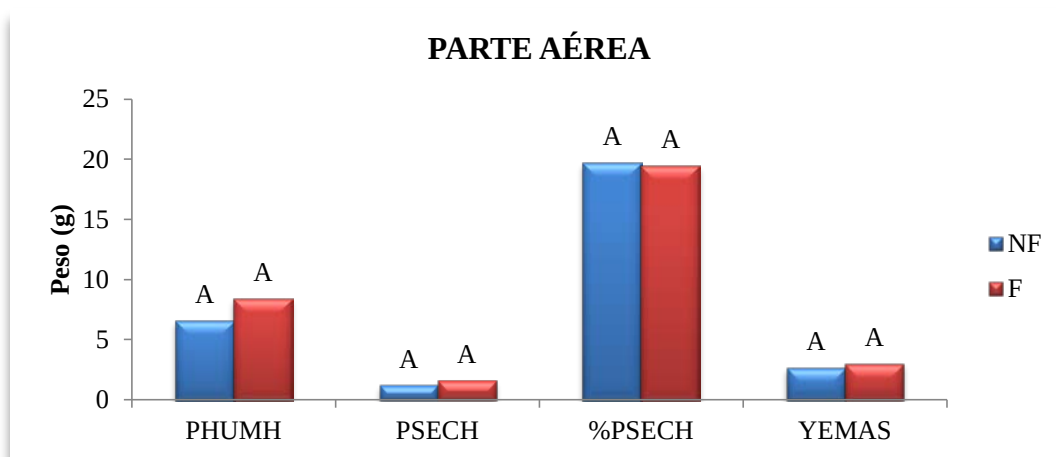


Figura 52: Comparación de medias para el tratamiento fertilización para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT4. Columnas con diferentes letras para cada caracter son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUMH: peso húmedo parte aérea; PSECH: peso seco parte aérea; %PSECH: porcentaje de materia seca parte aérea; YEMAS: n° de yemas desarrolladas. NF: no fertilizado; F: fertilizado.

En la comparación de medias en función de la época de trasplante (Figura 53), se observan diferencias significativas únicamente para %PSEC, donde el valor para P2009 (24,84%) es significativamente superior al de O2009 (23,48%). Mientras, los valores para las variables PHUM y PSEC, son 42,70 y 10,55 g para P2009 y de 45,06 y 10,55 g para O2009.

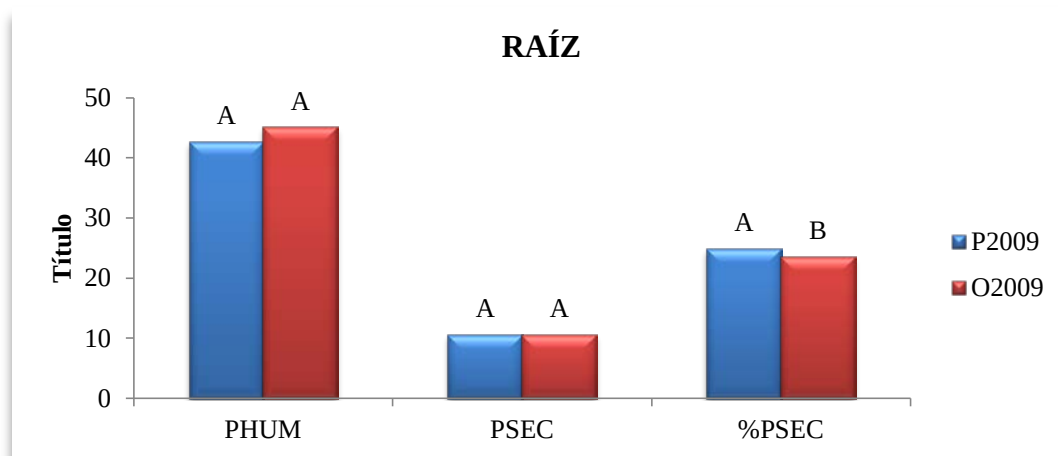


Figura 53: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT4. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. P: primavera; O: otoño.

Para la parte aérea en relación al momento de su trasplante (Figura 54), la comparación de medias únicamente muestra la existencia de diferencias significativas para %PSECH, donde el valor para P2009 (21,60%) es significativamente superior al valor para O2009 (18,22%).

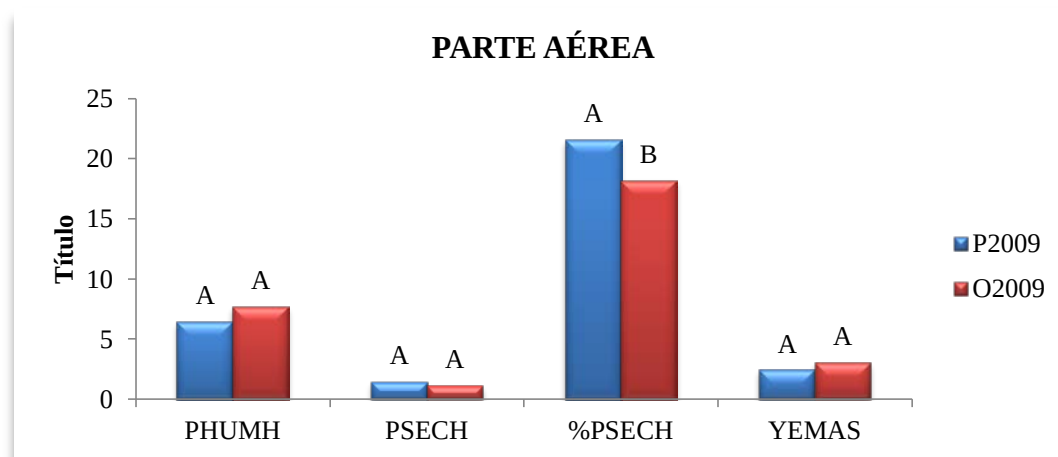


Figura 54: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación (P2009 y O2009) para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de la parcela CT4. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUMH: peso húmedo parte aérea; PSECH: peso seco parte aérea; %PSECH: porcentaje de materia seca parte aérea; YEMAS: n° de yemas desarrolladas. P: primavera; O: otoño.

Cuando se analiza PHUM y PSEC teniendo en cuenta las diferentes recolecciones para la plantación P2009 (Figura 55 y Figura 56), las comparaciones de medias se muestran prácticamente idénticas para ambos caracteres, produciéndose una regresión tanto para PHUM como para PSEC en las recolecciones primaverales para aumentar sus valores medios en el otoño respecto al anterior.

Los valores obtenidos en las recolecciones otoñales para ambos caracteres, se adaptan a líneas de crecimiento exponencial con valores del coeficiente de determinación (R^2), de 0,9975 para PHUM y 0,9981 para PSEC.

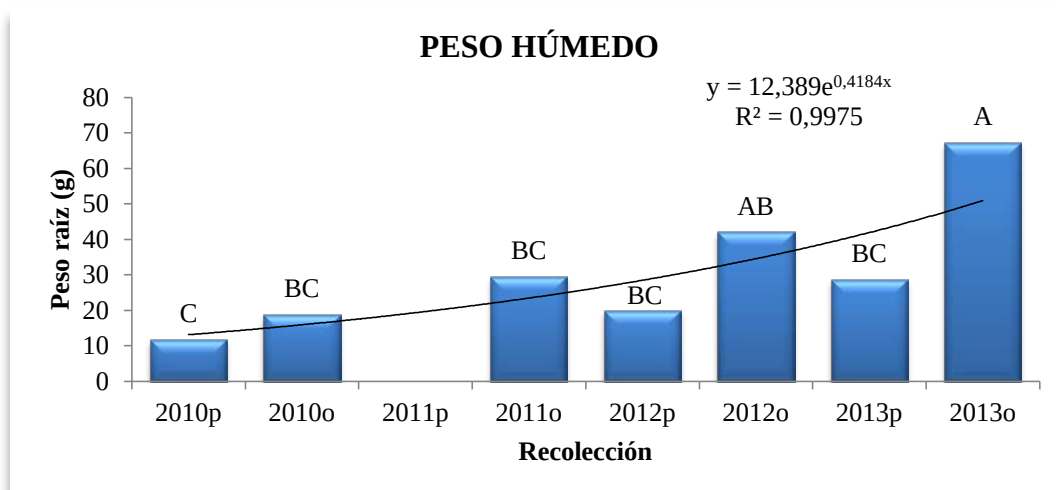


Figura 55: Comparación de medias para el peso húmedo (PHUM) de las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* respecto de las diferentes recolecciones para la plantación P2009 en la parcela CT4. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes para cada recolección (2010p, 2010o, 2011p, 2011o, 2012p, 2012o, 2013p, 2013o). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

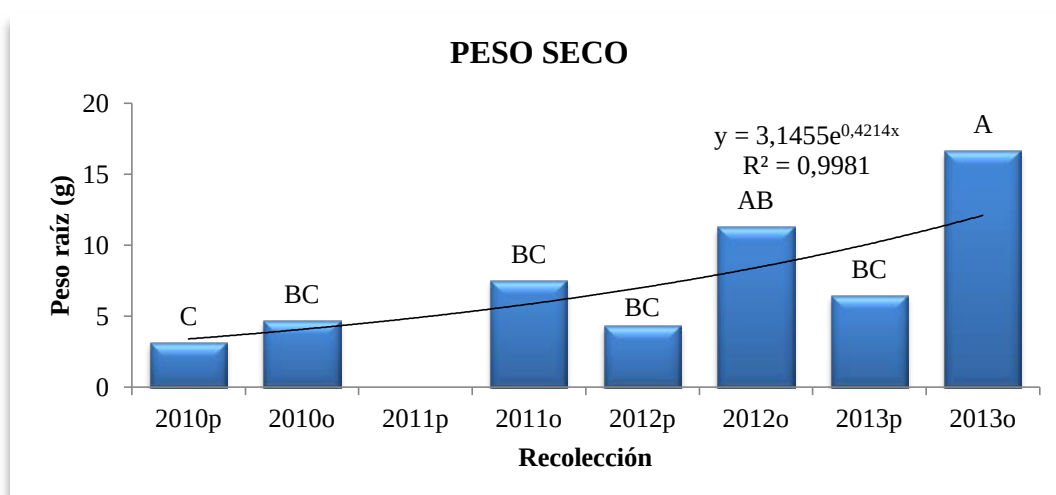


Figura 56: Comparación de medias para el peso seco (PSEC) de las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* respecto de las diferentes recolecciones para la plantación P2009 en la parcela CT4. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes para cada recolección (2010p, 2010o, 2011p, 2011o, 2012p, 2012o, 2013p, 2013o). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

Para el análisis de varianza separando las épocas de plantación para cada fecha de recolección respecto de PHUM y PSEC (Figura 57 y Figura 58), en la comparación de medias para cada recolección se observan las mismas significancias para ambos caracteres, de modo que para 2011o y 2012o los valores de la plantación P2009 es significativamente mayor que para 2008P. Así para PHUM los valores para estas dos recolecciones son de 29,31 y 41,92 g para P2009 mientras que para 2008P son 12,12 y 16,49 g. Del mismo modo para PSEC los valores son de 7,51 y 11,28 g cuando tratamos P2009 mientras que para 2008P son únicamente de 2,82 y 4,27 g respectivamente.

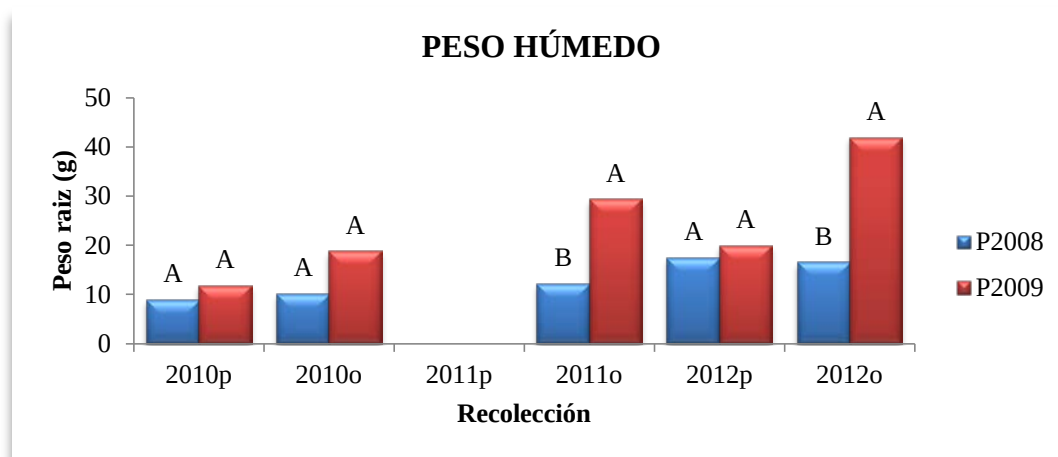


Figura 57: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación (P2008 y P2009) para cada recolección (2010p, 2010o, 2011p, 2011o, 2012p, 2012o, 2013p, 2013o) para el peso húmedo de las raíces (PHUM) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en la parcela CT4. Columnas con diferentes letras para una misma época de recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

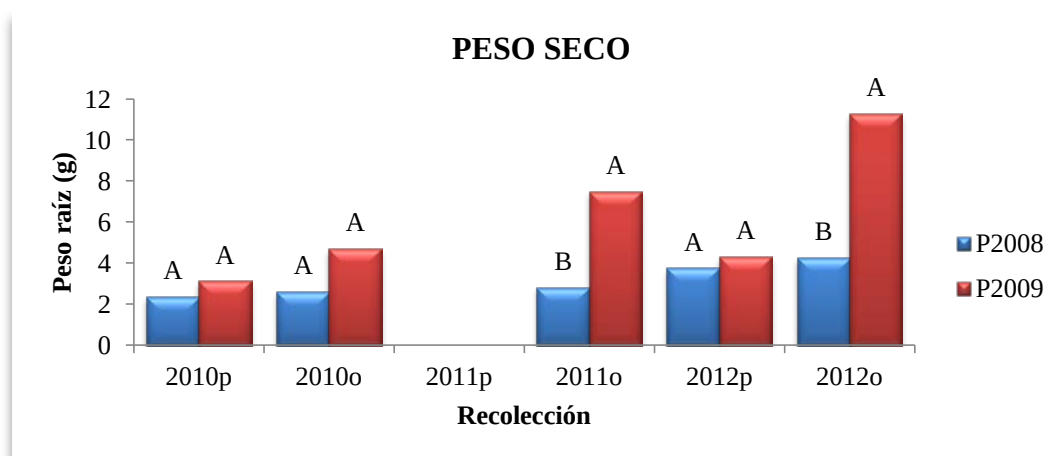


Figura 58: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación (P2008 y P2009) para cada recolección (2010p, 2010o, 2011p, 2011o, 2012p, 2012o, 2013p, 2013o) para el peso seco de las raíces (PHUM) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en la parcela CT4. Columnas con diferentes letras para una misma época de recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

4.6. ANÁLISIS COMBINADO DE LOS CUATRO AMBIENTES ENSAYADOS

El análisis de varianza para las diferentes variables medidas para la raíz de genciana (Figura 59) en cada una de las parcelas ensayadas muestra la existencia de diferencias significativas para cada uno de los caracteres estudiados cuando el factor a tener en cuenta son dichas parcelas.

En la comparación de medias para PHUM, PSEC y %PSEC (Figura 59) se puede observar como para PHUM, los pesos húmedos medios de las raíces de genciana obtenidos en las parcelas CT1 (102,382 g) y CT3 (87,71 g) son significativamente mayores que los obtenidos en las parcelas CT4 (50,16 g) y CT2 (32,05 g).

Para PSEC, una vez más CT1, con 25,21 g de materia seca por cada una de las raíces recolectadas se muestra significativamente mayor al resto, donde a su vez el valor para CT3 (20,51 g), es significativamente superior a CT4 (12,15 g) y CT2 (8,32 g).

De los valores de PHUM y PSEC se deriva el valor de %PSEC en el cual se aprecia como el valor para CT2 (26,27%) es significativamente mayor al resto y a su vez los valores de CT1 (24,59%) y CT4 (24,59%) son significativamente mayores al de CT3 que muestra los menores porcentajes de materia seca con únicamente el 23,78%.

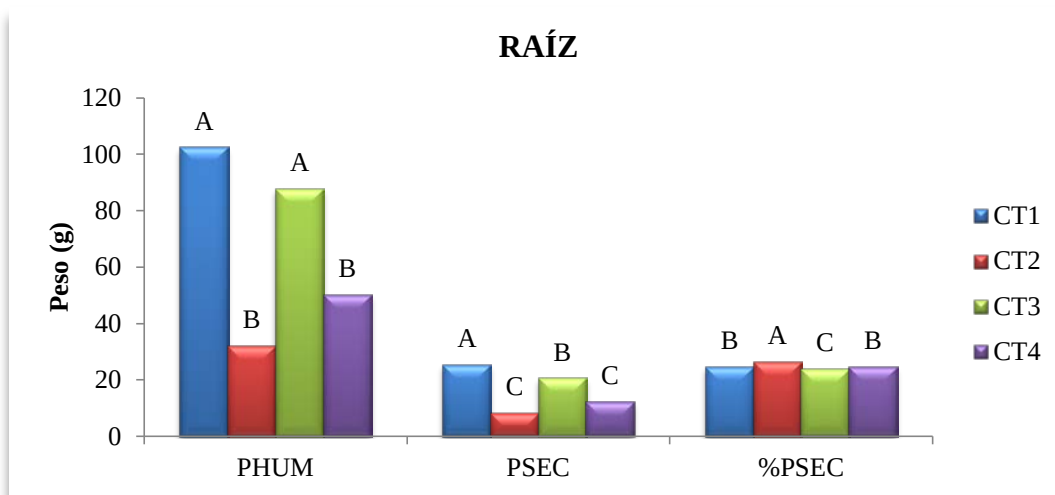


Figura 59: Comparación de medias para el tratamiento parcelas para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para todas las parcelas. Columnas con diferentes letras para cada caracter son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. CT: parcela de cultivo

Teniendo en cuenta los pesos obtenidos en la última de las recolecciones (2013o) en la Tabla 5 se puede comprobar las estimaciones de raíz de genciana producida por hectárea para cada una de las parcelas ensayadas así como para cada uno de los tratamientos de fertilización o ausencia de la misma para dichas parcelas, obteniéndose como valores máximos 15,68 y 11,95 toneladas por hectárea de raíz fresca para las parcelas CT1 y CT3 respectivamente, y ambos valores se han obtenido mediante la realización del trasplante en primavera, aunque en el caso de CT1 este resultado se obtuvo para el tratamiento no fertilizado mientras que para CT3 es bajo fertilización.

Tabla 5: Estimación de producciones de raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* fresca para cada una de las parcelas ensayadas, épocas de plantación y tratamiento fertilizado..

t/ha	Plantación			
	P2009		O2009	
	NF	F	NF	F
Parcela				
CT1	15,68	5,80	6,20	4,70
CT2	2,06	3,29	-	-
CT3	7,15	11,95	1,93	2,92
CT4	3,74	3,71	5,61	4,08

P: primavera; O: otoño. NF: no fertilizado; F: fertilizado

Cuando el análisis se realiza para las variables medidas sobre la parte aérea (Figura 60) para cada una de las parcelas ensayadas muestra, al igual que para la raíz (Figura 59), la existencia de diferencias significativas para cada uno de los caracteres estudiados.

En la comparación de medias para PHUMH (Figura 60), tanto CT1 como CT3 muestran valores significativamente superiores al resto, con 31,39 y 23,63 g cada una, siendo los valores para CT2 y CT4 de 6,87 y 8,69 g respectivamente. En lo que respecta a la comparación de medias para PSECH, los valores obtenidos para la parcela CT1 son significativamente superiores al resto con 5,52 g de peso seco, siendo a su vez CT3 con 3,34 g significativamente superior a los mostrados por CT2 y CT4 con 1,17 y 1,49 g respectivamente.

De los valores para PHUMH y PSECH se obtiene el valor de %PSECH (Figura 60) para el cual CT1 (19,12%) se muestra significativamente superior a CT2 (17,35%) y a CT3 (15,76%), que son significativamente diferentes entre ellos. Por último CT4 (18,49%) es significativamente superior a CT3.

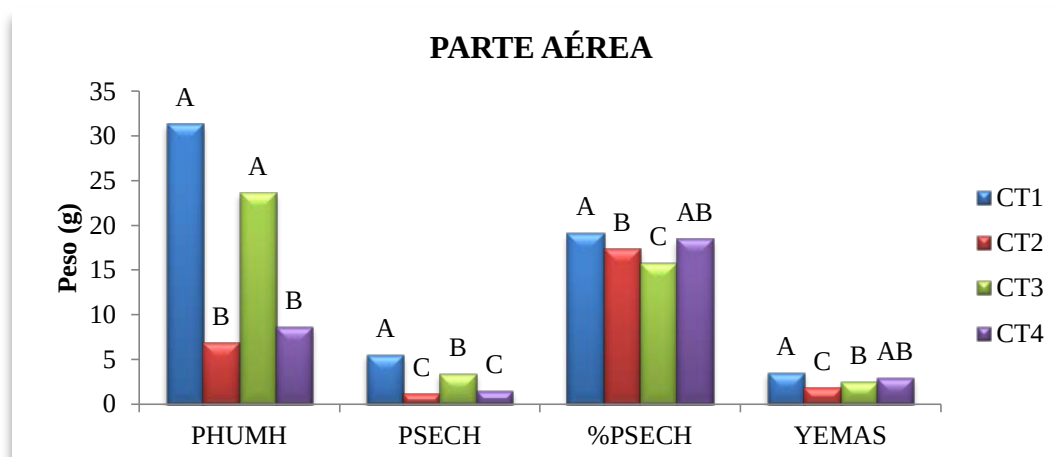


Figura 60: Comparación de medias para el tratamiento parcelas para diferentes caracteres medidos parte aérea de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para todas las parcelas. Columnas con diferentes letras para cada caracter son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. PHUMH: peso húmedo parte aérea; PSECH: peso seco parte aérea; %PSECH: porcentaje de materia seca parte aérea; YEMAS: n° de yemas desarrolladas. CT: parcela de cultivo

En el análisis de varianza PHUM, PSEC y %PSEC para las diferentes épocas de recolección Figura 61 se observa como para PHUM y PSEC los valores medios obtenidos para 2013o, 106,13 y 26,84 g son significativamente superiores al resto, siendo 56,44 y 11,21 g para 2013p y para 2012o estos valores son 49,09 y 13,12 respectivamente.

En la comparación de medias para %PSECH (Figura 61), el porcentaje de materia seca para 2012o se muestra significativamente mayor que para el resto de las recolecciones, siendo 21,09 y 25,48% los porcentajes medios para 2013p y 2013o respectivamente.

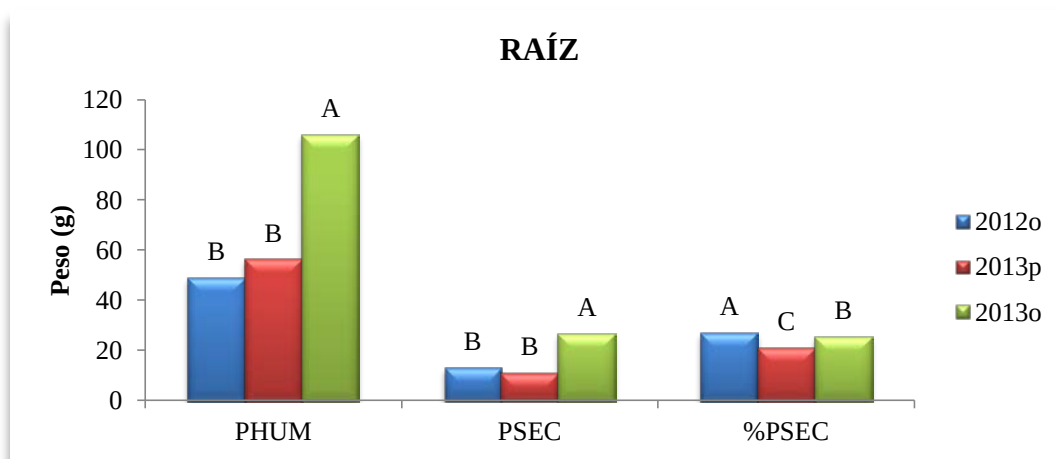


Figura 61: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012o, 2013p, 2013o) para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para todas las parcelas. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. PHUM: peso húmedo; PSEC: peso seco; %PSEC: porcentaje de materia seca. p: primavera; o: otoño.

En el análisis se realiza para los caracteres medidos sobre la parte aérea, en función de la recolección (Figura 62), únicamente se observan diferencias significativas para PHUMH, siendo el valor para 2013p de 14,99g, significativamente mayor que para 2012p (7,68 g).

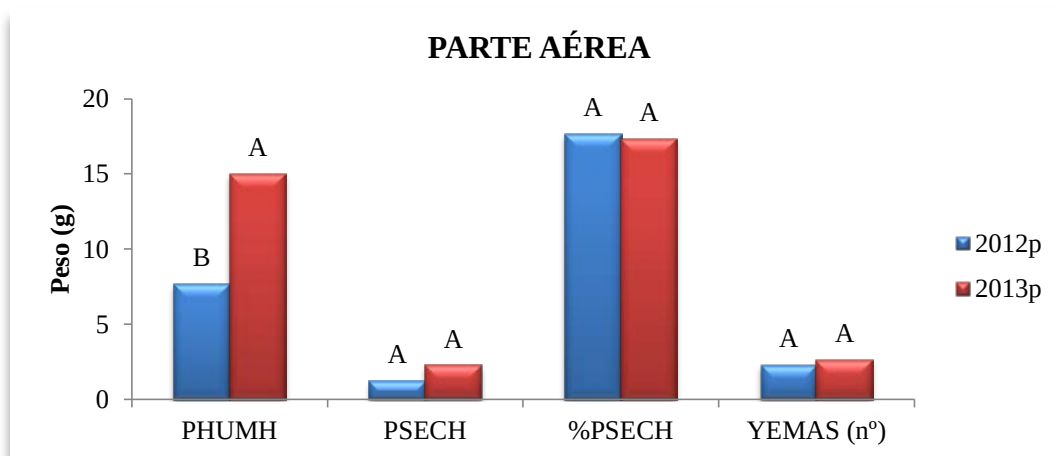


Figura 62: Comparación de medias para el tratamiento época de recolección (2012p, 2013p) para diferentes caracteres medidos sobre parte aérea *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para todas las parcelas. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. PSECH: peso seco parte aérea; %PSECH: porcentaje de materia seca parte aérea; YEMAS: nº de yemas desarrolladas. p: primavera; o: otoño.

En el análisis de varianza separando fecha de plantación para cada fecha de recolección (Figura 63) en relación a PHUM, se observan diferencias significativas para ambos factores. Cuando se comparan las diferentes recolecciones (Figura 63, letras mayúsculas), tanto para P2009 como O2009, los valores para 2013o son significativamente mayores al resto, siendo estos 119,82 y 85,08 g. Para 2012o y 2013p los valores son 65,45 y 70,28 g para P2009 y 29,61 y 32,33 g para O2009.

La comparación de medias para cada recolección (Figura 63, letras minúsculas) muestra para P2009 valores significativamente superiores a los de O2009.

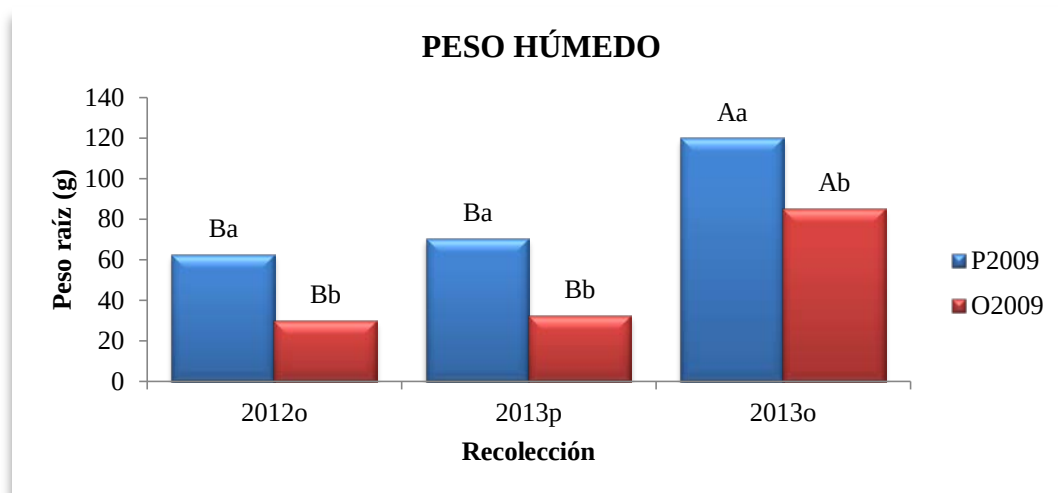


Figura 63: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección para el peso húmedo de las raíces (PHUM) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para todas las parcelas. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma plantación son significativamente diferentes entre épocas de recolección (2012o, 2013p, 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas para la misma época de recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

Para el análisis de varianza separando fecha de plantación y fecha de recolección se hace para PSEC, en la comparación de medias para las diferentes recolecciones (Figura 64, letras mayúsculas), de la misma manera que para PHUM (Figura 63) los valores para la recolección 2013o en ambas plantaciones son significativamente mayores al resto, siendo los valores para P2009 y O2009 de 30,44 y 21,30 g respectivamente, mientras que para 2012o y 2013p los valores son 16,59 y 13,85 g para P2009 y 8,07 y 6,65 g para O2009.

En la comparación de medias para cada recolección (Figura 64, letras minúsculas) para todas las recolecciones los valores para P2009 se muestran significativamente superiores.

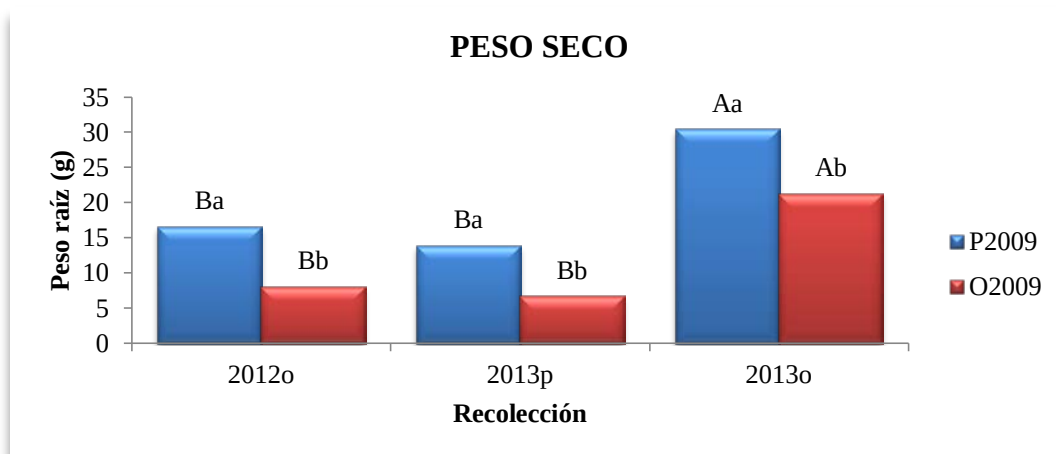


Figura 64: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección en relación al peso seco de las raíces (PSEC) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para todas las parcelas. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma plantación son significativamente diferentes entre épocas de recolección (2012o, 2013p, 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas para la misma época de recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

En el análisis para %PSEC, si observamos la comparación de medias para las diferentes recolecciones (Figura 65, letras mayúsculas), para ambas plantaciones, para la recolección 2012o los valores son significativamente superiores a los de 2013o y a su vez estos a los de 2013p, siendo por tanto los valores para 2009, de 26,91, 20,67 y 25,88% en orden cronológico de las recolecciones y 27,14, 21,81 y 24,87% para O2009.

Cuando se realiza la comparación de medias entre épocas de plantación no se observan diferencias significativas para 2013p y 2013o.

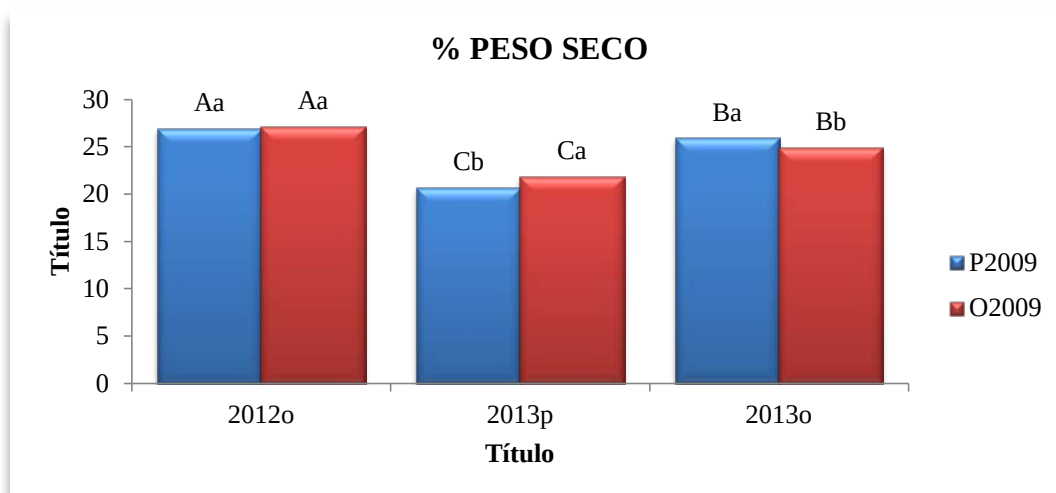


Figura 65: Comparación de medias para el análisis de varianza separando épocas de plantación para cada recolección en relación al porcentaje de materia seca de las raíces (%PSEC) de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para todas las parcelas. Columnas con diferentes letras mayúsculas para la misma plantación son significativamente diferentes entre épocas de recolección (2012o, 2013p, 2013o). Columnas con diferentes letras minúsculas para la misma época de recolección son significativamente diferentes entre épocas de plantación (P2009 y O2009). ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. P/p: primavera; O/o: otoño.

En la comparación de medias para los diferentes caracteres medidos en la parte aérea en relación al tratamiento fertilizado (F) o no fertilizado (NF) (Figura 66), los resultados muestran diferencias significativas para PHUM y PSEC, donde para NF los valores son de 77,91 y 18,97 g, por 62,93 y 15,34 para F. Por otro lado no existen diferencias significativas para %PSEC con valores de 24,79 y 24,59 para NF y F respectivamente.

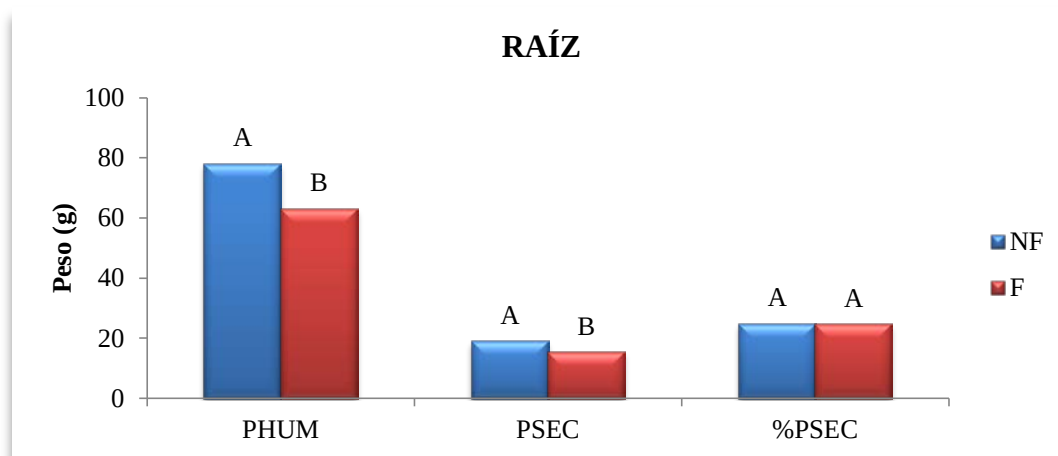


Figura 66: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación para diferentes caracteres medidos sobre raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para todas las parcelas. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUM: Peso húmedo; PSEC: Peso seco; %PSEC: Porcentaje de materia seca. NF: no fertilizado; F: fertilizado.

Cuando la comparación de medias se hace para los diferentes caracteres estudiados en la parte aérea, en relación al tratamiento fertilizado (F) o no fertilizado (NF) (Figura 67), los resultados no muestran diferencias significativas para ninguno de dichos caracteres.

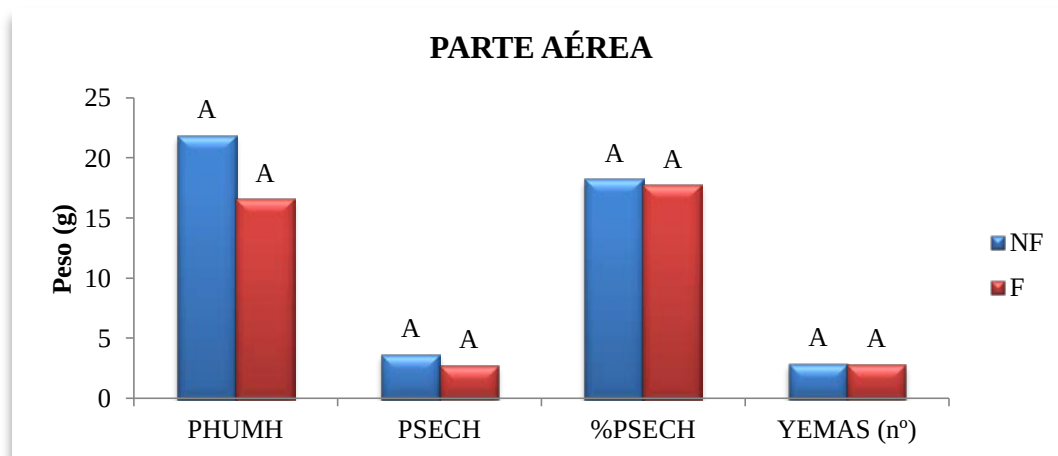


Figura 67: Comparación de medias para el tratamiento época de plantación para diferentes caracteres medidos sobre la parte aérea de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* para todas las parcelas. Columnas con diferentes letras para cada carácter son significativamente diferentes ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. PHUMH: Peso húmedo parte aérea; PSECH: Peso seco parte aérea; %PSECH: Porcentaje de materia seca parte aérea; YEMAS: n° de yemas desarrolladas. NF: no fertilizado; F: fertilizado.

Representando gráficamente los valores de PHUMH frente a los de PHUM, las coordenadas obtenidas (Figura 68) se ajustan a una recta de regresión lineal con un valor para el coeficiente de determinación R^2 de 0,859.

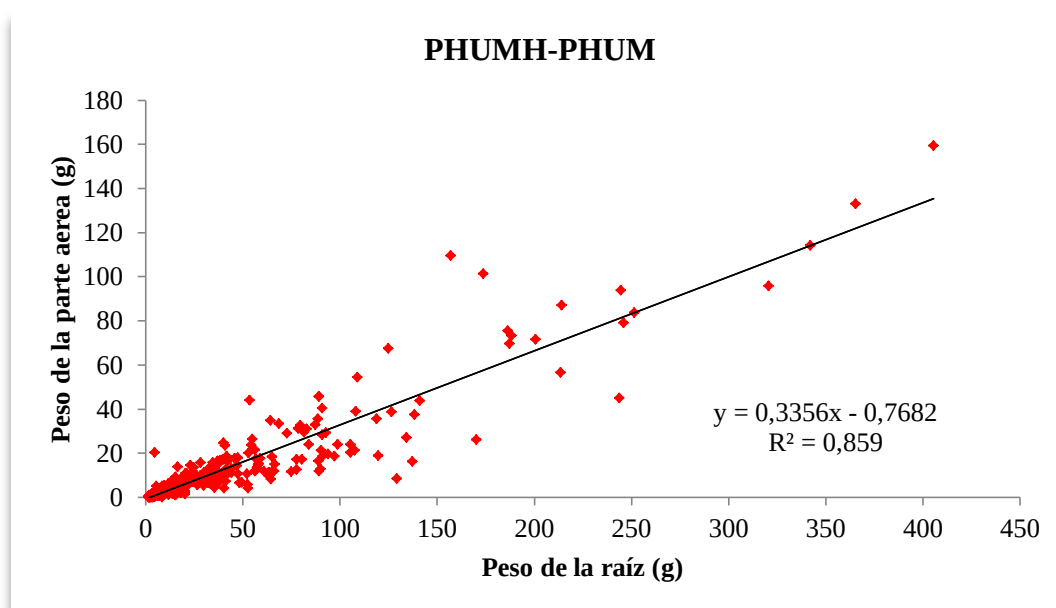


Figura 68: Representación gráfica de la recta de regresión lineal obtenida para la relación peso húmedo de la raíz (PHUM) y peso húmedo de la parte aérea (PHUMH) de las muestras provenientes de todas las parcelas.

5. DISCUSIÓN

Los ensayos del cultivo de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en localizaciones donde las condiciones edafoclimáticas permiten que esta crezca de manera silvestre, han demostrado favorecer su desarrollo respecto de aquellas donde no se desarrollan naturalmente. En estas localizaciones idóneas, siempre y cuando el lugar elegido para su cultivo no presente una pendiente elevada, se han obtenido rendimientos de raíz fresca moderados.

Para el desarrollo de este trabajo, tanto la parcela CT1 como la CT3 comparten ciertas características: una orientación que permite altas insolaciones, pendientes del terreno reducidas y características edáficas adecuadas, que principalmente son pH ácido, altos niveles de materia orgánica y textura franca o franco arenosa. En estas condiciones, los rendimientos potenciales por hectárea están por encima de las 10 toneladas, siendo para CT1 de 15,68 toneladas por hectárea y para CT3 de 11,95 toneladas, pero en el primero de los casos este valor se alcanza mediante el tratamiento no fertilizado y en el segundo mediante la fertilización, sin existir diferencias en la fertilidad de los suelos que justifiquen estos resultados. En cualquiera de los casos estos valores son superiores a las otras dos parcelas ensayadas.

Los valores de producción más altos de este trabajo son, por otra parte, inferiores a los expuestos por diferentes estudios acerca del cultivo de la *G. lutea* L. Hay que tener en cuenta, que los presentes ensayos se fundamentan en el cultivo sostenible, con un mínimo laboreo tras la plantación, limitando la erosión (hídrica y eólica) de un suelo de montaña de alto valor ecológico. Este tipo de cultivo, además supone una mínima inversión económica durante el desarrollo de la planta, contrastando con los demás estudios realizados hasta el momento.

Barralis et al. (1978), en uno de los primeros ensayos sobre el cultivo de la genciana, utilizando métodos mecánicos y químicos para la eliminación de malas hierbas, obtuvo como mejores producciones, en torno a las 45 toneladas de raíces frescas por hectárea, valor alcanzado para densidades de plantación de 100000 plantas por hectárea. Para densidades similares al actual estudio (50000 plantas por hectárea), la producción potencial descendió hasta las 33,50 toneladas por hectárea. En cualquiera de los casos, en este estudio se hace especial hincapié en la necesidad de controlar las malas hierbas para un desarrollo rápido de la raíz de genciana, evitando la competencia con estas.

En el caso de Bezzi et al. (1987), quienes realizaron un extenso estudio sobre el cultivo, incluyeron un pequeño estudio económico del coste en horas, del mantenimiento del cultivo de la genciana, y estimaron éste, alrededor de 850 a 1000 horas anuales por hectárea necesarias para la eliminación de las malas hierbas, hablando únicamente de medios manuales. Mientras, si lo que se hace es complementar los trabajos manuales mediante medios mecánicos para la realización de la limpieza entre filas (80 horas), el

número de horas de trabajos manuales se redujeron hasta las 200-250 horas por hectárea. Comparando estos datos con el actual estudio, a excepción del segundo año de cultivo, en el que se realizaron dos escardas manuales alrededor de las plantas, con el uso aproximado de 450 horas/hectárea, el resto de años la limpieza ha sido de forma mecánica (desbrozadora de gasolina manual), de modo que el coste en tiempo se reduce a unas 150 horas por hectárea, y con ello los costes económicos.

Con estos métodos utilizados por Bezzi et al. (1987), teniendo en cuenta que la densidad de plantación utilizada fue de 93000-100000 plantas por hectárea, en contraposición con las 55500 del actual ensayo, obtuvieron rendimientos que aparecen, junto con los de otras parcelas de cultivo, en Bezzi et al. (1996). Dichos rendimientos, para plantas de seis años, en el campo de ensayo situado en el Monte Bondone (1550 m s.n.m), donde crece la genciana de forma natural, se obtuvieron entre 28,4 y 38,7 toneladas por hectárea para diferentes ecotipos.

Igualmente Bezzi et al. (1996), para una parcela situada a 818 m y con un clima prealpino, utilizando semillas provenientes de la polinización cruzada de varios ecotipos, estos se mostraron mucho más vigorosos y con unos rendimientos de entre 55 y 70 toneladas por hectárea para raíces de siete años. Este resultado también se verificó para otra parcela situada en la falda del monte Bondone, localizada en S. Anna di Sopramonte, donde también el clima es prealpino, y se utilizaron plantas obtenidas de semillas de otros campos de cultivo, donde pudieron cruzarse diferentes ecotipos. Para raíces de siete años los rendimientos fueron de entre 16,4 y 32,8 toneladas por hectárea, mientras que para el ecotipo denominado Brenta (no cruzado), el rendimiento fue de únicamente 3,4 toneladas por hectárea.

Fuera del ambiente alpino, pero con unas condiciones de suelo y precipitaciones similares al mismo, y con unas temperaturas estivales suaves, los rendimientos obtenidos por Bezzi et al. (1996) para raíces de seis años fueron de entre 13,3 y 20,5 toneladas por hectárea. En todos los casos hay que tener en cuenta la mayor inversión de mano de obra necesaria para realizar el manejo del cultivo de la genciana de esta manera y, que en zonas más bajas esta inversión es mayor debido a que hay que realizar un mayor número de escardas, en concordancia con lo expuesto por Aiello y Bezzi (1998).

De igual manera, denotar que en otras parcelas situadas en los Apeninos, Bezzi et al. (1996) no obtuvieron datos debido al elevado número de fallos, ocasionados por la pérdida y consiguientes daños causados por el hielo, la desecación, etc. Es por estos problemas de erosión mencionados por Aiello y Bezzi (1998), que en el presente estudio se han limitado las labores mecánicas sobre el suelo, tratando de solucionar dichos problemas en el cultivo de la genciana en zonas con pendiente.

Radanović et al. (2012), en un ensayo de cultivo de *G. lutea* L. durante cuatro años (sin conocer el tiempo que se mantuvieron en envase antes de ser trasplantadas), en el que el trasplante se realizó sobre pequeñas parcelas de 10 m² recubiertas con una malla negra permeable, limitando así el crecimiento de las malas hierbas, y utilizando métodos

orgánicos e inorgánicos de fertilización, obtuvieron rendimientos de entre 33,6 y 37,8 toneladas de raíces frescas por hectárea. En este caso también hay que tener en cuenta que el coste de inversión para este tipo de mallas ronda entre los 0,80 euros y 1 euro por cada metro cuadrado de material.

Continuando con el actual trabajo, para las otras dos parcelas ensayadas, en el caso de CT2, aun estando bien localizada geográficamente para su cultivo (Tabla 2), esta parcela se caracteriza por su elevada pendiente, y el resultado fueron rendimientos incluso inferiores a los obtenidos para la parcela CT4, localizada en la ciudad de León. Este resultado negativo, concuerda con lo sucedido en algunas de las parcelas localizadas en los Apeninos y con elevada pendiente (Bezzi et al., 1996), donde la conjunción de la realización de labores para el trasplante, lluvias primaverales, acumulación de hielo y efectos del deshielo provocaron el descalce de las plantas de genciana al igual que lo sucedido en la parcela CT2 (Figura 18). Además, en este tipo de condiciones otras especies herbáceas tardan en colonizar el terreno al menos dos años con el consiguiente problema que genera una pendiente no estabilizada, manteniéndose la erosión del mismo en el tiempo.

Debido a estas condiciones, la parcela CT2 presenta los más bajos resultados de supervivencia, viéndose estos muy penalizados para la plantación otoñal, debido a que un terreno recién labrado, situado en pendiente y al inicio de las lluvias típicas de esta estación, es susceptible de verse gravemente erosionado. Las plantas que son descalzadas, quedan expuestas, viéndose penalizado su desarrollo, al contrario que en el resto de parcelas localizadas en la montaña.

Este hecho contrasta sin embargo con la existencia, no en pocos casos, de poblaciones silvestres de genciana caracterizadas por un elevado número de individuos como se puede observar en la Figura 6. Estas poblaciones silvestres son inaccesibles con cualquier tipo de vehículo, no resultando fácil hacerlo tampoco a pie, ya que presentan pendientes superiores a las de la parcela CT2 (aproximadamente el 20%), donde las labores ya se veían claramente dificultadas. Es posible que estas poblaciones se muestren tan saludables debido a la dificultad para ser explotadas. En contra de lo sucedido en cultivo, son necesarias otras herbáceas para que, una vez estabilizado el terreno, algunas de las semillas de genciana que hayan llegado hasta allí, por la acción del viento principalmente, se pueden establecer creando, con el paso del tiempo, poblaciones extensas, pero sin saber en ningún caso el tiempo que fue necesario para que dichas poblaciones alcanzasen dicho estatus.

En lo que respecta a la parcela de la ESTIA, CT4, ha sido necesario un mayor control de las malas hierbas, al igual que lo expuesto por Aiello y Bezzi (1998), realizándose tres limpiezas anuales. En esta ubicación, el periodo vegetativo de las plantas de genciana es reducido, ya que aun comenzando su actividad vegetativa en torno a un mes antes que en el resto de las parcelas, y aunque se realizan riegos semanales en la época estival debido a la ausencia de precipitaciones, las altas temperaturas provocan la parada vegetativa y la consiguiente desecación de la parte aérea de forma prematura (principios de julio).

Aunque muestran algún tipo de rebrote en septiembre, cuando descienden las temperaturas, esto no hace sino volver a movilizar las reservas de las raíces.

Las características del suelo para CT4 (Tabla 3), son notablemente diferentes a las mostradas por los suelos donde crece la genciana de forma natural, siendo un suelo pesado, con una cantidad de materia orgánica menor y un pH ligeramente básico, lo que ha hecho que incluso aportando fertilizantes las plantas mostrasen claros síntomas de clorosis poco después de brotar (Figura 45). Estos síntomas cloróticos son a su vez citados por Bezzi et al. (1996) apareciendo al cultivar en un terreno neutro el ecotipo denominado Auvergne, proveniente de terrenos ácidos formados a partir de una matriz silíceas, como es el caso.

Para todas las plantaciones, excepto para CT4 (Tabla 4), localizada en un ambiente diferente, y en la que los valores de supervivencia, tanto para el trasplante primaveral como para el otoñal son similares, para el resto de ellas presenta un significativo éxito el trasplante de primavera respecto del otoñal, tanto en el desarrollo de las raíces como en porcentaje de supervivencia de las plantas, siendo un caso particular y mucho más marcado para la parcela CT2, donde debido a sus características, el trasplante de otoño está contraindicado, obteniendo porcentajes de supervivencia inferiores al diez por ciento.

La realización de un trasplante a un terreno recién labrado, a pocas semanas del inicio de las lluvias otoñales y con el agravante, en el caso de la parcela CT2, de la elevada pendiente del terreno, provocó que estas lluvias erosionasen el terreno dejando expuestas las raíces de la genciana, perdiendo incluso la parte del cepellón con la que fueron trasplantadas (Figura 18). Esta situación no ocurrió en primavera realizando el trasplante cuando la nieve se retira y las lluvias primaverales cesan, permitiendo que el suelo adquiera las condiciones necesarias de para poder realizar la labor de forma adecuada.

En este sentido, Kusar y Baricevic, (2006) para trasplantes tanto primaverales como otoñales de dos ecotipos silvestres, realizados en tres localizaciones diferentes, obtuvieron porcentajes de supervivencia variables para plantas de dos años, de modo, que para una de las parcelas, no siendo apoyada con riego, el primer año conllevó la muerte de todas las plantas trasplantadas en primavera, debido a las condiciones severas de ese verano. Mientras, para el trasplante en el otoño anterior (Kusar and Baricevic, 2006) mostraron una supervivencia de entre el 57,3 y 67,5% para ambos ecotipos. Los resultados para las otras dos parcelas de cultivo fueron semejantes para ambos trasplantes, siendo, en la más montañosa en torno al 85%, mientras que para la restante, provista de riego de apoyo y situada fuera del hábitat de la genciana, de únicamente el 40%. En este estudio la subespecie de *Gentiana lutea* utilizada fue la *Symphyandra*.

En el actual ensayo el trasplante primaveral permitió el desarrollo de las plantas hasta el otoño, y con ello el desarrollo de su sistema radicular, permitiendo que se anclasen al terreno, que con el paso del tiempo se compactó poco a poco. De igual manera en este periodo, nuevas especies herbáceas comenzaron a establecerse fijando el suelo con sus raíces y evitando en parte la erosión. La mortandad observada tanto en las parcelas CT1 y

CT3 se originó mayoritariamente debido al descalce por la compactación del terreno labrado cuando grandes cantidades de nieve se acumularon sobre él, y por tanto, las plantas quedaron expuestas a los efectos del hielo primero, y posteriormente a la desecación, cuando aún sus raíces no habían profundizado suficientemente.

En el caso de CT4, no es posible decantarse por ninguno de los dos trasplantes en vista de los resultados, tanto de producción como de supervivencia, al contrario del ambiente montano. Para CT4, tras el trasplante primaveral las plantas sufrieron las rigurosidades del verano teniendo un periodo vegetativo muy corto, ya que las plantas a principios de julio pierden su parte aérea. Además, el suelo, con alto contenido en arcilla, al secarse se agrieta (Figura 5), exponiendo las raíces de las plantas al aire, sobre todo las recién trasplantadas, provocando su desecación y muerte.

Para aquellas trasplantadas en otoño, el periodo hasta el siguiente veranal fue prolongado, permitiendo que las plantas tuvieran más posibilidades de establecerse adecuadamente, por lo que los resultados para ambas épocas de plantación fueron similares y semejantes a los presentados por Kusar y Baricevic (2006). En el resto de trabajos tratados hasta ahora (Barralis et al., 1978, Franz and Fritz, 1978, Bezzi et al., 1987, Radanovic et al., 2012) los trasplantes se han realizado en todos ellos en primavera, pero, aunque no fue ensayado Bezzi et al. (1996), plantearon como, para este tipo de condiciones con veranos severos, en su caso, para el cultivo en la zona de los Apeninos, el trasplante en otoño podría ser una vía para obtener mejores resultados de supervivencia.

Bezzi et al. (1997), en trasplantes primaverales para plantas de siete años obtenidas tanto a partir de semillas de poblaciones silvestres como en campos de cultivo donde los diferentes ecotipos se habían polinizado libremente, obtuvieron resultados de supervivencia del 25% para un ecotipo silvestre mientras que para aquellos ecotipos de polinización libre los valores fueron de entre el 43 y el 63%.

Bezzi et al. (1996), para otros estudios referidos a dos localizaciones con condiciones climatológicas diversas, pero con una precipitación anual superior a los 1000 mm, obtuvieron valores de supervivencia de entre el 38,7 y el 88,1% para plantas de genciana de 4 años en la parcela de Vallarsa (740 m de altitud). Mientras, en la otra parcela denominada S. Anna di Sopramonte (839 m), para plantas de siete años, los porcentajes de supervivencia fueron de entre el 21,1 y el 70,7% para diferentes ecotipos, siendo el ecotipo proveniente de una población silvestre el que obtuvo los peores porcentajes.

Respecto a las causas de la mortalidad, para las plantas descalzadas, este es el origen de los daños, pero la causa de la muerte suelen ser enfermedades criptogámicas que aprovechan los tejidos dañados, ya sea por el hielo, encharcamientos prolongados o causados por algún animal o insecto, para el inicio de la infestación, que si no se trata acabará con la muerte de la planta. En general el hongo observado generalmente fue *Botrytis cinerea*. Este hecho fue constatado en distintas plantas muertas durante el ensayo, y ya descrito por Zinkernagel y Franz (1977) en su estudio sobre la podredumbre del cuello en *G. lutea* L, y remarcado por Bezzi et al.(1987).

Aiello y Bezzi (1998) enumeran otros hongos como posibles afecciones, en algunos de ellos determinados sobre diferentes especies de gencianas, pero que en ninguno de los casos generan problemas de importancia. Estas enfermedades son *Puccinia gentianae* (Str.) Link., *Phoma* sp., *Cladosporium gentianae* y *Septoria gentianicola*.

En lo que refiere al momento de la recolección, en todas las parcelas ensayadas, donde se han realizado tanto recolecciones primaverales como otoñales, se constata la pérdida de peso seco medio para las recolecciones primaverales respecto de las otoñales previas, algo que no se observa cuando nos referimos para el peso húmedo de las raíces en las parcelas CT1 y CT2, donde hay ligeros incrementos en el peso medio en la primavera de 2013 respecto del otoño de 2012. Pero, como se menciona anteriormente esto no sucede así para los pesos secos, ya que los porcentajes de peso seco en primavera son significativamente inferiores a los otoñales. Este hecho, demuestra como la planta invierte parte de las reservas acumuladas al final del periodo vegetativo, en la generación de la nueva parte aérea, y que aproximadamente, entre septiembre y abril, cuando las plantas de genciana han perdido su parte aérea, no existe una ganancia en peso que fundamente esta fecha como momento de recolección, y si al final del periodo vegetativo.

La dificultad de conocer el desarrollo del sistema radicular, ya que está enterrado, hacen que los resultados obtenidos (Figura 68) permitan establecer con un coeficiente de determinación del 0,859 que el desarrollo de las raíces está íntimamente ligado al de la masa foliar en la brotación, por lo que un mayor desarrollo de la parte aérea corresponde a mayores sistemas radiculares. En el mismo sentido del desarrollo de las raíces existe una relación exponencial entre la edad de las plantas y el desarrollo de sus raíces, de modo que con el transcurso de los años el ritmo de crecimiento de estas se ve acelerado.

Por último, y en relación a la fertilización de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* utilizando fertilizantes minerales, esta ha mostrado ser negativa respecto a la tasa de supervivencia, de modo que para ambos trasplantes y para las diferentes parcelas en general, exceptuando CT1, la mortandad observada en plantas fertilizadas excede a las que no lo han sido. Radanovic (2012)) en su estudio utilizando tanto fertilizantes orgánicos como inorgánicos, así como malla antihierba, no observó una mortandad significativamente diferente cuando las plantas fueron fertilizadas frente al control, no fertilizado, tras un año desde el trasplante. Aiello y Bezzi (1998) sostienen que la *Gentiana lutea* L. no es una planta exigente en fertilidad pero aplica una fertilización en todos sus ensayos, por lo que no se puede comparar respecto de un control no fertilizado.

En este punto, varias son las hipótesis para explicar la mayor mortandad de las plantas fertilizadas, como son el favorecer el desarrollo de plantas que puedan competir con la genciana, el remover el terreno alrededor de la planta de forma periódica, o incluso la fitotoxicidad causada por los fertilizantes. En este sentido, la fertilización tampoco se ha

mostrado positiva en cuanto a los rendimientos obtenidos ya que los resultados son variables.

6. CONCLUSIONES

- El cultivo de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en la montaña leonesa se adapta bien en localizaciones por encima de los 1400 m, suelos de textura franca o franco-arenosa con pH ácidos, altos contenidos de materia orgánica y que su exposición respecto del sol sea media o alta, siempre y cuando la humedad del suelo sea suficiente.
- El establecimiento del cultivo de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* se ve perjudicado en suelos con elevada pendiente, donde la erosión, así como la compactación debida a la acumulación de nieve durante el invierno causan el descalce de las plantas de genciana trasplantadas, convirtiéndose este en el principal foco de mortandad, favoreciendo los daños causados por el hielo, la desecación de las raíces y con ello la afección de enfermedades criptogámicas a través de los tejidos dañados.
- El trasplante primaveral de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* proporciona una mayor supervivencia así como un mayor desarrollo de las plantas de genciana, y por tanto de sus raíces.
- La aplicación de fertilizantes minerales disminuye la tasa de supervivencia de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en todos los ambientes ensayados.
- El desarrollo de la raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* está íntimamente ligado con el desarrollo anual de su parte aérea.
- La recolección de genciana en otoño aumenta los rendimientos en peso y materia seca respecto a la recolección primaveral, donde las raíces pierden parte del peso, invirtiéndolo en la creación de nuevos órganos aéreos.
- El manejo sostenible del cultivo de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, permite obtener unos rendimientos más de 15 toneladas por hectárea, reduciendo las labores de control de malas hierbas, realizadas únicamente durante los dos primeros años, y con ello la erosión del suelo de montaña, de alto valor ecológico, así como los costes de producción respecto a sistemas de cultivo más productivos, pero poco sostenibles.
- El cultivo de la genciana fuera de su hábitat es posible pero sus rendimientos se ven penalizados, disminuyendo el crecimiento así como el porcentaje de supervivencia, además de necesitar una inversión mayor en su manejo.

7. CONCLUSIONS

The suitable habitat for *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivation in the mountains of León province is characterized by being located above 1400 m, in soils with a loamy or sandy loam texture, very acid pH, high content in organic matter and sunny half sunny exposition, as long as the soil moisture is adequate.

Soils with high slope, which are affected by erosion as well as soil compaction due to the accumulation of snow during winter, are the main origin of the transplanted gentian high mortality. This facilitates the damage caused by frost, roots desiccation and thereby fungal diseases through the damaged tissues.

The spring transplant of *G. lutea* L. var. *aurantiaca* provides greater survival and further development of the plants, and therefore their roots.

The use of mineral fertilizers decreases the survival rate of luteal *G. lutea* L. var. *aurantiaca* in all environments tested.

The development of the root of *G. lutea* L. var. *aurantiaca* is closely linked with the development of its aerial part.

The autumnal collection of gentian roots increases yields in weight and dry matter percentage regarding the spring collection, where the roots invest part of their weight in the development of new aerial organs.

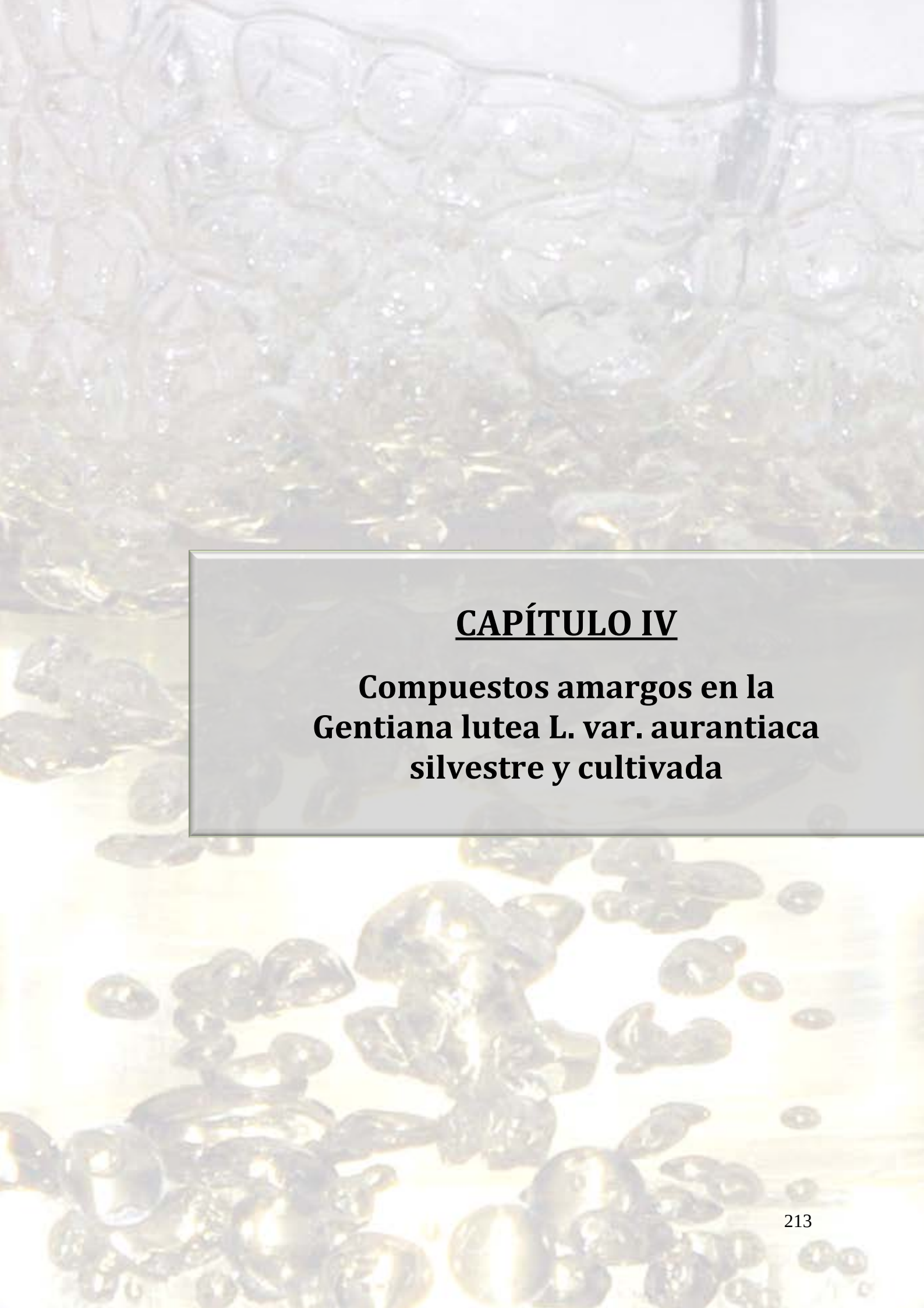
Sustainable crop management of *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, produces yields over 15 tons per hectare, decreasing weed control, which is performed only during the first two years, and thus decreasing the erosion of this soil, with a high ecological value. Furthermore, production costs are lower than most productive culture systems, but not sustainable.

Cultivation of *G. lutea* L. var. *aurantiaca* outside its habitat is possible but yields are lower, decreasing root growth and survival percentage, in addition to require higher investment in crop management.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AIELLO, N. & BEZZI, A. 1998. Genziana maggiore (*Gentiana lutea* L.): aspetti biologici, qualitativi e produttivi. *Agricoltura Ricerca* XX (176) : 8-17.
- AIELLO, N., D'ANDREA, L., SCARTEZZINI, F. & VENDER, C. 1998. Rimozione della dormienza dei semi di *Gentiana lutea* L. attraverso la prerefrigerazione e le gibberelline e durata dell'effetto stimolante. *Agricoltura ricerca*, 176, 18-22.
- BARRALIS, G., CHADOEUF, R. & DESMAREST, P. 1978. New trends of *Gentiana lutea* cultivation. *Acta Horticulturae*, 73, 303-306.
- BERGOUGNOUX, V. 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32, 170-189.
- BEZZI, A., AIELLO, N. & M., T. 1987. La coltivazione di *Gentiana lutea* L. nell'ambito del progetto "Piante officinali" del Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste. *Atti del Convegno su "La coltivazione delle piante officinali"*. Trento.
- BEZZI, A., VENDER, C. & AIELLO, N. 1997. Coltivazione di ecotipi di *Gentiana lutea* L. ottenuti da seme raccolto da piante coltivate e spontanee. *Comunicazioni di ricerca dell'ISAFa*, 3, 19-23.
- BEZZI, A., VENDER, C. & SCARTEZZINI, F. 1996. Dati morfologici e produttivi rilevati su coltivazioni di *Gentiana lutea* L. (1981 – 1994). *Atti del Convegno "Genziana e specie amaro – aromatiche Ricerche ed Applicazioni"*. Camerino Università degli Studi, Camerino (Macerata) Italia.
- FRANZ, C. 1981. Zur inkulturnahme von Gelben Enzian (*Gentiana lutea* L.) in Rumänien (1963-1971) *Z. Herbor.*
- FRANZ, C. H. & FRITZ, D. 1978. Cultivation aspects of *Gentiana lutea* L. *Acta Horticulturae*, 73, 307-314.
- GALAMBOSI, B. 1996. Experiences of cultivating *Gentiana lutea* L. in Finland. *Atti del convegno "Genziana e specie amaro-aromatiche. Recherche ed Applicazioni"*.
- GONZÁLEZ, O., MAYO, S., RODRÍGUEZ, A. & CASQUERO, P. A. 2012. Effect of soil in the growth of *Gentiana lutea* radical system in north mountain of León (Spain). *Acta Horticulturae*, 955, 281-285.
- KURIAN, A. & SANKAR, A. 2007. *Medicinal Plants*, New India Publishing Agency.
- KUSAR, A. & BARICEVIC, D. 2006. Cultivation trials of Yellow Gentian (*Gentiana lutea* L. subsp. *symphyandra* Murb.) in west part of Slovenia. *Acta agriculturae Slovenica*, 87, 213-224.
- LEITON, M. J. 1996. *Compuestos amargos y aromáticos de Gentiana lutea* L. Tesis Doctoral, País Vasco.
- MICROSOFT 2010. Microsoft Excel 2010. Redmond, Washington: Microsoft.
- PRIETO, F. G. & NAFRÍA, J. M. N. 2005. Trois nouvelles espèces du genre *Aphis* de l'Espagne. *The Canadian Entomologist*, 137, 49-60.
- RADANOVIC, D., SVETLANA, A. M. B., MARKOVIC', L. T., SEKULIC', P. & NINKOV, M. J. Yield and mineral content of Yellow Gentian root (*Gentiana*

- lutea* L.) grown on black water-permeable foil in organic and mineral model of fertilization. Seventh Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, (7th CMAPSEEC), 2012 Subotica; Serbia. Institute for Medicinal Plant Research and Association for Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (AMAPSEEC), 291-298.
- SAND, C., ANTOFIE, M.-M., BARBU, C. H. & POP, M. R. In vitro germination of *Gentiana lutea* L. valuable genotypes. Advances in Environment Technologies, Agriculture, Food and Animal Science, 2013 Brasov, (Romania). 309-312.
- SAS INSTITUTE INC 2004. SAS/STAT 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- TUCAKOV, J. 1976. Biologique, pharmacoéconomique et pharmacomédicale de la protection dans la nature des plantes medicinales et similaires en Yugoslavie. *Eppos*, 58 (5), 238-242.
- ZINKERNAGEL, V. & FRANZ, C. 1977. Occurrence of a collar rot on *Gentiana lutea*, yellow gentian. *Gartenbauwissenschaft*, 42.

The background of the page is a microscopic image of plant tissue, showing various cells and structures. A semi-transparent grey rectangular box is centered on the page, containing the chapter title. The text is in a bold, black, serif font.

CAPÍTULO IV

**Compuestos amargos en la
Gentiana lutea L. var. *aurantiaca*
silvestre y cultivada**

CAPÍTULO IV

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE.....	215
II. ÍNDICE DE FIGURAS	217
III. ÍNDICE DE TABLAS	221
1. INTRODUCCIÓN.....	223
2. OBJETIVOS.....	227
3. MATERIAL y MÉTODOS	229
3.1. MATERIAL VEGETAL RECOLECTADO	229
3.2. ANÁLISIS DE SUELOS	232
3.3. PROCESADO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	232
3.4. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	235
3.5. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO CON “HPLC”	236
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	237
4. RESULTADOS	239
4.1. CURVAS DE CALIBRADO	239
4.2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	240
4.3. GENCIANA CULTIVADA.....	244
4.3.1. Parcela CT3 (Murias de Paredes)	244
4.3.2. Parcela CT4 (ESTIA).....	249
4.3.3. Comparación parcelas CT3-CT4	253
4.4. POBLACIONES SILVESTRES	257
4.4.1. <i>Gentiana lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	257
4.4.1.1. RELACIÓN SEGÚN DESARROLLO	264
4.4.1.2. RELACIÓN CÓRTEX – XILEMA	266
4.4.1.3. RELACION DESARROLLO – CÓRTEX/XILEMA.....	267
4.4.2. <i>Gentiana lutea</i> L. subsp. <i>lutea</i>	270
4.4.3. <i>Gentiana lutea</i> L. subsp. <i>vardjanii</i>	270
4.5. COMPARACIÓN ENTRE ORÍGENES.....	272
5. DISCUSIÓN.....	275

5.1.	<i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	275
5.1.1.	Cultivo.....	275
5.1.2.	Partes de la raíz	280
5.1.3.	Silvestre.....	281
5.1.4.	Comparaciones entre plantas cultivadas y silvestres	283
6.	CONCLUSIONES.....	285
7.	CONCLUSIONS.....	287
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	289

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de los compuestos amargos característicos de la <i>G. lutea</i> L.	224
Figura 2: Diferentes tallos florales recogidos de plantas de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en la misma población silvestre	229
Figura 3: Raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> después de ser lavadas	232
Figura 4: Detalle del rizoma (A), raíz principal (B), raíces secundarias (C) y sus secciones características del sistema radicular de <i>G. lutea</i> L.	233
Figura 5: Detalle de las diferentes medidas tomadas sobre la sección de raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	233
Figura 6: Detalle del micromolino Culatti tras moler una muestra de raíz de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	234
Figura 7: Detalle de la balanza AG-204 (METTLER TOLEDO S.A.E)	235
Figura 8: Detalle del extractor Gerhardt Soxtherm S 306 AK (C. Gerhardt GmbH & Co. KG, C.)	235
Figura 9: Detalle del evaporador por corriente de nitrógeno Techne's Dri-Block © DB-3 (Bibby Scientific Ltd) (A) y evaporador a vacío Savant™ SC 110A SpeedVac™ Plus Concentrator (Thermo Fisher Scientific Inc ®) (B).	236
Figura 10: Espectro de absorción UV de amarogentina (A), genciopicrosido (B), swerosido (C) y swertiamarina (D) obtenidos a partir de sustancias puras comerciales. (A) Detección a 280,2 nm; (B), (C) y (D) detección a 252,2 nm.	239
Figura 11: Curva de calibración para swertiamarina.....	240
Figura 12: Cromatograma (HPLC) de extractos metanólicos de <i>G. lutea</i> L.	240
Figura 13: Ejemplos de perfiles cromatográficos (HPLC) de extractos metanólicos de <i>G. lutea</i> L.	241
Figura 14: Detalle del pico saturado para genciopicrosido en el cromatograma (HPLC) de extractos metanólicos para <i>G. lutea</i> L.	243
Figura 15: Detalle del pico para genciopicrosido en el cromatograma (HPLC) de extractos metanólicos para <i>G. lutea</i> L.	243
Figura 16: Comparación de medias para el contenido de amarogentina de raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> cultivadas en la parcela CT3, para cada el tratamiento de fertilización.	244
Figura 17: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido de raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> cultivadas en la parcela CT3, para cada una de las recolecciones (2012p 2012o).	245
Figura 18: Comparación de medias para el contenido de amarogentina (AMARO), swerosido (SWERÓSIDO), swertiamarina (SWERT) de raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> cultivadas en la parcela CT3, para cada una de las recolecciones (2012p 2012o).	245

Figura 19: Representación gráfica de las recta de regresión lineal obtenidas para la relación: contenido del compuesto (genciopicrosido, amarogentina, swerósido y swertiamarina) y peso seco de las raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> analizadas para la parcela de cultivo CT3.	247
Figura 20: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido de raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> cultivadas en la parcela CT4, para cada una de las recolecciones (2010p, 2010o, 2011o, 2012p 2012o).	249
Figura 21: Comparación de medias para el contenido de amarogentina (AMARO), swerósido (SWERÓSIDO), swertiamarina (SWERT) de raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> cultivadas en la parcela CT4, para cada una de las recolecciones (2010p, 2010o, 2011o, 2012p 2012o).	250
Figura 22: Comparación de medias para peso seco (P_SECO) de las raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> cultivadas y analizadas para la parcela CT4, para cada una de las recolecciones (2010p, 2010o, 2011o, 2012p 2012o).	250
Figura 23: Representación gráfica de las recta de regresión lineal obtenidas para la relación: contenido del compuesto (genciopicrosido, amarogentina, swerósido y swertiamarina) y peso seco de las raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> analizadas para la parcela de cultivo CT4.	251
Figura 24: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido de raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en relación a la parcela de cultivo (CT3 y CT4).	253
Figura 25: Comparación de medias para el contenido de amarogentina (AMARO), swerósido (SWERÓSIDO) y swertiamarina (SWERT) de raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en relación a la parcela de cultivo (CT3 y CT4).	253
Figura 26: Representación gráfica de las recta de regresión lineal obtenidas para la relación: contenido del compuesto amargo (genciopicrosido, amarogentina, swerósido y swertiamarina) y peso seco de las raíces de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> analizadas para la parcela de cultivo CT3 y CT4.	255
Figura 27: Representación gráfica bidimensional rotado del peso de las variables estudiadas para cada uno de los componentes principales (Dim). (Dim 1 Vs Dim 2) en el análisis de componentes principales para las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	260
Figura 28: Representación gráfica bidimensional rotado del peso de las variables estudiadas para cada uno de los componentes principales (Dim). (Dim 1 Vs Dim 3) en el análisis de componentes principales para las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	261
Figura 29: Diagrama de dispersión bidimensional de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> sobre los componentes rotados (Dim) (Dim 1 Vs Dim 2). El nº de la población coincide con el de la población LG de la	262
Figura 30: Diagrama de dispersión bidimensional de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> sobre los componentes rotados (Dim) (Dim 1 Vs Dim 3). El nº de la población coincide con el de la población LG de la	263
Figura 31: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido de raíces de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en relación a su desarrollo (RL, RC y RV).	264

Figura 32: Comparación de medias para el contenido de amarogentina de raíces de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en relación a su desarrollo (RL, RC y RV).	265
Figura 33: Comparación de medias para el contenido de swerósido y swertiamarina de raíces de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en relación a su desarrollo (RL, RC y RV).	265
Figura 34: Comparación de medias para el DIÁMETRO, grosor del córtex (CÓRTEX) y relación entre ambos (RELACIÓN D/C) para las raíces de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en relación a su desarrollo (RL, RC y RV).	266
Figura 35: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido de raíces de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en relación a sus diferentes partes (EXT, INT).	267
Figura 36: Comparación de medias para el contenido de amarogentina, swerósido y swertiamarina de raíces de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> en relación a sus diferentes partes (EXT, INT).	267
Figura 37: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido en el análisis de varianza combinado para el desarrollo y partes de la raíz (LE, LI, CE, CI, VE y VI) de raíces de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> .	268
Figura 38: Comparación de medias para el contenido de amarogentina en el análisis de varianza combinado para el desarrollo y partes de la raíz (LE, LI, CE, CI, VE y VI) de raíces de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> .	268
Figura 39: Comparación de medias para el contenido de swerósido en el análisis de varianza combinado para el desarrollo y partes de la raíz (LE, LI, CE, CI, VE y VI) de raíces de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> .	269
Figura 40: Comparación de medias para el contenido de swertiamarina en el análisis de varianza combinado para el desarrollo y partes de la raíz (LE, LI, CE, CI, VE y VI) de raíces de las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i> .	269
Figura 41: Comparación de medias para el contenido de GENCIOPICRÓSIDO de las raíces de <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>vardjanii</i> respecto su origen (Bondone, Brentónico, Peller y Tremalzo).	270
Figura 42: Comparación de medias para el contenido de AMAROGENTINA de las raíces de <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>vardjanii</i> respecto su origen (Bondone, Brentónico, Peller y Tremalzo).	271
Figura 43: Comparación de medias separados para el contenido de swerósido y swertiamarina de las raíces de <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>vardjanii</i> respecto su origen (Bondone, Brentónico, Peller y Tremalzo).	271
Figura 44: Comparación de medias para la ALTITUD de las poblaciones de <i>G. lutea</i> L. muestreadas en función de sus orígenes (CT3, LBO, RCC, Pirineos y Dolomitas).	272
Figura 45: Comparación de medias para el contenido de GENCIOPICRÓSIDO de las raíces de <i>G. lutea</i> L. en función de sus orígenes (CT3, LBO, RCC, Pirineos y Dolomitas).	273

Figura 46: Comparación de medias para el contenido de AMAROGENTINA de las raíces de <i>G. lutea</i> L. en función de sus orígenes (CT3, LBO, RCC, Pirineos y Dolomitas).....	273
Figura 47: Comparación de medias para el contenido de SWERÓSIDO de las raíces de <i>G. lutea</i> L. en función de sus orígenes (CT3, LBO, RCC, Pirineos y Dolomitas).	274
Figura 48: Comparación de medias para el contenido de SWERTIAMARINA de las raíces de <i>G. lutea</i> L. en función de sus orígenes (CT3, LBO, RCC, Pirineos y Dolomitas).....	274

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Localización de las poblaciones de <i>G. lutea</i> L. analizadas.	231
Tabla 2: Descripción de cada una de las variables utilizadas en el análisis de componentes principales (ACP)	238
Tabla 3: Ecuación de las rectas de calibrado para cada compuesto analizado y su coeficiente de determinación (R^2).....	239
Tabla 4: Valores característicos de las raíces principales para las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	258
Tabla 5: Valores propios para los diferentes componentes principales y varianza explicada para cada uno de ellos en el análisis de componentes principales para las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	259
Tabla 6: Valores de saturación de las variables para cada uno de los componentes principales rotados en el análisis de componentes principales para las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	259
Tabla 7: Concentración de los diferentes compuestos amargos para las raíces de <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>lutea</i> provenientes de los Pirineos, y su valor medio.	270

IV. ÍNDICE DE TABLAS. ANEXO I

ANEXO I. Tabla 1: Análisis de suelos para las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	299
ANEXO I. Tabla 2: Análisis de suelos para las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>lutea</i>	301
ANEXO I. Tabla 3:	301
ANEXO I. Tabla 4: Análisis de suelos para las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	301

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el uso de las plantas medicinales se ha generalizado, pasando de utilizarse únicamente en la medicina tradicional a su comercialización a través de diferentes canales (farmacias, parafarmacias, herboristerías, y tiendas de dietética). Entre las especies más demandadas se encuentra la equinacea (*Echinacea purpurea* (L.) Moench), conocida por su actividad antiinflamatoria, estimulante del sistema inmune, así como utilizada contra las infecciones del tracto respiratorio superior (Fonseca et al., 2014, Soeberdt et al., 2014). *Rhodiola rosea* L, conocida como raíz ártica o raíz de oro, ha sido utilizada durante siglos en la medicina tradicional rusa y escandinava como inmunoestimulante y para combatir la fatiga física y mental (György et al., 2013). Posiblemente, en la actualidad sea la stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)), la planta medicinal y alimentaria más novedosa, ya que se utiliza como edulcorante libre de calorías, reduciendo el nivel de glucosa, protegiendo de la diabetes, obesidad, y poseyendo una capacidad antihipertensiva y antihiper glucémica entre otras (Khan et al., 2014, Lorenzo et al., 2014).

Gentiana lutea L., además de ser utilizada para la elaboración de bebidas aperitivas, de forma tradicional ha sido utilizada como estimulante del apetito y en el tratamiento de diversos problemas gastrointestinales (dolor de estómago, acidez, gastritis, diarrea, vómitos, etc) (Leung, 1980), aunque como puede comprobarse en la introducción general, la lista de usos actuales es extensa.

La principal característica que presenta la raíz de genciana, y por la que ha sido utilizada desde hace cientos de años es su característico sabor amargo, el cual se debe principalmente a la presencia de secoiridoides-glycosidos, siendo los más característicos el genciopicrosido (Bourquelot y Bridel, 1910), cuya concentración es superior al resto, la amarogentina (Korte, 1955, Inouye y Nakamura, 1971), la swertiamarina (Inouye et al., 1970) y el swerósido (EMA, 2009) (Figura 1).

Como observan Franz et al. (1996), la Farmacopea Europea determina que la raíz de genciana o *Radix Gentianae* es un término restringido a *G. lutea* L, aunque en diferentes Farmacopeas son aceptadas las raíces de otras especies de la familia gentianaceae como materia prima (*G. pannonica* Scop., *G. punctata* L. y *G. purpurea* L.). Su restricción, se debe a que la mayoría de estas raíces provienen de la recolección silvestre y excepto *G. lutea* L, cuyo cultivo puede ser económicamente viable (Barralis et al., 1986), el resto, debido a su pequeño tamaño, son mucho menos productivas, incluyendo que además son plantas protegidas. Sin embargo, hay que destacar que algunas de ellas tienen concentraciones superiores en algunos de esos compuestos a los de *G. lutea* L.

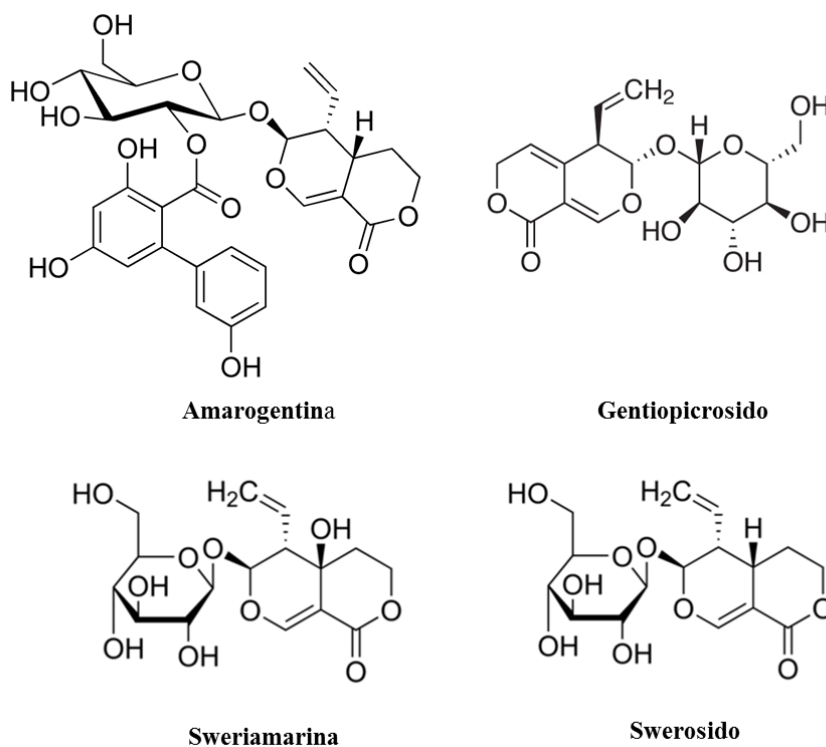


Figura 1: Estructura de los compuestos amargos característicos de la *G. lutea* L.

Generalmente, la calidad de la raíz de genciana es evaluada por el contenido en gentiopicrosido, el cual es el compuesto que se encuentra en una mayor concentración (Ando et al., 2007). La amarogentina, en cambio, se conoce como el compuesto natural más amargo, con un índice de amargor de 58×10^6 , mientras que para el gentiopicrosido, swerosido y swertiamarina el valor es de 12×10^3 (Chialva y Dada, 1990, EMA, 2009, Wagner et al., 1984).

Además de por sus compuestos amargos, la raíz de genciana se caracteriza por contener oligosacáridos, entre los que destacan la gencianosa y gentiobiosa, xantonas (genticina, isogenticina y gentiosido) y trazas de aceites esenciales. (ESCOP, 2003, Atkinson et al., 1969, Hayashi y Yamagishi, 1988).

Diferentes autores han realizado análisis sobre estos componentes característicos de la *G. lutea* L., utilizando en ellos diferentes técnicas como: HPLC (Sticher y Meier, 1978, Sticher y Meier, 1980, Jiang et al., 2005, Kusar et al., 2010, Zheng et al., 2011, Branka et al., 2013), cromatografía en capa fina (TLC) (Krupinska et al., 1991, Bodart et al., 1996), electroforesis capilar (Citova et al., 2008), cromatografía capilar electrocinética micelar (Glatz et al., 2000) o mediante HPLC-MS (Szucs et al., 2002, Aberham et al., 2007), entre otros.

Respecto de sus compuestos secoiridoides-glycosidos, se han elaborado diferentes trabajos. Algunos de ellos describen variaciones en la concentración para *G. lutea* L. en relación a la edad de las raíces, de sus tejidos, el estado fenológico de la planta o la altitud a la que se han desarrollado la *G. lutea* L (Barralis et al., 1978, Franz et al., 1985, Hayashi

et al., 1990, Leiton, 1996), de modo que, en el caso del genciopicrosido se encuentran resultados enfrentados de como la altitud afecta su concentración (Schultze y Franz, 1979, Rossetti, 1984). Otros trabajos evalúan como, los valores de amarogentina pueden variar desde trazas hasta pequeños porcentajes para diferentes ecotipos y subespecies, tanto de plantas silvestres, cultivadas o de la descendencia para el cruce de ellos (Franz et al., 1996, Bezzi et al., 1997, Aiello et al., 2013, Kusar y Baricevic, 2006, Bezzi et al., 1996). Aunque el órgano utilizado principalmente de la *G. lutea* L es la raíz existen, también trabajos que han analizado otros órganos de la planta, como son las hojas o las flores (Balijagic et al., 2012, Kusar et al., 2010).

En los estudios citados anteriormente se han evaluado las concentraciones de los diferentes compuestos amargos para diferentes subespecies de *G. lutea* L, como es el caso de la *Gentiana lutea* L. subsp. *lutea*, *Gentiana lutea* L. subsp. *symphyandra* Murbeck o *Gentiana lutea* L. subsp. *vardjanii* T. Wraber (Franz y Fritz, 1975, Schultze y Franz, 1979, Franz et al., 1996, Kusar et al., 2010, Aiello et al., 2013). Pero sin embargo, *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, salvo el análisis de seis individuos realizado por (Leiton, 1996), ha pasado inadvertida desde el punto de vista científico ya que Lainz (1982), fue el primero en diferenciar botánicamente ésta, de la subsp. *lutea*.

2. OBJETIVOS

En el trabajo llevado a cabo en este capítulo, se pretende cuantificar las concentraciones de los compuestos amargos: genciopicrosido, amarogentina, swerósido y swertiamarina, mediante el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para:

- Conocer, por primera vez, el perfil para dichos compuestos amargos en *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, hasta ahora prácticamente desconocido, analizando para ello un número significativo de individuos de un total de 32 poblaciones silvestres localizadas en la Cordillera Cantábrica.
- Analizar las posibles relaciones existentes entre diferentes variables como: la altitud, los componentes del suelo y el desarrollo de la raíz, respecto de la concentración de los compuestos amargos para las diferentes poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, así como identificar las poblaciones con elevada riqueza en dichos compuestos.
- Establecer la variación en la concentración de los compuestos amargos para diferentes partes del sistema radicular según su desarrollo, en plantas de poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.
- Conocer, para plantas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivadas en diferentes ambientes, dentro y fueran de su hábitat natural, las variaciones de los compuestos amargos entre dichos ambientes y para diferentes momentos de recolección durante su ciclo vegetativo.
- Establecer una comparativa entre las concentraciones de los compuestos amargos para las plantas, tanto silvestres como cultivadas, de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* respecto de los obtenidos para diferentes muestras de *G. lutea* L. subsp. *lutea* y *G. lutea* L. subsp. *vardjanii*, así como de los publicados en otros estudios.

El conocimiento de los contenidos en compuestos amargos para *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, y con ello su perfil, permitirá conocer el potencial de esta variedad respecto de las demás subespecies de *G. lutea* L.

Además, los resultados establecerán las bases de cómo obtener los mayores rendimientos en compuestos amargos para *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

3. MATERIAL y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL RECOLECTADO

Para el análisis cromatográfico se han utilizado raíces de *G. lutea* L. procedentes tanto de poblaciones silvestres como de parcelas de cultivo (Tabla 1).

A lo largo de la Cordillera Cantábrica y Macizo Galaico-Leonés, se recolectaron, en septiembre de 2010, raíces y rizoma de cuatro plantas para cada una de las 32 poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, localizándose 31 de ellas en la provincia de León y una en la de Zamora (Tabla 1). De todas ellas, 16 fueron remuestreadas de nuevo en el año 2011. En todos los casos, estas poblaciones se han catalogado como variedad *aurantiaca*, tanto por la coloración anaranjada o rojiza de las flores (Figura 2), como por la ausencia de entrenudos en el tallo estéril.



Figura 2: Diferentes tallos florales recogidos de plantas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en la misma población silvestre

Las poblaciones pertenecientes a la variedad *aurantiaca*, fueron divididas en dos grupos para la realización del estudio, de modo que 14 se encuentran en las comarcas de Laciana, Omaña y Babia, donde se origina este estudio, mientras que el resto se encuentran ubicadas a lo largo de las demás zonas montañosas de la provincia leonesa y Sanabria (Zamora) (Tabla 1).

Así mismo, se recolectaron muestras pertenecientes a la subespecie *lutea* de 15 localizaciones diferentes a lo largo de los Pirineos en septiembre de 2011 (Tabla 1). Estas poblaciones silvestres se distribuyen por las provincias de Gerona (GE), Lérida (LE),

Huesca (HU) y en la Comunidad Foral de Navarra (NA). En este caso únicamente se recolectó una planta por población, que se utilizaron como control para su comparación con la variedad *aurantiaca*.

Por último también han sido analizadas plantas provenientes de cuatro localizaciones diferentes en los Alpes Dolomitas (Trentino italiano), pertenecientes a la subespecie *vardjanii*, y que fueron recolectadas en septiembre de 2011 (Tabla 1). Estas muestras fueron enviadas por Nicola Aiello y Carla Vender (Unità di ricerca per il monitoraggio e la pianificazione forestale (Trento) (CRA-MPF)). Para cada una de las poblaciones han sido analizadas cinco plantas diferentes.

En todos los casos, cuando se ha recolectado más de un ejemplar para cada población, las plantas seleccionadas estaban separadas al menos cinco metros entre ellas para evitar muestrear la misma planta, ya que debido al desarrollo de la raíz de genciana es posible que varias rosetas correspondan a la misma planta.

Aunque no es posible conocer la edad de las raíces obtenidas a partir de poblaciones silvestres, se seleccionaron plantas que por el desarrollo de su parte aérea principalmente, al igual que su sistema radicular cuando era desenterrado, denotaran que se trataba de una planta adulta.

Las plantas cultivadas, pertenecientes igualmente a la variedad *aurantiaca*, se han obtenido de dos de las cuatro parcelas de cultivo diferentes establecidas para la elaboración de la tesis, de modo que una de ellas estaba ubicada en una localización con características edafoclimáticas que permite el crecimiento silvestre de la genciana (CT3), mientras que la otra fue ubicada en la ciudad de León, donde las condiciones no permiten el desarrollo de esta planta de modo natural (CT4) (Tabla 1). Dichas parcelas y su climatología estas descritas ampliamente en el capítulo III.

Las poblaciones silvestres se encuentran registradas en el Herbario Jaime Andrés Rodríguez, de la Universidad de León, donde se otorgó a cada una de las poblaciones un código (LEB-GERM (LG) (Tabla 1).

En las sucesivas recolecciones, para plantas cultivadas (2010, 2011 y 2012) se han muestreado plantas de 3, 4 y 5 años respectivamente. Del mismo modo, para cada año se han recolectado plantas en dos momentos diferentes de su ciclo vegetativo: el primero de ellos en primavera, en el inicio de actividad vegetativa (abril-mayo), denominada “recolección primaveral”, y el segundo al final de dicha actividad, que tiene lugar entre el final del verano e inicio del otoño (septiembre), cuando se seca su parte epífita y se abren las cápsulas que contienen las semillas, denominando a dicho momento de ahora en adelante “recolección otoñal”. Para un mismo estado fenológico, las fechas han variado levemente entre diferentes años, debido a las condiciones meteorológicas propias de cada anualidad. Otro de los tratamientos sobre estas plantas cultivadas ha sido la presencia o ausencia de fertilización tal y como se describe en el Capítulo III.

Tabla 1: Localización de las poblaciones de *G. lutea* L. analizadas.

Localización	Pob	<i>G. lutea</i> L.	Latitud (N)	Longitud	Altitud
Matalavilla (LE)	LG16	var. <i>aurantiaca</i>	42°52'13"	006°23'06"O	1794
Lumajo (LE)	LG17	var. <i>aurantiaca</i>	42°59'14"	006°15'33"O	1396
Torre de Babia (LE)	LG18	var. <i>aurantiaca</i>	43°00'47"	006°05'59"O	1801
Senra (LE)	LG19	var. <i>aurantiaca</i>	42°50'07"	006°11'25"O	1724
Caboalles de Arriba (LE)	LG20	var. <i>aurantiaca</i>	42°59'18"	006°25'26"O	1880
Riaño (LE)	LG21	var. <i>aurantiaca</i>	43°06'05"	005°00'24"O	1270
Valdelugeros (LE)	LG22	var. <i>aurantiaca</i>	42°56'32"	005°27'29"O	1419
Villamanin (LE)	LG23	var. <i>aurantiaca</i>	43°00'19"	005°40'58"O	1294
La Baña (LE)	LG24	var. <i>aurantiaca</i>	42°15'22"	006°46'08"O	1580
Truchas	LG25	var. <i>aurantiaca</i>	42°21'20"	006°25'22"O	1867
Boca de Huérgano (LE)	LG31	var. <i>aurantiaca</i>	43°04'14"	004°47'45"O	1621
Acebedo (LE)	LG32	var. <i>aurantiaca</i>	43°05'12"	005°09'34"O	1264
Puebla de lillo (LE)	LG33	var. <i>aurantiaca</i>	43°04'37"	005°14'33"O	1639
Puebla de Lillo (LE)	LG34	var. <i>aurantiaca</i>	42°58'42"	005°12'37"O	1380
Puebla de Lillo (LE)	LG35	var. <i>aurantiaca</i>	43°00'57"	005°21'19"O	1561
Puebla de Lillo (LE)	LG36	var. <i>aurantiaca</i>	43°02'43"	005°22'57"O	1657
San Emiliano (LE)	LG37	var. <i>aurantiaca</i>	42°55'25"	006°02'54"O	1494
Galende (ZA)	LG38	var. <i>aurantiaca</i>	42°09'30"	006°44'29"O	1727
Villamanin (LE)	LG39	var. <i>aurantiaca</i>	42°56'44"	005°44'52"O	1341
Tejedo (LE)	LG40	var. <i>aurantiaca</i>	42°56'10"	006°26'04"O	1508
Matalavilla (LE)	LG41	var. <i>aurantiaca</i>	42°52'16"	006°22'52"O	1740
Matalavilla (LE)	LG42	var. <i>aurantiaca</i>	42°52'20"	006°22'33"O	1720
Robles (LE)	LG43	var. <i>aurantiaca</i>	42°58'35"	006°17'13"O	1637
Senra (LE)	LG44	var. <i>aurantiaca</i>	42°49'55"	006°10'23"O	1693
Senra (LE)	LG45	var. <i>aurantiaca</i>	42°49'52"	006°10'36"O	1741
Rabanal de Arriba (LE)	LG46	var. <i>aurantiaca</i>	42°52'53"	006°18'06"O	1945
Caboalles de Arriba (LE)	LG47	var. <i>aurantiaca</i>	42°59'37"	006°25'07"O	1692
Palacios del Sil (LE)	LG48	var. <i>aurantiaca</i>	42°52'18"	006°23'32"O	1824
Salientes (LE)	LG49	var. <i>aurantiaca</i>	42°49'21"	006°19'18"O	1897
Sosas (LE)	LG50	var. <i>aurantiaca</i>	43°00'43"	006°17'27"O	1717
Villabandín (LE)	LG51	var. <i>aurantiaca</i>	42°53'35"	006°06'43"O	1877
Salentinos (LE)	LG52	var. <i>aurantiaca</i>	42°48'45"	006°19'19"O	1639
Murias de Paredes (LE)	CT3	var. <i>aurantiaca</i>	42°52'12"	006°12'57"O	1437
León (LE)	CT4	var. <i>aurantiaca</i>	42°34'59"	005°37'24"O	819
Collada de Tosas 1 (GE)	LG1	subsp. <i>lutea</i>	42°20'53"	001°59'08"E	1738
Collada de Tosas 2 (GE)	LG2	subsp. <i>lutea</i>	42°20'29"	002°01'49"E	1654
La Molina (GE)	LG3	subsp. <i>lutea</i>	42°17'13"	002°02'07"E	1578
La Bonaigua (L)	LG4	subsp. <i>lutea</i>	42°40'10"	000°58'11"E	1813
Salardu (L)	LG5	subsp. <i>lutea</i>	42°40'20"	000°54'58"E	1516
Montgarri (L)	LG6	subsp. <i>lutea</i>	42°45'27"	001°01'58"E	1602
Montgarri 2 (L)	LG7	subsp. <i>lutea</i>	42°45'33"	001°01'14"E	1588
Baqueira (L)	LG8	subsp. <i>lutea</i>	42°43'31"	000°55'59"E	1764
Sant Maurici (L)	LG9	subsp. <i>lutea</i>	42°39'28"	000°55'24"E	1516
Artiga de Lin (L)	LG10	subsp. <i>lutea</i>	42°40'50"	000°42'24"E	1458
Senet (L)	LG11	subsp. <i>lutea</i>	42°36'23"	000°46'01"E	1487
Cerler 1 (HU)	LG12	subsp. <i>lutea</i>	42°33'55"	000°34'01"E	1902
Cerler 2 (HU)	LG13	subsp. <i>lutea</i>	42°33'43"	000°34'03"E	1892
Garaioa (NA)	LG14	subsp. <i>lutea</i>	42°53'23"	001°13'51"O	1170
Formigal (HU)	LG15	subsp. <i>lutea</i>	42°47'45"	000°24'11"O	1701
Bondone (TAA-ITA)	LG27	subsp. <i>vardjanii</i>	46°00'34"	011°02'50"E	1557
Peller (TAA-ITA)	LG28	subsp. <i>vardjanii</i>	46°19'04"	010°57'34"E	1904
Tremalzo (TAA-ITA)	LG29	subsp. <i>vardjanii</i>	45°50'15"	010°41'23"E	1694
Brentonico (TAA-ITA)	LG30	subsp. <i>vardjanii</i>	45°47'16"	010°54'04"E	1482

GE: Gerona; HU: Huesca; L: Lérida; LE: León; TAA: Trentino-Alto Adige; ITA: Italia. LG: referencia LEB-GERM otorgada a las muestras depositadas en el Herbario Jaime Andrés Rodríguez, de la Universidad de León;

3.2. ANALISIS DE SUELOS

Tanto los suelos pertenecientes a las parcelas de cultivo, como los de las poblaciones silvestres de *G.lutea* L. var. *aurantiaca* recolectadas, fueron analizados. Igualmente, para la subsp. *lutea*, un número representativo de muestras de suelo provenientes de los Pirineos fueron analizadas.

El análisis de suelos fue realizado por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León. Para el análisis de las muestras de suelo se utilizaron los métodos oficiales de análisis propuestos por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1994).

Mientras, para las de la subsp. *vardjanii* los datos de las características del suelo fueron proporcionadas por Nicola Aiello, del ENTECRA ITALIA (Aiello et al., 2013)

Los análisis de suelo se pueden observar en el ANEXO I

3.3. PROCESADO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Cada uno de los sistemas radiculares recolectados fue limpiado mediante cepillado y posterior lavado utilizando para ello agua fría, eliminando con ello cualquier resto de tierra e impurezas (raíces de otras plantas) (Figura 3).



Figura 3: Raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* después de ser lavadas

Las raíces de cada una de las plantas de genciana provenientes de las poblaciones silvestres, de las cuales no se conoce la edad, y hasta el momento no existen descriptores morfológicos que permitan determinarla, fueron separadas identificándolas como rizoma, raíces principales o raíces secundarias para cada una de ellas. En este sentido cabe resaltar que las raíces no se diferenciaron en uno u otro tipo por sus dimensiones, sino por su desarrollo, mediante la observación de la fisiología de la sección (Figura 4)

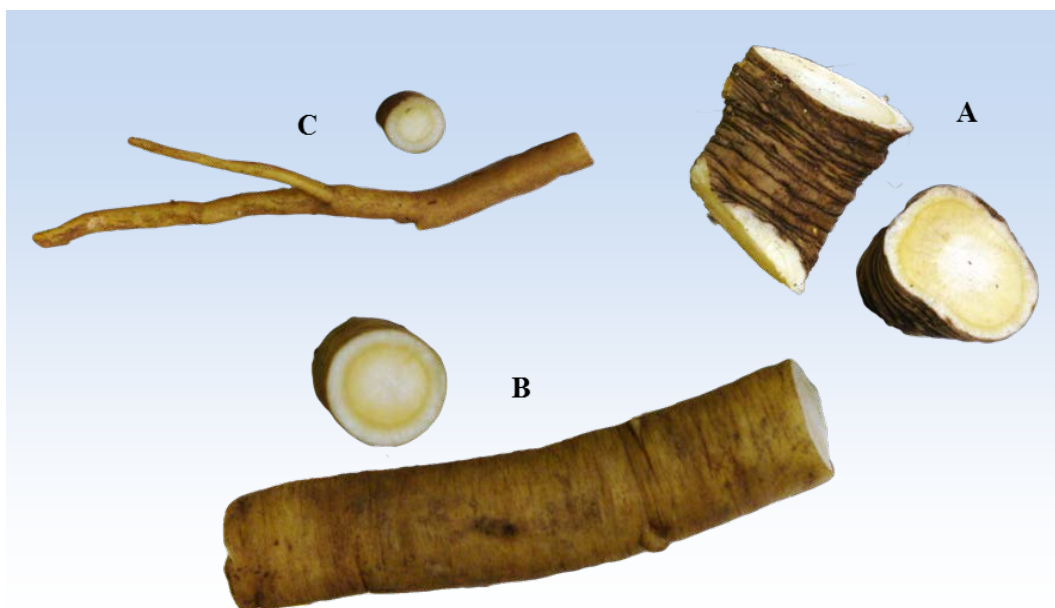


Figura 4: Detalle del rizoma (A), raíz principal (B), raíces secundarias (C) y sus secciones características del sistema radicular de *G. lutea* L.

Para cada sistema radicular, se tomaron medidas representativas de cada parte (rizoma, raíces principales, raíces secundarias) mediante la utilización de un calibre digital de la Serie 500 (Mitutoyo®). Estas medidas se realizaron en al menos tres puntos diferentes para cada grupo, donde se tomaron de cada uno de ellos tres medidas del diámetro total, así como del grosor del córtex, ya que la sección no es completamente circular, ni el grosor del córtex constante (Figura 5).

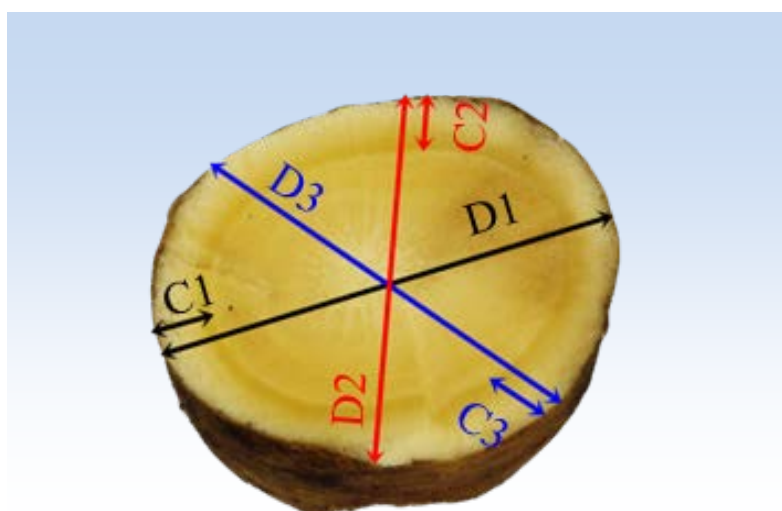


Figura 5: Detalle de las diferentes medidas tomadas sobre la sección de raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

Después de ser medidas, se separó el córtex del xilema a fin de poder ser analizados por separado, de modo que para cada una de las divisiones realizadas en cuanto a su desarrollo (rizoma (V), principal (C) y secundaria (L)), todas ellas, a su se diferenciaron en córtex (E) y xilema (I).

Finalmente, se fragmentaron las muestras para conseguir un secado rápido y uniforme, evitando con ello el inicio de procesos fermentativos y/o la proliferación de hongos. Para el secado se utilizó una estufa DIGITRONIC (JP SELECTA S.A), provista de ventilación forzada. La temperatura utilizada fue de 35°C, evitando así la degradación de alguno de sus compuestos, y se prolongó (hasta peso constante) durante 48 a 96 horas debido al alto contenido en agua de las raíces y su grosor.

Una vez totalmente secas, las muestras se almacenaron en bolsas herméticas debidamente identificadas, e introduciéndolas en bolsas igualmente herméticas conteniendo sílica gel, evitando así la rehidratación del material vegetal hasta ser utilizado, ya que este material es altamente higroscópico.

Para la realización de los extractos, las diferentes muestras procedentes de diferentes poblaciones y partes de la raíz de genciana, fueron molidas por separado utilizando para ello un micromolino de martillos (Culatti AG) (Figura 6). El tamiz utilizado fue el de 1 mm de diámetro, almacenando el producto en las mismas condiciones que las raíces.



Figura 6: Detalle del micromolino Culatti tras moler una muestra de raíz de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*

3.4. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para cada una de las muestras se realizaron tres repeticiones, cada una de ellas de 1g, utilizando para su pesado una balanza de precisión AG-204 (METTLER TOLEDO S.A.E) (Figura 7).



Figura 7: Detalle de la balanza AG-204 (METTLER TOLEDO S.A.E)

La preparación de los extractos se realizó mediante una extracción metanólica en caliente, utilizando para ello un extractor Gerhardt Soxtherm S 306 AK (C. Gerhardt GmbH & Co. KG, C.) (Figura 8). La duración del proceso, optimizado para la genciana a partir del utilizado por Varela et al. (2009), fue de 120 minutos. (60 minutos de ebullición en contacto de la muestra con el metanol, 30 minutos de reducción de solvente y 30 minutos de lavado por goteo de metanol condensado).



Figura 8: Detalle del extractor Gerhardt Soxtherm S 306 AK (C. Gerhardt GmbH & Co. KG, C.)

El resultado de la extracción fue evaporado mediante la combinación de dos acciones, primero la desecación por corriente de nitrógeno, utilizando para ello el equipo Techne's Dri-Block © DB-3 (Bibby Scientific Ltd) (Figura 9A) y posteriormente finalizando la

dsecación a través de la evaporación mediante vacío a temperatura ambiente, utilizando para ello el equipo Savant™ SC 110A SpeedVac™ Plus Concentrator (Thermo Fisher Scientific Inc[®]) (Figura 9B).

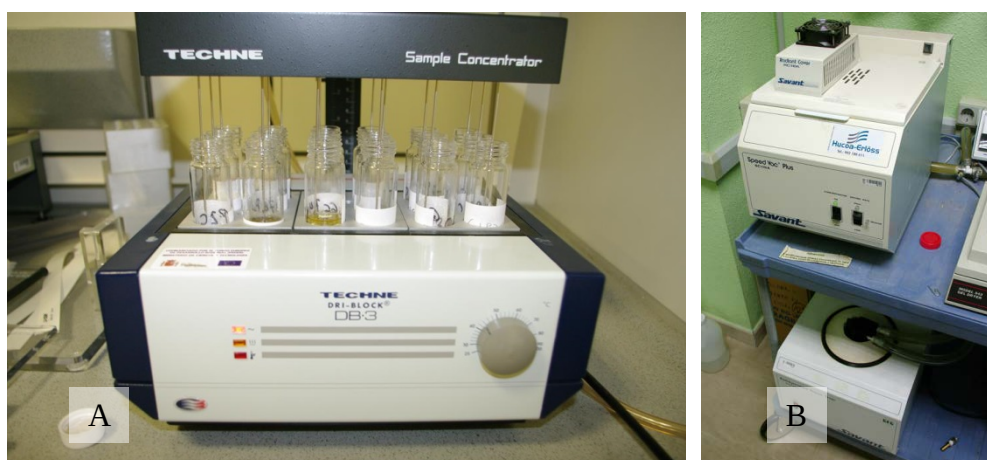


Figura 9: Detalle del evaporador por corriente de nitrógeno Techne's Dri-Block[®] DB-3 (Bibby Scientific Ltd) (A) y evaporador a vacío Savant™ SC 110A SpeedVac™ Plus Concentrator (Thermo Fisher Scientific Inc[®]) (B).

El extracto obtenido por dsecación fue diluido en 5 ml de metanol para HPLC, filtrándose el resultado a través de un filtro de jeringa de politetrafluoroetileno (PTFE), con un tamaño de poro de 0,45µm. El producto se conservó en viales topacio (-18°C) en el congelador hasta su análisis.

3.5. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO CON “HPLC”

Los compuestos se determinaron mediante la utilización de cromatografía de alta eficacia en fase reversa, utilizando para ello un cromatografo HP Agilent 1000 series (Agilent Technologies Inc), equipado con un *loop injector* de 20 microlitros. Se utilizó una columna Waters Spherisorb[®] 5 µm ODS2 (Waters[®]) de medidas 250 x 4,6 mm, y las fases móviles fueron agua con ácido acético al 5% v/v y metanol.

Los compuestos amargos analizados han sido los secoiridoides-glycosidos: genciopicrosido (nº CAS 20831-76-9), amarogentina (nº CAS 21018-84-8), swerósido (nº CAS 14215-86-2) y swertiamarina (17388-39-5).

La cuantificación de los compuestos amargos se ha realizado por el método de estándar externo, utilizándose para ello compuestos puros comerciales. La amarogentina, genciopicrosido y swerósido fueron suministrados por LGC Standards (© LGC Limited), mientras que la swertiamarina fue suministrada por Sigma Aldrich[™].

Dependiendo de la concentración de los compuestos amargos en los extractos vegetales analizados, se han realizado curvas de calibrado para diluciones de entre 0 y 400 ppm para la amarogentina, y de valores entre 0 y 2000 ppm en el caso del genciopicrosido, swerósido y de la swertiamarina. Estas diluciones de los compuestos puros se realizaron en metanol calidad HPLC.

Cada disolución se ha analizado con el sistema cromatográfico correspondiente y tras la integración del cromatograma han obtenido los valores de unidades de área para cada concentración, obteniendo cada curva de calibración y su correspondiente ecuación, a partir de la regresión lineal entre las unidades de área obtenidas para cada compuesto y su concentración.

La identificación de los compuestos en las muestras analizadas se ha realizado por comparación de sus espectros UV y los tiempos de retención con los de los patrones comerciales.

La detección se realizó en la región UV, mediante un detector de red de diodos o “diode array detector” (DAD), a dos longitudes de onda. El genciopicrosido, swerósido y swertiamarina han sido detectados a 254,2 nm mientras que la amarogentina a 280 nm.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de concentraciones de compuestos amargos, así como las medidas realizadas a las diferentes partes del sistema radicular, fueron analizados utilizando el Modelo Lineal Generalizado (GLM). Cuando el análisis mostró diferencias significativas entre tratamientos se realizó la comparación de medias mediante el método de Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fischer, con un grado de significancia $\alpha=0.05$. El software utilizado fue el SAS 9.1 (SAS Institute Inc, 2004).

Se utilizó el modelo de regresión lineal simple para obtener las curvas de calibrado, y con ello la ecuación y coeficiente de determinación (R^2), para cada uno de los compuestos analizados. De igual manera, se ha utilizado este mismo método para establecer la relación existente entre el peso seco de las raíces de genciana y el contenido total de cada uno de los compuestos analizados para las plantas cultivadas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. El software utilizado fue la hoja de cálculo EXCEL (Microsoft, 2010).

Los valores para las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* de concentraciones de los diferentes compuestos amargos, las medidas tomadas para las raíces, así como los valores de diferentes variables para los análisis de suelo y la altitud de cada una de ellas (Tabla 2), han sido analizados mediante la realización de un Análisis de Componentes Principales (ACP). El ACP permite la creación de variables no observables a partir de variables observables. Estas variables o componentes creadas a partir de los datos de análisis se han utilizado para la representación de una nube de puntos que de forma gráfica representa en dos dimensiones la interacción de dos componentes. Para ello se ha utilizado el software NTsys.2.1 (Rohlf, 2002)

Para el análisis de componentes principales (ACP) de las 32 poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, se han utilizado los valores de trece variables (Tabla 2).

Tabla 2: Descripción de cada una de las variables utilizadas en el análisis de componentes principales (ACP)

DIAMETRO	Diámetro medio de la raíz analizada
CÓRTEX	Grosor medio del córtex en la raíz analizada
%CÓRTEX	Porcentaje del grosor medio del córtex en relación al diámetro medio de la raíz analizada
ALTITUD	Altitud de la localización de las poblaciones de genciana estudiadas
GENCIOPICRÓSIDO	Contenido (%) de genciopicrosido en las raíces estudiadas
AMAROGENTINA	Contenido (%) de amarogentina en las raíces estudiadas
SWERÓSIDO	Contenido (%) de swerosido en las raíces estudiadas
SWERTIAMARINA	Contenido (%) de swertiamarina en las raíces estudiadas
ARENA	Contenido de arena (%) en los suelos de las poblaciones de genciana estudiadas
LIMO	Contenido de limo (%) en los suelos de las poblaciones de genciana estudiadas
ARCILLA	Contenido de arcilla (%) en los suelos de las poblaciones de genciana estudiadas
pH	Valor del pH para los suelos de las poblaciones de genciana estudiadas
MAT.ORGÁNICA	Contenido de materia orgánica (%) en los suelos de las poblaciones de genciana estudiadas

Además se ha llevado a cabo un análisis de correlaciones simples de Pearson entre los diferentes caracteres evaluados. El software utilizado fue el SAS 9.1. (SAS Institute Inc, 2004)

4. RESULTADOS

4.1. CURVAS DE CALIBRADO

Tras el análisis de los compuestos puros comerciales, se establecieron los tiempos de retención, así como los espectros UV característicos de cada uno de ellos (Figura 10), en la longitud de onda seleccionada.

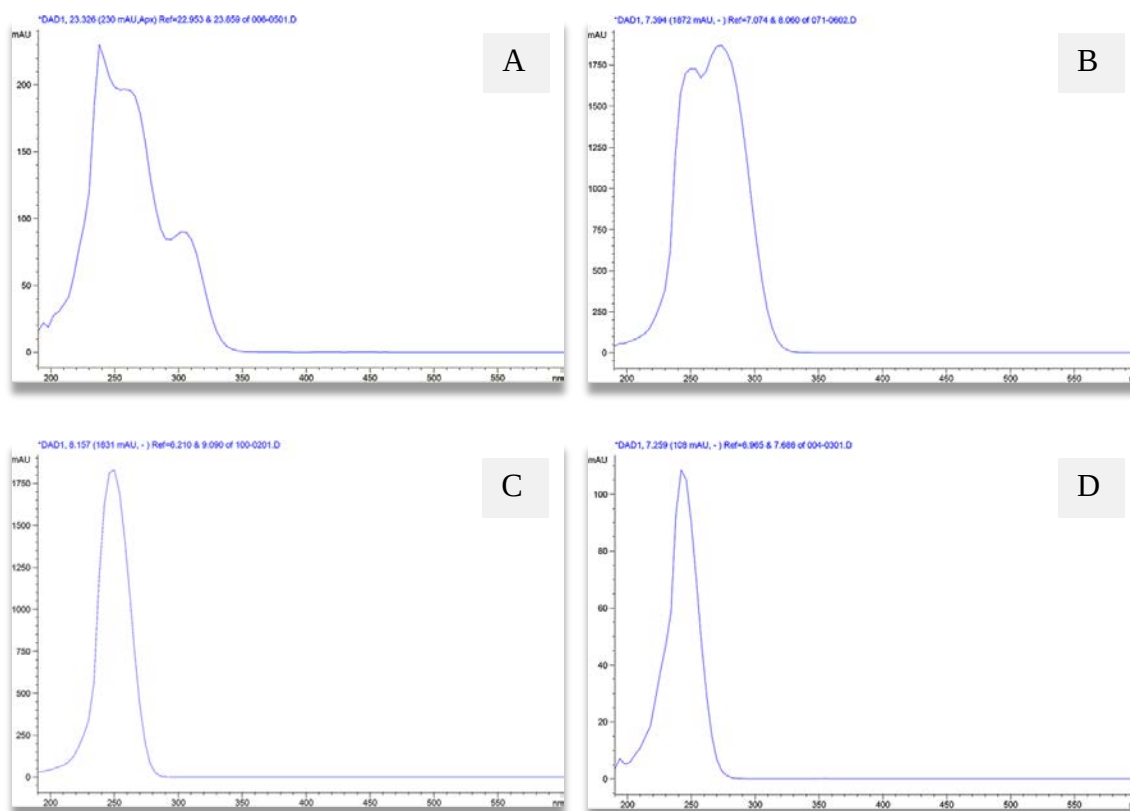


Figura 10: Espectro de absorción UV de amarogentina (A), genciopicrosido (B), swertiosido (C) y swertiamarina (D) obtenidos a partir de sustancias puras comerciales. (A) Detección a 280,2 nm; (B), (C) y (D) detección a 252,2 nm.

Establecidas las diluciones para cada compuesto puro, y analizadas estas mediante el método analítico correspondiente, se obtuvieron las curvas de calibración (Figura 11), sus correspondientes ecuaciones y coeficientes de determinación R^2 (Tabla 1).

Tabla 3: Ecuación de las rectas de calibrado para cada compuesto analizado.

Compuesto	Ecuación de la recta	R^2
Amarogentina	$x = (y - 34,362) / 8,9167$	0,9999
Genciopicrosido	$x = (y - 4,0627) / 0,5884$	0,9993
Swertiamarina	$x = (y + 80,306) / 8,6443$	0,9999
Swertiosido	$x = (y - 158,73) / 15,902$	0,9990

Ccoeficiente de determinación (R^2)

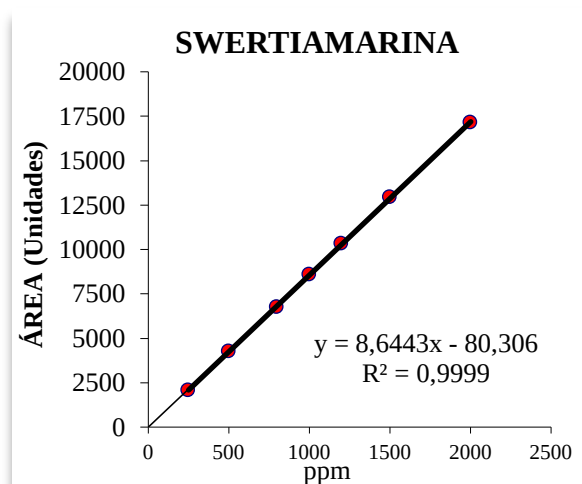


Figura 11: Curva de calibración para swertiamarina, obtenida por regresión lineal a partir de los valores de área resultantes del análisis HPLC para diluciones del compuesto puro comercial desde las 250 ppm hasta las 2000 ppm.

4.1. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Analizadas todas las muestras de raíces de *G. lutea* L., provenientes tanto de plantas silvestres como cultivadas y de distintas subespecies y variedades localizadas tanto en España como Italia, se obtienen los perfiles cromatográficos característicos (Figura 13).

Destaca el tamaño del pico para la amarogentina en el análisis correspondiente al perfil de las raíces cultivadas de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, respecto del resto (Figura 13), provenientes todos ellos de plantas silvestres.

Las detecciones se realizaron en dos longitudes de onda diferentes, de modo que para 252,2 nm se detectó el genciopicrosido, el swerósido y la swertiamarina, mientras que para 280,2 nm se detectó únicamente la amarogentina. Para esta longitud de onda el pico de la amarogentina demuestra estar menos interferido por compuestos presentes en tiempos de retención cercanos (Figura 12).

El comportamiento del genciopicrosido para ambas longitudes de onda es similar, mientras que el swerósido y la swertiamarina, para 280,2 nm prácticamente no son identificables (Figura 12).

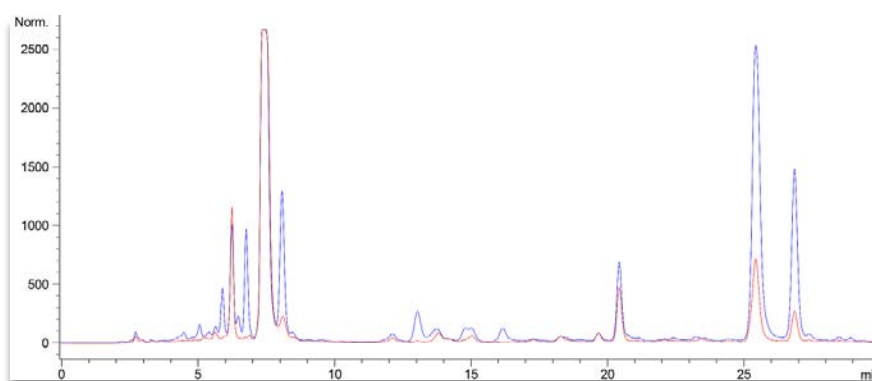


Figura 12: Cromatograma (HPLC) de extractos metanólicos de *G. lutea* L. Columna Waters Spherisorb® 5 µm ODS2 (Waters ©) 250 x 4,6 mm; Fase móvil metanol 1 ml/min. Azul: Detección a 252,2 nm; rojo: detección a 280,2 nm.

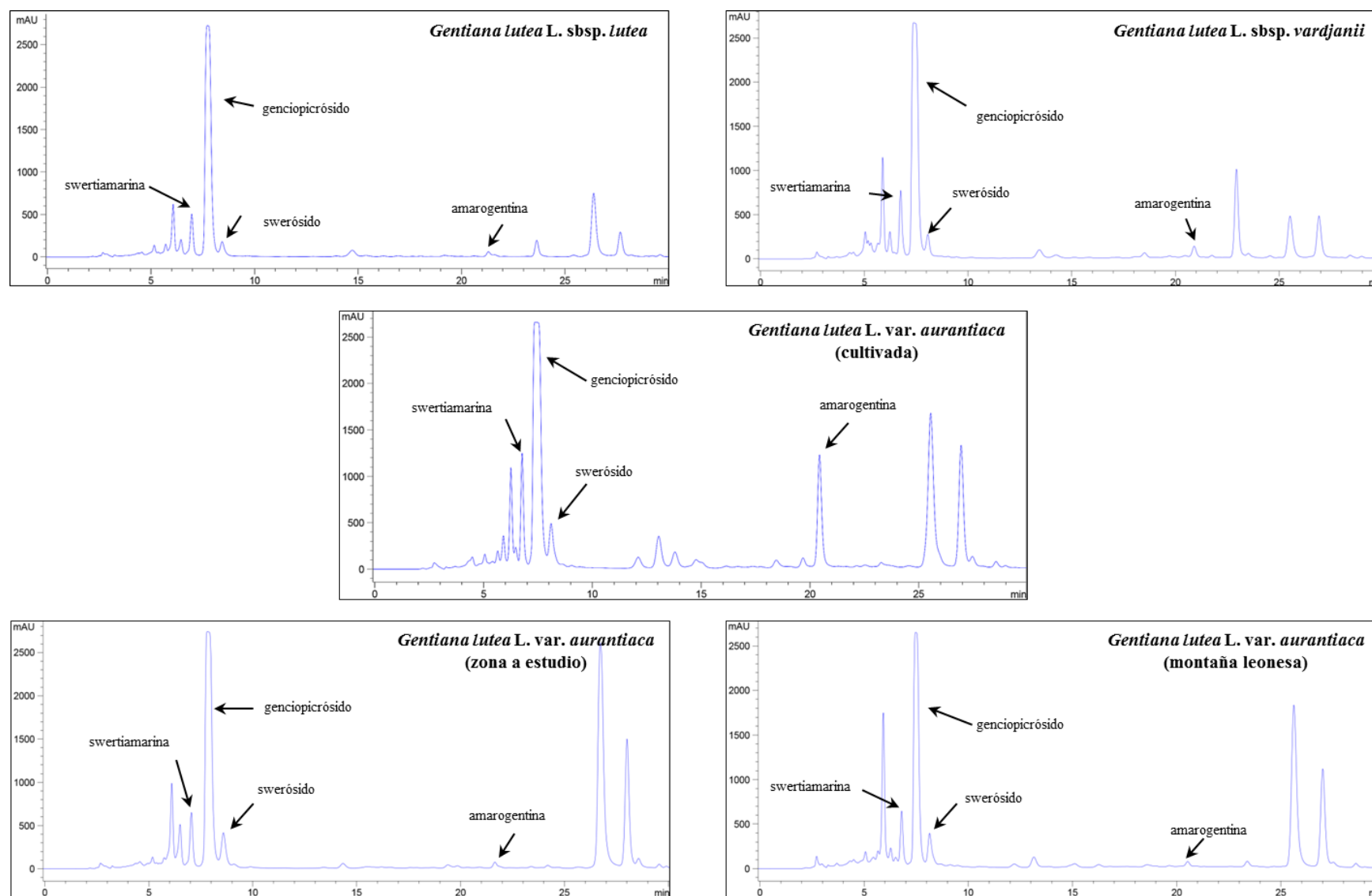


Figura 13: Ejemplos de perfiles cromatográficos (HPLC) de extractos metanólicos de *G. lutea* L. Columna Waters Spherisorb® 5 µm ODS2 (Waters ©) 250 x 4,6 mm: Fase móvil metanol 1 ml/min, Detección a 252,2 nm

Las dimensiones del pico correspondiente al genciopicrosido, y por tanto su contenido, resultaron ser muy superiores al resto de compuestos, de modo, que en los test de análisis se comprobó que para volúmenes de inyección de muestra de 10 μ l, se saturaba el detector (Figura 14), pero sin embargo, resultó ser un volumen óptimo para la medición de la amarogentina, compuesto presente en menor cantidad de los cuatro analizados.

Por tanto se realizaron dos análisis con volúmenes de inyección diferentes, uno a 10 μ l y otro a 0,5 μ l, donde el genciopicrosido pudo ser medido (Figura 15).

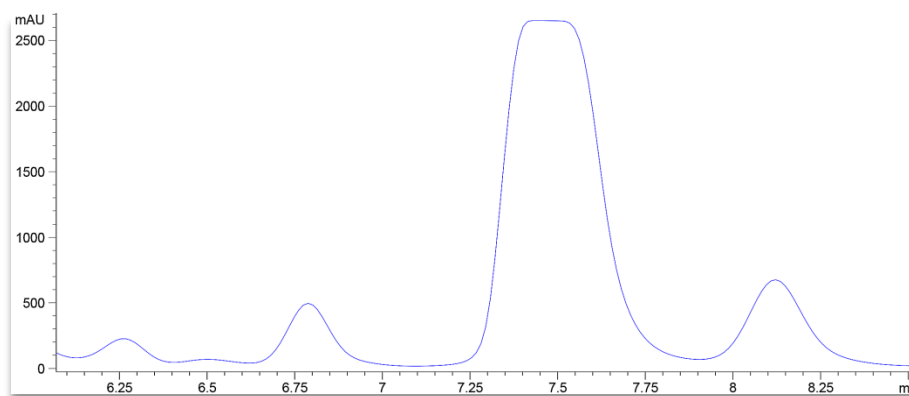


Figura 14: Detalle del pico saturado para genciopicrosido en el cromatograma (HPLC) de extractos metanólicos para *G. lutea* L. Columna Waters Spherisorb® 5 μ m ODS2 (Waters ©) 250 x 4,6 mm; Fase móvil metanol 1 ml/min. Detección a 252,2 nm. Inyección 10 μ l

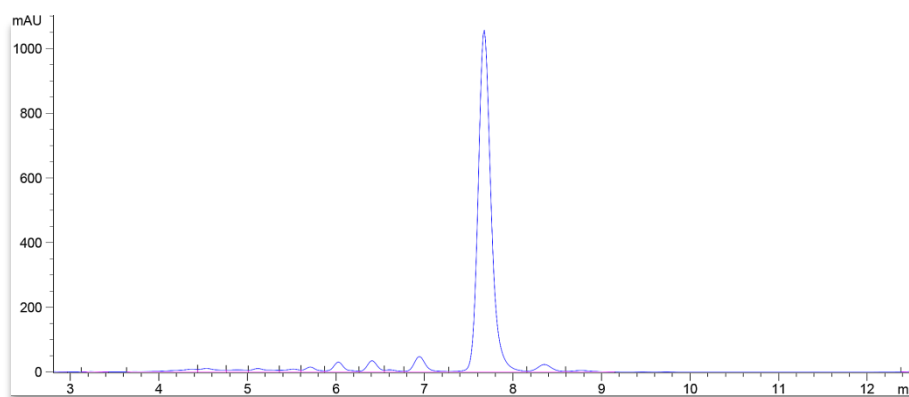


Figura 15: Detalle del pico para genciopicrosido en el cromatograma (HPLC) de extractos metanólicos para *G. lutea* L. Columna Waters Spherisorb® 5 μ m ODS2 (Waters ©) 250 x 4,6 mm; Fase móvil metanol 1 ml/min. Detección a 252,2 nm. Inyección 0,5 μ l.

4.2. GENCIANA CULTIVADA

4.2.1. Parcela CT3 (Murias de Paredes)

Para la parcela CT3, en la que únicamente se recolectaron raíces en la anualidad 2012 tanto en primavera como en otoño, cuando se realiza la comparación de medias para las concentraciones de los diferentes compuestos en relación al tratamiento fertilización, para el compuesto amarogentina, se observan diferencias significativas (Figura 16), de modo que aquellas raíces que fueron fertilizadas muestran unas concentraciones significativamente superiores (0,235%) a aquellas que no lo fueron (0,154%). En este sentido, el peso seco de las raíces fertilizadas analizadas no presentó diferencias significativas respecto de las no fertilizadas.

Para el resto de compuestos no se observan diferencias significativas para el tratamiento fertilización.

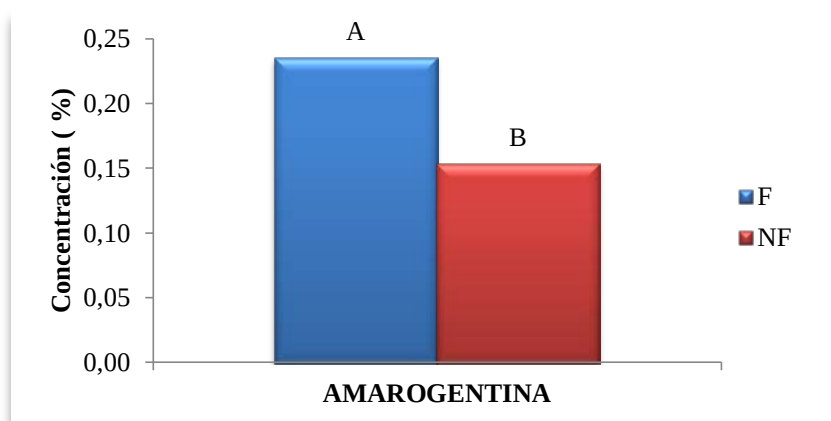


Figura 16: Comparación de medias para el contenido de amarogentina de raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivadas en la parcela CT3, para cada el tratamiento de fertilización. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. F:fertilizado; NF: no fertilizado.

Cuando lo que se realiza es la comparación de medias para para los distintos compuestos analizados en relación a las diferentes recolecciones (Figura 17 y Figura 18), se observan diferencias significativas para cada uno de los compuestos, siendo significativamente superiores los valores para las concentraciones de los compuestos en las raíces recolectadas en primavera respecto de las de otoño.

Teniendo en cuenta los dos compuestos más importantes, para el **genciopicrosido**, los valores son de 9,87 y 6,98% para para primavera y otoño respectivamente, mientras que en el mismo orden para la **amarogentina** son de 0,236 y 0,118%.

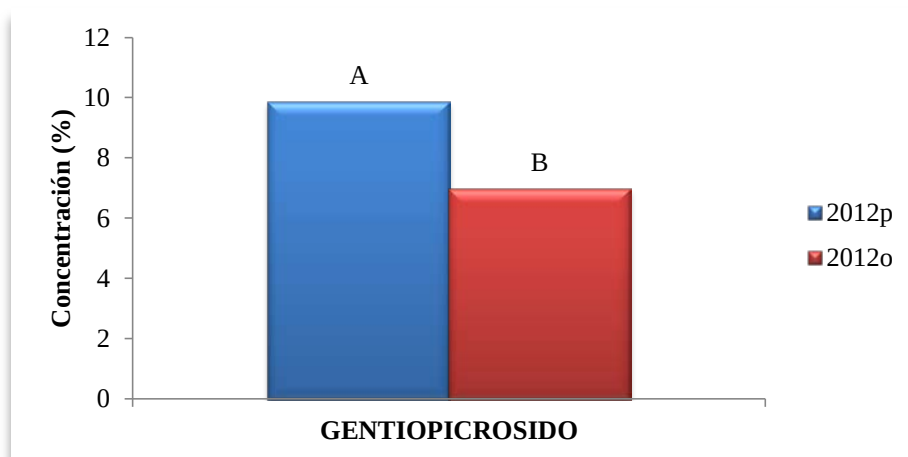


Figura 17: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido de raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivadas en la parcela CT3, para cada una de las recolecciones (2012p 2012o). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. o: otoño; p: primavera.

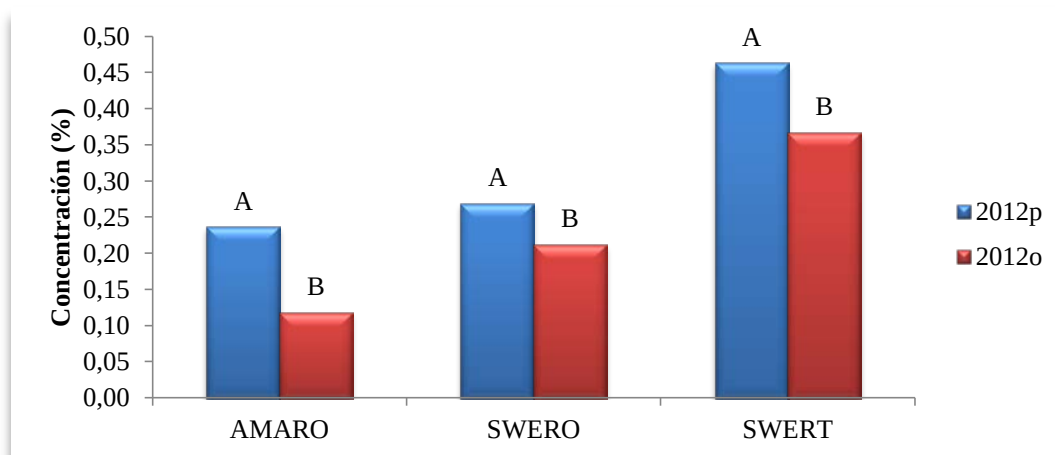


Figura 18: Comparación de medias para el contenido de amarogentina (AMARO), swerosido (SWERÓSIDO), swertiamarina (SWERT) de raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivadas en la parcela CT3, para cada una de las recolecciones (2012p 2012o). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes para cada compuesto. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. o: otoño; p: primavera.

Realizado el análisis de correlación de Pearson para los diferentes compuestos amargos y los pesos secos de las raíces de genciana analizadas para la parcela CT3, existe una correlación altamente significativa ($<0,0001$) para la concentración de amarogentina y swertiamarina, en relación al contenido en genciopicrosido, con coeficientes de correlación de 0,736 y 0,620 respectivamente, así como del contenido de swertiamarina en relación al de amarogentina, con un valor de 0,673.

De igual manera existe una relación altamente significativa ($<0,001$) para el contenido de genciopicrosido en relación al peso seco de las raíces analizadas, con un valor de -0,502, correlación que también se muestra significativa ($<0,05$) para el contenido de amarogentina y swertiamarina con valores de -0,406 y -0,354 respectivamente.

Relacionando los pesos secos y los contenidos para cada uno de los compuestos de las raíces de genciana analizadas provenientes de la parcela CT3, se han obtenido unas

dispersiones de puntos (Figura 19), donde, tanto para el genciopicrosido como para el swerosido y la swertiamarina, estos puntos se ajustan a una recta de regresión con unos valores para el coeficiente de determinación (R^2) de 0,893, 0,833 y 0,936 respectivamente. La dispersión de puntos obtenida para la amarogentina se ajusta a una recta de regresión con un valor de R^2 de únicamente 0,33.

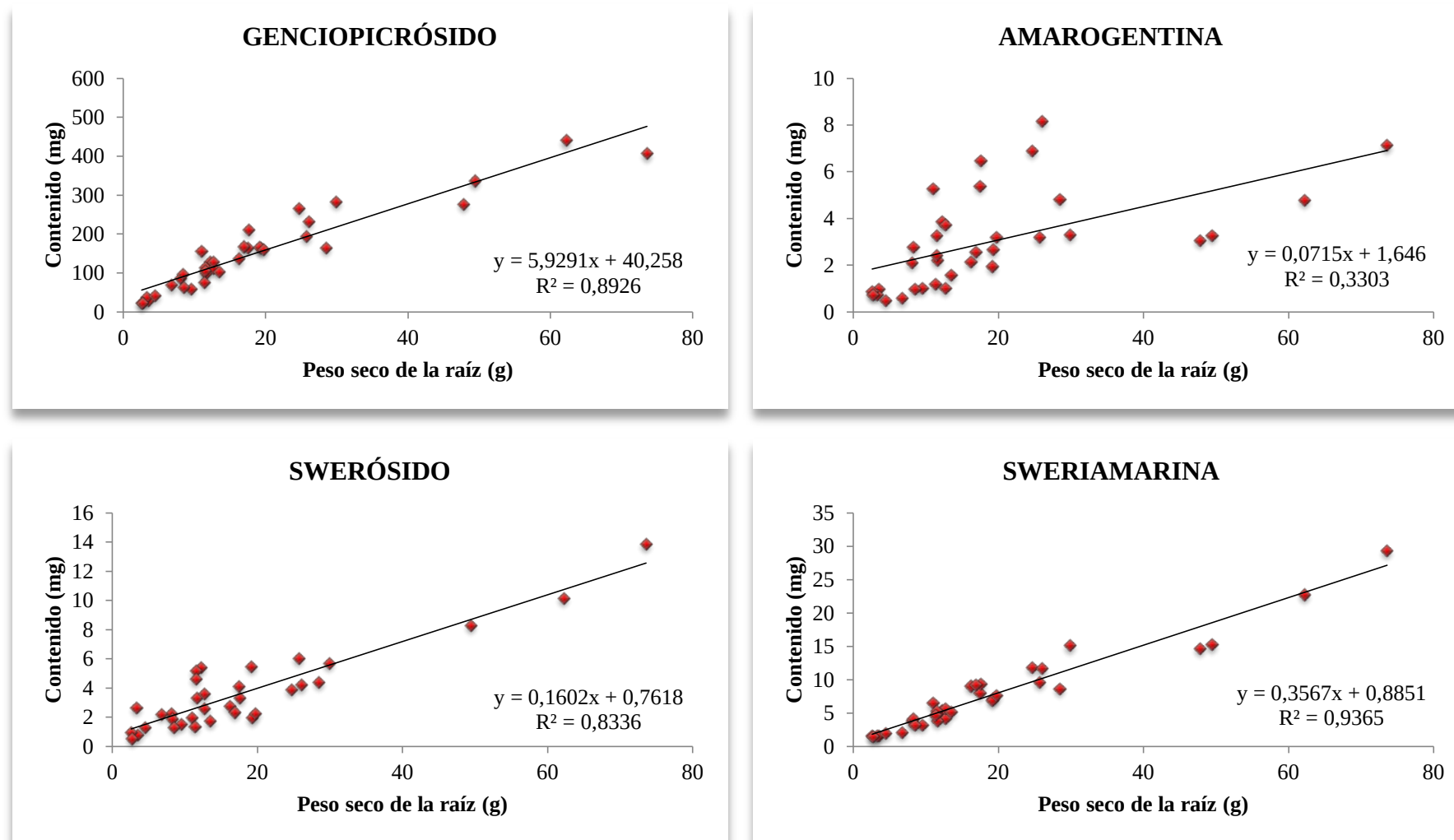


Figura 19: Representación gráfica de las recta de regresión lineal obtenidas para la relación: contenido del compuesto (genciopicrosido, amarogentina, swerósido y swertiamarina) y peso seco de las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* analizadas para la parcela de cultivo CT3.

4.2.2. Parcela CT4 (ESTIA)

Los resultados obtenidos mediante análisis HPLC de las raíces de genciana provenientes de la parcela CT4 entre los años 2010 y 2012, muestran diferencias significativas para los diferentes factores analizados.

En cuanto al tratamiento de fertilización no se observan diferencias significativas en las concentraciones de los diferentes compuestos amargos analizados.

En el análisis de varianza separado para para los distintos compuestos analizados y las diferentes recolecciones (Figura 20 y Figura 21), se observa como la concentración de **genciopicrosido** es significativamente superior para las raíces recogidas en primavera de 2012 (7,515%), respecto de las recogidas en otoño del mismo año (6,161%), pero no respecto de las concentraciones observadas para el resto de las recolecciones.

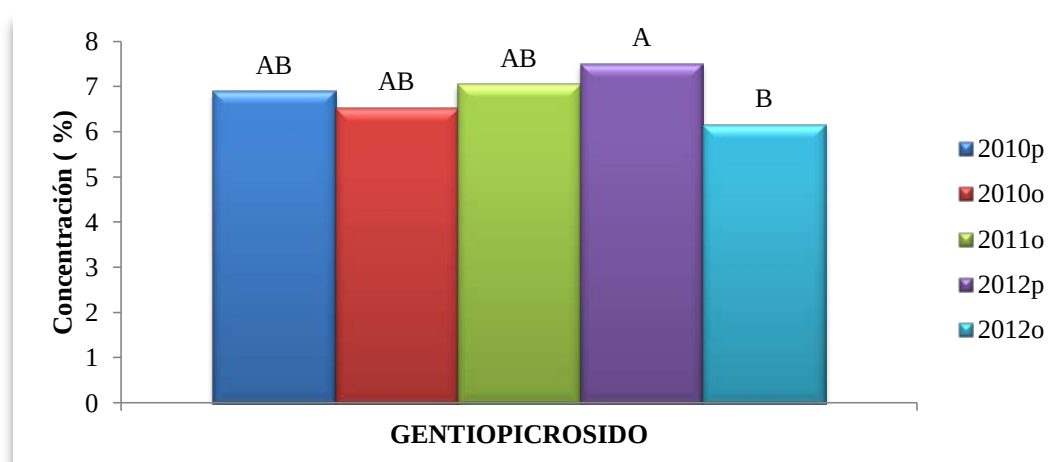


Figura 20: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido de raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivadas en la parcela CT4, para cada una de las recolecciones (2010p, 2010o, 2011o, 2012p 2012o). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. o:otoño; p:primavera.

Cuando lo que se analiza es el porcentaje de **amarogentina** presente en las raíces cultivadas en CT4 (Figura 21), para las recolecciones primaverales de 2010 y 2012, los valores son del 0,150 y 0,121% respectivamente, significativamente superiores a los de otoño, con concentraciones de 0,099% para 2010, y 0,072% para 2012.

Para la concentración de **swerósido** (Figura 21), no se observan diferencias significativas entre recolecciones, ni entre años ni estaciones, con valores entre el 0,398 y el 0,270%.

Para el porcentaje de **swertiamarina** (Figura 21) se observan diferencias significativas de los valores obtenidos para 2011o (0,423%) y 2012p (0,380%), respecto de los de 2010o (0,309%). Para las recolecciones realizadas en primavera las concentraciones de swertiamarina son mayores que las de otoño del mismo año pero sin mostrar diferencias significativas. Sin embargo los pesos secos de las raíces analizadas evolucionan de forma inversa siendo significativamente mayores en 2011 y 2012 los de la recolección otoñal (Figura 22).

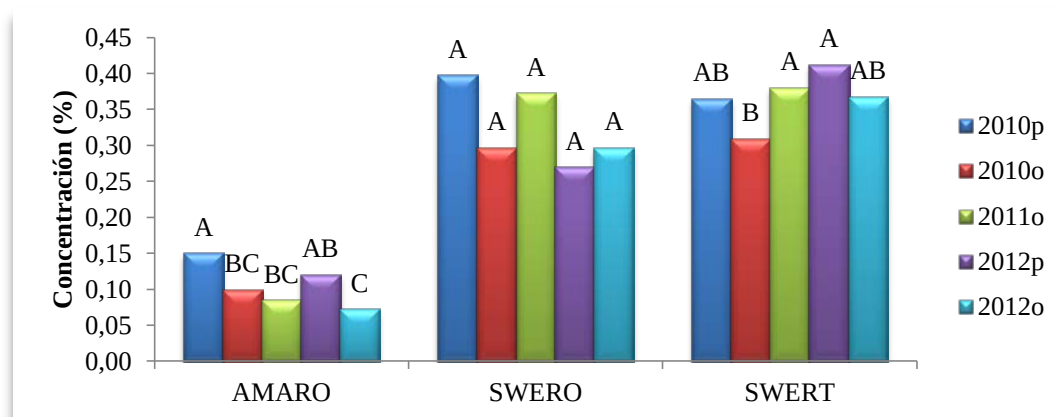


Figura 21: Comparación de medias para el contenido de amarogentina (AMARO), swerósido (SWERÓSIDO), swertiamarina (SWERT) de raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivadas en la parcela CT4, para cada una de las recolecciones (2010p, 2010o, 2011o, 2012p, 2012o). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes para cada compuesto. (P=0,05) de acuerdo con DMS. o: otoño; p: primavera.

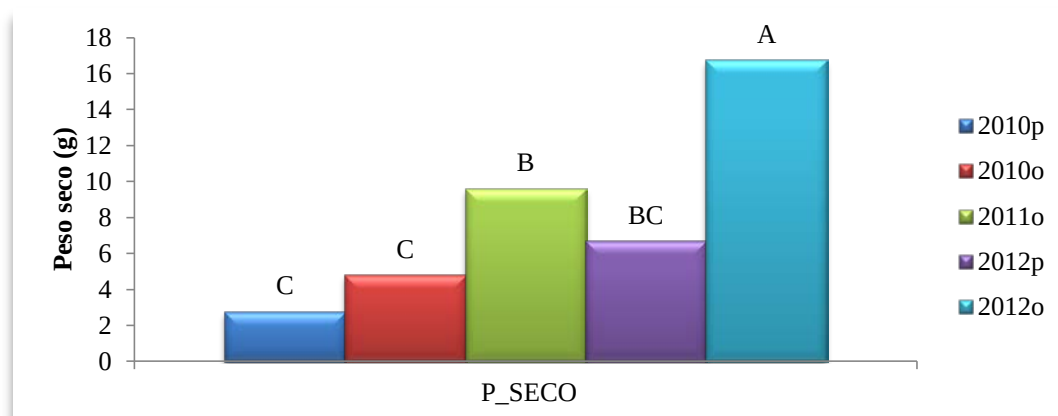


Figura 22: Comparación de medias para peso seco (P_SECO) de las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivadas y analizadas para la parcela CT4, para cada una de las recolecciones (2010p, 2010o, 2011o, 2012p, 2012o). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS. o: otoño; p: primavera.

El análisis de correlación de Pearson entre para diferentes los compuestos amargos y pesos secos de las raíces de genciana analizadas, muestra una correlación altamente significativa ($<0,0001$) para la concentración de amarogentina y swertiamarina en relación al contenido en genciopicrosido, con coeficientes de correlación de 0,396 y 0,553. Esta misma correlación existe para el contenido de swertiamarina en relación al de amarogentina (0,314) y para el contenido de genciopicrosido y amarogentina respecto del peso seco de las raíces analizadas, con valores de -0,328 y -0,336 respectivamente.

Teniendo en cuenta, tanto los pesos secos de las raíces analizadas para la parcela CT4, como las concentraciones de los compuestos analizados, y por tanto las cantidades totales de cada una de estas sustancias almacenadas en las raíces, se han obtenido unas dispersiones de puntos (Figura 23) Tanto el genciopicrosido como la swertiamarina, se ajustan a una recta de regresión con unos valores del coeficiente de determinación (R^2) de 0,917 y 0,920 respectivamente. Para los otros dos compuestos analizados, las coordenadas no se ajustan a una recta de regresión, con valores de R^2 para amarogentina y swerósido de 0,579 y de 0,432 respectivamente.

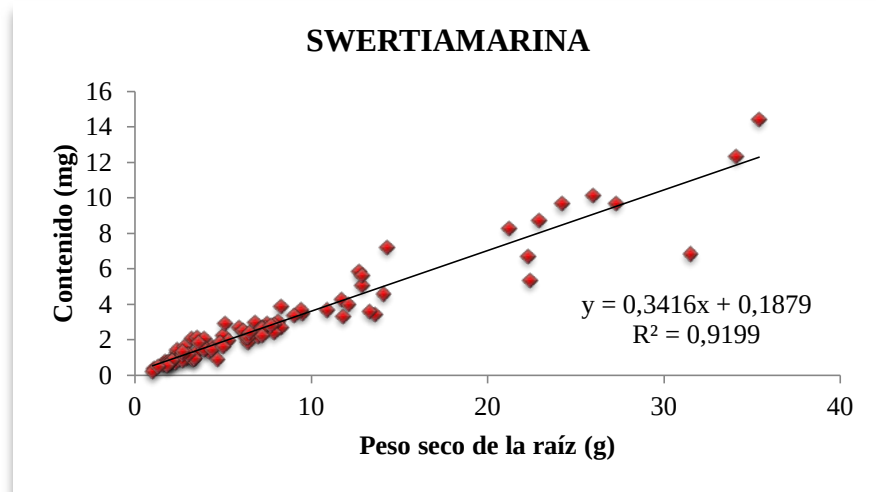
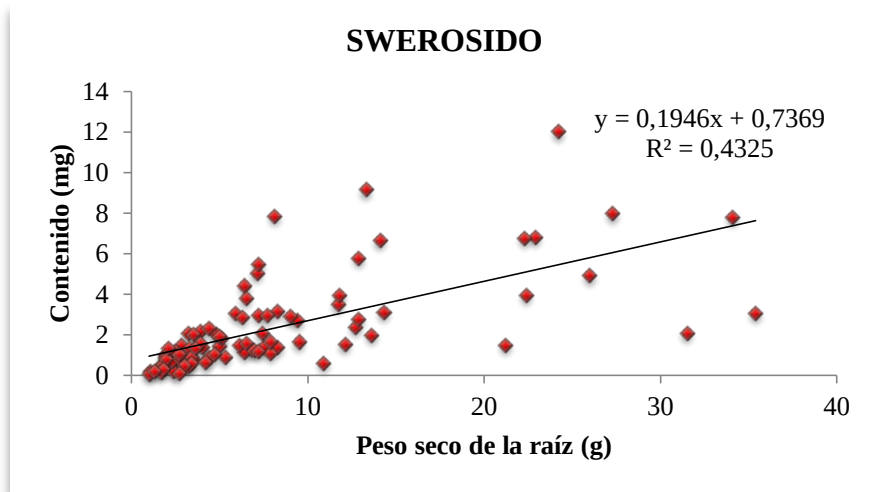
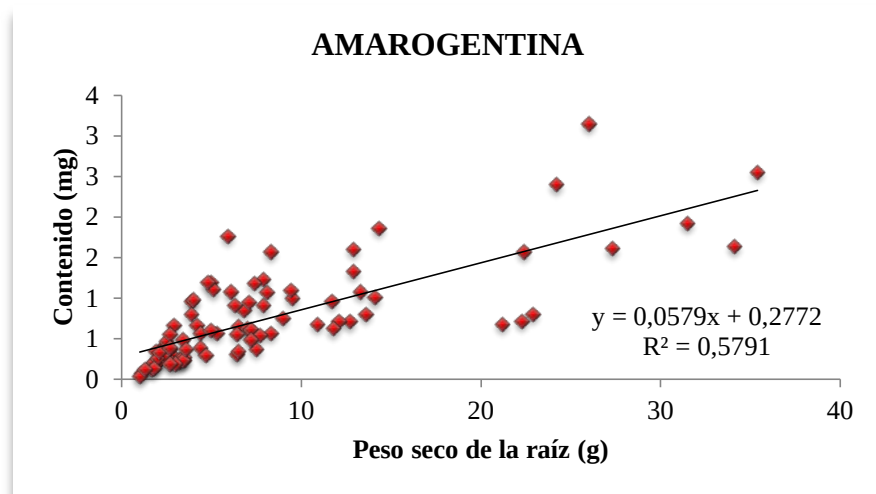
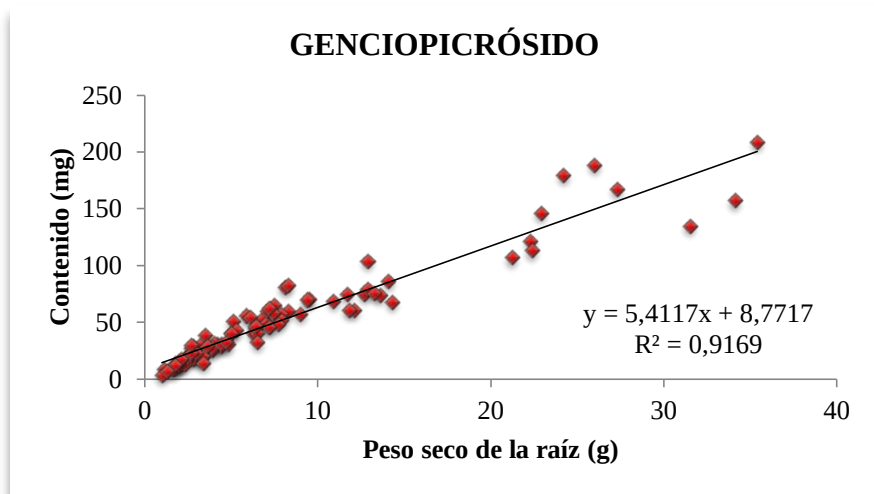


Figura 23: Representación gráfica de las recta de regresión lineal obtenidas para la relación: contenido del compuesto (genciopicrosido, amarogentina, swerosido y swertiamarina) y peso seco de las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* analizadas para la parcela de cultivo CT4.

4.2.3. Comparación parcelas CT3-CT4

En el siguiente apartado, se hace una comparación de los resultados obtenidos para las parcelas CT3 y CT4, con características edáficas y climatológicas diferentes, teniendo en cuenta que CT3 está localizada en una ubicación propicia, y donde la genciana crece de forma natural, mientras que para CT4 eso no sería posible.

Para los siguientes resultados, únicamente se han tenido en cuenta los resultados de los análisis HPLC realizados en CT3 y CT4 para el año 2012, tanto en las recolecciones de primavera como de otoño.

En la comparación de medias para los diferentes compuestos en relación a las parcelas estudiadas (Figura 25 y Figura 24), las concentraciones obtenidas para CT3, son significativamente superiores a las de CT4, tanto para el genciopicrosido (8,88 y 6,95%), como para la amarogentina (0,196 y 0,125%) y la swertiamarina (0,430 y 0,368%). Para el swerósido la concentración en CT4 (0,350%) es significativamente superior a la de CT3 (0,250%).

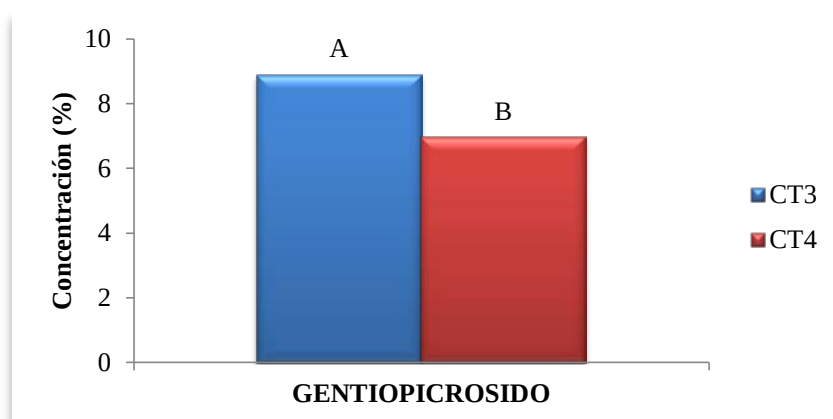


Figura 24: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido de raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en relación a la parcela de cultivo (CT3 y CT4). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

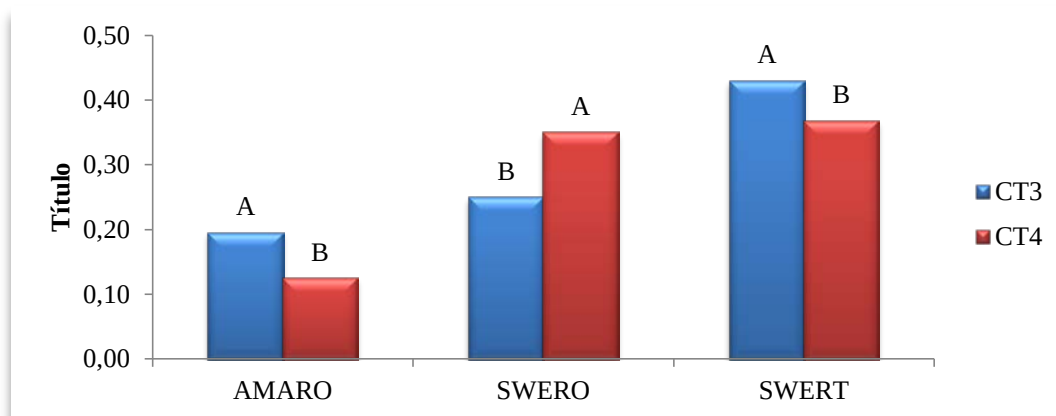


Figura 25: Comparación de medias para el contenido de amarogentina (AMARO), swerósido (SWERÓSIDO) y swertiamarina (SWERT) de raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en relación a la parcela de cultivo (CT3 y CT4).

Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes para cada diferentes compuesto. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

Realizado el análisis de correlación de Pearson para los diferentes compuestos amargos y los pesos secos de las raíces de genciana analizadas para las parcelas CT3 y CT4, existe una correlación altamente significativa ($<0,0001$), para la concentración de amarogentina y swertiamarina en relación al contenido en genciopicrosido, con coeficientes de correlación de 0,641 y 0,609 respectivamente. Igualmente esta correlación existe para el contenido de swertiamarina en relación al de amarogentina, con un valor de 0,499.

Teniendo en cuenta, tanto los pesos secos de las raíces analizadas para CT3 y CT4, así como las concentraciones de los compuestos amargos, y por tanto las cantidades que se almacenan en cada uno de los sistemas radicales, se han obtenido unas dispersiones de puntos. Tanto para el genciopicrosido como para la swertiamarina (Figura 26), estas dispersiones se ajustan a una recta de regresión con unos valores del coeficiente de determinación (R^2) de 0,925 para el genciopicrosido y de 0,911 para la swertiamarina. Para las dispersiones de puntos obtenidas para los otros dos compuestos analizados, tanto para la amarogentina como para el swerosido (Figura 26), los valores para el coeficiente de determinación de las rectas de regresión son inferiores, siendo este de 0,498 para la amarogentina, mientras que para el swerosido es de 0,622.

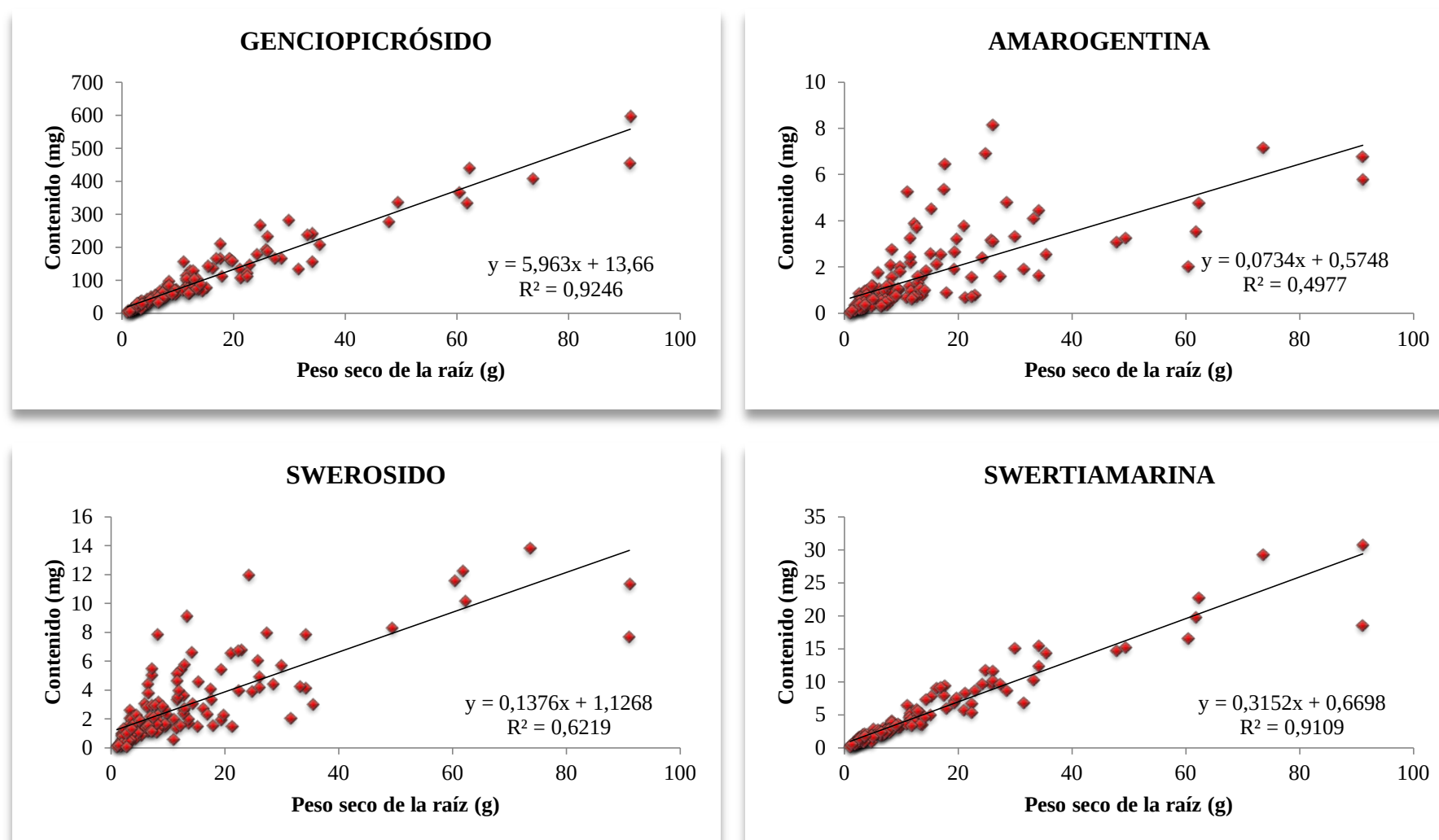


Figura 26: Representación gráfica de las recta de regresión lineal obtenidas para la relación: contenido del compuesto amargo (genciopicrosido, amarogentina, swerosido y swertiamarina) y peso seco de las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* analizadas para la parcela de cultivo CT3 y CT4.

4.3. POBLACIONES SILVESTRES

4.3.1. *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca*

Se han analizado un total de 32 poblaciones silvestres, de las cuales 18 pertenecen a la zona inicial de estudio, comarcas de Laciana, Babia y Omaña (LBO), y otras 14 a diferentes poblaciones silvestres, distribuidas por las montañas de León y Zamora, reunidas en el grupo resto de la Cordillera Cantábrica (RCC).

Los análisis de suelo realizados para estas poblaciones, muestran una estructura franco-arenosa de forma mayoritaria, con un pH medio para las poblaciones LBO del 4,24, y del 4,13 para las RCC. El contenido medio en materia orgánica para dichas poblaciones, este es del 16,57% para las LBO, mientras que para las RCC es del 12,50%. Los análisis completos para cada uno de los suelos pueden observarse en el ANEXO I. Tabla 1.

En la comparación de medias para las diferentes variables (Tabla 4) medidas sobre las raíces principales de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, al comparar las diferentes poblaciones silvestres muestreadas, ya sean LBO o RCC, existen diferencias significativas.

Respecto de las dimensiones de la raíz (Tabla 4), para su **diámetro** existen diferencias significativas siendo los mayores para las poblaciones LG45, LG47 y LG49, todas ellas de LBO, con valores medios de 38,60, 37,87 y 36,18 mm respectivamente. Por el contrario muchas de las poblaciones pertenecientes a RCC presentan valores significativamente inferiores, siendo para LG34, LG21 y LG31 significativamente más bajos, con 16,64, 21,92 y 21,97 mm respectivamente.

En cuanto al **grosor del córtex** (Tabla 4), este es significativamente mayor para LG45 y LG47, de 6,12 y 5,68 mm respectivamente, mientras que los menores grosores son para LG34, LG32 y LG31, con valores de 2,76, 3,02 y 3,05 mm, perteneciendo estas poblaciones al grupo RCC.

Para la relación grosor del **córtex/diámetro** de la raíz, los valores significativamente superiores son para la población LG33 (0,176), perteneciente a RCC, y las de LBO: LG44 y LG51, con valores de 0,175 y 0,173 respectivamente. Las poblaciones con menor valor fueron LG32 y LG39, ambas pertenecientes a RCC.

Para la concentración de los diferentes **compuestos amargos** para las diferentes poblaciones silvestres de la variedad *aurantiaca*: para **genciopicrosido**, las poblaciones con concentraciones significativamente superiores al resto son LG51, LG45 y LG34, con el 9,23, 8,29 y 8,24% respectivamente. Los valores significativamente inferiores corresponden a las poblaciones LG40 y LG50, con concentraciones de 5,16 y 5,41% respectivamente, siendo ambas poblaciones de LBO (Tabla 4).

Para la **amarogentina**, la mayor concentración y significativamente superior al resto es la de LG33, con el 0,053%, mientras que las menores son para LG24 y LG34 con el 0,014 y 0,015% respectivamente (Tabla 4).

En la comparación para el **swerósido**, la población con un valor significativamente superior al resto es LG49 (0,257%). La de menor valor es LG22, con el 0,066% (Tabla 4).

Por último, para la **swertiamarina**, son LG24 y la LG51 las poblaciones que presentan mayores concentraciones con el 0,572 y 0,507% respectivamente. Los menores valores son para LG23, LG31 y LG35, con el 0,238, 0,251 y el 0,258% (Tabla 4).

Tabla 4: Valores característicos de las raíces principales para las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

	POB	DIAMÉTRO	CÓRTEX	C/D	GENC	AMARO	SWERO	SWERT
LACIANA, BABIA Y OMAÑA (LBO)	LG16	28,753 abcde	4,375 abcd	0,148	7,411 abcdef	0,039 ab	0,236 ab	0,363 bcde
	LG17	30,742 abcde	4,632 abcd	0,152	5,925 cdef	0,019 b	0,158 abc	0,277 e
	LG18	29,963 abcde	4,782 abcd	0,164	7,226 abcdef	0,034 ab	0,117 abc	0,311 cde
	LG19	30,014 abcde	4,025 abcd	0,145	6,294 abcdef	0,036 ab	0,192 abc	0,383 bcde
	LG20	31,730 abcde	4,289 abcd	0,131	6,411 abcdef	0,022 b	0,144 abc	0,285 de
	LG40	25,611 cde	3,888 bcd	0,169	5,157 ef	0,030 ab	0,165 abc	0,281 de
	LG41	29,961 abcde	4,514 abcd	0,162	5,716 cdef	0,038 ab	0,194 abc	0,390 bcde
	LG42	30,734 abcde	3,922 bcd	0,134	6,035 bcdef	0,031 ab	0,187 abc	0,348 bcde
	LG43	29,253 abcde	4,442 abcd	0,152	7,528 abcd	0,029 ab	0,243 ab	0,319 cde
	LG44	26,170 abdce	4,100 abcd	0,173	6,817 abcdef	0,034 ab	0,111 abc	0,388 bcde
	LG45	38,599 a	6,117 a	0,159	8,290 ab	0,030 ab	0,129 abc	0,406 bcde
	LG46	30,810 abcde	4,926 abcd	0,162	6,755 abcdef	0,028 ab	0,202 abc	0,459 abc
	LG47	37,869 ab	5,679 ab	0,145	6,568 abcdef	0,024 b	0,139 abc	0,312 cde
	LG48	29,854 abcde	4,208 abcd	0,137	7,479 abcde	0,027 ab	0,243 ab	0,308 cde
	LG49	36,178 abc	5,112 abc	0,145	7,280 abcdef	0,028 ab	0,257 a	0,448 abcd
	LG50	31,022 abcde	4,969 abc	0,172	5,411 def	0,017 b	0,101 abc	0,299 cde
	LG51	30,369 abcde	5,291 abcd	0,175	9,231 a	0,024 ab	0,308 ab	0,507 ab
	LG52	30,577 abcde	3,915 bcd	0,133	5,677 cdef	0,020 b	0,202 abc	0,287 de
RESTO C. CANTABRICA (RCC)	LG21	21,917 de	3,078 cd	0,125	6,849 abcdef	0,027 ab	0,136 abc	0,279 de
	LG22	25,082 cde	3,630 bcd	0,146	7,264 abcdef	0,018 b	0,066 c	0,323 cde
	LG23	27,778 abcde	3,791 bcd	0,133	6,625 abcdef	0,017 b	0,099 abc	0,238 e
	LG24	25,953 bcde	3,426 cd	0,124	7,863 abc	0,014 b	0,128 abc	0,572 a
	LG25	28,931 abcde	4,161 abcd	0,141	7,421 abcdef	0,021 b	0,222 abc	0,365 bcde
	LG31	21,968 de	3,046 cd	0,139	7,513 abcde	0,037 ab	0,237 ab	0,251 e
	LG32	23,569 cde	3,022 cd	0,110	7,565 abcd	0,040 ab	0,101 abc	0,303 cde
	LG33	24,129 cde	3,589 bcd	0,176	7,657 abcd	0,053 a	0,143 abc	0,302cde
	LG34	19,644 e	2,765 d	0,144	8,237 ab	0,015 b	0,203 abc	0,312 cde
	LG35	27,543 abcde	3,811 bcd	0,134	6,171 abcdef	0,024 b	0,085 bc	0,258 e
	LG36	24,517 cde	3,317 cd	0,139	7,950 abc	0,041 ab	0,097 abc	0,309 cde
	LG37	31,801 abcde	4,175 abcd	0,144	5,145 f	0,020 b	0,193 abc	0,269 e
	LG38	25,528 bcde	3,398 cd	0,133	7,270 abcdef	0,023 b	0,185 abc	0,400 bcde
	LG39	33,317 abcd	4,187 abcd	0,112	7,857 abc	0,022 b	0,086 bc	0,296 cde

DIAMÉTRO, grosor del CÓRTEX, relación entre córtex/diámetro (C/D), y concentración en porcentaje para

Una vez obtenidos los componentes principales, el porcentaje acumulado de la varianza explicada para los tres primeros es del 56,56%, de modo que para el primero de los componentes principales el porcentaje explicado es del 31,57%, del 14,16% para el segundo y 10,83% para el tercero (Tabla 5).

Tabla 5: Valores propios para los diferentes componentes principales y varianza explicada para cada uno de ellos en el análisis de componentes principales para las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

COMPONENTE PRINCIPAL	VALORES PROPIOS	% DE VARIANZA EXPLICADA	%ACUMULADO
1	4,10	31,57	31,57
2	1,84	14,16	45,73
3	1,40	10,83	56,56
4	1,37	10,55	67,12
5	1,11	8,55	75,67
6	1,08	8,29	83,96
7	0,64	4,93	88,89
8	0,49	3,81	92,70
9	0,43	3,34	96,04
10	0,32	2,44	98,48
11	0,17	1,34	99,81
12	0,02	0,16	99,98
13	0,003	0,02	100

Rotados los componentes principales obtenidos, para una más fácil interpretación, utilizando para ello el método de Normalización Varimax, se obtiene una matriz de valores de saturación para cada uno de los componentes principales (Tabla 6), donde se observa como para el primero de los componentes (Dim-1) son LIMO, ARENA, CÓRTEX, DIÁMETRO, %CÓRTEX y ALTITUD las variables que tienen un mayor peso para dicho componente.

Para Dim-2 (Tabla 6), son la SWERTIAMARINA, ALTITUD, SWERÓSIDO y GENCIOPICRÓSIDO las variables que aportan un mayor peso, mientras que para Dim-3 estas variables son AMAROAGENTINA y DIAMETRO.

Tabla 6: Valores de saturación de las variables para cada uno de los componentes principales rotados en el análisis de componentes principales para las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

	Dim-1	Dim-2	Dim-3
DIAMETRO	0,6346	0,0862	-0,6336
CÓRTEX	0,7035	0,2533	-0,4657
%CÓRTEX	0,4986	0,3464	0,2094
ALTITUD	0,4674	0,7022	-0,0968
GENCIOPICRÓSIDO	-0,3539	0,5352	0,2347
AMAROAGENTINA	0,169	0,1122	0,7409
SWERÓSIDO	0,3024	0,6417	0,1158
SWERTIAMARINA	0,0517	0,8052	-0,1718
ARENA	-0,9044	-0,0045	-0,1072
LIMO	0,9103	0,1103	-0,0006
ARCILLA	-0,0399	-0,3815	0,4456
PH	0,0566	-0,2226	0,1244
MAT.ORGÁNICA	0,0513	0,2822	0,0294

En la Figura 27 y Figura 28 se representan gráficamente de forma bidimensional el peso de cada variable para cada uno de los componentes principales.

De este modo cuando se comparan el componente principal 1 (Dim 1) y el componente principal 2 (Dim 2), la variable que tiene una mayor aportación a ambos componentes es ALTITUD y en parte SWERÓSIDO. También se puede observar como los pares SWERIAMARINA-ARCILLA para Dim 2 como ARENA-LIMO para Dim 1 tienen valores contrapuestos.

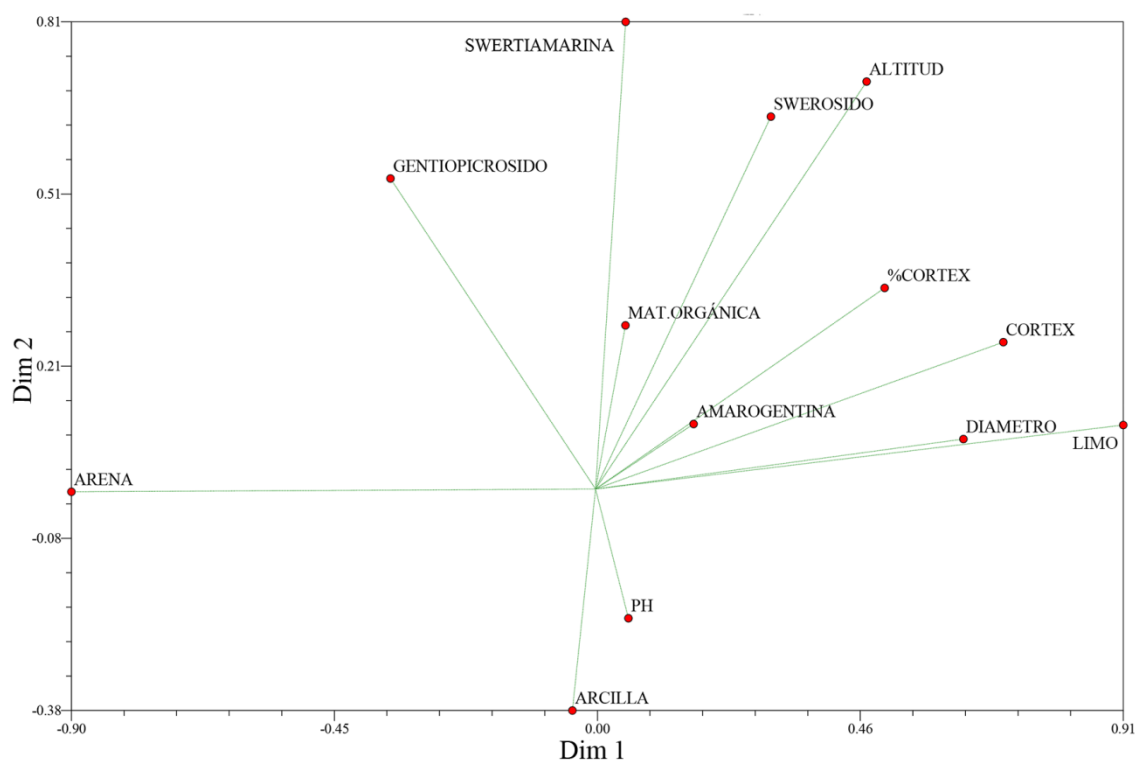


Figura 27: Representación gráfica bidimensional rotado del peso de las variables estudiadas para cada uno de los componentes principales (Dim). (Dim 1 Vs Dim 2) en el análisis de componentes principales para las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

Para la Figura 28, tanto DIAMETRO como CÓRTEX son las variables que más peso aportan en la comparación de dimensión1 (Dim 1) y dimensión3 (Dim 3), de modo, que al igual que para la Figura 27, ARENA y LIMO tienen posiciones contrapuestas, destacando también el valor de AMAROGENTINA.

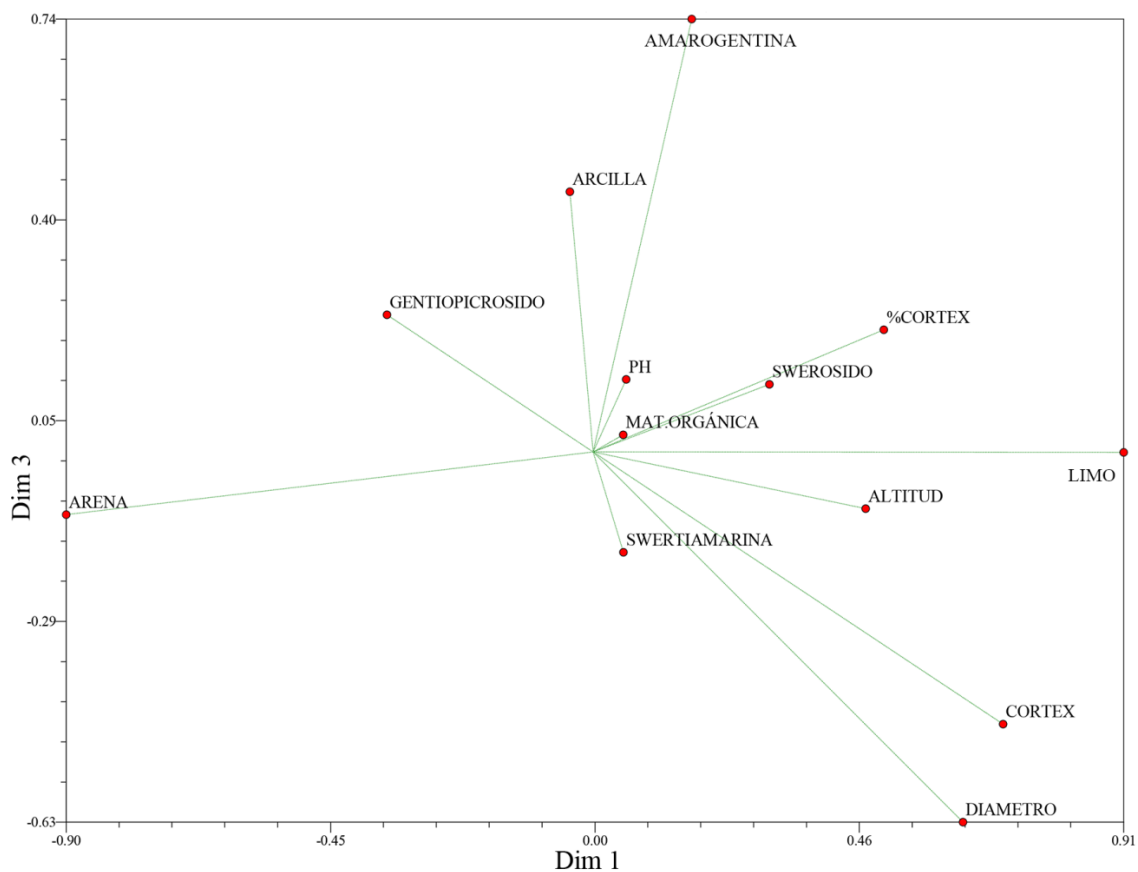


Figura 28: Representación gráfica bidimensional rotado del peso de las variables estudiadas para cada uno de los componentes principales (Dim). (Dim 1 Vs Dim 3) en el análisis de componentes principales para las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

Cuando se representan gráficamente las diferentes poblaciones silvestres de la variedad *aurantiaca*, las cuales constituyen las unidades básicas de caracterización en el ACP, sobre los componentes rotados, se observa, que cuando se comparan con los componentes principales uno y dos (Dim 1 vs Dim 2), (Figura 29), se forman dos grupos separados en función del primero de los componentes, de modo que las poblaciones pertenecientes a LBO, incluyéndose la 25 y la 37, forman un grupo, mientras que las restantes poblaciones de RCC forman otro grupo.

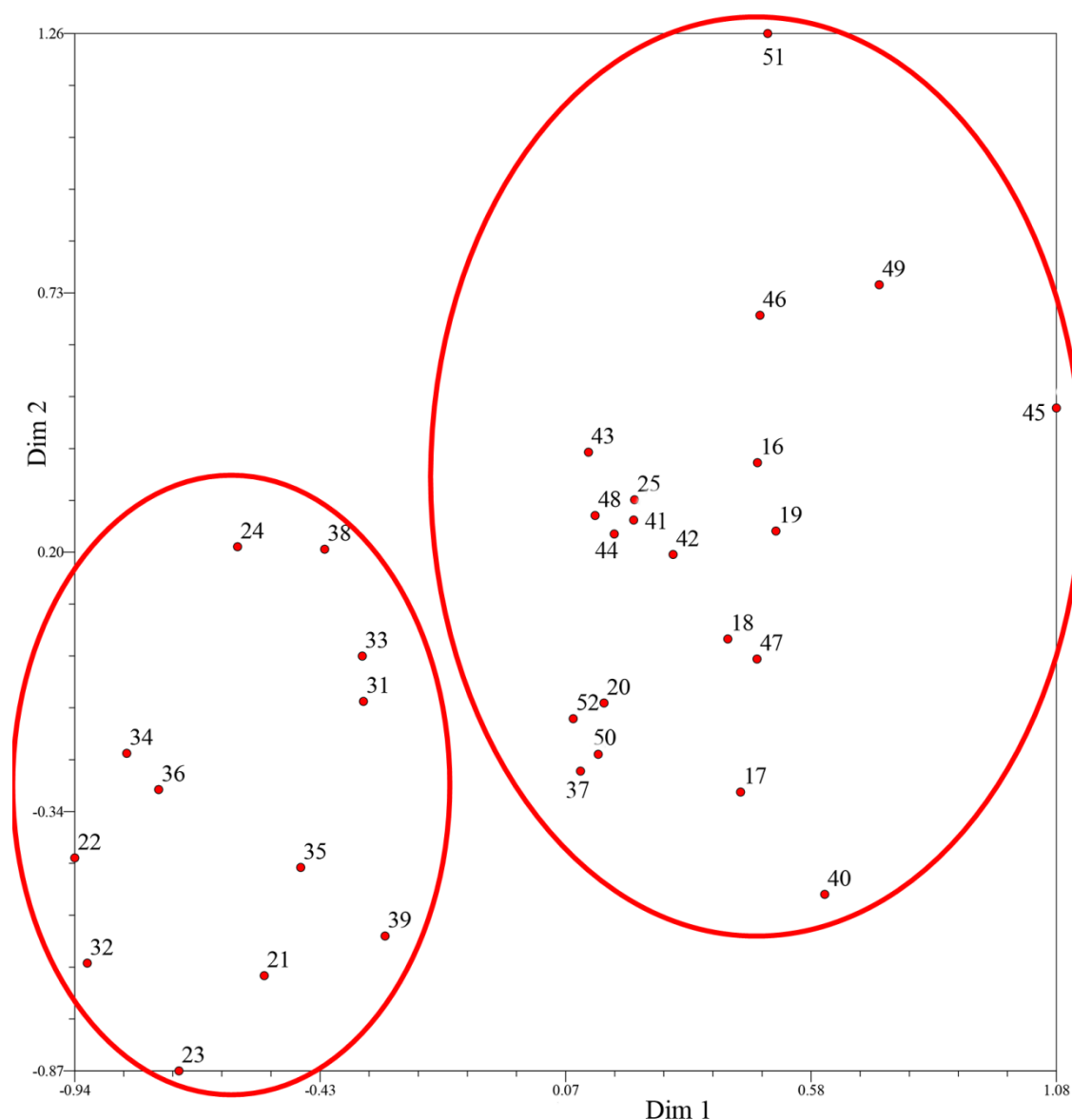


Figura 29: Diagrama de dispersión bidimensional de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* sobre los componentes rotados (Dim) (Dim 1 Vs Dim 2). El n° de la población coincide con el de la población LG de la Tabla 1.

Cuando se enfrentan Dim 1 vs Dim 3 (Figura 30), el resultado es el mismo que para Figura 29, de modo que se forman también dos grupos en función de Dim 1, siendo que las poblaciones pertenecientes a LBO, incluyendo de nuevo a las poblaciones 25 y 37, las cuales pertenecen a RCC, forman un grupo, mientras que las restantes poblaciones de RCC forman otro grupo.

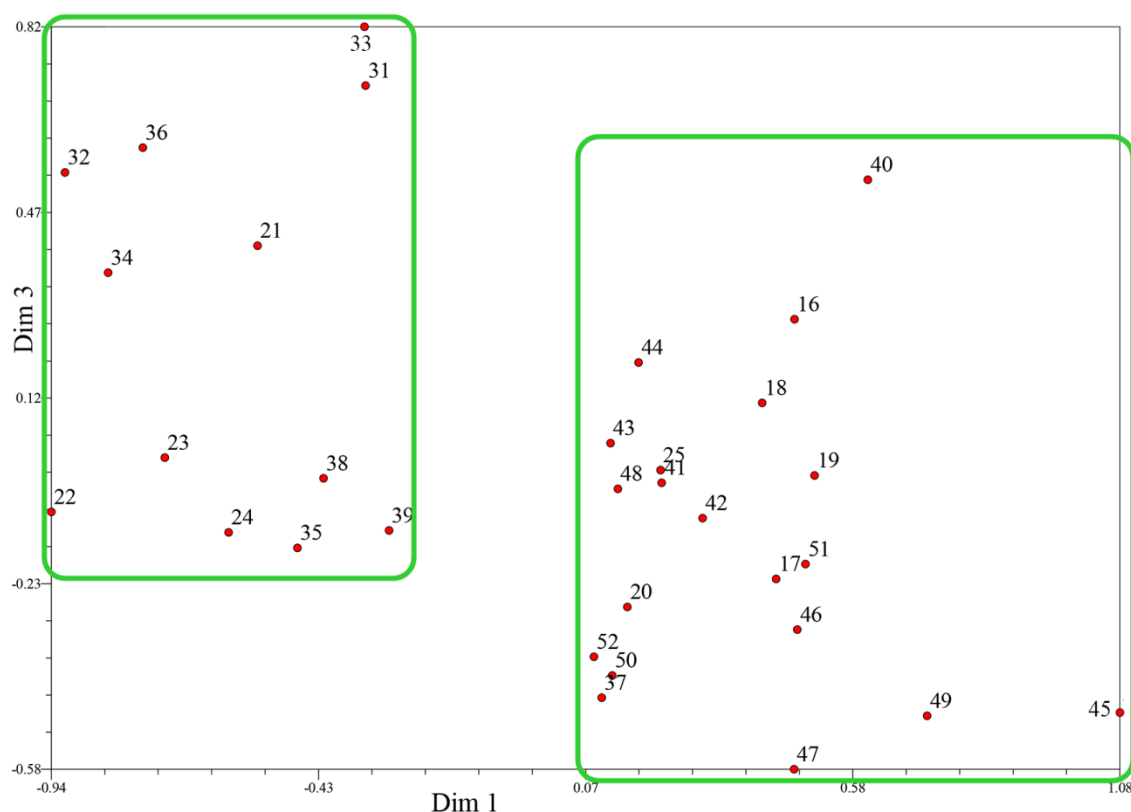


Figura 30: Diagrama de dispersión bidimensional de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* sobre los componentes rotados (Dim) (Dim 1 Vs Dim 3). El n° de la población coincide con el de la población LG de la Tabla 1.

Realizado el análisis de correlación de Pearson para las diferentes variables tenidas en cuenta en el análisis de componentes principales (Tabla 2) para las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* analizadas, se observan diferentes correlaciones significativas.

En cuanto a la morfología de la raíz, existe una correlación altamente significativa ($<0,0001$) del grosor del córtex en relación al diámetro de la raíz, con un valor de 0,848, pero no así para el porcentaje del córtex en relación al diámetro de la raíz. Además, existe una correlación altamente significativa ($<0,001$) entre el grosor del córtex y la altitud de las poblaciones de genciana, siendo el valor de la correlación de 0,469.

En cuanto a los compuestos amargos, existe una correlación significativa ($>0,05$) entre el porcentaje del córtex y del contenido de amarogentina, con un valor de 0,357, siendo, para el mismo grado de significancia el valor de la correlación entre el contenido de

amarogentina y el diámetro de la raíz de -0,359. Este mismo grado de significancia existe entre la altitud de la población y los contenidos de swerósido y swertiamarina, con valores de correlación del 0,394 y 0,472.

Cuando se correlacionan los contenidos de arcilla, arena y limo con los valores propios de las dimensiones de las raíces, se observan correlaciones altamente significativas para el grosor del córtex en relación al contenido en limo y arena del suelo, con un valor de 0,492 para el primero y de -0,413 para el segundo. Igualmente, existen correlaciones significativas ($<0,05$) entre el contenido en limo y arena, respecto del diámetro de las raíces, con valores de 0,402 y -0,329 respectivamente.

Por último, se observa una correlación altamente significativa ($<0,001$) para el contenido de genciopicrosido en relación a la presencia de boro, con un valor de 0,496; y una correlación significativa ($<0,05$) entre el contenido de limo y el contenido de swerósido, con un valor de 0,353.

4.3.1.1. RELACIÓN SEGÚN DESARROLLO

Cuando se analizan por separado las diferentes partes de la raíz en función de su desarrollo y por tanto de su edad (rizoma, raíces principales y raíces secundarias), en la comparación de medias para los diferentes compuestos amargos característicos de la genciana, se observan diferencias significativas (Figura 31 a Figura 33).

En la comparación de medias para el **genciopicrosido** (Figura 31), se puede observar como el contenido de este compuesto en el rizoma (RV), con un valor del 7,10%, se muestra significativamente superior al de la raíz principal (RC), del 6,14%, y al de las raíces secundarias (RL), con un 5,93%, no siendo los dos últimos valores significativamente diferentes entre sí.



Figura 31: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido de raíces de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en relación a su desarrollo (RL, RC y RV). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. RL: raíces secundarias; RC: Raíz principal; RV: rizoma.

Para la **amarogentina**, en la comparación de medias se observa como el valor obtenido para RL (0,087%) es significativamente superior tanto al de RC (0,029%) como al de RV (0,040%), que no se muestran significativamente diferentes entre sí (Figura 32).

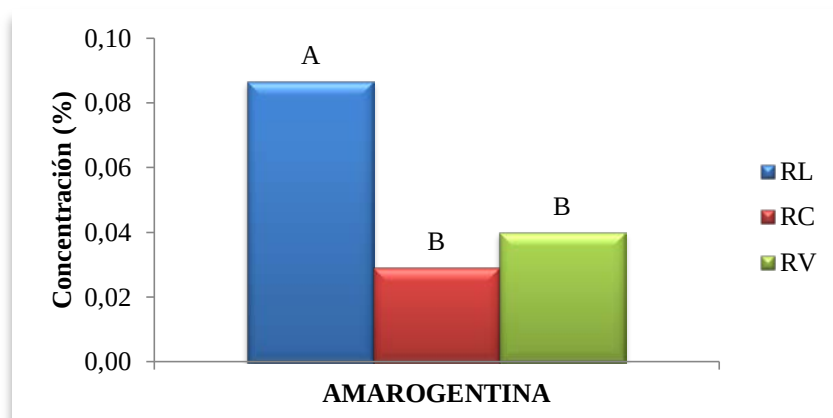


Figura 32: Comparación de medias para el contenido de amarogentina de raíces de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en relación a su desarrollo (RL, RC y RV). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. RL: raíces secundarias; RC: Raíz principal; RV: rizoma.

Para el **swerósido** (Figura 33), no se observan diferencias significativas para los valores de los diferentes tipos de raíz, siendo los valores para RL, RC y RV del 0,143, 0,120 y 0,171% respectivamente.

Por último, para la **swertiamarina** (Figura 33) el valor de concentración para RL, con un valor de 0,291% se muestra significativamente inferior al de RC (0,372%) y al de RV (0,371%), que no son significativamente diferentes entre ambos.

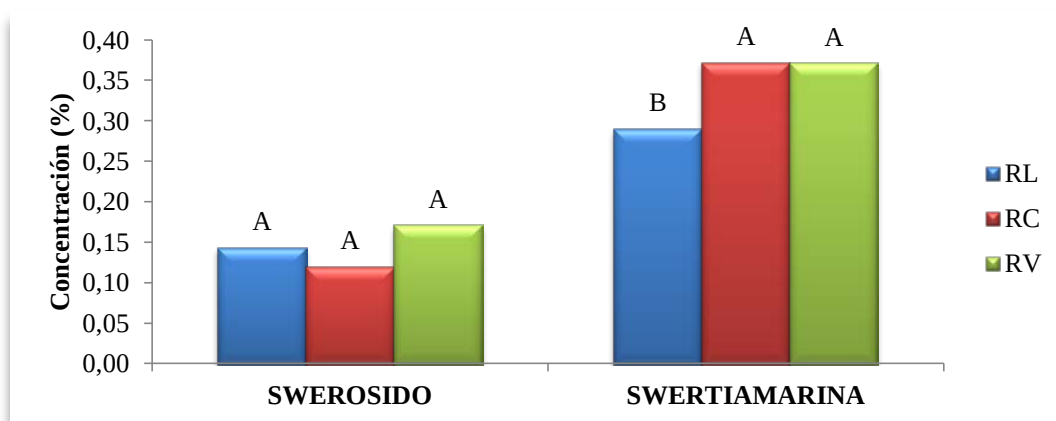


Figura 33: Comparación de medias para el contenido de swerósido y swertiamarina de raíces de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en relación a su desarrollo (RL, RC y RV). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes para cada compuesto. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. RL: raíces secundarias; RC: Raíz principal; RV: rizoma.

4.3.1.2. RELACIÓN CÓRTEX – XILEMA

Diferenciadas las partes del sistema radicular (rizoma, raíces principales y raíces secundarias), para las plantas recolectadas de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, y medidos tanto el diámetro como el grosor del córtex, se observan diferencias significativas para las comparaciones de medias.

Cuando la comparación de medias se realiza para el **diámetro de la raíz** en función de las partes del sistema radicular se observa cómo, el diámetro del rizoma, con un valor medio de 36,6 mm resulta ser significativamente superior al de las raíces principales (28,1 mm) y estas respecto de las raíces secundarias (12,5 mm) (Figura 34).

En la comparación para el **grosor del córtex** (Figura 34), las raíces secundarias presentan, con 1,99 mm, un valor significativamente inferior al de raíces principales y el rizoma, con valores de 4,19 y 4,55 mm respectivamente

Por último, en la relación grosor del **córtex/diámetro** de la raíz para las partes descritas, se observa que en este caso el valor es significativamente superior para las raíces secundarias (15,91%) y principales (15,02%) respecto del rizoma (12,53%) (Figura 34).

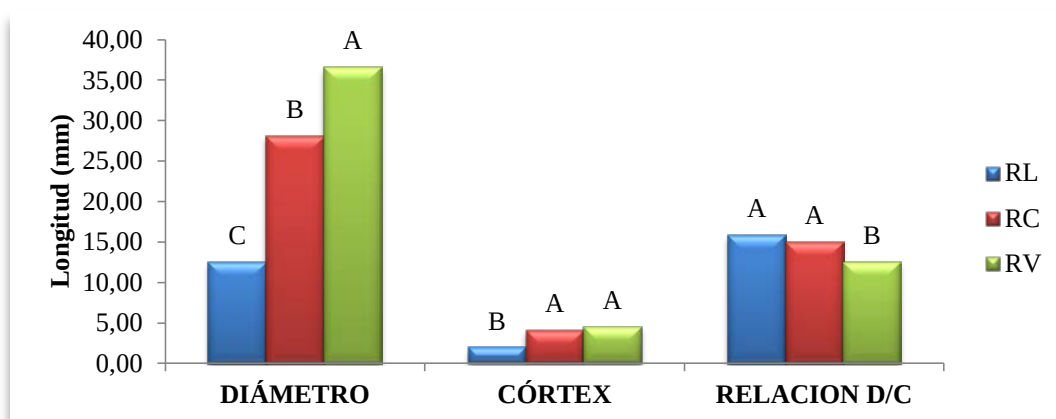


Figura 34: Comparación de medias para el DIÁMETRO, grosor del córtex (CÓRTEX) y relación entre ambos (RELACIÓN D/C) para las raíces de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en relación a su desarrollo (RL, RC y RV). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes para cada carácter. (P=0,05) de acuerdo con DMS. RL: raíces secundarias; RC: Raíz principal; RV: rizoma.

Cuando se analizaron por separado el córtex (EXT), incluyendo la peridermis, y el xilema (INT) para los diferentes compuestos amargos, la comparación de medias para los valores obtenidos, muestran diferencias significativas para la concentración compuestos analizados (Figura 35 y Figura 36).

En la comparación de medias para cada uno de los compuestos amargos, se observan diferencias significativas, siendo en todos ellos la concentración en el córtex significativamente superior a la del xilema.

En este sentido, para el **genciopicrosido** (Figura 35), el valor para EXT es del 7,19% mientras que para INT es del 5,38%.

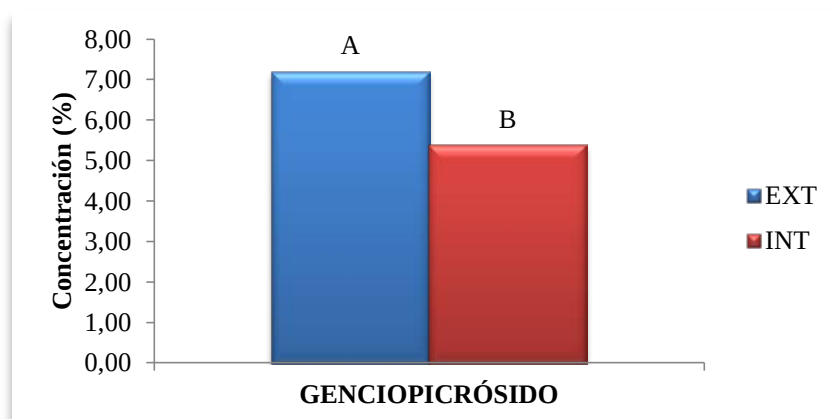


Figura 35: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido de raíces de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en relación a sus diferentes partes (EXT, INT). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. EXT: córtex; INT: xilema.

Cuando la comparación de medias se realiza para la concentración de **amarogentina**, **swerósido** y **swertiamarina** (Figura 36), el valor de la amarogentina para EXT es de 0,088%, mientras que para INT es del 0,024%. En el mismo orden, para el swerósido los porcentajes son del 0,174% y del 0,108%, mientras que para la swertiamarina estos valores son del 0,370 y del 0,309% respectivamente.

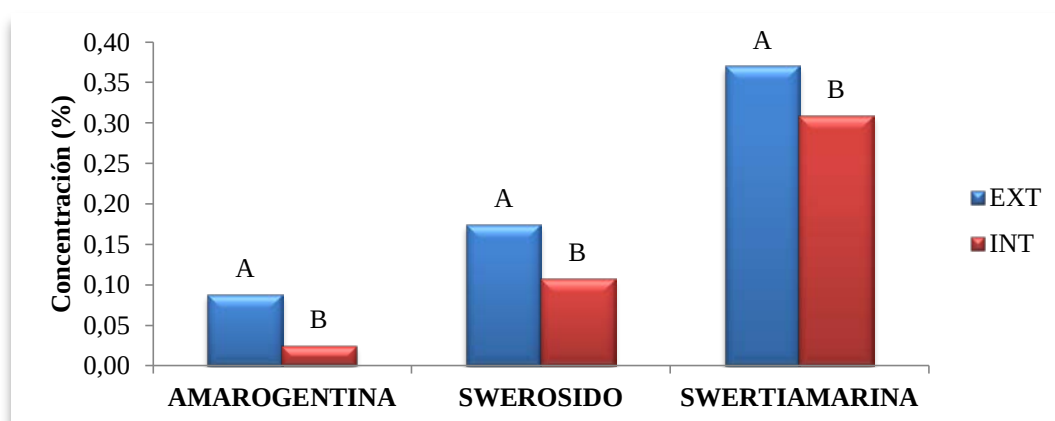


Figura 36: Comparación de medias para el contenido de amarogentina, swerósido y swertiamarina de raíces de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en relación a sus diferentes partes (EXT, INT). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes para cada compuesto. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. EXT: córtex; INT: xilema.

4.3.1.3. RELACION DESARROLLO – CÓRTEX/XILEMA

Por último, se describen los resultados obtenidos combinando tanto el desarrollo de la raíz como las diferentes partes de ésta, de modo, que para cada una de las divisiones realizadas en cuanto a su desarrollo (rizoma (V), principal (C) y secundaria (L)), todas ellas, a su vez están diferenciadas en córtex (E) y xilema (I).

Para el análisis de varianza combinado de la concentración de **genciopicrosido** presente para las divisiones de las raíces en función de sus partes y su desarrollo (Figura 37), en la comparación de medias, se observan diferencias significativas, de modo, que tanto CE

cómo VE se muestran significativamente superiores al resto con porcentajes del 7,65 y 7,67% respectivamente. El valor de LE (6,56%), aunque significativamente inferior a los anteriores se muestra significativamente superior al resto excepto VI (6,02%), siendo por tanto significativamente superior al valor obtenido para la LI (5,62%) y CI (4,88%)

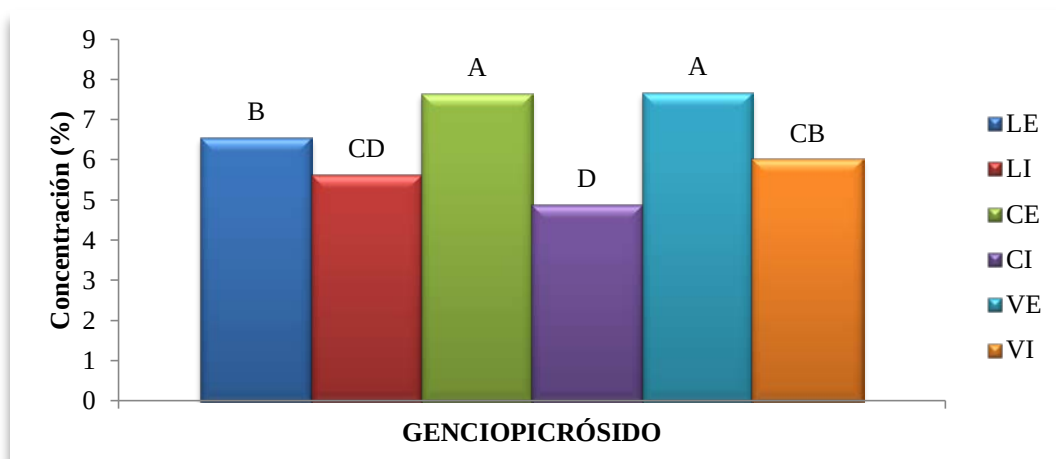


Figura 37: Comparación de medias para el contenido de genciopicrosido en el análisis de varianza combinado para el desarrollo y partes de la raíz (LE, LI, CE, CI, VE y VI) de raíces de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. LE: secundaria córtex; LI: secundaria xilema; CE: Principal exterior; CI: principal xilema; VE: rizoma exterior VI: rizoma xilema.

Quando el análisis se realiza para la **amarogentina** (Figura 38), el valor de LE es significativamente mayor al del resto de las muestras analizadas, con un 0,136%, siendo los menores valores para CI y VI, con una concentración del 0,012% para ambos. En todos los tipos de raíces, el valor de la concentración para el córtex ha resultado ser superior al correspondiente del xilema, al igual que para el resto de compuestos (Figura 37 a Figura 40).

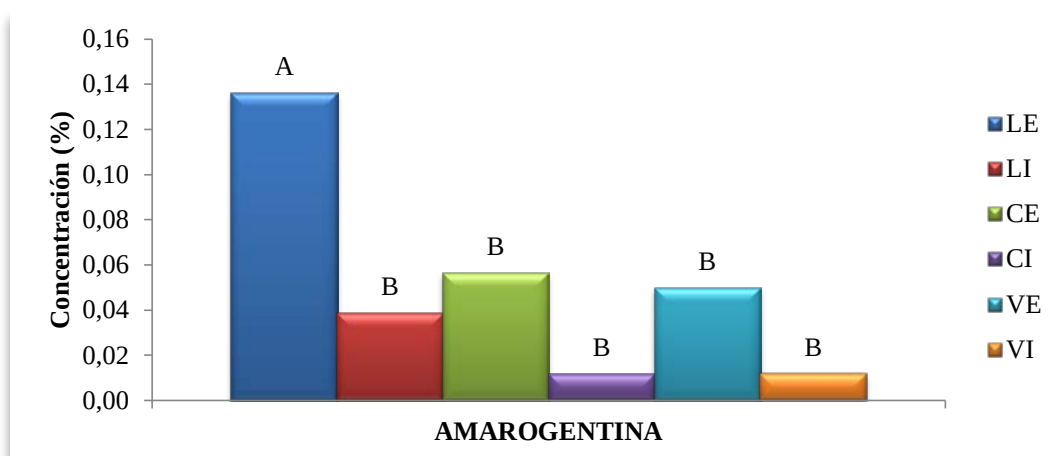


Figura 38: Comparación de medias para el contenido de amarogentina en el análisis de varianza combinado para el desarrollo y partes de la raíz (LE, LI, CE, CI, VE y VI) de raíces de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. LE: secundaria córtex; LI: secundaria xilema; CE: Principal exterior; CI: principal xilema; VE: rizoma exterior VI: rizoma xilema.

En el análisis de varianza combinado para la concentración de **swerósido** para las diferentes divisiones de la raíz (Figura 39), en la comparación de medias, se observan diferencias significativas, siendo el valor de la concentración para VE (0,220%) significativamente mayor que el de VI (0,098%) y CI (0,087%) pero no del resto. Las diferencias entre las concentraciones del córtex y el xilema aumentan con la edad de la raíz siendo esta diferencia del 22,4% para L, del 44,7% para C y del 55,3% para V.

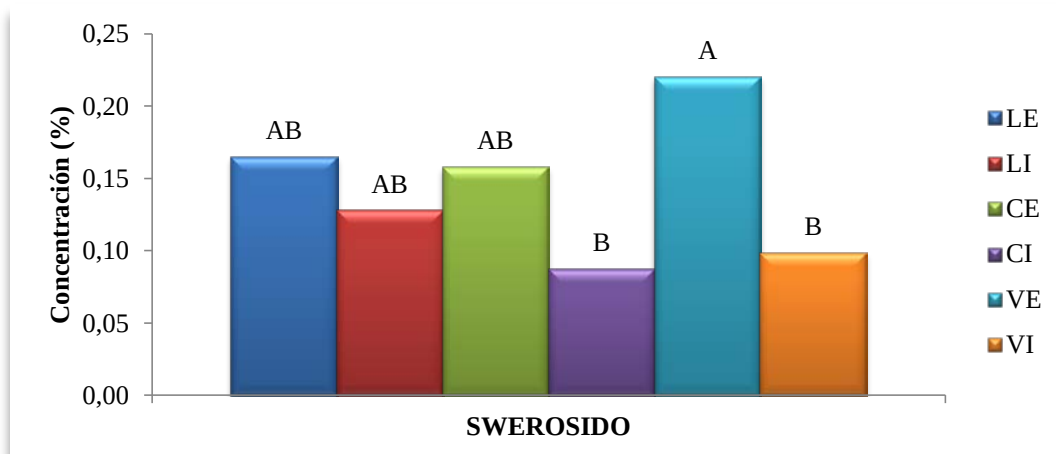


Figura 39: Comparación de medias para el contenido de swerósido en el análisis de varianza combinado para el desarrollo y partes de la raíz (LE, LI, CE, CI, VE y VI) de raíces de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. LE: secundaria córtex; LI: secundaria xilema; CE: Principal exterior; CI: principal xilema; VE: rizoma exterior VI: rizoma xilema.

Por último, en el análisis de varianza combinado para la concentración de **swertiamarina** y las diferentes divisiones de la raíz (Figura 40), en la comparación de medias se observa como únicamente el valor para CE (0,422%) presenta diferencias significativas respecto de LI, que presenta el menor valor, con un 0,275%).

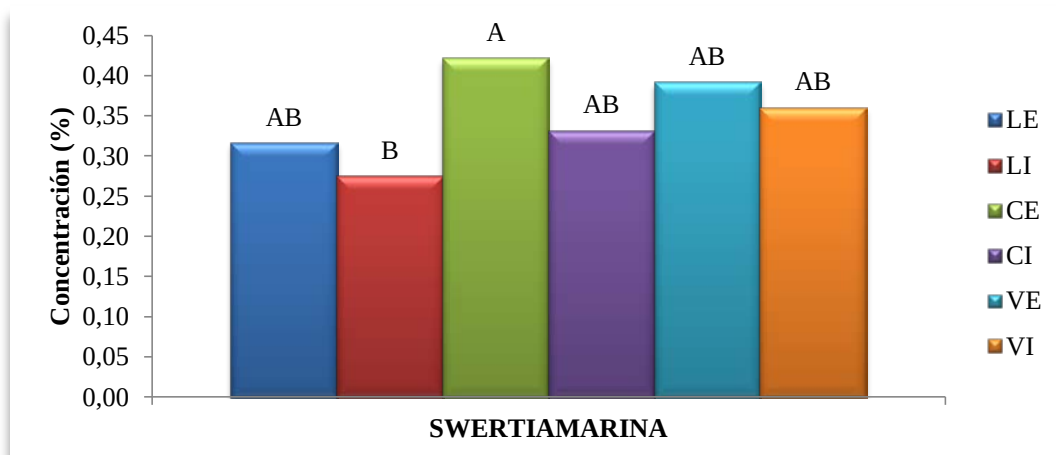


Figura 40: Comparación de medias para el contenido de swertiamarina en el análisis de varianza combinado para el desarrollo y partes de la raíz (LE, LI, CE, CI, VE y VI) de raíces de las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*. Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS. LE: secundaria córtex; LI: secundaria xilema; CE: Principal exterior; CI: principal xilema; VE: rizoma exterior VI: rizoma xilema.

4.3.2. *Gentiana lutea* L. subsp. *lutea*

Los resultados para estas 15 poblaciones silvestres, procedentes de la vertiente española de los Pirineos, recolectando un solo individuo para cada una, se pueden ver en la Tabla 7. Los análisis de suelos de estas poblaciones se pueden observar en ANEXO I. Tabla 2.

Tabla 7: Concentración de los diferentes compuestos amargos para las raíces de *G. lutea* L. subsp. *lutea* provenientes de los Pirineos, y su valor medio.

	Genciopicrosido %	Amarogentina %	Swerósido %	Swertiamarina %
PIR01	6,20	0,023	0,513	0,264
PIR02	8,45	0,013	0,155	0,307
PIR03	6,75	NS	0,077	0,273
PIR04	10,80	0,011	0,072	0,338
PIR05	7,23	0,017	0,104	0,361
PIR06	5,77	0,023	0,067	0,269
PIR07	7,23	0,011	0,078	0,271
PIR08	7,38	0,008	0,060	0,289
PIR09	6,00	0,026	0,198	0,263
PIR10	5,31	0,004	0,164	0,218
PIR11	8,06	NS	0,107	0,257
PIR12	6,98	0,016	0,080	0,288
PIR13	6,50	0,023	0,260	0,279
PIR14	6,46	0,003	0,112	0,264
PIR15	8,15	0,017	0,088	0,269
MEDIA	7,15	0,015	0,142	0,281

4.3.3. *Gentiana lutea* L. subsp. *vardjanii*

Los resultados obtenidos para las poblaciones silvestres pertenecientes a la subespecie *vardjanii*, provenientes de los Alpes Dolomitas, muestran diferencias significativas para los contenidos en los diferentes compuestos amargos característicos de la *G. lutea* L.

En la comparación de medias para la concentración de **genciopicrosido** (Figura 41), BRENTONICO es la de mayor concentración, con un 9,04%, siendo este valor significativamente superior al de PELLER, que únicamente contiene un 7,07%. Las concentraciones de genciopicrosido para BONDONE y TREMALZO, del 8,76 y 8,16% respectivamente, no se muestran significativamente diferentes respecto del resto.

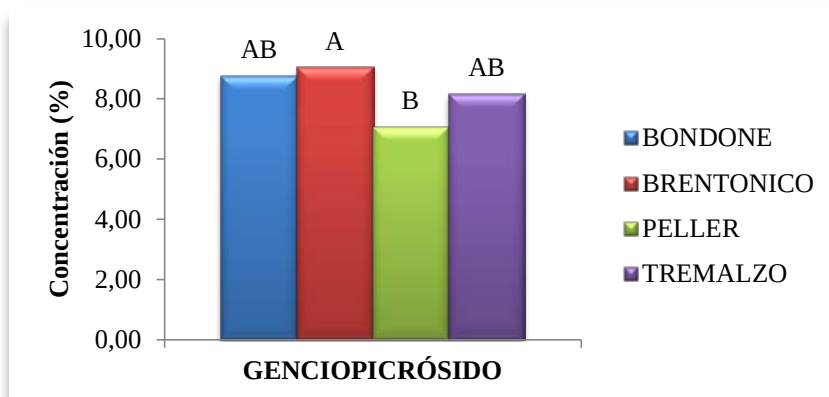


Figura 41: Comparación de medias para el contenido de GENCIOPICRÓSIDO de las raíces de *G. lutea* L. subsp. *vardjanii* respecto su origen (Bondone, Brentónico, Peller y Tremalzo). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. (P=0,05) de acuerdo con DMS.

Cuando la comparación se realiza para la concentración de **amarogentina** (Figura 42), tanto los valores obtenidos tanto para PELLER (0,040%) como para TREMALZO (0,043%) se muestran significativamente superiores a los de BONDONE y BRENTONICO, con concentraciones de 0,130 y 0,160% respectivamente.

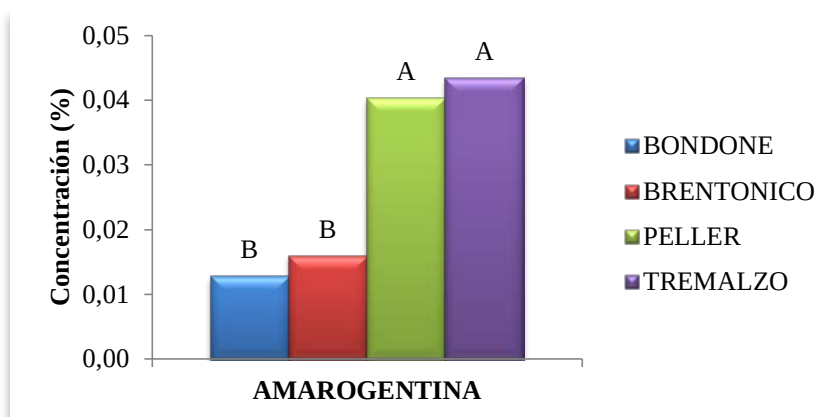


Figura 42: Comparación de medias para el contenido de AMAROGENTINA de las raíces de *G. lutea* L. subsp. *vardjanii* respecto su origen (Bondone, Brentónico, Peller y Tremalzo). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

Por último, en la comparación de medias para las concentraciones de swerósido y swertiamarina, para el primero de los compuestos (Figura 43), la concentración de **swerósido** para las diferentes poblaciones provenientes de los Alpes Dolomitas, no presentan diferencias significativas en cuanto a dicho compuesto, siendo el valor de la concentración superior para BONDONE, con un 0,163%, mientras que la menor es para PELLER, con únicamente el 0,058%

Para la **swertiamarina** (Figura 43) las significancias observadas son las mismas que para el genciopicrosido (Figura 41), de modo que el valor para BRENTONICO (0,373%) se muestra significativamente superior al obtenido para PELLER (0,294%). Tanto BONDONE (0,333%) como TREMALZO (0,350%) no se muestran significativamente diferentes al resto.

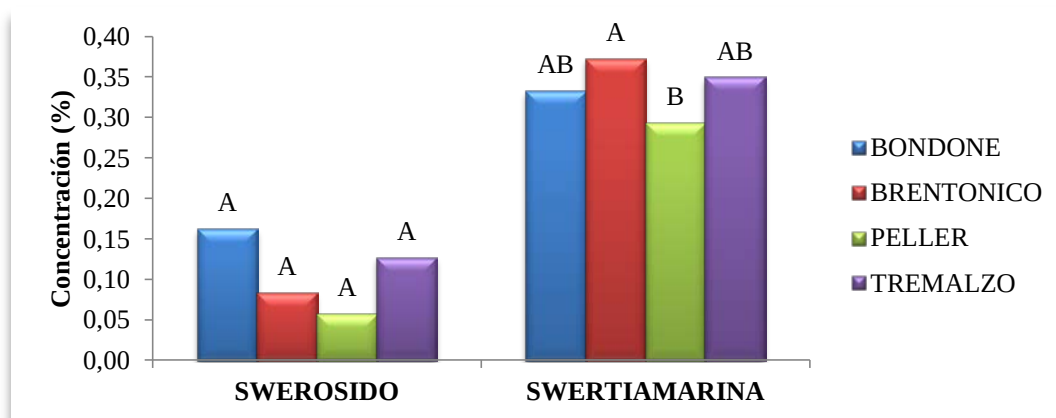


Figura 43: Comparación de medias separados para el contenido de swerósido y swertiamarina de las raíces de *G. lutea* L. subsp. *vardjanii* respecto su origen (Bondone, Brentónico, Peller y Tremalzo). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes para cada compuesto. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

4.4. COMPARACIÓN ENTRE ORÍGENES

Como ya se ha descrito anteriormente, tanto la genciana cultivada, en este caso en montaña (CT3) como aquella recolectada de poblaciones silvestres en el noroeste de la Península Ibérica denominadas como LBO y RCC pertenecen a la variedad *aurantiaca*. En el caso de la genciana proveniente de los Pirineos (PIRINEOS), se trata de la subespecie *lutea* mientras que la recogida en los DOLOMITAS pertenece a la subespecie *vardjanii*.

Los resultados utilizados en este apartado para los diferentes orígenes, y por tanto para las diferentes subespecies y variedades, se han obtenido a partir de raíces de genciana recolectadas en el mismo estado fenológico de la planta.

Para la comparación de medias para la **altitud** de las poblaciones analizadas para este estudio (Figura 44), cabe destacar que las pertenecientes a LBO están localizadas, por término medio, a 1736 metros de altitud, siendo este valor significativamente superior al resto, a excepción de las localizadas en los DOLOMITAS (1659 m). Inmediatamente después están las poblaciones PIRINEOS, que con una altitud media de 1625 metros resulta significativamente superior a RCC, con una altura media de 1508 metros, así como para CT3, ya que estas zonas aunque adecuadas para el cultivo de la genciana, fueron seleccionadas también en base a su accesibilidad, por lo que su altura media es significativamente inferior a todos los demás orígenes, con una altura media de “únicamente” 1388 metros.

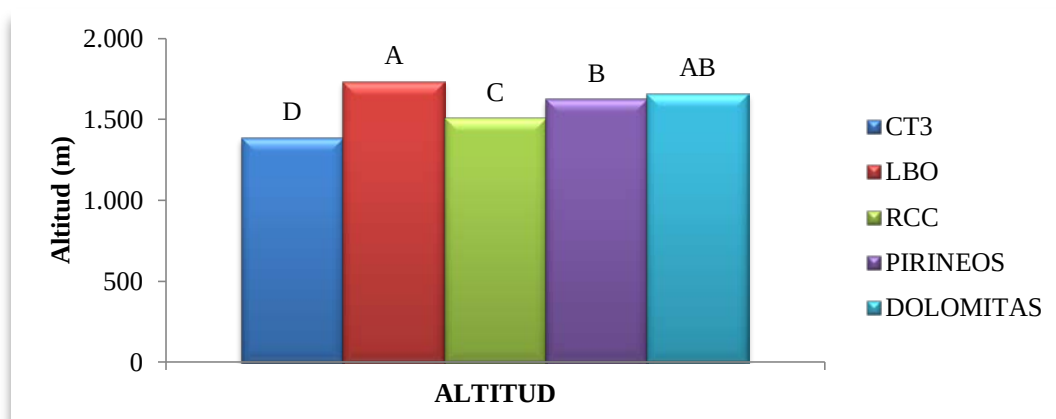


Figura 44: Comparación de medias para la ALTITUD de las poblaciones de *G. lutea* L. muestreadas en función de sus orígenes (CT3, LBO, RCC, Pirineos y Dolomitas). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

Cuando lo que se compara es el contenido de **genciopicrosido** para los diferentes orígenes (Figura 45), resulta que estas concentraciones observadas son significativamente superiores para las raíces provenientes de DOLOMITAS (8,26%) respecto del resto, excepto de RCC (7,37%), cuya concentración no resulta ser significativamente diferente a la de ninguno de los demás orígenes descritos. Para PIRINEOS la concentración es del 7,15%, para LBO del 7,01%, mientras que el valor menor es para CT3, con una concentración del 6,99%.

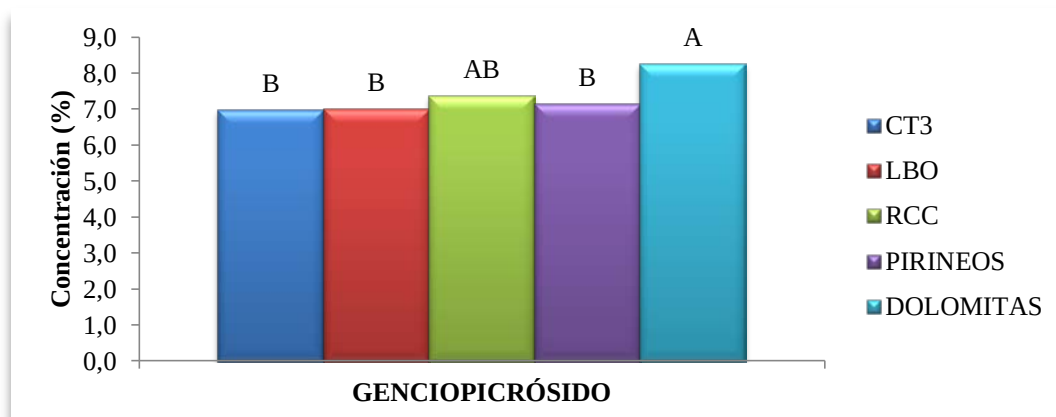


Figura 45: Comparación de medias para el contenido de GENCIOPICRÓSIDO de las raíces de *G. lutea* L. en función de sus orígenes (CT3, LBO, RCC, Pirineos y Dolomitas). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

Cuando la comparación se hace para el contenido de **amarogentina** (Figura 46), cabe destacar que las raíces pertenecientes a las plantas cultivadas muestran un contenido significativamente superior al resto de las raíces analizadas, con un porcentaje de amarogentina del 0,144%. Para el resto de orígenes no se observan diferencias significativas, con concentraciones muy similares para LBO, RCC y DOLOMITAS, siendo estas del 0,031, 0,029 y de 0,028% respectivamente, mientras que para PIRINEOS la concentración únicamente es del 0,013%.

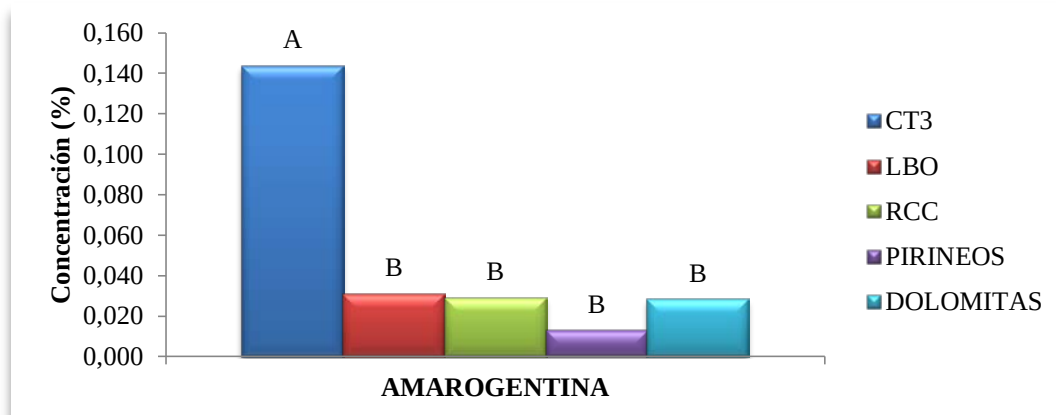


Figura 46: Comparación de medias para el contenido de AMAROAGENTINA de las raíces de *G. lutea* L. en función de sus orígenes (CT3, LBO, RCC, Pirineos y Dolomitas). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

En el análisis para el **swerósido** (Figura 47), al igual que para la amarogentina, los mayores valores de concentración son para las raíces de plantas provenientes de CT3, con un porcentaje del 0,210%, que no resulta ser significativamente mayor a LBO, con un 0,163%, pero si sobre el resto de orígenes, que no se muestran significativamente diferentes entre ellos. El valor para PIRINEOS es de 0,142%, mientras que para RCC es del 0,124% y, por último, con el valor más bajo, DOLOMITAS, con una concentración media de swerósido del 0,108%.

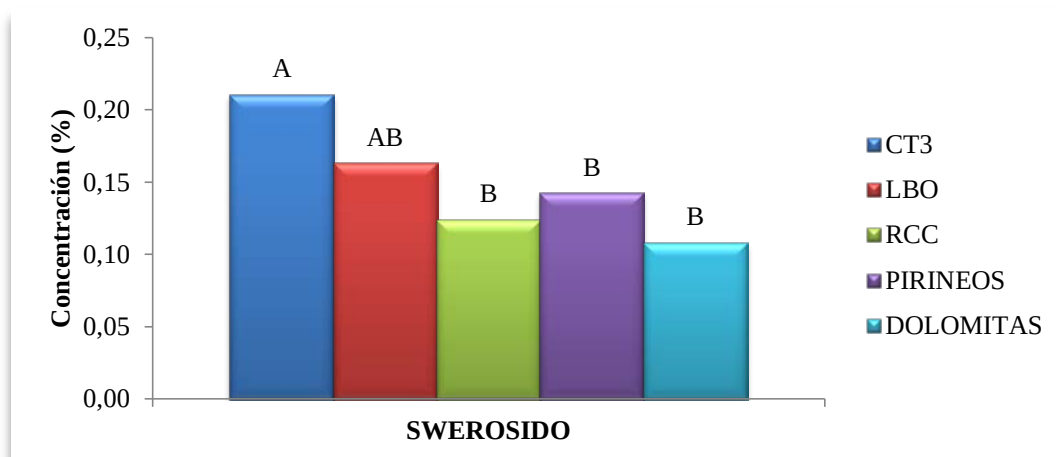


Figura 47: Comparación de medias para el contenido de SWERÓSIDO de las raíces de *G. lutea* L. en función de sus orígenes (CT3, LBO, RCC, Pirineos y Dolomitas). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

Por último, para la **swertiamarina** (Figura 48), los resultados obtenidos muestran concentraciones más elevadas para las plantas provenientes de LBO y CT3, con valores del 0,372 y 0,362% respectivamente, siendo los valores de ambos significativamente superiores a los obtenidos para PIRINEOS, que con un 0,281% presenta la concentración de swertiamarina más baja. Para los otros dos orígenes, RCC y DOLOMITAS, los valores de concentración no son significativamente diferentes al resto, siendo estos del 0,322 y 0,337% respectivamente.

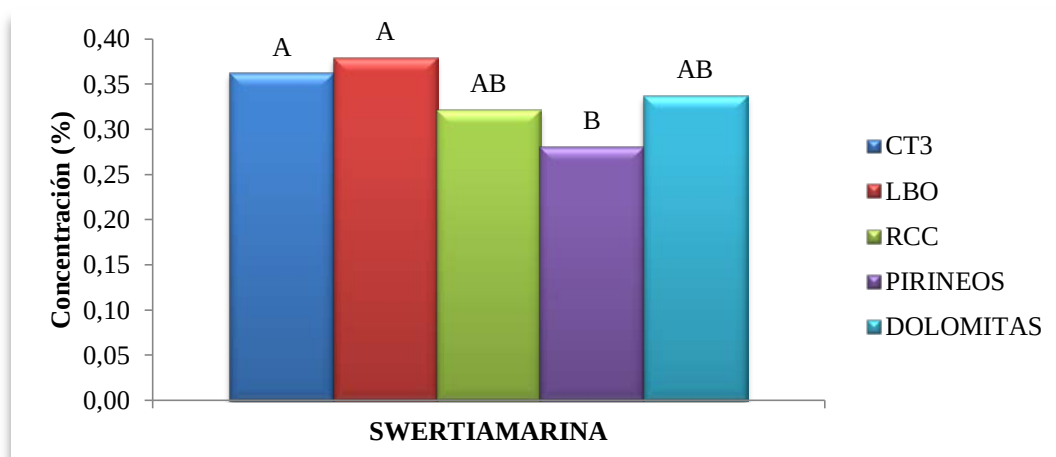


Figura 48: Comparación de medias para el contenido de SWERTIAMARINA de las raíces de *G. lutea* L. en función de sus orígenes (CT3, LBO, RCC, Pirineos y Dolomitas). Columnas con diferentes letras son significativamente diferentes. ($P=0,05$) de acuerdo con DMS.

5. DISCUSIÓN

5.1. *G. lutea* L. var. *aurantiaca*

5.1.1. Cultivo

La concentración de los compuestos amargos característicos de *G. lutea* L. (amarogentina, genciopicrosido, swerósido y swertiamarina), analizados en las raíces de plantas cultivadas para la variedad *aurantiaca*, son superiores para las raíces recolectadas en primavera, respecto del otoño del mismo año. Las diferencias estacionales observadas son superiores cuando la genciana es cultivada en montaña (CT3), donde las concentraciones de todos los compuestos presentan diferencias significativas, y no así para el cultivo fuera de su hábitat natural (CT4).

De forma independiente, para alguno de los compuestos, estas variaciones observadas son más notables, como es el caso de la amarogentina, donde los incrementos estacionales para el año 2012 son del 50 y 40,4% para CT3 y CT4 respectivamente, mientras que para el resto de los compuestos las variaciones fluctúan entre el 20 y el 29% para CT3, y 10-18% para CT4. Por tanto, la concentración de amarogentina se muestra más variable al paso de las estaciones.

Respecto de las variaciones de las concentraciones de compuestos amargos a lo largo del ciclo vegetativo, Franz et al. (1985) analizaron dichas variaciones para la amarogentina y el genciopicrosido durante dos años consecutivos, entre los meses de abril y septiembre, para plantas cultivadas de *G. lutea* L. del ecotipo denominado Auvergne, realizando al menos una analítica mensual. Para ambos compuestos, establecieron los máximos valores en primavera, al inicio del ciclo vegetativo, e incluso a finales de septiembre, en el segundo año del estudio, en el que el periodo de muestreo se amplió hasta inicios del mes de octubre. En este sentido, establecieron que las variaciones también dependen de la meteorología, ya que el comportamiento no fue igual para ambos ejercicios.

Leiton (1996), para una población silvestre de *G. lutea* L. subsp. *lutea* recolectada en Valnera (Burgos), y realizando análisis de raíces y rizomas durante todo el ciclo vegetativo, observó que, para la amarogentina y el genciopicrosido existen dos valores máximos, que coinciden, uno con el inicio del ciclo vegetativo, al igual que lo expuesto por Franz et al. (1985), alrededor del mes de mayo, y de nuevo en diciembre, cuando la parada vegetativa es total, algo que Franz, et al. (1985) no observaron debido a que sus análisis finalizaron al inicio de octubre aproximadamente. Del mismo modo Leiton (1996), identificó las menores concentraciones de amarogentina a inicios de agosto. En este mismo estudio, se estableció como momento de menor concentración para el genciopicrosido en torno a la floración, para crecer de nuevo a partir de este momento, algo que no coincide con lo expuesto por Franz et al. (1985).

Como se puede observar en los resultados del presente estudio, se comprueba, que el descenso de las concentraciones para los diferentes compuestos analizados es generalizado entre los dos momentos de recolección seleccionados, coincidiendo el momento de mayor concentración de amarogentina y genciopicrosido con los descritos por Franz et al. (1985) y Leiton (1996). Hay que tener en cuenta que la recolección “otoñal” coincide con el momento en el que se abren las cápsulas, aunando así la recolección de semilla, y con ello se establece un estado fenológico concreto para la recolección de las raíces, tanto de plantas cultivadas como silvestres.

Desde el punto de vista práctico, cabe mencionar respecto del estudio de Leiton (1996), que rara vez sería posible recolectar genciana de forma masiva, proveniente de poblaciones silvestres, en el mes de diciembre, por lo costoso de la actuación o imposibilitado por condiciones meteorológicas, que a partir de octubre dificultan las actividades en alta montaña, ya sea por la lluvia, hielo o la nieve. De igual modo, en primavera, debido al deshielo y a la abundancia de agua, esta labor también se vería afectada. En este sentido, en prácticamente todos los estudios realizados sobre *G. lutea* L, se ha recolectado la genciana alrededor de las mismas fechas, al final del verano o inicios de otoño (Barralis et al., 1978, Bezzi et al., 1996, Bezzi et al., 1997, Aiello et al., 2013), coincidiendo estas con aquellas utilizadas de forma tradicional en toda Europa.

Existen diferencias significativas cuando comparamos las concentraciones de los diferentes compuestos amargos analizados para raíces de la variedad *aurantiaca*, respecto de la parcela de cultivo (parcelas CT3 y CT4), comprobándose como, la modificación de las condiciones, tanto climáticas como edáficas, tienen un efecto sobre las concentraciones de dichos compuestos, siendo en este caso un efecto negativo, comparándolas con las concentraciones en su hábitat natural, a excepción del swerósido, cuya concentración es superior para la parcela localizada fuera del hábitat de la genciana (CT4) respecto de la localizada en la montaña (CT3).

En este aspecto, hay que resaltar que algunas plantas responden a situaciones de estrés desencadenando una mayor producción de algunos compuestos (Abreu y Mazzafera, 2005)

En cuanto a los compuestos amargos hay que tener en cuenta que en la raíz de genciana, tanto la amarogentina como el genciopicrosido son los más importantes, uno por su índice de amargor y otro por su concentración (Ando et al., 2007, Chialva y Dada, 1990), por lo cual, si no se busca específicamente el incremento del contenido de swerósido en las raíces, el cultivo fuera del hábitat afecta negativamente a la concentración de compuestos amargos.

En relación con la importancia de los compuestos amargos analizados, la mayoría de los trabajos publicados sobre *G. lutea* L únicamente tienen en cuenta la amarogentina y el genciopicrosido, los más importantes (Kusar y Baricevic, 2006, Bezzi et al., 1997), y en muchos casos sólo la amarogentina (Bezzi et al., 1996, Franz et al., 1996, Aiello et al., 2013). Para estos dos compuestos, los análisis realizados para la variedad *aurantiaca*,

proporcionan concentraciones de genciopicrosido 300 veces mayores que de amarogentina, mientras que para las cultivadas son unas 50 veces mayores.

Existen diversos estudios sobre el cultivo de diferentes subspecies de *G. lutea* L. tanto en habitats naturales de la genciana como fuera de los mismos. En ellos, se analizan las concentraciones de algunos de los compuestos amargos presentes en la raíz de dicha planta. En este aspecto, este trabajo, es el primero de los estudios en el que la variedad cultivada estudiada es la *aurantiaca*.

Bezzi et al. (1996), realizaron un estudio de cultivo de *G. lutea* L. en diversas parcelas, situadas en el Trentino italiano, dentro y fuera de su habitat natural. Para ello, utilizaron diferentes ecotipos obtenidos a partir de semillas de plantas de genciana descritas como subsp. *symphyandra* y subsp. *lutea*, y que fueron cultivadas en parcelas donde pudieron cruzarse con otros ecotipos presentes.

En este trabajo, además de los rendimientos, analizaron el contenido de amarogentina, de modo, que para la parcela denominada Bondone, situada a 1550 metros de altitud, donde crece de forma natural la genciana, los valores de amarogentina obtenidos para plantas de ocho años de ambas subespecies variaron entre el 0,073 y el 0,08%.

Fuera del hábitat natural, en dos de las parcelas ensayadas, los valores de amarogentina obtenidos para raíces de seis y siete años fueron de entre el 0,029 al 0,096%. Valores sorprendentemente elevados fueron los que se obtuvieron para la parcela denominada Garniga (aprox. 800 metros de altitud), donde los porcentajes de amarogentina para las mismas accesiones se dispararon hasta valores de entre el 0,129 y 0,231%, correspondiendo en este caso, el mayor valor al ecotipo Aosta, de la subsp. *symphyandra*. No se describe época de recolección en algunos casos, por lo que existe la duda de que estos últimos valores, más elevados, puedan haber sido obtenidos para plantas recolectadas en primavera, que según lo observado en el presente estudio, así como por Franz et al. (1985) y Leiton (1996), es el momento en el que las concentraciones en las raíces son mayores.

En el presente estudio, para las raíces de 5 años de la variedad *aurantiaca* analizadas, los contenidos en amarogentina varían para la parcela CT3 entre 0,118 y 0,236% entre primavera y otoño, mientras que para CT4 esos porcentajes descienden hasta el 0,072 y 0,121% para primavera y otoño respectivamente, siendo en muchos de los casos estos valores superiores a las concentraciones observadas por Bezzi et al. (1996).

En otro de los trabajos llevados a cabo por este grupo italiano, Bezzi et al. (1997), cultivaron plantas de genciana a partir de cinco ecotipos, cuatro de ellos obtenidos a partir de semillas de libre polinización, ya que los ecotipos de origen estaban cultivados juntos en la anteriormente nombrada parcela Bondone, perteneciendo dos a la subsp. *symphyandra*. El quinto ecotipo fue obtenido a partir de semillas de plantas silvestres. Para este trabajo además de la concentración de amarogentina también se obtuvo el de genciopicrosido, todos ellos para raíces de 7 años. Los resultados obtenidos para la concentración de amarogentina variaron entre el 0,036 y el 0,083%, siendo el mayor

contenido para el ecotipo originario de plantas silvestres. También en este caso, los porcentajes de amarogentina fueron inferiores los obtenidos en el presente estudio.

En lo que respecta a la concentración de genciopicrosido, para Bezzi et al. (1997), los resultados obtenidos variaron entre el 8,35 y el 15,12%, valores estos para otoño, y superiores a los obtenidos para plantas de cultivo en la variedad *aurantiaca*, que para CT3 los variaron entre el 9,87% en primavera y el 6,91% en otoño, mientras que para la parcela CT4 los porcentajes fueron del 7,51 y 6,16% para las citadas estaciones.

Kusar y Baricevic (2006), para plantas de genciana de la subespecie *symphyandra* provenientes de dos ecotipos diferentes, habiendo establecido campos de ensayo en dos parcelas con características diferentes, y para plantas de dos años de edad, obtuvieron valores de concentración de amarogentina de entre el 0,1 y 0,3%, mientras que para el genciopicrosido los valores obtenidos únicamente fueron de entre el 1,4% y el 3,7%. Estos valores resultan sorprendentes por lo bajo del contenido de genciopicrosido, en comparación con los obtenidos tanto en el presente estudio como en otros (Bezzi et al., 1997, Franz et al., 1996). Hay que tener en cuenta que los valores obtenidos por Kusar y Baricevic (2006) fueron para raíces recolectadas a finales de abril, por lo que la concentración de amarogentina es muy similar a la obtenida para la variedad *aurantiaca* en raíces de cinco años en esa misma estación.

Franz et al. (1996), en un estudio donde no se menciona la fecha de recolección de las raíces, obtuvieron concentraciones de amarogentina, para plantas silvestres pertenecientes a diferentes ecotipos de la subsp. *lutea*, de entre el 0,05 y 0,10%, mientras que para un ecotipo de la subsp. *symphyandra* proveniente de los Alpes Cárnicos la concentración fue del 0,4%, resultando los valores prácticamente iguales a las concentraciones obtenidas habiendo cultivado estos mismo ecotipos en una parcela situada a 1200 metros. Mientras, para otra parcela situada a 450 metros de altitud esas concentraciones de amarogentina fueron aproximadamente la mitad para la subsp. *lutea* y marcadamente inferiores para la subsp. *symphyandra*. En este mismo estudio, no se observó la existencia de relación entre el grosor de las raíces y la concentración de los compuestos amargos. En el presente estudio se observa para la variedad *aurantiaca* como la concentración de amarogentina no muestra una relación directa con el peso seco de la raíz, ni por tanto su tamaño.

El valor de concentración de amarogentina para el ecotipo de la subsp. *symphyandra* proveniente de los Alpes Cárnicos (Franz et al., 1996) a partir de plantas silvestres y en cultivo, se muestra más alto que los de otros estudios comparados (Kusar y Baricevic, 2006, Bezzi et al., 1997, Bezzi et al., 1996), y que los obtenidos en el presente trabajo para la variedad *aurantiaca*

De forma generalizada, se observan disminuciones de las concentraciones de amarogentina cuando los mismos ecotipos de *G. lutea* L son cultivados fuera del hábitat natural, constatado en el actual estudio, y que se ha contrastado para los estudios de Franz et al. (1996), Kusar y Baricevic (2010), Bezzi et al. (1996), refutando por tanto lo expuesto por (Rossetti, 1984), y resaltado por Leung (1980).

En cuanto a la evolución de las cantidades totales de los compuestos amargos presentes en las raíces, estos se han comportado de manera diversa para los diferentes ambientes de cultivo. Tanto el genciopicrosido como la swertiamarina han mostrado evoluciones lineales para ambos ambientes, de modo que la cantidad total de compuesto aumenta de forma proporcional a medida que el peso seco de la raíz aumenta, con unos coeficientes de determinación (R^2) superiores al 0,9, lo que se puede explicar debido a una mínima variación de las concentraciones para las diferentes partes de la raíz y para los diferentes ambientes, como se puede observar en los resultados.

Esto no sucede así para el swerósido, mostrando una evolución lineal para el hábitat natural (CT3), pero no así para CT4, desapareciendo este comportamiento lineal, y observándose, que a medida que el peso seco de la raíz analizada es superior, aparecen valores erráticos por encima y por debajo de la recta de regresión, y por lo tanto los contenidos no aumentan con el crecimiento de la raíz.

En el caso de la amarogentina, para ninguno de los ambientes ha mostrado una relación lineal entre la evolución del contenido total de amarogentina y el peso seco de la raíz analizada, pero en este caso, la tendencia de los valores observados fuera de su hábitat natural (CT4), son similares a los del swerósido, es decir, existen valores tanto mayores como menores a la línea de tendencia, cuando el peso seco de la raíz analizada aumenta.

Para las raíces analizadas provenientes de CT3, se observa como para pesos secos de las raíces bajos, las concentraciones de amarogentina son superiores a los que marca la línea de tendencia. Cuando las raíces aumentan su peso seco, siendo además estos pesos secos significativamente superiores a los de la parcela CT4, sucede lo contrario, siendo los valores menores a esa línea.

En este aspecto, cabe destacar que, tratándose la *G. lutea* L. de una planta silvestre, y que únicamente se comenzó a cultivar en el siglo XX, su desarrollo es muy heterogéneo incluso para los individuos de un mismo ecotipo. Durante este estudio se ha observado cómo, para sistemas radiculares completos con el mismo peso o peso similar, su hábito de desarrollo es muy variable, pudiendo estar compuesto este, únicamente por una raíz principal gruesa y muy desarrollada, o, en otros casos, estar formado por una multitud de raíces secundarias que surgen de una raíz principal corta y poco desarrollada.

Teniendo en cuenta los resultados de los análisis realizados para diferentes tipos de raíz según su desarrollo, donde se pone de manifiesto, que las raíces jóvenes tienen mayores concentraciones de amarogentina que las principales y que los rizomas, la variabilidad en el desarrollo puede explicar la no linealidad en los contenidos de amarogentina. El estudio realizado por Leiton (1996), demuestra cómo, la amarogentina se concentra en un 80% en su peridermis y si añadimos el córtex hasta el 85%, cuyo volumen relativo es mayor en raíces jóvenes, confirmando los resultados aquí obtenidos. De este modo se explica cómo, raíces del mismo peso puedan tener valores de amarogentina muy diversos, pero también, que un aumento del desarrollo implica un mayor porcentaje de raíces principales y de rizoma. De esta manera quedan relacionados el peso de la raíz y el

contenido en amarogentina para una misma parcela, pero no para la comparación de dos parcelas de diferentes características, ya que en este estudio los valores de compuestos amargos para CT3 han sido obtenidos para raíces de genciana con un peso seco significativamente superior (18,86 gramos/raíz) a las de CT4 (9,15 gramos/raíz)

Esta explicación, siendo válida para la amarogentina, no lo es para el resto de compuestos analizados, ya que lo a largo de la sección de una raíz, y para raíces con distintos desarrollos, las variaciones de los mismos no son tan marcadas, según los resultados obtenidos en este estudio y por lo expuesto por Leiton (1996).

Las correlaciones significativas entre las variables analizadas en ambas parcelas de cultivo, como son entre los compuestos analizados, así como de estos con el peso seco de las raíces, son mayores en la parcela de montaña (CT3) que en la parcela de la ESTIA en León (CT4).

5.1.2. Partes de la raíz

Relacionados con los resultados para las plantas cultivadas, están los obtenidos a partir de los análisis del córtex y el xilema para: el rizoma, las raíces principales y secundarias de plantas silvestres de la variedad *aurantiaca*. Para todos ellos las concentraciones de los compuestos amargos analizados son superiores en el córtex a los del xilema, y con mayores variaciones para la amarogentina, para la cual, de forma significativa, los mayores contenidos se encuentran en las raíces secundarias respecto de las principales o el rizoma, tejidos de mayor edad. En este sentido cabe destacar que, tanto para el genciopicrosido como la para la swertiamarina las mayores concentraciones se obtuvieron en raíces principales y rizoma, sobre todo para la swertiamarina. El contenido de swerósido no sufre cambios significativos para segmentos de raíz de diferentes edades.

Barralis et al. (1978) ya mencionaron en su trabajo sobre plantas de genciana cultivadas de la subsp. *lutea*, analizadas con diferente edad, que el contenido en amarogentina es superior para las raíces jóvenes, al contrario que sucede con el genciopicrosido y aseverando que, en la comparación de raíces del mismo grosor, cultivadas y silvestres, el contenido de amarogentina y genciopicrosido son comparables.

Pero sin duda, el trabajo más completo acerca de la distribución de los compuestos amargos en las raíces de genciana, con el que comparar los actuales resultados, es el elaborado por Leiton (1996), donde describe la evolución de los compuestos amargos a lo largo de la sección de la raíz y rizoma de la genciana.

Respecto de la amarogentina, Leiton (1996) obtuvo que para las raíces, el 80% de este compuesto se encuentra en la peridermis, un 5% en el córtex y un 15% en el xilema, aumentando en este a medida que la raíz envejece, al contrario que para la peridermis, estando estos resultados en línea con los aquí obtenidos. Igualmente Leiton (1996) describió como a medida que la sección de la raíz aumenta el contenido en amarogentina disminuye, algo que se observa en los resultados obtenidos cuando se comparan las raíces laterales con las principales.

Para el caso del genciopicrosido, Leiton (1996) obtuvo, de igual manera, la mayor concentración para la peridermis en las raíces, aunque los valores son similares a los de otras partes de la sección. Sin embargo para el rizoma, donde las concentraciones son más elevadas, la distribución del genciopicrosido es mucho más homogénea, disminuyendo únicamente en la medula del xilema. De igual manera, los resultados obtenidos están en línea con los descritos, observando unas variaciones entre el córtex y el xilema mucho menores que para la amarogentina.

Para swertiamarina, la distribución observada es semejante a la del gentiopicrosido, mientras que para el swerósido, como se puede observar en los resultados, los valores obtenidos para el rizoma son algo superiores, concentrándose sobre todo este compuesto en el córtex. Ambos resultados también pueden considerarse semejantes a los obtenidos por Leiton (1996).

5.1.3. Silvestre

Cuando se analizan los resultados obtenidos para las diferentes poblaciones silvestres de la variedad *aurantiaca* las características del suelo donde crecen todas ellas guardan similitudes, como se puede comprobar en el ANEXO I. Tabla 1, caracterizándose principalmente por pH muy ácidos, textura franca, franco arenosa o franco limosa y con elevados porcentajes de materia orgánica.

El análisis de componentes principales (ACP) separa dos grupos de poblaciones, de modo que estos coinciden con las poblaciones asignadas a LBO y RCC, exceptuando las poblaciones LG37, que realmente se encuentra en el límite de LBO, y la población LG25, localizada en el Monte del Teleno, siendo ésta la población más aislada de las estudiadas.

Como se puede observar en el apartado de los resultados, para el componente principal 1, el cual explica un mayor porcentaje de la varianza, tienen gran peso tanto los componentes responsables de la textura del suelo, como aquellos ligados a las dimensiones de las raíces, siendo este componente el que claramente discrimina cuando se compara con otros. Para los otros dos componentes, las variables con más peso son la altitud y los compuestos amargos exceptuando la amarogentina, que junto con las dimensiones de las raíces son las variables con mayor valor para el tercero de los componentes.

Las poblaciones silvestres para la zona LBO, se localizan en suelos con un menor contenido en arena y mayor de limo que los de RCC. Además, las poblaciones de LBO están situadas a una mayor altitud, y tienen unas concentraciones tanto para swerósido como swertiamarina superiores a los de RCC, incluso, para raíces con las mismas características, las dimensiones para las de LBO son mayores, así como la relación de córtex/diámetro.

Tanto el **diámetro de la raíz** y el **grosor del córtex**, están correlacionados positivamente con el porcentaje de **limo** del suelo así como con la **altitud** de las poblaciones. La correlación es negativa respecto al contenido en **arena** del suelo. En general, las

poblaciones correspondientes a LBO poseen unos valores superiores en diámetro y grosor del córtex, destacando las poblaciones LG45, LG47 y LG49, caracterizadas por estar localizadas por encima de los 1700 metros de altitud y en suelos con altos contenidos de limo, siendo para LG45 el suelo con mayor contenido de limo para la variedad *aurantiaca*. Por el contrario, las poblaciones con diámetros y grosor de corteza menores son las poblaciones LG21 y LG32, ambas ubicadas a las menores altitudes para la citada variedad, observando como este factor es muy importante para ambos caracteres.

Para el **porcentaje del córtex**, relacionando por tanto los dos caracteres descritos anteriormente, tanto el contenido en **limo**, como la **altitud** están correlacionados positivamente con dicho porcentaje, de modo que las poblaciones que presentan mayores valores para el porcentaje del córtex están situadas por encima de los 1600 metros, en suelos con contenidos medios o altos en limo y contenidos elevados en compuestos amargos, especialmente LG33, que presenta los mayores contenidos de amarogentina. Además todas ellas poseen unos diámetros con valores medios.

En cuanto al **genciopicrosido**, se observa como la **altitud** y la concentración de **boro** del suelo están correlacionadas positivamente con el contenido del citado compuesto en las raíces. Las poblaciones con mayores concentraciones son: LG51 ubicada a 1900 metros, LG45 con las raíces de mayor **grosor** de las estudiadas (carácter relacionado con concentraciones elevadas de genciopicrosido) y LG34, situada a 1380 m, con un porcentaje de limo medio y con un diámetro de las raíces muy pequeño, pero que comparte con LG51 la elevada concentración de boro en el suelo, que para LG34 es la mayor registrada para la variedad *aurantiaca*. Sin embargo, las poblaciones LG40 y LG50, con las menores concentraciones de genciopicrosido, se caracterizan por las bajas concentraciones de boro en el suelo que parece ser determinante para el contenido en las raíces del citado compuesto.

Para la **amarogentina**, tanto el **porcentaje del córtex** respecto del diámetro total como la **altitud** están correlacionados positivamente con la concentración de este compuesto en las raíces de genciana. Correlacionado de forma negativa con el contenido de amarogentina está el **diámetro** de la raíz. La población con mayor contenido es la LG24, que además de estar localizada a 1700 m, presenta la máxima relación córtex/diámetro, lo que puede indicar, junto con el diámetro medio/bajo de las raíces, que éstas pudiesen ser más jóvenes según lo expuesto por Barralis et al. (1978). Mientras, las poblaciones con menores valores para la amarogentina, combinan valores medios o bajos tanto para altitud como relación córtex/altitud.

En cuanto al **swerosido** y la **swertiamarina**, las concentraciones de estos compuestos en las raíces están correlacionadas con la **altitud** y con el contenido en **limo** del suelo. Para el swerosido, LG49 presenta el mayor valor, estando situada a unos 1900 metros. Del mismo modo para la swertiamarina, las poblaciones con mayores concentraciones son LG24 y LG51, encontrándose ambas por encima de los 1700 metros.

5.1.4. Comparaciones entre plantas cultivadas y silvestres

Por último, los resultados obtenidos para los análisis de las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, provenientes tanto de plantas cultivadas, como de poblaciones silvestres, éstas últimas divididas en dos grupos (LBO y RCC), comparados con aquellos obtenidos para las raíces de la subsp. *lutea*, provenientes de Pirineos, y de la subsp. *vardjanii*, provenientes de los Alpes Dolomitas, se observa cómo, las poblaciones de LBO se encuentran localizadas a una altura superior al resto. Esta diferencia puede ser debida, a que en LBO, tradicionalmente se ha recolectado la raíz de genciana, diezmando las poblaciones silvestres y restringiendo su desarrollo actual a zona elevadas y de difícil acceso. Mientras, para RCC su uso, aunque conocido, nunca tuvo tal importancia, permitiendo la supervivencia de las poblaciones silvestres en zonas más bajas.

Respecto de los compuestos amargos, cabe destacar, como las plantas cultivadas se muestran mucho más ricas en amarogentina que las silvestres, siendo los valores obtenidos, unas cinco veces superiores al de las plantas silvestres de la variedad *aurantiaca* y la subespecie *vardjanii*, mientras que, respecto de la subespecie *lutea*, esta diferencia estaría en torno a diez veces. Destacar también la mayor riqueza de las raíces de plantas cultivadas respecto del resto en cuanto a swerósido, algo que se explica debido a la mayor concentración del mismo en las raíces jóvenes, lo que estaría en consonancia con lo mencionado por Leiton (1996). Para el resto de los compuestos amargos se observan algunas diferencias, de modo que para la variedad *aurantiaca*, en LBO, los contenidos en swerósido y swertiamarina son superiores al resto, algo que no sucede para el otro grupo de la variedad *aurantiaca* (RCC), lo cual se explica debido a la diferencia de altitud media de las poblaciones, algo que Franz et al. (1996) indican como causa del incremento de la concentración de compuestos amargos, mostrando por tanto la variedad *aurantiaca* una interacción con el medio en el que se desarrolla.

Igualmente reseñar los valores superiores de genciopicrosido para las poblaciones dolomíticas, donde este compuesto se encuentra en mayores concentraciones que para el resto de las analizadas. En este caso esto también puede ser debido a la edad de las raíces, ya que Barralis et al. (1978) concluyen que una mayor edad de las raíces redundaría en un mayor contenido de este compuesto.

Para los resultados de las poblaciones de la variedad *vardjanii*, cabe destacar como dos de las poblaciones poseen unas concentraciones elevadas, situándolas entre las que mayor contenido de amarogentina poseen de este estudio, mientras que las otras dos se encuentran en el caso contrario. Igualmente, la edad de las raíces puede ser la causante de este hecho ya que Barralis et al. (1978) establecían igualmente que las raíces jóvenes tenían una mayor concentración en dicho compuesto. En este sentido no existe un método exacto de selección del material que permita identificar la edad de las raíces, ya que no está directamente relacionada con el grosor de las mismas.

En el trabajo llevado a cabo por Aiello et al. (2013), se analizan diversas poblaciones silvestres de *G. lutea* L., perteneciendo siete de ellas a la subsp. *vardjanii* y dos a la *symphyandra*, donde se analizan los contenidos de amarogentina. Las concentraciones de

dicho compuesto varían desde el 0,03 hasta el 0,09 para las poblaciones de la subsp. *vardjanii* mientras que para la subsp. *symphyandra* los valores son del 0,1% para ambas.

Cabe destacar la existencia de claras diferencias en cuanto a las características del suelo donde crece la variedad *aurantiaca*, como describen González et al. (2012), y se puede observar en los análisis de suelo realizados para el presente trabajo (ANEXO I. Tabla 1), respecto de las demás subespecies estudiadas (ANEXO I. Tabla 2 y ANEXO I. Tabla 3). Para la subsp. *lutea* los valores de pH varían entre el 4,5 y el 5,3 y para la subsp. *vardjanii* entre el 5,6 y el 7,2, mientras que para la variedad *aurantiaca*, los valores van de 3,7 a 4,7 de forma mayoritaria, lo que sería un indicador del hábitat para el desarrollo de la variedad *aurantiaca*.

Esta característica se puede observar en otros estudios, Aiello et al. (2013), para las subsp. *lutea* y subsp. *symphyandra* los valores de pH varían entre el 6 y 7, igualmente que los descritos por Bezzi et al. (1987) para poblaciones de la subsp. *lutea*. Anchisi & Cattaneo (2010), describen como los suelos donde crece la *G. lutea* L. son sustratos calcáreos generalmente, mientras Bezzi et al. (1987), señalan que a veces es posible encontrarla en suelos de origen silíceo, pero ambos autores, en ningún caso tratan la variedad *aurantiaca*, que no ha sido observada creciendo fuera de suelos de matriz silícea.

En todo caso los valores obtenidos en este estudio para la amarogentina están en línea con otros estudios y en el rango publicado por la Farmacopea Europea (ESCOP, 2003) quienes citan estas concentraciones entre el (0,025-0,4%). Para el genciopicrosido, el rango publicado es del (1-4%) (ESCOP, 2003, Wagner y Bladt, 1996), dentro del que se encuentran algunos trabajos (Kusar y Baricevic, 2006, Sand et al., 2008), siendo en el presente estudio superiores, pero en línea con la mayoría de los estudios llevados a cabo para este compuesto (Carnat et al., 2005, Aberham et al., 2007, Aberham et al., 2011).

Los valores obtenidos para swertiamarina, que varían entre 0,1 y 0,65% también se encuentran dentro de los valores que obtienen otros autores (Carnat et al., 2005, Aberham et al., 2007), igualmente que el swerósido, que con valores de entre 0,03 y 0,97% muestra una gran variabilidad al igual que lo expuesto por Aberham, et al. (2007, 2011) que obtuvieron concentraciones entre el 0,05 y el 0,93%.

En definitiva, los resultados obtenidos no permiten establecer una diferenciación respecto de los contenidos en compuestos amargos analizados para las raíces de las diferentes subespecies o variedades de *G. lutea* L. creciendo de forma silvestre, pero cabe destacar que las concentraciones de amarogentina obtenidas para raíces de cinco años de la variedad *aurantiaca* cultivadas en terreno montañoso, son superiores al resto y muy similares a los mejores resultados obtenidos para los diferentes estudios realizados hasta la fecha.

6. CONCLUSIONES

- Las concentraciones de los compuestos amargos característicos de la *G. lutea* L., analizadas sobre raíces de plantas cultivadas de la variedad *aurantiaca*, muestran variaciones estacionales, siendo mayores en primavera que en otoño, y superiores para aquellas plantas cultivadas en su hábitat natural y a mayor altitud, donde estas variaciones estacionales son aún más marcadas.
- Las concentraciones de amarogentina para las raíces de algunos individuos de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivados en montaña, y recolectados en primavera, han alcanzado valores similares a los mayores valores conocidos, tanto para plantas silvestres como cultivadas de *G. lutea* L. Estos valores pertenecen a la subespecie *symphyandra*, conocida como la de mayor contenido en amarogentina, por lo que sería interesante llevar a cabo una selección y multiplicación de estos individuos sobresalientes de la variedad *aurantiaca*, para comprobar que esta característica se mantiene en su descendencia.
- Para el sistema radicular de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, los compuestos amargos varían con la edad de los tejidos, de modo, que para la amarogentina, los valores más altos se encuentran en las raíces jóvenes, disminuyendo este contenido con la edad de estas, y por tanto los valores son mínimos para el rizoma, comportándose la amarogentina de forma contraria a como lo hacen el genciopicrosido y la swertiamarina, los cuales aumentan su concentración para los tejidos más viejos, mientras que el swerósido no se ve influenciado por la edad de las raíces.
- Las variaciones sufridas en la concentración de amarogentina respecto del momento de recolección de las raíces de genciana, así como de la parte de la raíz analizada, son marcadamente superiores a las sufridas por genciopicrosido, swerósido y swertiamarina. Tratándose la amarogentina del compuesto amargo más importante, las plantas deberían recolectarse al inicio del ciclo vegetativo, cuando la concentración de dicho compuesto es máxima.
- Las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* localizadas a mayor altitud, en suelos ricos en limo y boro, permiten el desarrollo de raíces de mayor diámetro con un mayor grosor del córtex, y por lo tanto, con valores más elevados de compuestos amargos.
- Las poblaciones de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* se encuentran localizadas en las comarcas de Laciana, Babia y Omaña (LBO) están ubicadas a mayor altitud y en suelos con superior contenido de limo que las del resto de la Cordillera Cantábrica (RCC), dando lugar a raíces con mejores características en cuanto a tamaño y concentraciones de compuestos amargos

- Los contenidos en compuestos amargos para raíces de plantas silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* no difieren significativamente de los obtenidos para las de la subespecie *vardjanii*, pero si respecto de la subespecie *lutea*, más pobre en amarogentina.
- La concentración de amarogentina para las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivadas y recolectadas en primavera, puede llegar a ser hasta cuarenta veces superior a los obtenidos para raíces de plantas silvestres recolectadas en otoño, cuando de forma tradicional se ha realizado su recolección en la provincia de León, y por tanto, la calidad de estas raíces cultivadas, excede en mucho a aquellas obtenidas creciendo de manera silvestre, lo que implica que si se estableciesen cultivos regulares para satisfacer la demanda existente, esta sería más demandada debido a su mayor calidad, y con la consiguiente protección de las poblaciones silvestres.

7. CONCLUSIONS

The concentrations of characteristic bitter compounds in *G. lutea* L., analyzed on cultivated roots of *aurantiaca* variety show seasonal variations, being higher in spring than in autumn. Also these concentrations are higher for those plants growing in their natural habitat and higher altitudes where these seasonal variations are even stronger.

Amarogentine concentrations in roots of some *G. lutea* L. var. *aurantiaca* plants, cultivated in mountainous habitat, and harvested in spring, have reached similar values to the highest known for both wild and cultivated plants in *G. lutea* L. The *symphyandra* subspecies is known as the highest content in amarogentina. It would be interesting to carry out a selection and multiplication of these outstanding individuals of *aurantiaca* variety, to check if this characteristic is maintained in the offspring.

The concentration of bitter compounds in the *G. lutea* L. var. *aurantiaca* root system varies regarding the tissues age. For the amarogentina, the highest values are for young roots, decreasing as time goes on. Therefore, the minimum values are for the rhizome. Conversely, for the genciopicroside and swertiamarine, their concentration is higher in older tissues, while the swerósido is not influenced by the age of the roots.

Changes in amarogentina concentration, regarding the harvest time and the root part analyzed, are markedly higher to those for gentiopicrósido, swerósido and swertiamarina. Being amarogentina the most important bitter compound, plants should be collected at the beginning of the growing season, when the concentration of this compound is the highest.

Wild populations of *G. lutea* L. var. *aurantiaca* located at higher elevations, in soils with higher silt and boron contents, allow the development of thicker roots and also thicker cortex, and therefore, with higher values in bitter compounds.

The *G. lutea* L. var. *aurantiaca* populations of Laciana, Babia and Omaña (LBO) regions, are located at higher altitudes and in soils with higher silt content than the rest of the Cantabrian Mountains populations (RCC). This results in roots with better characteristics in terms of size and concentrations of bitter compounds.

The concentration of bitter compounds in the roots of wild *G. lutea* L. var. *aurantiaca* are not significantly different from those obtained for *vardjanii* subspecies, but higher in amarogentina regarding *lutea* subsp.

The concentration of amarogentina in *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivated roots, and harvested in spring, can be up to forty times higher than those obtained for wild roots and collected in autumn, when traditionally they have been in the León province. Therefore the quality of these cultivated roots exceeds those obtained growing wild. This supposes that if regular crops would be established to meet the demand, the higher quality of these roots, allow to reduce the harvesting pressure on wild populations, protecting them.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ABERHAM, A., PIERI, V., CROOM, E. M., JR., ELLMERER, E. & STUPPNER, H. 2011. Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthonenes in *Centaurium erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54, 517-525.
- ABERHAM, A., SCHWAIGER, S., STUPPNER, H. & GANZERA, M. 2007. Quantitative analysis of iridoids, secoiridoids, xanthonenes and xanthone glycosides in *Gentiana lutea* L. roots by RP-HPLC and LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 437-442.
- ABREU, I. N. & MAZZAFERA, P. 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 241-248.
- AIELLO, N., BONTEMPO, R. & VENDER, C. 2013. Use of morphological features and amarogentin content for characterization of wild yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) populations in north-east Italy. *Acta Botanica Gallica*, 160, 33-41.
- ANCHISI, E. & CATTANEO, F. 2010. *Genziane d'Europa*, Verba&Scripta.
- ANDO, H., HIRAI, Y., FUJII, M., HORI, Y., FUKUMURA, M., NIIHO, Y., NAKAJIMA, Y., SHIBATA, T., TORIIZUKA, K. & IDA, Y. 2007. The chemical constituents of fresh Gentian root. *Journal of Natural Medicines*, 61, 269-279.
- ATKINSON, J. E., GUPTA, P. & LEWIS, J. R. 1969. Some phenolic constituents of *Gentiana lutea*. *Tetrahedron*, 25, 1507-1511.
- BALIJAGIC, J., JANKOVIC, T., ZDUNIC, G., BOSKOVIC, J., SAVIKIN, K., GODEVAC, D., STANOJKOVIC, T., JOVANCEVIC, M. & MENKOVIC, N. 2012. Chemical Profile, Radical Scavenging and Cytotoxic Activity of Yellow Gentian Leaves (*Genitaneae luteae* folium) Grown in Northern Regions of Montenegro. *Natural Product Communications*, 7, 1487-1490.
- BARRALIS, G., CHADOEUF, R. & DESMAREST, P. 1978. New trends of *Gentiana lutea* cultivation. *Acta Horticulturae*, 73, 303-306.
- BARRALIS, G., CHADOEUF, R., DESMAREST, P. & DERCHUE, D. 1986. Atti convegno sulla Coltivazione delle Pianta officinali. ISAFa Trento.
- BEZZI, A., AIELLO, N. & M., T. 1987. La coltivazione di *Gentiana lutea* L. nell'ambito del progetto "Pianta officinali" del Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste. *Atti del Convegno su "La coltivazione delle piante officinali"*. Trento.
- BEZZI, A., VENDER, C. & AIELLO, N. 1997. Coltivazione di ecotipi di *Gentiana lutea* L. ottenuti da seme raccolto da piante coltivate e spontanee. *Comunicazioni di ricerca dell'ISAFa*, 3, 19-23.
- BEZZI, A., VENDER, C. & SCARTEZZINI, F. 1996. Dati morfologici e produttivi rilevati su coltivazioni di *Gentiana lutea* L. (1981 – 1994). *Atti del Convegno "Genziana e specie amaro – aromatiche Ricerche ed Applicazioni"*. Camerino Università degli Studi, Camerino (Macerata) Italia.

- BODART, P., POUKENSRENWART, P., WAUTERS, J. N. & ANGENOT, L. 1996. Densitometric evaluation of gentiopicroside in the roots of *Gentiana lutea* L. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc*, 9, 143-145.
- BOURQUELOT, E. & BRIDEL, M. 1910. Sur la présence de la gentiopicrina dans les racines et dans les tiges foliées de la *Gentiana pneumonante* L. . *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 2, 149-153.
- BRANKA, V., DIJANA, K.-M., TEODORA, J., SNEZANA, Z.-K. & DRAGAN, V. 2013. Quantitative determination of secoiridoid and xanthone glycosides of *Gentiana dinarica* Beck. cultured in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 567-574.
- CARNAT, A., FRAISSE, D., CARNAT, A. P., FELGINES, C., CHAUD, D. & LAMAISON, J. L. 2005. Influence of drying mode on iridoid bitter constituent levels in gentian root. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 598-602.
- CHIALVA, F. & DADA, G. 1990. Bitterness in alcoholic beverages. *Development in Food Sciencies*, 25, 103-122.
- CITOVA, I., GANZERA, M., STUPPNER, H. & SOLICH, P. 2008. Determination of gentisin, isogentisin, and amarogentin in *Gentiana lutea* L. by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 31, 195-200.
- ESCOP 2003. Gentianae radix (Gentian root). *ESCOP Monographs*, 174-177.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS 2009. Assessment report on *Gentiana lutea* L., radix. (Doc. Ref.:EMA/HMPC/578322/2008). London, UK.
- FONSECA, F. N., PAPANICOLAOU, G., LIN, H., LAU, C. B. S., KENNELLY, E. J., CASSILETH, B. R. & CUNNINGHAM-RUNDLES, S. 2014. *Echinacea purpurea* (L.) Moench modulates human T-cell cytokine response. *International Immunopharmacology*, 19, 94-102.
- FRANZ, C., BEZZI, A. & BELLIARDO, F. 1996. Variability and breeding of *Gentiana lutea* L. with respect to bitter substances. *Atti del Convegno (ed) Genziana e specie amaro-aromatiche, Ricerche ed Applicazioni*. University of Camarino Publications, Italy.
- FRANZ, C., FRANZ, G., FRITZ, D. & SCHULTZE, N. 1985. Jahreszeitliche schwankungen des gehalts an löslichen zuckern und bitterstoffen in *Gentiana lutea* L. *Scientia Pharmazeutica*, 53, 31-38.
- FRANZ, C. & FRITZ, D. 1975. Cultivation of *Gentiana lutea* and main substances of some ecotypes. *Planta Medica*, 28, 289-300.
- GLATZ, Z., POSPISILOVA, J. & MUSIL, P. 2000. Determination of gentiopicroside in extracts of *Centaureum erythrae* and *Gentiana lutea* by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23, 1831-1839.
- GONZÁLEZ, O., MAYO, S., RODRÍGUEZ, A. & CASQUERO, P. A. 2012. Effect of soil in the growth of *Gentiana lutea* radical system in north mountain of León (Spain). *Acta Horticulturae*, 955, 281-285.

- GYÖRGY, Z., FJELLDAL, E., LADANYI, M., ASPHOLM, P. E. & PEDRYC, A. 2013. Genetic diversity of roseroot (*Rhodiola rosea*) in North-Norway. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50, 361-367.
- HAYASHI, T., MINAMIYAMA, Y., MIURA, T., YAMAGISHI, T. & KANESHINA, H. 1990. Cultivation of *Gentiana lutea* and chemical evaluation of *Gentiana radix*. *Hokkaidoritsu Eisei Kenkyushoho*, 40, 103-106.
- HAYASHI, T. & YAMAGISHI, T. 1988. Two xanthone glycosides from *Gentiana lutea*. *Phytochemistry*, 27, 3696-3699.
- INOUE, H. & NAKAMURA, Y. 1971. Monoterpene glucosides and related natural substances.14. Structure of 2 very bitter tasting glycosides amarogentin and amaroswerin from *Swertia Japonica*. *Tetrahedron*, 27, 1951-&.
- INOUE, H., UEDA, S. & NAKAMURA, Y. 1970. Monoterpene glucosides .10. Secoiridoid glucosides from *Swertia japonica* - Isolation of 5 secoiridoid glucosides and structural elucidation of swerisudem - swertiamarine and gentiopicroside. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 18, 1856-1865.
- JIANG, R.-W., WONG, K.-L., CHAN, Y.-M., XU, H.-X., BUT, P. P.-H. & SHAW, P.-C. 2005. Isolation of iridoid and secoiridoid glycosides and comparative study on *Radix gentianae* and related adulterants by HPLC analysis. 66, 2674-2680.
- KHAN, S. A., UR RAHMAN, L., SHANKER, K. & SINGH, M. 2014. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transgenic plant and somaclone production through direct and indirect regeneration from leaves in *Stevia rebaudiana* with their glycoside profile. *Protoplasma*, 251, 661-70.
- KORTE, F. 1955. Characteristic plant constituents. IX. Amarogentin, a new bitter principle from Gentianaceae. *Chemische Berichte*, 88, 704-707.
- KRUPINSKA, A., SEGIET-KUJAWA, E., SKRYPZAK, L. & ELLNAIN-WOJTASZEL, M. 1991. Quantitative determination of amarogentin by TLC-densitometry. *Scientia Pharmaceutica*, 59, 135-138.
- KUSAR, A. & BARICEVIC, D. 2006. Cultivation trials of Yellow Gentian (*Gentiana lutea* L. subsp. *symphyandra* Murb.) in west part of Slovenia. *Acta agriculturae Slovenica*, 87, 213-224.
- KUSAR, A., SIRCELJ, H. & BARICEVIC, D. 2010. Determination of seco-iridoid and 4-pyrone compounds in hydro-alcoholic extracts of *Gentiana lutea* L. subsp. *symphyandra* Murb. leaves and roots by using high performance liquid chromatography. *Israel Journal of Plant Sciences*, 58, 291-296.
- LAINZ, M. Mis contribuciones al conocimiento de la flora de Asturias. 1982 Oviedo, Spain. Diputación Provincial de Asturias, Instituto de Estudios Asturianos (del C.S.I.C.), 61-62.
- LEITON, M. J. 1996. *Compuestos amargos y aromáticos de Gentiana lutea* L. Tesis Doctoral, Pais Vasco.
- LEUNG, A. Y. 1980. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*, Wiley.

- LORENZO, C., SERRANO-DIAZ, J., PLAZA, M., QUINTANILLA, C. & ALONSO, G. L. 2014. Fast methodology of analysing major steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food chemistry*, 157, 518-23.
- MICROSOFT 2010. Microsoft Excel 2010. Redmond, Washington: Microsoft.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACIÓN, M. 1994. *Métodos oficiales de análisis. Tomo II*. Madrid.
- ROHLE, F. J. 2002. NTSYS pc: Numerical Taxonomy System. In: PUBLISHING, E. (ed.) Version 2.1. ed. Setauket, NY.
- ROSSETTI, V. L., A.SANCIN, P.BUFFA, M.MENGHINI, A. 1984. Composition of *Gentiana lutea* L. dried roots harvested at different altitudes. *Plantes medicinales et phytotherapie*, 18, 15-23.
- SAND, C., POP, M. R., BARBU, C. H., BOBIT, D. & LAZURCA, D. 2008. Active Substances in Some *Gentiana lutea* L. genotypes. *43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture*. (508- 510). Opatija, Croatia.
- SAS INSTITUTE INC 2004. SAS/STAT 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SCHULTZE, J. & FRANZ, C. 1979. Sugars, bitter substances and essential oils of *Gentiana lutea* L. in dependence of ecotype, plant age and stage of development. . *Herba Hungarica*, 18, 311-316.
- SOEBERDT, M., KNIE, U., METZE, D. & ABELS, C. 2014. Anti-inflammatory and anti-pruritic activity of an alkylamide from *Echinacea purpurea* in murine models of delayed-type hypersensitivity and atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, 23, E15-E15.
- STICHER, O. & MEIER, B. 1978. HPLC identification of bitter components of *Gentiana* roots. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 53, 40-45.
- STICHER, O. & MEIER, B. 1980. Quantitative determination of the bitter principles in roots of *Gentiana lutea* and *Gentiana purpurea* using HPLC. *Planta Medica*, 40, 55-67.
- SZUCS, Z., DANOS, B. & NYIREDY, S. 2002. Comparative analysis of the underground parts of *Gentiana* species by HPLC with diode-array and mass spectrometric detection. *Chromatographia*, 56, S19-S23.
- VARELA, F., HERNÁN, G., NAVARRETE, P., PÉREZ, B., PÉREZ-MAO, D., LÓPEZ-CEPERO, P., CUADRADO, J., HERRAIZ, D., USANO-ALEMANY, J., SOTOMAYOR, J. A., JORDÁN, M. J., CRISTOBAL, R., FANLO, M., MELERO, R., MORÉ, E., CABOT, P., ASENSIO S.-MANZANERA, M. C., ASENSIO VEGAS, C., MARTÍN, H., HERRERO, B., FERNÁNDEZ, M., PELUZZO, A., GONZÁLEZ BENITO, M. E., PÉREZ, F., SÁNCHEZ, D. & CASES, M. A. 2009. Bioprospecting: genetic resources of medicinal and aromatic plants in Spain. *4th International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants*. Ljubljana, Slovenia.
- WAGNER, H. & BLADT, S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, Hendrickson Publishers.
- WAGNER, H., BLADT, S. & ZGAINSKI, E. M. 1984. *Plant drug analysis*, Berlin, Springer-Verlag.

ZHENG, P., ZHANG, K. & WANG, Z. 2011. Genetic diversity and gentiopicroside content of four *Gentiana* species in China revealed by ISSR and HPLC methods. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 704-710.

CONCLUSIONES GLOBALES

Las características de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, que la diferencian de *G. lutea* L. subsp. *lutea* y *G. lutea* L. subsp. *vardjanii* más allá del color de sus flores, convierten a esta planta en un activo para la generación de nuevas actividades económicas. Sus requerimientos específicos en cuanto a condiciones edafoclimáticas permiten que sean las zonas de montaña donde ha sido recolectada de forma silvestre las más adecuadas para su cultivo sostenible.

La concentración de compuestos amargos de las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* cultivada en zonas de montaña, claramente superior a la de las plantas silvestres, así como los rendimientos obtenidos llevando a cabo un cultivo sostenible, convierten al cultivo de la *G. lutea* L. var. *aurantiaca* en una actividad económica potencialmente rentable, que a su vez reduciría la presión recolectora sobre las poblaciones silvestres de genciana, gravemente erosionadas.

La determinación del momento óptimo para la recolección de las raíces de *G. lutea* L. var. *aurantiaca* genciana depende de si el valor de la raíz es medido en términos de rendimiento de raíz, óptimo para las recolecciones otoñales, o si por el contrario, lo que se valora es la concentración en compuestos amargos, en cuyo caso es la recolección primavera, al inicio del ciclo vegetativo la que asegura valores máximos de dichos compuestos.

GLOBAL CONCLUSIONS

The characteristics of *G. lutea* L. var. *aurantiaca*, which distinguish it from *G. lutea* L. subsp. *lutea* and *G. lutea* L. subsp. *vardjanii* beyond the color of its flowers, make this plant an asset for the generation of new economic activities. The specific requirements in terms of soil and climate conditions allow them to be mountain areas where it has been collected in the wild the most suitable for sustainable cultivation.

The concentration of bitter compounds from the roots of *G. lutea* L. var. *aurantiaca* grown in mountain areas, clearly superior to that of wild plants and the yields obtained by carrying out sustainable farming, make the cultivation of *G. lutea* L. var. *aurantiaca* in a potentially profitable economic activity, which in turn would reduce the harvesting pressure on wild populations of gentian, severely eroded.

The determination of the optimum time for harvesting the roots of *G. lutea* L. var. *Gentian aurantiaca* depends on whether the value of the result is measured in terms of performance of root optimal for autumn collections, or if on the contrary, what is valued is the concentration of compounds bitter, in which case the spring collection, at the beginning of the growing season to ensure the maximum values of these compounds.

ANEXO I: ANÁLISIS DE SUELOS

I. ÍNDICE DE TABLAS. ANEXO I

ANEXO I. Tabla 1: Análisis de suelos para las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	299
ANEXO I. Tabla 2: Análisis de suelos para las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. subsp. <i>lutea</i>	301
ANEXO I. Tabla 3:	301
ANEXO I. Tabla 4: Análisis de suelos para las poblaciones silvestres de <i>G. lutea</i> L. var. <i>aurantiaca</i>	301

ANEXO I. **Tabla 1:** Análisis de suelos para las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

		AR			L	AC	pH	Mat.Org	P (Olsen)	Ca	K	Mg	Na	CIC	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Cond	
Población					(%)		(%)	(ppm)	cmol (+) kg ⁻¹					(ppm)							dS/m
LACIANA, BABIA Y OMAÑA (LBO)	LG16	50	44	6	4,17	14,25	<5,44	2,29	0,52	0,96	0,10	6,85	0,52	441,5	90,44	5,38	0,46	0,06			
	LG17	48	46	6	3,93	17,12	13,48	0,62	0,32	0,38	0,02	4,69	0,15	406,4	11,63	3,60	0,43	0,04			
	LG18	54	40	6	4,65	10,48	<5,44	2,76	0,56	1,56	0,04	8,23	0,31	269,8	57,52	2,71	0,48	0,02			
	LG19	50	48	2	4,41	14,32	<5,44	0,17	0,22	0,13	0,05	4,44	0,32	109,8	8,03	0,96	0,28	0,01			
	LG20	58	36	6	3,99	10,08	<5,44	0,29	0,18	0,20	0,33	4,49	0,34	391,9	50,78	1,21	0,37	0,05			
	LG40	38	50	12	4,19	9,88	<5,44	0,58	0,18	0,19	0,11	6,93	0,13	477,6	13,55	1,53	0,25	0,02			
	LG41	64	32	4	3,83	13,21	<5,44	0,32	0,30	0,33	0,07	4,65	0,25	508,1	26,05	1,90	0,34	0,05			
	LG42	54	42	4	3,80	29,84	<5,44	2,53	0,76	1,48	0,20	7,49	0,81	453,5	118,60	19,25	0,53	0,14			
	LG43	64	34	2	5,24	43,57	<5,44	0,25	0,50	0,37	0,94	2,34	3,66	18,9	100,10	9,46	0,28	0,07			
	LG44	58	38	4	4,19	24,89	<5,44	2,44	0,56	1,23	0,05	9,27	0,39	901,9	114,10	13,42	0,48	0,03			
	LG45	42	54	4	4,50	12,73	<5,44	0,45	0,32	0,35	0,02	4,88	0,45	299,6	18,17	2,45	0,39	0,01			
	LG46	60	38	2	4,55	18,38	<5,44	1,99	0,40	0,86	0,05	6,81	0,54	365,0	36,90	5,98	0,41	0,02			
	LG47	58	36	6	3,99	10,08	<5,44	0,29	0,18	0,20	0,33	4,49	0,34	391,9	50,78	1,21	0,37	0,05			
	LG48	58	34	4	4,41	16,92	<5,44	4,57	0,57	1,44	0,14	9,70	0,63	480,8	85,02	5,95	0,55	0,07			
	LG49	54	44	2	4,55	14,52	<5,44	1,59	0,49	1,04	0,10	7,64	0,59	643,3	22,65	3,11	0,36	0,02			
LG50	66	28	6	4,12	12,78	<5,44	0,76	0,16	0,21	0,16	4,53	0,20	1021,0	3,51	1,56	0,25	0,03				
LG51	58	38	4	3,71	15,74	<5,44	0,56	0,32	0,28	0,09	4,36	0,21	1064,0	0,79	1,13	0,71	0,06				
LG52	60	38	2	4,09	9,49	20,15	1,24	0,70	0,77	0,07	3,80	0,46	114,7	111,90	3,27	0,28	0,06				
RESTO DE CORDILLERA CANTABRICA (RCC)	LG31	60	32	8	3,77	15,03	<5,44	0,98	0,36	0,64	0,03	4,21	0,75	715,2	42,41	2,45	0,54	0,09			
	LG21	60	34	6	4,55	11,26	<5,44	0,60	0,27	0,33	0,09	3,98	0,71	262,6	42,03	3,92	0,48	0,04			
	LG32	70	24	6	4,52	14,07	<5,44	2,64	0,27	0,97	0,11	6,00	0,80	273,5	61,21	8,21	0,56	0,06			
	LG33	70	24	6	4,18	8,20	<5,44	0,89	0,28	0,33	0,03	3,57	0,43	347,0	33,94	2,39	0,41	0,05			
	LG34	68	26	6	3,99	10,17	<5,44	1,00	0,25	0,30	0,02	3,71	0,60	579,0	28,67	3,06	0,77	0,07			
	LG35	70	26	4	3,72	13,03	<5,44	0,38	0,21	0,27	0,03	2,36	0,55	1097,0	2,37	2,11	0,53	0,05			
	LG36	74	18	8	4,32	10,87	<5,44	1,92	0,42	0,60	0,05	4,73	0,38	215,2	37,25	3,89	0,31	0,08			
	LG22	80	16	4	4,06	8,72	<5,44	0,37	0,20	0,19	0,03	3,58	0,27	231,5	55,30	1,44	0,33	0,07			
	LG23	72	20	8	4,60	9,37	<5,44	1,86	0,27	0,74	0,04	3,42	0,47	208,2	16,63	5,10	0,37	0,04			
	LG37	62	36	2	3,91	11,89	<5,44	0,31	0,24	0,19	0,02	4,06	0,16	424,5	33,08	2,27	0,31	0,06			
	LG38	68	28	4	3,89	16,51	<5,44	0,92	0,43	0,54	0,03	3,84	0,26	274,1	50,29	2,86	0,47	0,20			
	LG24	66	26	8	3,82	14,88	<5,44	0,51	0,10	0,28	0,06	3,38	0,50	418,4	9,27	2,37	0,23	0,20			
	LG25	54	38	8	3,96	17,90	6,6	1,00	0,51	0,80	0,07	5,06	0,62	597,4	23,64	5,47	0,39	0,11			
	LG39	58	31	8	4,51	13,04	<5,44	1,64	0,58	0,58	0,06	6,32	0,34	200,5	73,64	6,77	0,49	0,04			

LG (LEB-GERM (referencia herbario Universidad de León); AR: arena; L: limo; AC: arcilla; Mat.Org: materia orgánica; P: Fósforo; Ca: calcio; K: potasio; Mg: magnesio; Na: sodio; CIC: complejo de intercambio catiónico; Cu: cobre; Fe: hierro; Mn: manganeso; Zn: zinc; B: boro; Cond: conductividad

ANEXO I. **Tabla 2:** Análisis de suelos para las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. subsp. *lutea*

Población	AR	L	AC	pH	Mat.Org	P	Ca	K	Mg	Na	CIC	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Cond dS/m
	(%)				(%)	(ppm)	cmol (+) kg ⁻¹					(ppm)					
LG1	76	22	2	5,28	9,37	<5,44	7,09	0,16	0,72	0,05	9,42	0,69	135,4	14,37	1,39	0,36	0,34
LG2	50	38	12	5,3	5,46	<5,44	7,06	0,29	1,96	0,04	9,27	1,18	100,3	6,9	2,5	0,46	0,24
LG4	74	22	4	5,24	8,45	6,07	8,18	0,25	0,97	0,06	10,89	0,30	84,67	10,8	1,23	0,38	0,39
LG6	52	46	2	4,51	7,14	13,16	6,01	0,24	0,53	0,05	8,47	0,82	127,1	81,92	3,22	0,46	0,73
LG10	62	28	10	4,73	5,11	9,47	6,14	0,36	0,85	0,04	8,16	1,59	119,4	20,82	2,28	0,32	0,42
LG11	76	24	0	4,54	9,57	15,43	3,86	0,29	0,56	0,05	6,75	0,32	105,9	17,98	1,38	0,38	0,45

. LG (LEB-GERM (referencia herbario Universidad de León); AR: arena; L: limo; AC: arcilla; Mat.Org: materia orgánica; P: Fósforo; Ca: calcio; K: potasio; Mg: magnesio; Na: sodio; CIC: complejo de intercambio catiónico; Cu: cobre; Fe: hierro; Mn: manganeso; Zn: zinc; B: boro; Cond: conductividad

ANEXO I. **Tabla 3:**

Población	AR	L	AC	pH	Mat.Org	P	Ca	K	Mg	Na	CIC	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Cond dS/m
	(%)				(%)	(ppm)	cmol (+) kg ⁻¹					(ppm)					
LG27	76	18	6	6,4	11,3	0		110									
LG28	50	20	30	7,2	9,5	Trazas		190									
LG29	60	10	30	6,1	14,6	0		430									
LG30	60	35	5	5,6	11,5	17		129									

Análisis de suelos para las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. subsp. *vardjanii*. LG (LEB-GERM (referencia herbario Universidad de León); AR: arena; L: limo; AC: arcilla; Mat.Org: materia orgánica; P: Fósforo; Ca: calcio; K: potasio; Mg: magnesio; Na: sodio; CIC: complejo de intercambio catiónico; Cu: cobre; Fe: hierro; Mn: manganeso; Zn: zinc; B: boro; Cond: conductividad

ANEXO I. **Tabla 4:** Análisis de suelos para las poblaciones silvestres de *G. lutea* L. var. *aurantiaca*.

Población	AR	L	AC	pH	Mat.Org	P (Olsen)	Ca	K	Mg	Na	CIC	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Cond
	(%)				(%)	(ppm)	cmol (+) kg ⁻¹					(ppm)					dS/m
CT3	48	50	2	4,46	11,86	16,71	1,09	0,35	0,3	0,02	4,95	0,65	216,83	35,48	2,97	0,56	0,08
CT4	30	46	24	7,34	4,69	8,62	20,42	0,2	3,15	0,12	26,52	5,13	85,79	12,88	1,13	1,62	0,11

LG (LEB-GERM (referencia herbario Universidad de León); AR: arena; L: limo; AC: arcilla; Mat.Org: materia orgánica; P: Fósforo; Ca: calcio; K: potasio; Mg: magnesio; Na: sodio; CIC: complejo de intercambio catiónico; Cu: cobre; Fe: hierro; Mn: manganeso; Zn: zinc; B: boro; Cond: conductividad

