

CAPITULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se denomina en castellano como **alcornoque**, que deriva del latín “quercus”, antecedido por el prefijo al-. También denominado sufreiro, chaparro, corco... o Catalán: alzina surera, surer, suro, que deriva del latín “suber” y coincide con el nombre que se le da al corcho. o Euskera: artelatza, tortix. o Gallego: corticeira, sobreiro, sobriro.

Portugués: sobreiro, sobro.

Árabe/ bereber: fersi, fernan, chuber, dlém.

Italiano: sughera.

Francés: chêne liège, surier.

Inglés: cork oak, cork tree.

1.1. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

El alcornoque es un árbol de tamaño medio, llegando a medir 20 o 25 m de altura como mucho. Su copa es amplia, muy extendida cuando crece aislado, aunque su forma es muy variable según las podas y sistema de selvicultura al que se vea sometido.

1.1.1. Tronco

Puede llegar a ser muy grueso, citándose árboles de hasta 12 m de circunferencia, y con 500 años de edad datados en su corteza.

Esta corteza es de tipo suberoso, es decir, compuesta por corcho, siendo relativamente blanda y esponjosa, de muy poco peso y con grietas muy profundas, longitudinales desde jóvenes en los árboles que no han sido descorchados nunca o desde hace tiempo; a esta corcha se le llama bornizo. Es de color grisáceo y llega a alcanzar grosores de más de 25 cm.

En los árboles que han sido descorchados, la corteza interior, llamada capa madre o casca, se ve de un color amarillento que enseguida pasa a rojo oscuro y, con el tiempo, a prácticamente negro. Esta corteza interior es lisa y comienza con los años a resquebrajarse con el crecimiento hacia el exterior, aunque mucho menos que en el corcho bornizo original. Se

llama raspa a esta nueva corteza exterior del alcornoque. Las sucesivas pelias del alcornoque van dando un corcho más fino y de mejor calidad, denominado corcho segundero.

La corteza protege al árbol contra las heridas, las enfermedades, los insectos. Se trata de una parte muerta que protege la parte viva del árbol. El alcornoque, al igual que otros árboles mediterráneos, produce gran cantidad de corteza para sobrevivir a la sequía (al proteger los tejidos internos contra las pérdidas de agua) y a los incendios. De hecho, parece que el corcho del alcornoque es una adaptación al alto riesgo de incendio que existe en sus masas. Lo cierto es que el alcornoque en estado natural (no descorchado) resiste el incendio mucho mejor que cualquier otra especie mediterránea.

El corcho se produce a partir del felógeno. El felógeno produce hacia el interior un tejido llamado felodermis, y hacia el exterior produce súber o felema. El conjunto de felema y felodermis se llama peridermis, y es un tejido protector de tallos y raíces. El *Quercus suber* desarrolla muchos centímetros de felema.

El súber se forma por células que se refuerzan con suberina, sustancia muy impermeable, y al final la célula se asfixia y muere. Al morir, el hueco se rellena de gas y por ello el corcho flota. En el súber existen aberturas especiales, llamadas lenticelas, áreas donde las células del súber desintegran sus paredes y forman masas harinosas, con escamas de ceras que impiden que se mojen para no dificultar el intercambio gaseoso.

1.1.2. Raíces

El alcornoque posee un sistema radical fuerte y vigoroso, profundo y desarrollado en todos los sentidos. Presentan una morfología característica con un eje central flexible, que puede profundizar varios metros si el terreno lo permite, unas raíces secundarias oblicuas, a veces sinuosas, más bien superficiales, que le permiten progresar hasta en suelos rocosos, y que provocan muchas veces brotes de raíz en torno al árbol y a veces incluso a distancias bastante considerables del mismo.

De esta red de raíces secundarias parten hacia la superficie y hasta unos 5 cm. de la misma, cabelleras de finas raíces que presentan una distribución muy irregular, siendo más abundantes bajo la proyección de la copa y, en particular, hacia la orientación norte y este

del árbol (Metro y Sauvage, 1975). Estas raíces permiten establecer competencia radical directa con casi todas las especies de su sotobosque.

El sistema radical del alcornoque se asocia con micorrizas diversas, pertenecientes principalmente a los géneros *Boletus*, *Russula*, *Armillaria* y *Lactarius* (Torres Juan, 1975).

Estos hongos entran en simbiosis con el sistema radical del alcornoque, aumentando su poder de absorción y la solubilidad de algunos compuestos de fósforo y potasio.

1.1.3. Ramas

La ramificación es simpódica y conduce a la formación de troncos más o menos sinuosos, ramificados a alturas variables, en función principalmente de las intervenciones silvícolas de poda y de la espesura de la masa.

Las ramas, de aspecto grueso y resistente, no resisten el peso del viento u otros agentes, quebrándose con relativa facilidad, pues bajo una gruesa capa de bornizo, son en realidad más bien finas. Los tallos jóvenes están cubiertos de pelosidad.

La copa tiende a ser largamente aovada, irregular o aparasolada, presentando ramificación abundante.

1.1.4. Hojas

Las hojas son simples, alternas y persistentes o subpersistentes, ya que pueden tener una duración en el árbol en algunas zonas de 11 meses (normalmente oscila entre 13 y 23 meses). Presenta una clara heteromorfia, tanto en individuos como en grupos territoriales, variando su tamaño, dureza, coloración, etc., con el medio en que vive el árbol, con su posición dentro de él, con las características genéticas propias del mismo, e incluso con las intervenciones culturales.

El peciolo es corto y presenta en la base estípulas lineares. La polimorfía también es muy acusada, el limbo suele ser largamente aovado (de mayor tamaño y más lustroso que el de la encina), abarquillado, coriáceo y con el margen entero o situado con dientes espaciados poco profundos. De color verde oscuro reluciente por el haz y grisáceo por el envés debido a la presencia de pelos.

La nerviación es muy característica con el nervio medio sinuoso y 5-7 pares de nervios secundarios que forman con el principal un ángulo muy agudo. Este carácter permite diferenciarlo de la encina ya que ésta presenta un ángulo más atenuado.

1.1.5. Flores

Las flores son unisexuales, situadas ambas sobre el mismo árbol.

Las flores masculinas aparecen en amentos (inflorescencias en forma de espiga, muy densas) de 4-8 cm., de raquis vellosa, amarillenta y colgante, en grupos de 5 o 6 en el extremo de las ramas jóvenes. Estas flores tienen un perianto de 5-7 lóbulos, ovados, pelosos; anteras pelosas, casi iguales o más largas que los filamentos.

Las flores femeninas se encuentran solitarias o en pequeños grupos, poco pedunculadas, con perianto de 4-6 lóbulos pelosos; estilos linear-claviformes, divergentes desde la base. Éstas se presentan al final de los brotes del año, sobre todo en los más vigorosos. A veces aparecen también en los ramillos del año anterior, dando entonces frutos tardíos de evolución más lenta.

1.1.6. Fruto

El fruto es una bellota de tamaño variable, a veces muy grande, con más de 40 mm de longitud y hasta unos 20 mm de anchura, con pedúnculo de hasta 4 cm. De color castaño rojizo, está cubierta en su parte inferior por una cúpula de 1-2 cm., de color grisáceo claro, campanulada, de base atenuada, cubriendo hasta la mitad de la bellota, formada por escamas triangulares, imbricadas y más o menos aplicadas en la base, las medias y superiores alargadas, terminadas en punta libre, generalmente arqueadas o reflejas.

La floración ocurre normalmente en primavera, entre marzo y junio, pero es también muy variable, pudiendo tener lugar durante todos los meses del año en condiciones benignas.

Las bellotas maduran antes de un año y asimismo, de forma escalonada, la mayor parte de ellas alrededor de octubre o noviembre, pero pudiendo aparecer desde septiembre a febrero e incluso más tarde. Las mayores suelen ser las más tempranas.

En estaciones buenas comienza a fructificar a los 15 años y con regularidad desde los 25-30 años. Suele ser vecero ya que a pesar de fructificar todos los años da cosechas más abundantes cada 2 o 3 años, frecuentemente tras primaveras lluviosas.

1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Hamamelidae

Orden: Fagales

Familia: Fagaceae

Género: *Quercus*

Especie: *Quercus suber*



1.3. EL CICLO VEGETATIVO DE *Quercus suber* L.

El despertar vegetativo de las yemas y la floración tienen lugar entre abril y mayo cuando todavía las reservas hídricas del suelo son abundantes. Las sucesivas fenofases se desarrollan desde junio hasta el final de noviembre (Macchia et al., 1993).

1.4. DESARROLLO DE LAS YEMAS Y DE LOS BROTES VEGETATIVOS

Algunos estudios realizados en alcornoque muestran que la brotación del alcornoque es algo más tardía que la de la encina. Las yemas inician su hinchamiento de mediados de abril a primeros de mayo (Molinas et al., 1989).

A continuación, se produce la apertura de los catáfilos, la extensión de las hojas y el acelerado desarrollo longitudinal de los brotes. Desde que se detecta el hinchamiento, los catáfilos se doblan apareciendo las hojas que todavía no han iniciado su expansión. La elongación de los entrenudos y la maduración de las hojas se sucede rápidamente (Molinas et al., 1989).

La mayor parte de los esclerófilos perennes mediterráneos, efectúan en otoño una segunda actividad vegetativa cuando las temperaturas son favorables para el crecimiento y las lluvias llegan al final del verano. Este segundo crecimiento no se produce (o se reduce), si las temperaturas disminuyen por debajo de la temperatura umbral o si las precipitaciones llegan al final del otoño (Macchia et al., 1993).

1.5. MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES FORESTALES

1.5.1. Posibilidades de la Biotecnología en la conservación y uso de los recursos genéticos.

La Biotecnología, mediante los importantes avances que se han hecho en las áreas de Biología Molecular y del Cultivo de Tejidos Vegetales, ofrece nuevas técnicas que complementan a las metodologías tradicionales de la Mejora Genética Forestal (Toribio y Celestino, 2000), para el conocimiento, conservación y uso de los recursos genéticos forestales.

El uso de marcadores de ADN, está permitiendo caracterizar la naturaleza, amplitud y distribución de la variabilidad natural de especies vegetales. La crioconservación y la **regeneración de plantas** se están utilizando para conservar y micropropagar material vegetal específico, por ejemplo, que pudiera estar en poblaciones amenazadas, a fin de llevar a cabo la conservación *ex situ* y permitir el desarrollo de la silvicultura clonal (Toribio y Celestino, 2000).

Los métodos de regeneración *in vitro* de plantas permiten salvar los inconvenientes originados por las condiciones geográficas, climáticas y de tiempo de producción, ya que se realizan en condiciones ambientales muy controladas, lo que supone una gran ventaja respecto de los métodos de propagación tradicionales (Pierik, 1987).

El cultivo *in vitro* no está exento de dificultades, entre las que destacan, la necesidad de lograr unas condiciones de cultivo que permitan una producción a gran escala más rentable que los sistemas tradicionales. Otra de las dificultades, es la estabilidad genética y funcional de sus células y tejidos, la cual se ve alterada a menudo por diversos factores, tales como la composición de los medios de cultivo, las condiciones ambientales de cultivo, o el aumento de la propia variabilidad intrínseca del material genético, debido a la aceleración de los procesos de crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. Otro de los grandes inconvenientes es la falta de adaptación de condiciones *in vitro* a *ex vitro*, debido a los grandes cambios adaptativos que ha de sufrir el tejido vegetal para ser manipulado *in vitro* y, que posteriormente han de revertir para que la planta regenerada pueda sobrevivir en un ambiente natural.

1.5.2. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* (término que literalmente significa en vidrio) se refiere al conjunto de técnicas que permiten el cultivo de células y tejidos vegetales en condiciones estériles o axénicas. Dentro de esas técnicas, destaca las de micropropagación que permiten la regeneración de plantas completas a partir de células o tejidos de las mismas usadas como explantos. La micropropagación se puede lograr mediante la proliferación de yemas axilares, la caulogénesis o inducción de yemas adventicias y la embriogénesis somática. De las tres, la más sencilla y de uso ampliamente extendido es la proliferación de yemas axilares. Consiste en aprovechar el crecimiento continuado del meristemo apical junto con la formación de yemas laterales.

El cultivo *in vitro* de plantas ha permitido el desarrollo de una serie de biotecnologías destinadas a distintas finalidades, la mayoría basadas en la regeneración de plantas, fundamentalmente ligadas a programas de mejora (Toribio y Celestino, 2000). Una de esas aplicaciones, y en la que se centra este trabajo, es la micropropagación. Presenta una serie de ventajas frente a las técnicas tradicionales: la multiplicación *in vitro* es más rápida que la multiplicación *in vivo*, en ocasiones hace posible propagar especies que no pueden ser multiplicadas *in vivo*, permite una multiplicación libre de enfermedades, supone importantes ahorros en combustible, superficie de invernadero, etc. y elimina el efecto estacional, consiguiéndose una producción homogénea a lo largo del año.

La micropropagación supone la manipulación del explanto inicial, de la composición del medio de cultivo (sobre todo nutrientes y reguladores de crecimiento) y de otros factores del cultivo, para tratar de dirigir el crecimiento de los tejidos hacia el desarrollo de respuestas morfogénicas de interés y, finalmente, regenerar en un corto periodo de tiempo un gran número de plantas completas, genéticamente idénticas al material de partida, utilizando un espacio físico reducido y con independencia de la época del año. Existen una serie de factores que pueden afectar a la capacidad de regeneración del explanto: los que principalmente vienen determinados por las condiciones de la planta madre (la edad y el estado fisiológico de la planta donadora, el tipo de explanto y la posición que ocupa en la planta, la época de recogida del material vegetal y el genotipo) y los que se refieren a las condiciones ambientales de los cultivos (la composición del medio de cultivo, el tipo y la concentración

de los reguladores de crecimiento, el volumen del envase, la calidad y la cantidad de luz y la temperatura, entre los más importantes).

En general las especies leñosas son más difíciles de clonar *in vitro* que las herbáceas, ya que tienen una capacidad regenerativa relativamente más débil y son más propensas a verse afectadas por la emisión de sustancias tóxicas en los medios de cultivo. Por otra parte la esterilización de los explantos suele ser más difícil ya que, por su gran tamaño, es complejo cultivarlas en condiciones controladas. Así mismo, la variabilidad genética en los árboles suele ser más grande que en los cultivos agrícolas, dando lugar a resultados más variables.

La regeneración *in vitro* se puede lograr por dos vías: organogénesis y embriogénesis somática.

1.5.3. La organogénesis

Es la vía más clásica, siendo la inducción del desarrollo de yemas axilares y su posterior enraizamiento la más utilizada, y la que presenta mayores garantías de estabilidad genética frente a las otras vías organogénicas (Toribio y Celestino, 2000). Ha resultado efectiva en la propagación de algunas especies forestales, adquiriendo un valor económico importante, sobre todo en especies de angiospermas, como *Populus* y *Eucalyptus*, aunque también han destacado otras como *Robinia pseudoacacia*, *Liquidambar styraciflua*, especies de *Prunus*, *Juglans* y *Ulmus* (Merkle y Nairn, 2005).

1.5.4. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones completos a partir de una o varias células somáticas, de características similares al embrión cigótico, el cual se origina a partir de la fusión de gametos. Este fenómeno es posible encontrarlo en la naturaleza como una forma de apomixis llamada “embrionía adventicia”, la cual fue descrita por primera vez por Strasburger en 1878. Haberlandt, en 1902, predijo que si todas las células de un organismo tenían la misma información genética que la célula inicial o cigoto, sería posible revertir su expresión génica para que volvieran a expresar el patrón de desarrollo embriogénico y formar auténticos embriones de origen somático, lo que mostraría la totipotencia de estas células. La totipotencia es una característica especial de las células de tejidos jóvenes y meristemas, las cuales tienen una capacidad latente de producir una planta entera. La inducción de la embriogénesis somática supone el lograr un cambio del patrón de

expresión genética de las células del tejido, por un nuevo programa de expresión, el cual conduciría al desarrollo de una nueva planta completa y funcional, siguiendo un desarrollo similar al del embrión de origen cigótico.

La embriogénesis somática presenta una serie de ventajas sobre la organogénesis: se obtienen tasas de multiplicación mayores; los embriones somáticos son estructuras bipolares con meristemas apical y radicular, por lo que no es necesaria la inducción del órgano complementario, normalmente la raíz, como en la organogénesis, eliminando dificultad y trabajo; se obtienen conexiones vasculares raíz-tallo perfectas; los embriones somáticos pueden ser encapsulados, dando lugar a semillas artificiales que permitan, por ejemplo, forestaciones a gran escala; pueden ser conservados en nitrógeno líquido (crioconservación) más fácilmente que los brotes axilares o adventicios, lo que supone una ventaja para el desarrollo de la propagación clonal, especialmente de especies forestales (Bonga y Park, 2003).

1.5.5. Condiciones de cultivo en la micropropagación

Los factores que habitualmente son controlados en la micropropagación para alcanzar y regular unas condiciones de cultivo adecuadas, son tanto de carácter físico como químico. A continuación, se describen los más importantes y algunas de sus características durante la micropropagación, así como su implicación para las plántulas durante las distintas fases del cultivo *in vitro*.

1.5.5.1. Factores físicos:

- **Temperatura (T^a):** es un factor determinante que influye en la mayoría de procesos fisiológicos. Cada tipo de células, tejidos u órganos cultivados va a presentar un rango de temperatura óptima de crecimiento y desarrollo, que generalmente oscila entre 20 y 25 °C.
- **Luz:** es la fuente principal de energía de los organismos autótrofos y, por tanto, otro factor determinante junto con la temperatura. El control de la luz se centra en tres aspectos principales:
 - **Intensidad de luz (irradiación):** la cantidad de luz requerida *in vitro* es aproximadamente 10 veces menor que la requerida *in vivo*, debido a que la actividad autótrofa está reducida *in vitro*.

- **Calidad de luz (espectro):** la calidad de la luz en las cámaras de cultivo es más pobre que la luz en condiciones naturales. Por ello, la combinación de distintos tipos de lámparas que cubran rangos de longitud de onda más similares a los de las condiciones naturales, favorecerá un mejor desarrollo del cultivo.
- **Fotoperiodo:** es el número de horas diarias de luz que recibe el cultivo. En general, durante la fase de multiplicación o propagación, el mejor fotoperiodo *in vivo* será también el mejor *in vitro*.
- **Humedad relativa (HR):** las condiciones de humedad dependen mucho de la planta seleccionada, y de la presencia o no de raíces, situándose en general, entre el 75 y el 90% en los recipientes.
- **Otros factores físicos** que pueden influir en el éxito del cultivo son por ejemplo, el tamaño y la forma de los recipientes de cultivo. Generalmente, se escogen tamaños fácilmente manipulables, pero que al mismo tiempo permitan que haya suficiente aire en su interior para las plantas. En este sentido, otro factor importante es la posibilidad de inyectar aire limpio en los recipientes, o mantenerlos en agitación en el caso de medios líquidos.

1.5.5.2. Factores químicos

- **pH:** el pH de la plántula se regula a través del pH del medio de cultivo. Este se ajusta por lo general entre 5 y 6, y normalmente, disminuye durante la asimilación de las sales de amonio y aumenta con la asimilación de los nitratos (McDonald y Jackman, 1989).
- **Composición del medio de cultivo:** el medio de cultivo consta básicamente de un aporte inorgánico (macro- y micronutrientes), un aporte orgánico (hidratos de carbono, vitaminas, aminoácidos, etc.) y reguladores del crecimiento, todos ellos necesarios para el crecimiento celular y la acumulación de metabolitos secundarios (Misawa, 1985; Stafford *et al.*, 1986). Las sales inorgánicas suministran los macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) y los micronutrientes (boro, cobalto, cobre, manganeso, yodo, hierro y zinc) necesarios para el crecimiento de los cultivos (Hartmann *et al.*, 1990).

1.5.5.3. Vitaminas

Las vitaminas que se usan con más frecuencia en los medios de cultivo son la tiamina, el ácido nicotínico, la piridoxina y la biotina. El myo-inositol, que no es considerado una

vitamina puesto que no tiene reconocida una función esencial como tal, suele describirse junto a éstas debido a que se le atribuyen efectos beneficiosos semejantes a los de las vitaminas (Murashige, 1974). En cuanto a los hidratos de carbono de los medios de cultivo, los cuales resultan necesarios como fuente de carbono para las células vegetales, destacan los azúcares, mayoritariamente la sacarosa, aunque también la fructosa, la glucosa o la maltosa. En otros casos, se usan extractos de otros vegetales, incluso de microorganismos, en los que no sólo se aportan carbohidratos, sino también minerales, aminoácidos, vitaminas, etc.

1.5.5.4. Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento más usados en el cultivo de tejidos son las auxinas y las citoquininas y, en menor medida, las giberelinas y el ácido abscísico. El uso de los reguladores de crecimiento es bastante específico para cada proceso y especie vegetal y, aun cuando a cada tipo de los mismos se les atribuyen unas características generales, su efecto en los diferentes procesos de desarrollo y crecimiento, suele ser el resultado de la interacción de dos o más de ellos (Leopold, 1987).

En organogénesis, las auxinas más usadas son el AIA (ácido indol 3acético), que es una auxina natural o, el AIB (ácido indol 3-butírico) y ANA (ácido α -naftalen-1-acético) que son sintéticas. Son incluidas en los medios de cultivo para estimular la diferenciación y crecimiento de raíces principalmente, así como para la elongación de los tallos gracias a su efecto favorecedor de la dominancia apical. En embriogénesis, se usan para favorecer la formación de *callos* (Pierik, 1987), como es el caso también, del 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

Citoquininas

Las citoquininas actúan sobre el proceso de división celular, favoreciendo la diferenciación de tallos principalmente, y la proliferación de meristemos axilares, así como la formación de brotes adventicios. Son inhibitoras de la formación de raíces porque disminuyen la dominancia apical. En embriogénesis, suelen emplearse combinadas con las auxinas para estimular la formación de callos (Bonga y Von Aderkas, 1992). Entre las más utilizadas se encuentra el 6-BAP (6-benziladenina), el 2-iP (2isopenteniladenina), la quinetina, la zeatina y el tidiazurón.

Giberelinas

Las giberelinas son habitualmente utilizadas en medios de cultivo para promover el alargamiento de los entrenudos, y el crecimiento de los meristemos y yemas, inhibiendo la inducción adventicia de los brotes y raíces (Pierik, 1987). La giberelina más utilizada es el ácido giberélico (GA₃).

En cuanto al ácido abscísico, se usa sobre todo, en la maduración de los embriones somáticos, aunque en organogénesis, se ha aplicado en algunos casos, para paliar posibles efectos del estrés o activar estados de letargo, ya que actúa inhibiendo el crecimiento de tallos y favoreciendo el cierre de estomas.

1.5.6. FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN

La adecuación de los factores de cultivo resulta determinante para lograr la regeneración de plantas *in vitro* vía organogénesis, a partir del cultivo de meristemos axilares y apicales. De forma general, en esta vía de regeneración, se distinguen cinco fases:

Fase 0→ Preparación de la planta madre o tejido original.

Fase I→ Iniciación y establecimiento de cultivos.

Fase II→ Multiplicación de los cultivos.

Fase III→ Alargamiento y enraizamiento de los brotes.

Fase IV→ Aclimatación de las plantas producidas *in vitro*.

La fase 0 engloba todos los tratamientos efectuados antes de la iniciación de los cultivos, para obtener explantes más limpios y con mayor estado de juvenilidad, que les permitan ser más reactivos y, por tanto, adaptarse mejor a las nuevas condiciones de cultivo a las que se van a ver expuestos en la siguiente fase, que es la de implantación *in vitro*. En el caso de las plantas leñosas, en esta fase se trata principalmente, de rejuvenecer el material vegetal, dado que su estado de diferenciación y su grado de lignificación, constituyen un gran inconveniente en la fase de implantación. Una variante de esta técnica, es la inducción de la brotación de las yemas laterales de ramas de un árbol adulto, manteniendo las estacas en cámara de cultivo con alta humedad relativa.

En la fase I, el objetivo consiste en la iniciación y establecimiento de los cultivos en condiciones de asepsia. Para ello hay que controlar las posibles infecciones y asegurar un número razonable de explantes con viabilidad de crecimiento. En esta fase es importante la elección del explante inicial (embriones, yemas axilares y apicales, meristemos, etc.), así como su tamaño, estado fisiológico y juvenilidad. Pero también es importante elegir el método de desinfección para tener controlados los posibles contaminantes. Es frecuente que en esta etapa no se utilicen reguladores de crecimiento para estimular a los tejidos implantados, pero en algunos casos se suelen utilizar citoquininas, para inducir la ruptura de la dormición y el crecimiento de los meristemos, así como promover el desarrollo y crecimiento de las yemas axilares (Romano *et al.*, 1992; Mac AntSaoir y Kabrianis, 1993; Schwarz y Schlarbaum, 1993; Vieitez *et al.*, 1994).

La fase II es la fase de multiplicación o aumento de la cantidad de material vegetal que va a ser utilizado posteriormente para regenerar la planta completa. Este aumento de masa implica generar nuevas estructuras, de manera que los explantes puedan ser divididos en unidades funcionales menores (propágulos), a partir de las cuales volver a iniciar el proceso de multiplicación (crecimiento y separación de propágulos), de forma periódica cada vez que se renueve el medio de cultivo (subcultivo).

En la fase de multiplicación, entre otros factores, resulta determinante el uso de los reguladores de crecimiento, especialmente el uso de citoquininas y auxinas y, en concreto, el balance entre ambas.

La fase III consiste en la inducción del enraizamiento. En esta fase, cada propágulo individual formado durante la fase de multiplicación, ha de ser manipulado *in vitro* para que, además de seguir creciendo y desarrollando el tallo y las primeras hojas, forme y desarrolle raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al trasplantarse sobre un sustrato enriquecido y, convertirse en una vitroplanta aclimatada lista para llevarse al campo (Orellana, 1998).

Esta fase pasa generalmente por la aplicación de auxinas y, es influenciada por otros factores químicos, como por ejemplo, el efecto inhibitorio de la rizogénesis debido al tratamiento con citoquininas durante la multiplicación (Galiana *et al.*, 1991) o, la concentración de azúcares en los medios de cultivo. También es influenciada por factores físicos, como la luz y la

temperatura (Murashige, 1974), el tipo de sustrato, el número de subcultivos o el tamaño de los brotes.

La fase IV es la fase de aclimatación. Las plántulas que crecen *in vitro* están expuestas a un micro-ambiente muy particular, con atmósferas con alta humedad relativa, con una baja densidad lumínica, forzadas a que varíen su metabolismo autotrófico a un metabolismo heterotrófico, donde la fuente de carbono es suministrada en los medios de cultivo, los cuales además, contienen otros compuestos que suelen alterar el normal desarrollo y crecimiento de sus tejidos (sales minerales, vitaminas, reguladores del crecimiento, etc.). Todas estas condiciones pueden provocar deficiencias anatómicas, morfológicas y fisiológicas que hacen a las plantas crecidas *in vitro* muy sensibles a su transferencia a condiciones *ex vitro*.

1.5.7. FACTORES A TOMAR EN CUENTA EN LA MICROPROPAGACIÓN

➤ **Posibilidad de contaminación con microorganismos.**

De ser posible, se deben cultivar explantes de plantas donantes que crecen en condiciones de invernadero, con ello se reduce sustancialmente las tasas de contaminación. Por otra parte, es recomendable evitar el uso de «explantes sucios» (raíces, rizomas) que provienen de plantas crecidas en macetas o en el campo, dado que en la mayoría de los casos no es posible conseguir una buena desinfección de los mismos.

➤ **Edad fisiológica**

Este es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. Es por ello que los meristemas apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies. En el caso de la micropropagación de plantas leñosas, la edad del explante es un factor crítico. Si los tejidos son jóvenes, la micropropagación tiene mayores posibilidades de ser exitosa que con tejidos maduros.

➤ **Tamaño**

En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con

microorganismos. También es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados.

➤ **Época del año**

Es un factor que suelen tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al grado de dormición que presentan ciertos explantes (yemas, por ejemplo) y también con la posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos.

➤ **Asepsia**

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por explante-medio de cultivo-condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. Es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus y fitoplasmas, por lo que en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se quiere significar que son cultivos donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias.

Dos son las fuentes de contaminaciones: **a)** microorganismos presentes en el interior o en la superficie de los explantes y **b)** fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio. La correcta detección de estas fuentes y del tipo de microorganismo son aspectos importantes para el éxito de los cultivos, pues por un lado ayuda a determinar la fuente de contaminación y por otro lado, ayuda a la planificación de los procedimientos para controlarlos.

➤ **Medios de cultivo**

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos. Para dar una idea de la cantidad de formulaciones disponibles, George y *col.*,

Básicamente, los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran:

- Una fuente de carbono.
- Nutrientes minerales.
- Sustancias vitamínicas.
- Sustancias reguladoras del crecimiento.
- Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos).

➤ **Preparación del material vegetal**

Según Cárdenas (2011) y Olmos et al. (2005), para establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado.

Los materiales que tienen mayor capacidad regenerativa son los tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas (Martin, 1997).

➤ **Protocolo de desinfección**

El proceso de desinfección, consiste en eliminar los microorganismos, sin causar daño al explante, los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia (Abdelnour, 1994).

Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo de laboratorio. Pueden observarse infecciones por bacterias y hongos que sobreviven a los tratamientos de esterilización.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Descripción de la zona de estudio

2.1.1. Ubicación geográfica

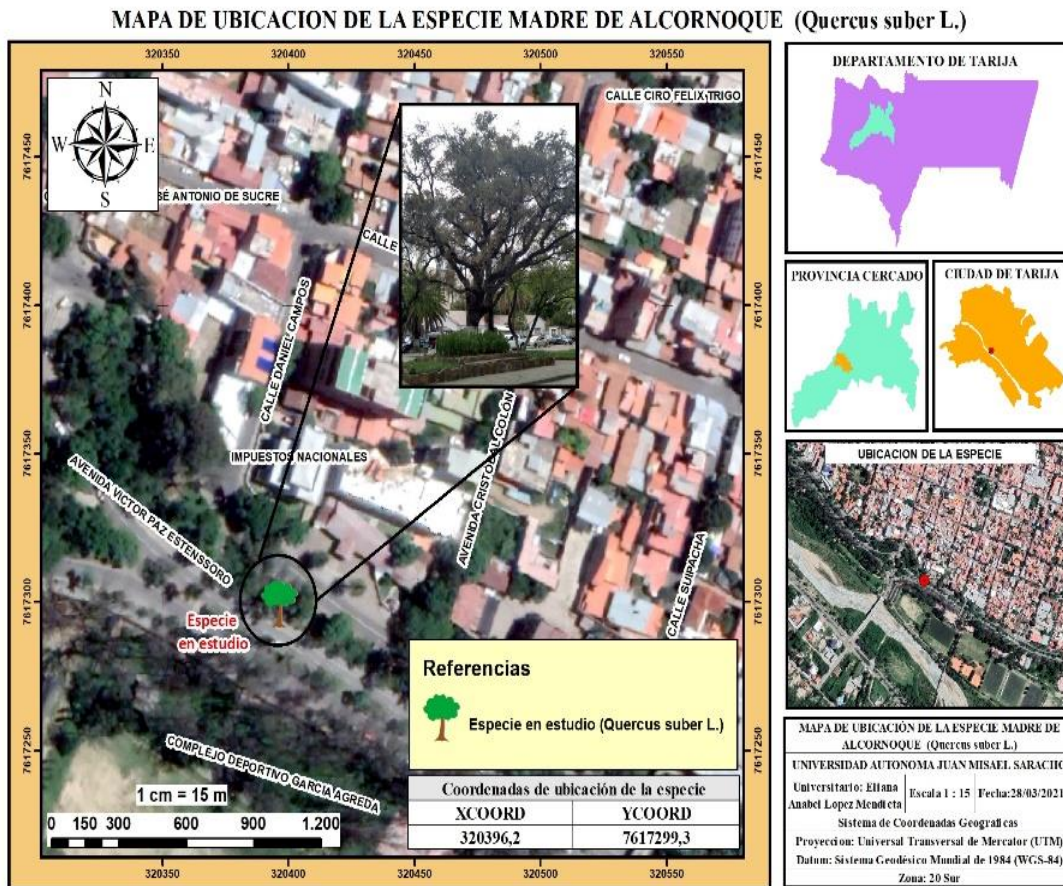


Figura 1. Mapa de ubicación de la planta madre de alcornoque (*Quercus suber* L.)

La planta madre de la especie alcornoque (*Quercus suber* L.) se encuentra ubicada en la avenida Las Américas a la altura del Rectorado de la U.A.J.M.S. entre los paralelos 21°32'17,1" de latitud sur y 64°44'3,8" de longitud oeste.

2.1.2. Suelos

Los suelos en la avenida Las Américas presenta una textura que va de franco limosa a franco arcillo limosa, con presencia de materia orgánica en la superficie son suelos poco profundos por acumulación de material aluvial en la llanura de inundación. Fuente: elaboración propia.

2.1.3. Características climáticas

El clima en el valle central de Tarija es sub húmedo con un periodo de disponibilidad de agua en el suelo para el crecimiento de las plantas que varía entre los 4 y 6 meses y un periodo libre de heladas entre 7 y 9 meses. ZONISIG, 2001.

2.1.4. Hidrografía

La cuenca del río Bermejo en territorio boliviano se compone principalmente de la cuenca del río Bermejo, como tal, y del río Grande de Tarija, que tiene su origen en las serranías de Sama, en el Valle Central posee importantes afluentes como son los ríos Guadalquivir, Tolomosa, Santa Ana y Camacho.

Para la estación Aeropuerto de Tarija la precipitación total anual es de 594,0mm con una frecuencia de precipitación de 74,3 días al año. SENAMHI.

2.1.5. Temperatura

En base a los datos de la estación de aeropuertos de la ciudad de Tarija que según el SENAMHI 2021 es la estación más representativa de la ciudad de Tarija con una serie climática de 1979 - 2020. La temperatura media anual es de 18°C, la máxima media es de 26,2° C y la temperatura mínima anual es de 9,8°C. Las temperaturas máximas absolutas llegaron a los 37,9°C y las mínimas absolutas a -9,2°C.

2.1.6. Humedad

Debido a las características regionales esta depende a los factores: temperatura, altura sobre el nivel del mar, orientación de la pendiente y los regímenes de precipitación.

Presenta una humedad relativa anual del 59,9% y una evapotranspiración potencial de 1272,8 mm. anuales.

2.2. Ubicación del ensayo

El presente trabajo se realizará en el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in Vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho zona El Tejar ubicado en la ciudad de Tarija provincia Cercado.

2.3. Materiales

2.3.1. Material vegetal

Se utilizarán meristemas nodales procedentes de las estacas que serán recolectados de plantas adultas de alcornoque (*Quercus suber* L.), que se encuentran ubicadas en la avenida Las Américas de la ciudad de Tarija.

2.3.2. Material de campo

GPS

Bolsas plásticas.

Tijera de podar.

Tijera estereoscópica.

2.3.3. Materiales y/o equipo de laboratorio

➤ Área de preparación

Matraces.

Balanza de precisión.

Pipetas.

Erlenmeyers.

Frascos y tubos de ensayo.

Agua destilada.

➤ Área de esterilización

Autoclave.

Estufa de esterilización.

➤ Área de siembra

Bisturí.

Hojas de bisturí.

2.4. Metodología

2.4.1. Origen y Preparación de Material Vegetal

El material vegetal para la micropropagación consiste en segmentos nodales procedentes de brotes tiernos obtenidos mediante la inducción en la brotación de las estacas de individuos adultos.

La recolección de las estacas tuvo lugar el mes de mayo, y se cortaron a una longitud de 15 a 20 cm, y de entre 2 y 4 cm de diámetro. Se intentó que las estacas escogidas estén en buen estado, descartando aquellas cuya corteza este demasiado envejecida o con heridas importantes.

Una vez recolectada las estacas se procedio a tratarlas con una solución fungicida de carbendazin (5ml/l) y captan (5gr/l) durante 10 minutos.

A las estacas se les coloco en una bandeja de plástico con un sustrato de perlita (8cm de espesor aproximadamente), que fue humedecida periódicamente para mantener las condiciones de humedad entre 50 – 60%, bajo un fotoperiodo de 16 hr de luz y a una temperatura de 25 °C aproximadamente.

Los explantes fueron seleccionados según características deseables de sanidad, vigor y del tamaño conveniente (1,5 a 2 cm de longitud) para después ser sometidos al proceso de desinfección. Luego, dentro de la cámara de Flujo Laminar que permite asepsia, se extrajeron los explantes definitivos (meristemas y segmentos nodales) con ayuda de pinzas y bisturíes.

Posteriormente los explantes se los inoculo a los tubos de ensayo con el medio de cultivo específico, siempre con máxima asepsia dentro de la cámara de flujo laminar.

2.4.2. Protocolo de desinfección

Se evaluaron dos protocolos de desinfección para evitar la contaminación del explante en el desarrollo de cultivo in vitro de *Quercus suber* L.

Protocolo de desinfección	descripción
P1	Los explantes fueron lavados en agua corriente por 10 min, colocados en jabon liquido en agitaci3n con Tween 20 (2 gotas/100ml) durante 25 min, lavados con ADE (3 veces), se aplicaron fungicidas (Carbendazim y Benomil 2g.l ⁻¹) y bactericidas (Ampicilina y soluci3n de Iodo 1ml.l ⁻¹) por 30 min con 2 gotas de Tween 20, luego se lavaron con ADE. En c3mara de flujo laminar los explantes desinfectados, se colocaron en alcohol al 70% por 1 min, posteriormente lavados con ADE, fueron colocados en hipoclorito de sodio al 3% durante 20 min con Tween 20, finalmente lavados con ADE. (ADE= Agua Destilada Esteril).
P2	Los explantes ser3n lavados en tween durante 30 min en agitaci3n, luego se colocara en alcohol al 70% por 30 segundos y posteriormente colocados en hipoclorito de sodio al 1,5% por 10 minutos y finalmente lavados con ADE (3 veces).

2.4.3. Establecimiento del cultivo in vitro

2.4.3.1. Medios de cultivo

En este ensayo se evaluaron dos medios de cultivo para la introducci3n in vitro de *Quercus suber* L.

Cuadro N° 1. Composición de los medios de cultivo de Murashigue y Skoog, y Woody Plant Medium (WPM) a utilizar en la fase de implantación de segmentos nodales.
(Cantidades expresadas en mg/l).

	Compuesto	MS	WPM
Macronutrientes			
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650	1400
KNO ₃	Nitrato de potasio	1900	
K ₂ SO ₄	Sulfato de potasio		990
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	180	180,54
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	170	170
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Nitrato de calcio tetrahidratado		471,26
CaCl ₂ .H ₂ O	Cloruro de calcio hidratado	332,02	72,50

Micronutrientes			
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8,6	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0,025	0,25
CoCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de cobalto bihidratado	0,025	
H ₃ BO ₃	Acido borico	6,20	6,20
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0,25	0,25
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de manganeso hidratado	16,90	22,3
KI	Yoduro de potasio	0,83	
Quelatos			
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado	27,85	27,85
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	Sal de sodio del acido etilendiamino tetra acetico	37,25	37,25

Vitaminas	MS	WPM
Glicina	2,0	2,0
Tiamina	1,0	1,0
Acido nicotínico	0,50	0,50
Piridoxina	0,50	0,50
Myo-inositol	100	100

Los medios de cultivo fueron suplementados con 30g/l de sacarosa como fuente de carbono, 125ml/l de carbón activo y 5,5 g/l de Plant – Agar.

El pH se ajustó en 5,75 antes de autoclavar, proceso que se llevo a cabo durante 20 minutos a 121 °C.

2.4.3.2. Introducción del material vegetal in vitro

La desinfección del material vegetal con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 3% se realizo en la cámara de flujo laminar, posteriormente se realizaron los cortes para obtener los segmentos nodales que contengan 1 yema cada uno. Las yemas fueron sembradas en el medio de cultivo estéril, para evitar la contaminación se flameo la tapa del tubo de ensayo, se selló y etiquetó, para finalmente ser incubados en la cámara de crecimiento a una temperatura promedio de 25 °C con un fotoperiodo de 16 horas/luz.

2.4.3.3. Diseño experimental

El diseño experimental a emplear en la investigación fue completamente al azar con un arreglo bifactorial (2x2), con cuatro tratamientos y tres repeticiones, un total de doce unidades experimentales.

Factores:

- **Factor 1. Protocolo de desinfección de explantes**

P1= protocolo con bactericida

P2= protocolo estándar del laboratorio

- **Factor 2. Medio de cultivo**

M1= MS (Murashigue y Skoog)

M2= WPM (Woody Plant Medium)

- **Tratamientos**

1= P1 M1 (protocolo con bactericida y medio de cultivo MS)

2= P1 M2 (protocolo con bactericida y medio de cultivo WPM)

3= P2 M1 (protocolo estándar del laboratorio y medio de cultivo MS)

4= P2 M2 (protocolo estándar del laboratorio y medio de cultivo WPM)

2.4.3.4. Unidad experimental

La unidad experimental esta compuesta por tres tubos de ensayo con explantes de segmentos nodales.

Variables a medir

- Porcentaje de regeneración.
- Porcentaje de contaminación.
- Tamaño del brote.
- Número de yemas del brote.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Inducción a la brotación de estacas de árboles maduros de *Q. suber*.

Como material experimental se utilizaron estacas de *Q. suber* de 15 a 20 cm de longitud sumergidas en una solución fungicida para desinfectarlas y fueron llevadas a una cámara de frío durante 5 días, pasado esos días se las colocaron en una bandeja de plástico con perlita de unos 8cm de espesor aproximadamente. La perlita fue humedecida periódicamente para mantener las condiciones de humedad dentro de invernadero.



Figura 2. Estacas de *Q. suber* tratadas con un solución fungicida

Los datos tomados de las estacas para la inducción a la brotación se describen a continuación:

- **Número de estacas**, es la cantidad de estacas utilizadas para obtener yemas.
- **Tiempo de aparición de las primeras yemas**. Entendido este como el tiempo transcurrido desde la disposición de las estacas en las bandejas con perlita hasta la aparición de las primeras yemas brotando.
- **Tiempo de producción de yemas**, como el tiempo transcurrido desde la aparición de las primeras yemas hasta que las estacas dejen de producir.
- **Máximo número de yemas producidas**, es el número máximo de yemas producidas.
- **Tamaño de los brotes**, cuando los brotes producidos por las estacas han sido suficientemente grandes se han dividido en dos o más segmentos nodales.

-

Cuadro N° 2. Inducción a la brotación de estacas leñosas de *Q. suber*

Nro de estacas	Nro estacas con brotes	Tiempo de aparición de primeras yemas (días)	Tiempo de producción de yemas (días)	Máximo número de yemas producidas	Tamaño de los brotes (cm)
31	14	10	30	32	6

De las 31 estacas solo se obtuvieron yemas de 14 de ellos con un porcentaje del 45,16% que fueron aptos para la implantación in vitro, las demás estacas no presentaron brotes o se produjo un amarillamiento de las hojas y su posterior muerte.

Figura 3. Estacas de *Q. suber* en una bandeja con un sustrato de perlita para inducir a la brotación de sus yemas.



3.2. Establecimiento in vitro del alcornoque

Para el inicio o establecimiento in vitro del alcornoque (*Quercus suber* L.) se realizaron 7 ensayos probando dos medios de cultivo: MS (Murashing y Skog) y WPM (Woody Plant Medium) aplicando hormonas como las citoquininas, y dos protocolos de desinfección mencionados anteriormente.

Para analizar los resultados de la investigación se trabajó con porcentajes.

De acuerdo a los objetivos planteados y en base a la metodología del establecimiento in vitro del alcornoque (*Quercus suber* L.) se obtuvieron los siguientes resultados:

En el siguiente cuadro se muestra el detalle y los resultados del primer ensayo, donde la variable a evaluar es la regeneración y la contaminación.

3.2.1. 1er ensayo in vitro del alcornoque con dos medios de cultivo MS y WPM.

Tipo de explante: segmento nodal.

Época: invierno.

Fecha de inicio: 09 de agosto de 2019.

Cuadro N° 3. Porcentaje de regeneración

tratamiento	iniciados	7 días	%	15 días	%	30 días	%
M1D1	9	2	22,22	0	0,00	0	0,00
M1D2	9	0	0,00	0	0,00	0	0,00
M2D1	9	0	0,00	0	0,00	0	0,00
M2D2	9	0	0,00	0	0,00	0	0,00

M1= medio MS

D1= Protocolo de desinfección con bactericida

M2= medio WPM

D2= Protocolo estándar del laboratorio

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	11	4073,26				
Tratamiento	3	1110,89	370,29	1	4,07	7,59
Error	8	2962,37	370,29			

En el análisis de varianza (ANOVA) no se evidencio diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual indica que puede existir una regeneración de los explantes en cualquiera de los dos medios de cultivo usados en este ensayo (MS y WPM). Pero al existir un bajo porcentaje de regeneración del 22,22% con el medio de cultivo MS se considera que es el más apto para lograr el establecimiento in vitro de *Q. suber*.

Cuadro N°4. Porcentaje de contaminación

Tratamiento	Iniciados	7 días	%	15 días	%	30 días	%
M1D1	9	1	11,11	1	11,11	5	55,55
M1D2	9	1	11,11	1	11,11	2	22,22
M2D1	9	1	11,11	2	22,22	3	33,33
M2D2	9	3	33,33	3	33,33	3	33,33

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	11	12128,48				
Tratamiento	3	1759,29	586,43	0,45	4,07	7,59
Error	8	10369,19	1296,15			

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) no se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de contaminación de estos tratamientos, en base a esto se puede decir que cualquier de los dos protocolos descritos anteriormente son aptos para la desinfección de los explantes de *Q. suber*.

La contaminación va aumentando a medida que pasa el tiempo, a los 30 días llega a un porcentaje del 55,55% en el tratamiento uno (M1D1), causado por hongos y bacterias.

3.2.2. 2do ensayo in vitro del alcornoque con tres concentraciones de citoquininas y una prueba testigo con medio de cultivo MS (Murashing y Skog).

Tipo de explante: segmento nodal.

Época: primavera.

Fecha de inicio: 17 de diciembre de 2019.

Cuadro N° 5. Porcentaje de regeneración

Tratamiento	Iniciados	7 días	%	15 días	%	30 días	%
-------------	-----------	--------	---	---------	---	---------	---

T1	9	1	11,11	1	11,11	1	11,11
T2	9	0	0,00	1	11,11	1	11,11
T3	9	0	0,00	0	0,00	0	0,00
T4	9	0	0,00	0	0,00	0	0,00

T1= medio MS (prueba testigo)

T3= medio MS + 2mg/L BAP

T2= medio MS + 1 mg/L BAP

T4= medio MS + 3 mg/L BAP

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	11	1851,49				
Tratamiento	3	370,30	123,43	0,66	4,07	7,59
Error	8	1481,19	185,15			

En el análisis de varianza (ANOVA) no se evidencia diferencias significativas en los tratamientos, sin embargo se puede observar un porcentaje mínimo de regeneración del 11,11% para el tratamiento uno (T1) como prueba testigo y para el tratamiento dos (T2) con 1 mg/L BAP.

Cuadro N° 6. Porcentaje se contaminación

tratamiento	iniciados	7 días	%	15 días	%	3° días	%
T1	9	0	0,00	2	22,22	6	66,66
T2	9	1	11,11	5	55,55	7	77,77
T3	9	0	0,00	3	33,33	7	77,77
T4	9	1	11,11	6	66,66	6	66,66

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	11	1296,7				
Tratamiento	3	370,3	123,43	0,078	4,07	7,59
Error	8	12593,4	1574,17			

De acuerdo con el análisis de varianza no se logró determinar diferencias significativas de los tratamientos de desinfección aplicados, la contaminación fue causada principalmente por hongos y bacterias.

En este ensayo los tratamientos consistieron en tres concentraciones de BAP (1, 2 y 3 mg/L) y una prueba testigo a la cual no se adiciono BAP. Según algunos autores (Glovak y Greatbach 1982 y Villalobos y Thorpe 1991), las citoquininas son fundamentalmente reguladores de crecimiento para la formación de brotes entre ellas la 6-BAP es en general la más efectiva y la más empleada en la inducción de yemas axilares (Orellana 1998). Es por eso que se empleó esta fitohormona en este ensayo de establecimiento, pero no se logró una regeneración de los explantes.

3.2.3. 3er ensayo in vitro del alcornoque con dos medios de cultivo MS y WPM y carbón activo

Tipo de explante: segmento nodal.

Época: verano.

Fecha de inicio: 17 de febrero de 2020.

Días de oscuridad: 5

Cuadro N° 7. Porcentaje de regeneración

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
M1	9	0	0,00	0	0,00	0	0,00
M2	9	0	0,00	0	0,00	0	0,00
M3	9	0	0,00	0	0,00	0	0,00

M4	9	1	33,33	0	0,00	0	0,00
-----------	---	---	-------	---	------	---	------

M1= medio MS

M2= medio MS + carbón activo

M3= medio WPM

M4= medio WPM + carbón activo

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	11	1018,32				
Tratamiento	3	277,72	92,57	1	4,07	7,59
Error	8	740,6	92,57			

Según el análisis de varianza no existe diferencia significativa de los tratamientos, sin embargo se observa la regeneración del 33,33% a los 7 días en el tratamiento cuatro (M4) donde se usó el carbón activo y medio MS, llegando a los 15 días se torna una coloración marrón del explante y su posterior muerte a causa de la necrosis.

Cuadro N° 8. Porcentaje de contaminación

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
M1	9	2	22,22	3	22,22	3	33,33
M2	9	0	0,00	2	33,33	2	22,22
M3	9	0	0,00	2	22,22	3	33,33
M4	9	2	22,22	3	33,33	3	33,33

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	11	7683,65				

Tratamiento	3	277,72	92,57	0,10	4,07	7,59
Error	8	7405,93	925,74			

En el análisis de varianza no se encontró diferencias significativas en los tratamientos, lo cual se podría usar o no el carbón activo en los medios de cultivo para reducir la oxidación, sin embargo se puede observar que hay una reducción en los porcentajes de contaminación en relación con el anterior ensayo.

Cuadro N° 9. Porcentaje de necrosis/fenolización

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
M1	9	6	66,66	6	66,66	6	66,66
M2	9	4	44,44	4	44,44	5	55,55
M3	9	5	55,55	5	55,55	5	55,55
M4	9	4	44,44	4	44,44	5	55,55

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	11	9166,50				
Tratamiento	3	277,83	92,61	0,08	4,07	7,59
Error	8	8888,67	1111,08			

Según el análisis estadístico no se encontró diferencias significativas en los tratamientos, sin embargo existe un alto porcentaje de necrosis pasando el 50% en los 4 tratamientos que serían el principal problema para que no hay una regeneración de los explantes.

Según los resultados obtenidos en este ensayo se puede observar que continúa el problema de la contaminación, pero más aún es el problema de la necrosis o fenolización de los explantes que finalmente causan una coloración marrón y su posterior muerte.

3.2.4. 4to ensayo in vitro del alcornoque con medio de cultivo MS y ácido cítrico

Tipo de explante: segmento nodal.

Época: primavera.

Fecha inicio: 12 de octubre de 2020.

Días en oscuridad: 5

Cuadro N° 10. Porcentaje de regeneración

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
T1	17	0	0,00	0	0,00	0	0,00
T2	17	0	0,00	0	0,00	0	0,00

T1= medio MS

T2= medio MS + ácido cítrico

. No se observa la regeneración en ninguno de los tratamientos es decir el 0%.

Cuadro N° 11. Porcentaje de contaminación

Trat.	inic	7 días	%	15 días	%	30 días	%
T1	17	2	11,76	3	17,65	3	17,65
T2	17	0	0,00	0	0,00	0	0,00

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	5	1036,88				
Tratamiento	1	474,02	474,02	3,37	7,71	21,2
Error	4	562,86	140,72			

Según el análisis de varianza no se encuentra diferencias significativas para los tratamientos, en los explantes contaminados por hongos y bacterias se pudo observar en el tratamiento uno (T1) al cual no se adiciono el ácido cítrico, mientras que en tratamiento dos (T2) no muestra un porcentaje de contaminación durante los 30 días de evaluación, es decir 0% de contaminación.

Cuadro N° 12. Porcentaje de necrosis/fenolización.

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
T1	17	4	23,53	8	47,03	9	52,94
T2	17	0	0,00	1	5,88	1	5,88

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	5	3288,31				
Tratamiento	1	2399,60	2399,6	10,8	7,71	21,2
Error	4	888,71	222,18			

Según el análisis de varianza se pudo determinar diferencias significativas de los tratamientos, se observa una gran pérdida de explantes en el tratamiento uno (T1) a causa de la necrosis/ fenolización, mientras que para el tratamiento dos (T2) solo hay un porcentaje de 5,88% lo cual nos indica que el ácido cítrico ayuda a reducir los porcentajes de necrosis.

Al analizar el anterior ensayo y observar que hubo un alto porcentaje de necrosis y fenolización se realizaron dos tratamientos en el cual al tratamiento uno (T1) se le aplico el ácido cítrico para evitar la oxidación en los explantes ya que es el antioxidante más usado en el cultivo in vitro, al tratamiento dos (T2) no se le aplico ácido cítrico. El medio de cultivo usado fue el MS (Murashing y Skog).

3.2.5. 5to ensayo in vitro del alcornoque con medio de cultivo MS y aplicación de hormonas BAP y AIB

Tipo de explante: segmento nodal.

Época: primavera.

Fecha inicio: 6 de noviembre de 2020.

Días en oscuridad: 5

Cuadro N° 13. Porcentaje de regeneración

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
T1	20	0	0,00	0	0,00	0	0,00
T2	20	0	0,00	1	5,00	1	5,00

T1= medio MS + ácido cítrico + BAP 0,3mg/L + AIB 2mg/L

T2= medio MS + ácido cítrico

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	5	169,93				
Tratamiento	1	33,98	33,98	0,99	7,71	21,2
Error	4	135,95	33,99			

Según el análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas para los tratamientos, sin embargo hay un porcentaje mínimo de regeneración del 5% en el tratamiento dos (T2) sin el uso de las fitohormonas.

Cuadro N° 14. Porcentaje de contaminación

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
-------	-------	--------	---	---------	---	---------	---

T1	20	2	10,00	2	10,00	2	10,00
T2	20	5	25,00	6	30,00	7	35,00

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	5	1209,58				
Tratamiento	1	967,74	967,74	16,01	7,71	21,2
Error	4	241,84	60,46			

Según el análisis de varianza se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se observó que el tratamiento dos (T2) presentaron un mayor porcentaje de contaminación causado por hongos y bacterias.

Cuadro N° 15. Porcentaje de necrosis/fenolización

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
T1	20	7	35,00	9	45,00	10	50,00
T2	20	4	20,00	4	20,00	4	20,00

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	5	2045,49				
Tratamiento	1	1293,60	1293,6	6,88	7,71	21,2
Error	4	751,89	187,97			

Según el análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas para los tratamientos, en el tratamiento uno (T1) al usar la BAP y el AIB se redujo la contaminación

pero la necrosis continúa llegando hasta el 50%, en lo cual se llega a perder gran cantidad de material vegetal a causa de esto.

3.2.6. 6to ensayo in vitro del alcornoque con medio de cultivo MS, ácido cítrico, ácido ascórbico y la hormona 2ip

Tipo de explante: segmento nodal.

Época: primavera.

Fecha inicio: 9 de diciembre de 2020.

Días en oscuridad: 5

Cuadro N° 16. Porcentaje de regeneración

Trat.	Inic	7 días	%	15 días	%	30 días	%
T1	20	0	0,00	0	0,00	0	0,00
T2	20	0	0,00	0	0,00	0	0,0,

T1= medio MS + ácido cítrico + ácido ascórbico + hormona 2ip 2mg/L

T2= medio MS + ácido cítrico + ácido ascórbico + hormona 2ip 2mg/L + BAP 0,5mg/L

En este ensayo no se observa la regeneración en ninguno de los tratamientos durante los 30 días de evaluación, es decir el 0%.

Cuadro N° 17. Porcentaje de contaminación

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
T1	20	9	45,00	10	50,00	13	65,00
T2	20	11	55,00	13	65,00	15	75,00

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	5	1243,59				
Tratamiento	1	185,25	185,25	0,70	7,71	21,2

Error	4	1058,34	264,58			
--------------	---	---------	--------	--	--	--

Según el análisis de varianza no se encontró diferencias significativas para los tratamientos, sin embargo se observa un alto porcentaje de contaminación en los dos tratamientos causado por hongos.

Cuadro N° 18. Porcentaje de necrosis/fenolización

trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
T1	20	2	10,00	4	20,00	5	25,00
T2	20	2	10,00	3	15,00	4	20,00

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	5	245,83				
Tratamiento	1	34,03	34,03	0,64	7,71	21,2
Error	4	211,8	52,95			

En el análisis de varianza no se observan diferencias significativas para los tratamientos, sin embargo hay una reducción en los porcentajes de necrosis en ambos tratamientos, pero aún no hay regeneración de los explantes (0%).

3.2.7. 7mo ensayo in vitro de alcornoque con medio de cultivo MS hormonas 2ip y BAP

Tipo de explante: segmento nodal.

Época: verano.

Fecha inicio: 26 de enero de 2021.

Días en oscuridad: 3

Cuadro N° 19. Porcentaje de regeneración

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
T1	19	0	0,00	0	0,00	0	0,00
T2	19	0	0,00	0	0,00	0	0,00

T1= medio MS + ácido cítrico + ácido ascórbico + hormona 2ip

T2= medio MS + ácido cítrico + ácido ascórbico + BAP

En este ensayo no se observa la regeneración de los explantes en ninguno de los tratamientos durante los 30 días de evaluación.

Cuadro N° 20. Porcentaje de contaminación

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
T1	19	1	5,26	1	5,26	2	10,53
T2	19	5	26,31	6	31,58	7	36,84

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	5	2578,15				
Tratamiento	1	1028,88	1028,88	2,66	7,71	21,2
Error	4	1549,27	387,32			

Según el análisis de varianza no se encontró diferencias significativas en los tratamientos, sin embargo sin embargo sigue existiendo el problema de la contaminación causado por hongos y bacterias.

Cuadro N° 21. Porcentaje de necrosis/fenolización

Trat.	Inic.	7 días	%	15 días	%	30 días	%
T1	19	3	15,79	4	21,05	5	26,31

T2	19	2	10,53	3	15,79	3	15,73
-----------	----	---	-------	---	-------	---	-------

Cuadro ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
Total	5	430,97				
Tratamiento	1	185,26	185,26	3,01	7,71	21,2
Error	4	245,71	61,43			

Según el análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas para los tratamientos, se puede observar que continua la necrosis pero con porcentajes más bajos pero sigue siendo el principal problema para lograr una regeneración de los explantes.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

En la evaluación de la contaminación los resultados indicaron que el hipoclorito de sodio a 1,5% de concentración y el tiempo de inmersión de 10 min y el alcohol al 70% durante 60 segundos son suficientes para descontaminar los explantes de esta especie.

La aplicación de antioxidantes tuvo un efecto muy marcado en la sobrevivencia de los explantes, los mejores resultados se obtuvo aplicando el ácido cítrico a una concentración de 75mg/L, aunque no se logró la regeneración se pudo mantener los explantes vivos libres de contaminantes.

De acuerdo a los objetivos propuestos se llegó a las siguientes conclusiones:

- Para la inducción a la brotación de la especie en estudio el mejor material vegetal para recolectar son las estacas leñosas con diámetros de 2 a 4cm.
- En la desinfección de los explantes se determinó que el protocolo estándar de laboratorio (protocolo de desinfección para la papa) es el óptimo para realizar la desinfección de los explantes de *Quercus suber* L.
- Se concluyó que el medio óptimo para el establecimiento in vitro del *Quercus suber* L. es el medio Murashing y Skog (MS).
- La necrosis y fenolización se redujo con la adición de ácido cítrico a una dosis de 37,5mg/L.
- La combinación de ácido cítrico y ácido ascórbico logro reducir la oxidación pero no de manera eficiente.
- La adición de carbón activo no logro reducir los porcentajes de necrosis y fenolización.
- La oscuridad no redujo la fenolización de los tejidos.
- En esta investigación la citoquinina BAP no indujo a la brotación de los explantes.
- Con la adición de la hormona 2ip no se logró una regeneración de los explantes

4.2. RECOMENDACIONES

- Recomendamos continuar con la investigación del establecimiento in vitro del alcornoque (*Quercus suber* L.).
- Para obtener brotes tiernos se recomienda recolectar estacas que sean leñosas ya que en esta especie las tiernas no suelen brotar.
- Para el establecimiento in vitro se recomienda iniciar con el medio de cultivo Murashing y Skog (MS).
- Para especies leñosas se recomienda el uso de ácido cítrico en el medio de cultivo para evitar la oxidación de los explantes.