

Universidad de Huelva

Departamento de Ciencias Agroforestales



**Micropropagación de *Quercus suber* L. y
resistencia/tolerancia in vitro al patógeno *Phytophthora
cinnamomi* Rands. fases iniciales de la micropropagación
de *Q. ilex* L.**

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

Juan José García Martínez

Fecha de lectura: 8 de febrero de 2016

Bajo la dirección del doctor:

Raúl Tapias Martín

Huelva, 2016



**MICROPROPAGACIÓN DE *Quercus suber* L.
Y RESISTENCIA/TOLERANCIA *IN VITRO* AL
PATÓGENO *Phytophthora cinnamomi* Rands.
FASES INICIALES DE LA MICROPROPAGACIÓN DE
Q. ilex L.**

Memoria de investigación realizada por **Juan José García Martínez**,
(Licenciado en Biología)
para la obtención del grado de Doctor
por la Universidad de Huelva



**Universidad
de Huelva**

**Universidad de Huelva
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Dpto. Ciencia Agroforestales
Programa de doctorado Gestión y Salud Ambiental
(Septiembre de 2015)**

Doctorando: Juan José García Martínez

Director: Raúl Tapias Martín.

El presente trabajo ha sido financiado a través del Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía P07-RMN-3108 "Selección y propagación de encinas y alcornoques resistentes a *Phytophthora cinnamomi*", a través de un contrato de Funcionario Laboral Temporal desde Abril de 2009 hasta octubre de 2011.

La presentación de esta memoria para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas, se acoge a la normativa vigente dentro del programa de doctorado "Gestión y Salud Ambiental" del bienio 2009-2011, cursado por el doctorando en el Departamento de Gestión Ambiental y Salud Pública de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva.

**A VOSOTROS,
MANOLO Y CONCHITA,
POR TODA UNA VIDA DE
DEDICACIÓN Y
CARIÑO INAGOTABLE**

AGRADECIMIENTOS

Esta es la parte más emotiva y a veces, más difícil de escribir, pues quisiera ser justo y no dejarme a nadie sin nombrar. Por favor, que me disculpe de antemano todo aquel que se sienta omitido en estos agradecimientos, pues no por ello mi sentimiento es diferente.

Primero de todo, debo agradecer al Dr. Raúl Tápias Martín, la oportunidad que me brindó de realizar esta tesis doctoral bajo su tutela, agradecer tus enseñanzas, tu buena disposición, tu paciencia y la confianza puesta en mi. Esta experiencia ha servido sin pretenderlo, de punto de inflexión en mi vida, y me alegro que así haya sido.

Seguidamente, la primera persona que se me viene a la mente en esta andadura, es mi amiga y compañera de proyecto, Isabel León. ¡Qué agradable es trabajar contigo! Gracias por estar siempre ahí, por haber podido compartir juntos buena parte de esta etapa, en lo profesional y en lo personal. Gracias por la alegría y la fuerza que me transmites. Nos seguimos teniendo el uno al otro y, eso es lo mejor de todo...

Gracias también a Isidro, por tu amistad, por tu buen humor, por tu ayuda y buena disposición siempre para echar una mano y servir en lo que hubieras podido. Y por supuesto, gracias también a Juan Peña, igualmente por tu amistad, ayuda y por los buenos ratos compartidos.

Gracias a los profesores que de un modo u otro, me han ayudado en este trabajo, con sus enseñanzas y experiencia. Gracias a Manuel Fernández, siempre amable y cordial y, por darme la oportunidad de intervenir en una de tus clases para impartir un seminario. Gracias a Alfredo Cravador, a Fernando Bastida, a Carlos Weiland, a Inmaculada Pulido, a Beatriz Cuenca y a Paula Caetano.

Gracias también a los compañeros que han intervenido en parte de este trabajo, como Daniel Segador. Y a compañeros del departamento como Dani, Carmen, Enrique Andivia, Arantxa, Eva, Chani, Rocio, Toñi, Israel, Juan

Domingo, Luis, Gloria, Javier Piqué, etc, por la ayuda prestada y los momentos compartidos.

Gracias a Sebastián, Lorenzo Lidueña, Manu, Corsi y Pepe, por vuestra colaboración en los asuntos administrativos y de infraestructura. Así como también al personal de seguridad, siempre serviciales, Pepe, Tello, Miguel, etc.

Para ir acabando, quiero dedicar un agradecimiento enorme y muy especial a Eli, Manoli, Esperanza, Manuel y Andrés. Gracias por tan buenos momentos y por vuestra cercanía dentro y fuera del trabajo, ¡sois auténticos! Y en esta misma línea, gracias también a Carmen, Pilar, Juan Carlos, Pablo, los "hermanos", Rocío "Rubi", Antonio, Amalia, Raffaella,... (y perdón, porque seguro que me dejo sin nombrar a más compañeros).

Y ya sí, llegando al final, no podría acabar esta sección si no dedicara este último párrafo a Lorena y a mi familia por completo. Vosotros habéis vivido conmigo esta andadura, os habéis ilusionado y sufrido conmigo, habéis sido mi apoyo y fortaleza, me habéis animado siempre, he podido desahogarme con vosotros como siempre, en los peores momentos, y también compartir los momentos de alegría por los logros cumplidos. Pero sobretodo, debo lo que soy a vuestro enorme cariño, con el que he crecido como persona. Que nunca nos falte ese calor familiar que siempre hemos cuidado, ¡os quiero muchísimo!

INDICE

Resumen	15
Abstract	17
Glosario de tablas y figuras	19
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. El Decaimiento en los <i>Quercus</i>	25
1.2. Implicación de <i>Phytophthora cinnamomi</i> en el decaimiento	30
1.2.1. Ciclo biológico de <i>P. cinnamomi</i>	31
1.2.2. El proceso infectivo de <i>P. cinnamomi</i>	33
1.3. Micropropagación de especies forestales	36
1.3.1. Posibilidades de la Biotecnología en la conservación y uso de los recursos genéticos	36
1.3.2. Condiciones de cultivo en la micropropagación	38
1.3.3. Fases de la micropropagación	42
1.4. Inoculación <i>in vitro</i> y evaluación de la infección	50
2. OBJETIVOS	57
3. CAPÍTULO I: MICROPROPAGACION	61
3.1. Material y Métodos	63
3.1.1. Origen y preparación del material vegetal	63
3.1.2. Inducción de yemas laterales e implantación <i>in vitro</i>	64
3.1.2.1. Efecto del tratamiento en frío y régimen de temperatura en la inducción de yemas laterales de estacas de material adulto	64
3.1.2.2. Efecto del periodo de recogida en la inducción de yemas laterales en estacas de material adulto	66
3.1.2.3. Inducción de la brotación en individuos juveniles	67
3.1.2.4. Efecto del medio de cultivo y del origen del material en la implantación de segmentos nodales	67
3.1.2.5. Análisis de los datos de inducción e implantación	70
3.1.3. Multiplicación <i>in vitro</i> de segmentos nodales	73
3.1.3.1. Efecto de las sales minerales y la combinación hormonal	74
3.1.3.2. Efecto de la relación auxinas/citoquininas	74
3.1.3.3. Análisis de los datos de multiplicación	74
3.1.4. Enraizamiento de explantes <i>in vitro</i>	75
3.1.4.1. Efecto de la concentración de auxina sobre la capacidad de enraizamiento y la incidencia de necrosis apical	76
3.1.4.2. Efecto de la duración del tratamiento con auxinas sobre la capacidad de enraizamiento y la incidencia de necrosis apical	76

3.1.4.3. Efecto del tratamiento previo en medio libre de hormonas sobre la capacidad de enraizamiento y la necrosis apical	77
3.1.4.4. Efecto del tratamiento previo en oscuridad sobre la capacidad de enraizamiento y la necrosis apical.....	77
3.1.4.5. Análisis de los datos de enraizamiento.....	78
3.2. Resultados de micropropagación en encina	79
3.2.1. Inducción de yemas laterales.	79
3.2.1.1. Efecto del tratamiento en frío y del régimen de temperatura en la inducción de yemas laterales de estacas de material adulto	79
3.2.1.2. Efecto del periodo de recogida en la inducción de yemas laterales en estacas de encina.....	81
3.2.1.3. Inducción de la brotación en plántulas juveniles de encina.....	83
3.2.1.4. Efecto del medio de cultivo en la implantación <i>in vitro</i> de segmentos nodales de encina	84
3.3. Resultados de micropropagación en alcornoque.....	88
3.3.1. Inducción de yemas laterales	88
3.3.1.1. Efecto del tratamiento en frío y del régimen de temperatura en la inducción de yemas laterales de alcornoque	88
3.3.1.2. Efecto del periodo de recogida en la inducción de yemas laterales en estacas de alcornoque	89
3.3.1.3. Inducción de la brotación en plantas juveniles de alcornoque.....	92
3.3.1.4. Efecto del medio de cultivo en la implantación <i>in vitro</i> de segmentos nodales de alcornoque	94
3.3.1.5. Efecto del origen del material de partida en la implantación <i>in vitro</i> de segmentos nodales de alcornoque.....	95
3.3.2. Multiplicación de explantes de alcornoque.....	97
3.3.2.1. Efecto de las sales minerales y de la combinación hormonal	97
3.3.2.2. Efecto de la relación auxinas/ citoquininas	100
3.3.3. Enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de alcornoque	102
3.3.3.1. Efecto de la concentración de auxinas.....	102
3.3.3.2. Efecto de la duración del tratamiento con auxinas.....	106
3.3.3.3. Efecto del tratamiento previo en medios libres de hormonas	109
3.3.3.4. Efecto del tratamiento previo en oscuridad	112
3.4. Discusión	116
4. CAPÍTULO II: INOCULACIÓN IN VITRO	129
4.1. Material y Métodos	131
4.1.1. Origen de las cepas de <i>P. cinnamomi</i>	131
4.1.2. Cultivo de <i>P. cinnamomi</i>	131

4.1.3. Origen y preparación de las plántulas de <i>Q. suber</i> para su inoculación <i>in vitro</i> con <i>P. cinnamomi</i>	132
4.1.4. Preparación de inóculo de <i>P. cinnamomi</i> en medio V8 líquido.....	132
4.1.5. Efecto de la dosis de inóculo de <i>P. cinnamomi</i> en plántulas de <i>Q.</i> <i>suber</i>	133
4.1.6. Efecto del tiempo de inoculación sobre el estado físico de las plántulas de <i>Q. suber</i> inoculadas	135
4.1.7. Efecto de la inoculación <i>in vitro</i> con <i>P. cinnamomi</i> sobre la capacidad de tolerancia/resistencia de clones de <i>Q. suber</i>	137
4.1.8. Re-aislamiento del patógeno en cultivo puro	138
4.1.9. Análisis de los resultados de inoculación.....	139
4.2. Resultados	142
4.2.1. Efecto de la dosis de inóculo de <i>P. cinnamomi</i> en plántulas de <i>Q.</i> <i>suber</i> inoculadas <i>in vitro</i>	142
4.2.2. Efecto del tiempo de inoculación sobre el estado físico de las plántulas de <i>Q. suber</i> inoculadas con <i>P. cinnamomi</i>	144
4.2.3. Efecto de la inoculación <i>in vitro</i> con <i>P. cinnamomi</i> sobre la capacidad de tolerancia/resistencia de clones de <i>Q. suber</i>	153
4.2.4. Re-aislamiento del patógeno en cultivo puro	161
4.3. Discusión	164
5. CONCLUSIONES FINALES	179
6. BIBLIOGRAFIA	183

RESUMEN

El espectacular descenso de la masa forestal de Quercíneas producido en la zona mediterránea desde el último tercio del siglo XX, ha levantado una enorme preocupación sobre la conservación de las dehesas y bosques de *Quercus*, de vital importancia en dicha zona. Fruto de ello es que los numerosos estudios llevados a cabo, han permitido asociar a varios factores causales, de manera que actualmente se mantiene la hipótesis de que la acción combinada de estos factores, origina el deterioro progresivo y generalizado del árbol hasta causar su muerte, por lo que a esta enfermedad se le ha denominado como “el decaimiento” de los *Quercus*, considerando al patógeno *Phytophthora cinnamomi* como el principal factor contribuyente de esta enfermedad. Uno de los recursos para actuar frente a ésta, son los estudios de resistencia/tolerancia encaminados a la selección y propagación de individuos élite, dentro de los cuales se enmarca el presente trabajo, centrado concretamente en la selección y propagación de encinas (*Q. ilex* L., *spp. ballota*) y alcornoques (*Q. suber* L.). La propagación se ha llevado a cabo mediante cultivo *in vitro*, ya que este método de regeneración permiten salvar los inconvenientes originados por las condiciones geográficas, climáticas y de tiempo de producción, gracias a que se realizan en condiciones ambientales muy controladas.

En el primer capítulo, se ha abordado la micropropagación de material adulto y juvenil, tanto de encinas como de alcornoques. En la fase de preparación del material se observó un comportamiento diferente de ambas especies respecto al pre-tratamiento en frío de estacas de material adulto, no siendo recomendable para encina y sí para alcornoque. En la fase de implantación, las formulaciones de medios de cultivo basadas en las sales GB5 mostraron los mejores resultados en encina respecto a las GD o MS, mientras que en alcornoque, se impusieron las GD frente a las MS. En la fase de multiplicación, ya solo para el caso de los alcornoques, los explantes cultivados con sales MS mostraron mejor comportamiento que con sales GD.

La mejor combinación de hormonas fue de 0,3mg/L de BAP + 2mg/L de AIB, resultando novedoso que los explantes presentaran mejor desarrollo y aspecto estando las auxinas en mayor proporción que las citoquininas. En la fase de enraizamiento, concentraciones de AIB superiores a 4mg/L, originaron problemas de necrosis apical, siendo esta causa muy dependiente del genotipo y origen del material. Porcentajes de hasta el 80% de brotes enraizados viables se lograron con el tratamiento de 4mg/L de AIB durante 15 días. Ni el tratamiento previo en oscuridad, ni en medios libres de hormonas, lograron mejorar los porcentajes globales de enraizamiento, aunque en algunos clones como el HEE-6 se llegó a alcanzar el 100% de brotes enraizados con el tratamiento en oscuridad durante los 7 primeros días de la rizogénesis. No obstante, el tratamiento en medio libre de hormonas previamente a la inducción de la rizogénesis en medios con auxinas, logró disminuir los porcentajes globales de la necrosis apical.

En el segundo capítulo, se abordó la inoculación *in vitro* con *Phytophthora cinnamomi* de explantes de alcornoque y, la evaluación de parámetros representativos de la afección provocada por la infección en las plántulas inoculadas. Tras establecer la dosis de inóculo y el tiempo de inoculación adecuados para los ensayos, se pudieron establecer qué parámetros del estado sanitario de las plantas podían reflejar mejor los efectos de la infección tanto en la parte aérea como radical de las plántulas y, se compararon 5 clones de alcornoque por su diferente comportamiento frente a la infección respecto a esos parámetros. Así, parámetros de la parte aérea como el “tiempo en alcanzar la necrosis total”, “tiempo en aparecer los primeros síntomas de necrosis”, “velocidad en alcanzar la necrosis total desde la aparición de los primeros síntomas” o la “valoración visual del tallo” y, parámetros de la zona radical como el “porcentaje de longitud de raíz necrosada respecto a la longitud total”, “la tasa de crecimiento en longitud de las raíces” o la “tasa de crecimiento en número de las raíces”, actuaron como parámetros diferenciadores entre genotipos de las plántulas enraizadas *in vitro* e inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*.

ABSTRACT

The dramatic fall in *Quercinea* forests occurred in the Mediterranean area from the last third of the twentieth century, has generated great preoccupation about the "dehesa" and *Quercus* forest conservation, because its importance in that area. Numerous studies have allowed relate the factors involved in the aforementioned fall, so the hypothesis remaining today is that the combined action of these factors, leads to the progressive and widespread deterioration of the tree up to cause its death. That is why this disease was known as oaks "decline", considering the pathogen *Phytophthora cinnamomi* as the main contributor to this disease. One of the resources to respond to this problem, are the studies of resistance/tolerance for selection and propagation of elite trees, within which is framed the present work, specifically focusing on the selection and propagation of holm oak (*Q. ilex* L. , *ssp. ballota*) and cork oak (*Q. suber* L.). The propagation has been carried out by *in vitro* culture, since this method of regeneration allows saving the disadvantages caused by geographical and weather conditions, as well as time of production, in very controlled environmental conditions.

The first chapter deals with micropropagation of adult and juvenile material were made, both of holm and cork oaks. In the initial phase of the material, a different behavior of both species was observed with respect to the cuttings pre-cold treatment in adult material, not being recommended for holm oak but just for cork oak. In the establishment phase, the culture media based on GB5 salts showed the best results in holm oak respect to GD or MS media, while GD rinsed better results than MS in cork oak. In the proliferation phase, only performed for cork oak, explants showed better aspect and multiplication rates in MS in opposition to GD. The best hormones combination was 0,3mg/L BAP + 2mg/L AIB, being novelty the better aspect and development of the explants remaining the auxins in greater proportions than cytokines. Rooting was performed only for cork oak too. Percentages of up to 80% of available rooted shoots were achieved with the treatment of

4mg/L of AIB for 15 days. Neither the darkness pre-treatment, nor free-hormone media treatments, improved the overall percentages of rooting, although some clones as the HEE-6 reached 100% of available rooted shoots with darkness treatment during the first 7 days of rhizogenesis. Tips necrosis problems were caused by concentrations of AIB higher than 4mg/L, being this cause very dependent on the genotype and origin of the material. However, treatment in free-hormone media prior induction of rhizogenesis in auxins media, reduced the overall percentages of the tip necrosis.

In the second chapter, the *in vitro* inoculation with *P. cinnamomi* of *in vitro* rooted explants of cork oak was made, as well as the evaluation of parameters representing the symptoms caused by infection in those plantlets. Dose of inoculum, time of inoculation for the appropriate tests and the better parameters reflecting the health state of the plants after infection in both the aerial and the radical part of plantlets were established. After that, 5 clones of cork oak were compared by its different behavior after infection with *P. cinnamomi*. Parameters as the "time to reach the total necrosis", "time to appear the first symptoms of necrosis", "speed to reach the total necrosis from the emergence of the first symptoms" and the "visual rating of stem" of the aerial part, and parameters as the "percentage of necrotic root length compared to the total length", "the rate of growth in length of the roots" and the "rate of growth in the number of roots" of the root zone, showed differences between genotypes of the *in vitro* rooted and inoculated plantlets.

GLOSARIO DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras	pg.
1. Morfología de las estructuras reproductoras de <i>P. cinnamomi</i>	32
2. Fase infectiva de <i>P. cinnamomi</i> a partir de una zoospora	34
3. Ciclo de vida de <i>Phytophthora spp.</i>	35
4. Efectos del balance auxinas/CK en la regeneración <i>in vitro</i> de plantas.....	45
5. Microscopia electrónica de barrido de raíz infectada de zoosporas	54
6. Estacas de <i>Q. suber</i> en perlita para inducción de la brotación lateral	64
7. Segmentos nodales de <i>Q. ilex</i> en los recipientes de fase de implantación	68
8. Promedios de los parámetros de inducción de estacas de <i>Q. ilex</i> en función del periodo de recogida	82
9. Brotes de <i>Q. ilex</i> en implantación y multiplicación	87
10. Promedios de los parámetros de inducción en estacas de <i>Q. suber</i> en función del periodo de recogida	91
11. Tasa media de multiplicación de explantes de <i>Q. suber</i> en función de la combinación de sales minerales y la relación auxinas/citoquininas	99
12. Tasas de multiplicación y mortalidad en <i>Q. suber</i> en medio MS respecto a la relación auxinas/citoquininas y la concentración de auxinas	101
13. Porcentajes de enraizamiento y necrosis apical de <i>Q. suber</i> respecto a la concentración de AIB	104
14. Explantes de <i>Q. suber</i> enraizados <i>in vitro</i> en medio MSR4	105
15. Porcentajes de brotes enraizados viables de <i>Q. suber</i> en función de la duración del tratamiento de rizogénesis en medio MSR4 y del clon	108
16. Porcentajes de enraizamiento y necrosis apical en <i>Q. suber</i> en función del tratamiento previo en MSRsh o el tratamiento directo en MSR5	111
17. Porcentajes de enraizamiento y necrosis apical en <i>Q. suber</i> en función del tratamiento en oscuridad continua durante 7 días	114
18. Diámetro de la raíz de plántulas del clon C47 en función de la zona de medida y el tratamiento de inoculación	148
19. Imágenes comparativas entre plántulas control e inoculadas de <i>Q. suber</i> .	157
20. Imágenes del cultivo de raíces, tallos y hojas en V8-NARPH	162

Tablas del capítulo I:	pg.
3.1. Periodo de recogida y origen de las estacas de <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i>	67
3.2. Composición de los medios de cultivo usados en la implantación	69
3.3. Combinación de sales minerales y hormonas de los medios de cultivo de la fase de multiplicación de <i>Q. suber</i> y clones empleados en cada uno....	73
3.4. Inducción de la brotación en estacas de <i>Q. ilex</i> en función del tratamiento	80
3.5. Inducción de la brotación en estacas de <i>Q. ilex</i> en función del periodo de recogida.....	81
3.6. Inducción de la brotación en plantas juveniles de <i>Q. ilex</i>	84
3.7. Porcentajes de contaminación y supervivencia en la implantación de brotes de <i>Q. ilex</i> respecto al medio de cultivo y el material de origen	85
3.8. Inducción de la brotación en estacas de <i>Q. suber</i> en función del tratamiento	89
3.9. Inducción de la brotación en estacas de <i>Q. suber</i> en función del periodo de recogida	90
3.10. Inducción de la brotación en plantas juveniles de <i>Q. suber</i>	93
3.11. Porcentajes de contaminación y supervivencia en la implantación de brotes de <i>Q. suber</i> respecto al medio de cultivo	94
3.12. Porcentajes de contaminación y supervivencia en implantación de brotes de <i>Q. suber</i> respecto al periodo u origen y, el tipo de material	96
3.13. Nivel de significación del análisis estadístico en fase de multiplicación de <i>Q. suber</i> respecto a las sales minerales y la combinación hormonal	97
3.14. Porcentajes de mortalidad y tasas de multiplicación de <i>Q. suber</i> en función de las sales minerales y la combinación hormonal	98
3.15. Nivel de significación del análisis estadístico en fase de multiplicación de <i>Q. suber</i> respecto a la relación auxinas/citoquininas	100
3.16. Porcentajes de mortalidad y tasas de multiplicación de <i>Q. suber</i> en función de la relación auxinas/citoquininas	101
3.17. Nivel de significación del análisis estadístico en fase de enraizamiento de <i>Q. suber</i> respecto a la concentración de auxinas y el clon	103
3.18. Porcentajes de enraizamiento <i>in vitro</i> de 6 clones de <i>Q. suber</i> respecto a la concentración de AIB	103

3.19. Nivel de significación del análisis estadístico en fase de enraizamiento de <i>Q. suber</i> respecto a la duración del tratamiento y al clon	106
3.20. Porcentajes de enraizamiento <i>in vitro</i> de 5 clones de <i>Q. suber</i> respecto a la duración del tratamiento de rizogénesis.....	107
3.21. Nivel de significación del análisis estadístico en fase de enraizamiento de <i>Q. suber</i> respecto al tratamiento previo en medio libre de hormonas y al clon	110
3.22. Porcentajes de enraizamiento <i>in vitro</i> de 6 clones de <i>Q. suber</i> respecto al tratamiento previo en medio libre de hormonas	110
3.23. Nivel de significación del análisis estadístico de la fase de enraizamiento de <i>Q. suber</i> respecto al tratamiento en oscuridad durante los 7 primeros días de cultivo y al clon	113
3.24. Porcentajes de enraizamiento <i>in vitro</i> de 5 clones de <i>Q. suber</i> respecto al tratamiento en oscuridad durante los 7 primeros días de cultivo	113

Tablas del capítulo II:

pg.

4.1. Dosis de inóculo empleadas para la infección <i>in vitro</i> de plántulas de <i>Q. suber</i> con <i>P. cinnamomi</i>	133
4.2. Efecto de la dosis en la sintomatología aérea de <i>Q. suber in vitro</i>	143
4.3. Nivel de significación mediante ANOVA de dos factores en la inoculación <i>in vitro</i> de <i>Q. suber</i> respecto a los factores tratamiento y día ..	145
4.4. Promedios y error típico de las variables relacionadas con el desarrollo y estado sanitario a los 6 y 14 días tras la inoculación del clon C47	145
4.5. Matriz de correlación de Pearson entre los parámetros del estado sanitario de plántulas control del clon C47	149
4.6. Matriz de correlación de Pearson entre los parámetros del estado sanitario de plántulas control del clon C47 inoculadas <i>in vitro</i> con <i>P. cinnamomi</i>	149
4.7. Nivel de significación mediante ANOVA de un factor de las variables relativas obtenidas tras la inoculación de plántulas del clon C47	150
4.8. Promedio y error típico de las variables relativas obtenidas a partir de los datos de inoculación de plántulas del clon C47	151
4.9. Nivel de significación mediante análisis de supervivencia de las variables de la parte aérea de 5 clones de <i>Q. suber</i> respecto a la inoculación con <i>P. cinnamomi</i> , el clon y la interacción entre factores	154

4.10. Promedio y error típico de los parámetros relacionados con la sintomatología en la parte aérea de 5 clones de <i>Q. suber</i> inoculados con <i>P. cinnamomi</i>	155
4.11. Nivel de significación del ANOVA de dos factores de variables de la parte radical de 5 clones de <i>Q. suber</i> respecto al tratamiento de inoculación con <i>P. cinnamomi</i> , el clon y la interacción entre factores	158
4.12. Promedio y error típico de los parámetros relacionados con la sintomatología en la parte radical de 5 clones de <i>Q. suber</i> inoculados con <i>P. cinnamomi</i>	159
4.13. Resultados del cultivo en medio selectivo V8-NARPH, de raíces y hojas de plántulas de 5 clones de <i>Q. suber</i>	161

INTRODUCCIÓN

1.1. EL DECAIMIENTO DE LOS QUERCUS

El alcornoque (*Quercus suber*, L.) y la encina (*Q. ilex*, L.) son árboles perennifolios de la familia de las Fagáceas, muy abundantes en los bosques mediterráneos, siendo los máximos representantes de un tipo de explotación agraria y forestal de alto valor natural, denominada “dehesa”. El término dehesa es conocido desde hace siglos, aunque no siempre con la misma acepción con la que lo conocemos hoy día. A lo largo de los siglos, la dehesa ha pasado de ser el término jurídico con el que se asignaba a una zona acotada reservada a la caza de alguna (-s) especie (-s) (San Miguel, 1994), a ser unidades de producción en las que se combina la actividad agrícola, ganadera y forestal, tal y como la conocemos hoy día, pasando por diferentes acepciones relacionadas generalmente con la forma de aprovechamiento de la tierra (Rodríguez y Mata, 2002).

Así, en la actualidad se define la dehesa como un conjunto formado por pastizal arbolado y monte mediterráneo, de aspecto sabanoide (Blanco-Castro, 1998). La superficie forestal estaría ocupada por un estrato arbolado, con una fracción de cabida cubierta (superficie de suelo cubierta por la proyección de la copa de los árboles) comprendida entre el 5% y el 75%, compuesto principalmente por encinas, alcornoques, quejigos o acebuches, y ocasionalmente por otro arbolado, que permita el desarrollo de un estrato esencialmente herbáceo (pasto), para aprovechamiento del ganado o de las especies cinegéticas. La transformación de los primitivos bosques mediterráneos por parte del hombre, ha dado lugar a un sistema en el que se han combinado valores de conservación y, de diversificación de los usos que se han hecho del mismo (ganadero, agrícola, forestal y cinegético), lo que ha permitido que estos sistemas hayan ido evolucionando hacia sistemas sostenibles, tanto desde el punto de vista de su aprovechamiento (lo que ha permitido el desarrollo económico y social de los territorios adehesados), como de su conservación.

Desde hace algunas décadas, se ha venido observando un espectacular descenso del número de árboles del género *Quercus* en las dehesas mediterráneas (Cobos *et al.*, 1993), provocado por un conjunto de factores, que en suma, son la causa de lo que se ha denominado como “el decaimiento” de los *Quercus*. Esta enfermedad forestal de etimología compleja, se caracteriza porque origina un deterioro progresivo y generalizado del árbol, hasta causar su muerte (Trapero *et al.*, 2006).

En España y Portugal las especies más afectadas de decaimiento son *Q. suber* y *Q. ilex*, y en menor proporción *Q. faginea* y *Q. pyrenaica* (Montoya, 1992). También se ha detectado el decaimiento de *Q. suber* y *Q. ilex* en Túnez y Marruecos (Brasier, 1996), así como en el sur de Francia (Robin *et al.*, 1998). En cualquiera de estas regiones se han detectado toda una serie de factores implicados en el decaimiento de los *Quercus* mediterráneos, incluyendo sequías severas y recurrentes, encharcamientos, contaminación atmosférica, cambios en el uso tradicional de las dehesas, ataques de insectos barrenadores del tronco, y de hongos de chancro, así como de hongos del suelo que atacan principalmente a las raíces. Los síntomas del decaimiento no son debidos generalmente, a un solo factor (Trapero *et al.*, 2006) sino que es la suma de varios de ellos en un determinado espacio físico y, la acumulación de los mismos a lo largo de un periodo de tiempo, lo que determina el progreso de la enfermedad. Tal complejidad ha originado confusión en el pasado a la hora de considerar como causantes de la enfermedad, cualquier factor que originara un deterioro del estado vegetativo de los árboles, pudiendo estar implicados realmente, o no, en ella.

Aunque resulta difícil clasificar los factores implicados en el decaimiento debido a su diferente naturaleza y, a la difícil definición de su grado de implicación en la enfermedad, se podrían clasificar de forma general en tres grandes grupos (Trapero *et al.*, 2006):

- **Factores que predisponen:** actúan a largo plazo, acentuando la susceptibilidad del arbolado al ataque del siguiente grupo de factores. Su

acción es asintomática y, en términos generales, pueden ser abióticos o bióticos. En el caso del decaimiento de los *Quercus*, estos factores parecen ser de tipo silvícola principalmente (Fernández Rebollo *et al.*, 2003), como por ejemplo:

- envejecimiento generalizado del arbolado;
 - carencia de regeneración, debido al sobrepastoreo y al cultivo agrícola;
 - presencia de heridas, producto de malas prácticas culturales;
 - acumulación de biomasa por falta de cuidados culturales.
-
- **Factores incitantes:** su acción es de corta duración y dan lugar a la expresión de los síntomas del decaimiento. Suelen ser de tipo abiótico y, en el caso concreto del decaimiento de encinas y alcornoques, el principal factor incitante son las alteraciones sufridas por el clima en los últimos años. Estudios fito-climáticos realizados recientemente en Andalucía (Gil-Pelegrín *et al.*, 2008), muestran que ha existido una tendencia a largos periodos de sequía con aumento de la temperatura estival, lo que se refleja en el empeoramiento del estado general de las coberturas vegetales, haciendo más susceptibles las especies vegetales a la invasión por insectos barrenadores y hongos patógenos.

 - **Factores contribuyentes:** actúan a largo plazo en los últimos estados del desarrollo del decaimiento, produciendo la muerte o “seca” del árbol sintomático. Son factores de tipo biótico principalmente: enfermedades causadas por hongos productores de chancros como *Botryosphaeria spp.*; *Hypoxyton mediterraneum*, *Diplodia mutila* (Montoya, 1981; Torres-Juan, 1985; Ragazzi *et al.*, 1995; Vannini *et al.* 1996), u oomicetos que producen podredumbre radical como *Phytophthora cinnamomi* (Brassier, 1993; Brassier *et al.*, 1993) y *Pythium spiculum* (Romero *et al.*, 2007), e insectos perforadores de ramas y troncos como *Cerambyx spp.* o *Platypus spp.* (Fernández-Rebollo *et al.*, 2007). Incluso algunas bacterias como *Erwinia*

quercina, podrían estar también relacionadas con el decaimiento de los *Quercus* (Soria y López, 1997).

De entre todos los factores contribuyentes, se ha señalado a *P. cinnamomi* como el factor que está afectando con mayor gravedad al decaimiento y seca de los *Quercus*, dada su presencia en la mayoría de zonas afectadas y las graves consecuencias de su acción (Moreira *et al.*, 1993; Brasier, 1993; Brasier *et al.*, 1993; Cobos *et al.*, 1993). *P. cinnamomi* es un oomiceto presente en el suelo, ampliamente distribuido por todo el mundo. Es la especie de su género más común y destructiva, afectando principalmente a especies forestales (Zentmeyer, 1980), a las que ataca sus raíces reduciendo la capacidad de los árboles para absorber el agua y los nutrientes del suelo, originando unos síntomas iniciales parecidos a los que causa la sequía.

En la Península Ibérica, los primeros trabajos que relacionaron este oomiceto con el decaimiento de los *Quercus*, llegarían en la década de 1990 (Brasier, 1992; Brasier, 1993; Brasier *et al.*, 1993; Brito De Carvalho, 1993), a raíz de los estudios que se iniciaron como consecuencia del espectacular desarrollo de la enfermedad que se ha venido observando desde la década de 1980. Las evidencias que relacionan a *P. cinnamomi* con el decaimiento se han basado en la presencia del patógeno en individuos en los que se observa la misma sintomatología, la cual está caracterizada por la marchitez y muerte de la parte aérea, súbita o lentamente (Sánchez *et al.*, 2000) empezando generalmente por la copa, la aparición de chancros sangrantes en el tronco de algunos pies afectados y la producción de brotes adventicios, todo ello indicativo de algún tipo de estrés radical (Brasier, 1996), y finalmente el decaimiento crónico que lleva a la muerte del árbol afectado al cabo de una o dos estaciones (Ragazzi *et al.*, 1989). También se consideró la distribución de las masas afectadas, en las que aparecen árboles muertos o moribundos en grandes grupos o focos, la asociación del decaimiento con valles o depresiones topográficas, o con zonas estacionalmente encharcadizas, así como con zonas alteradas, como márgenes de caminos, cortafuegos o áreas que soportan altas cargas ganaderas. Los

descalces de árboles afectados a menudo revelan elevados porcentajes de raicillas absorbentes muertas, tanto en *Q. ilex* como en *Q. suber*. De estas raicillas necróticas, así como del suelo asociado, se ha podido aislar *P. cinnamomi* (Brasier, 1993). A pesar de ser una tarea difícil para esta especie, siendo recomendable su aislamiento a partir de lesiones frescas o activas (Shearer y Tippett, 1989), los porcentajes de aislamiento obtenidos eran comparables a los del mismo patógeno en raíces afectadas de *Eucalyptus marginata* en Australia (Shearer y Tippet, 1989), lo que ayudó a su identificación. También se ha aportado una evidencia indirecta de la implicación de *P. cinnamomi*, mediante la recuperación de encinas afectadas de decaimiento tras la inyección al tronco de fungicidas específicos (Fernández Escobar *et al.*, 1999).

En la búsqueda de tratamientos para paliar la enfermedad del decaimiento en los *Quercus*, no conviene pensar en una única solución eficaz, dada la complejidad con que actúan los factores implicados, como hemos visto anteriormente. Es por tanto aconsejable, aunar diferentes actuaciones que vayan encaminadas a paliar los diferentes factores implicados. Así, los manuales de buenas prácticas culturales en el manejo de las dehesas (Navarro *et al.*, 2000 a y b), se postulan como una actuación preventiva frente a los factores “que predisponen” a la enfermedad. Por su parte, las cambiantes condiciones climáticas no son controlables por la acción humana, pero son predecibles en cierta medida y, en este sentido, se pueden anticipar actuaciones dirigidas a paliar periodos de sequía y de incremento de temperaturas, que tanto afectan al estado vegetativo de los árboles, y que además favorecen el ataque de insectos y patógenos (factores contribuyentes). Sobre las enfermedades y patologías que causan estos últimos, las investigaciones llevadas a cabo han ido dirigidas tanto a la búsqueda de métodos paliativos, como por ejemplo, la aplicación de compuestos fungicidas (Fernández Escobar *et al.*, 1999; Navarro Cerrillo *et al.*, 2004), o los estudios moleculares sobre la interacción planta-patógeno (Horta *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2006), como a la búsqueda de actuaciones preventivas, por ejemplo, el control de plagas (Fernández Rebollo,

2007; Domínguez Nevado, 2008; López Pantoja, 2008) y los estudios de resistencia/tolerancia que permiten la selección y propagación de individuos élite (Tapias *et al.*, 2005 y 2008; León Sánchez, 2013).

Precisamente, para poder llevar a cabo actuaciones relacionadas en esta última línea, es necesario definir protocolos de propagación para las especies forestales afectadas y, diseñar experiencias para la búsqueda de individuos resistentes o tolerantes a los factores que afectan a esas especies, siendo este uno de los objetivos de la presente memoria, como se verá más adelante.

1.2. IMPLICACIÓN DE *P. CINNAMOMI* EN EL DECAIMIENTO DE LOS QUERCUS

P. cinnamomi Rands es un oomiceto de la familia *Pythiaceae*, dentro del Reino Chromista. Es un patógeno presente en el suelo que causa la necrosis y pudrición de raíces absorbentes de muchas especies forestales, ornamentales y hortícolas (Rossman y Palm, 2006). Fue descrita por primera vez como patógeno de *Cinnamomun burmannii* (Rands, 1922), planta de la familia *Lauraceae*. Aunque ese trabajo lo situaba en Sumatra, su origen geográfico es aún desconocido. No obstante, se trata de un patógeno de distribución mundial, localizado preferentemente en zonas tropicales y subtropicales así como en la región mediterránea y, en algunas regiones de climas suaves donde ha sido introducido según recoge la "European and Mediterranean Plant Protection Organization" (EPPO, 1998).

P. cinnamomi es la especie de *Phytophthora* de distribución más extendida, afectando a alrededor de 1000 especies huéspedes (Zentmyer, 1983), entre las que destacan *Avocado spp.*, *Ananas comosus*, *Castanea dentata* y *C. sativa*, *Cinchona spp.*, *Chamaecyparis lawsoniana*, *Cinnamomum spp.*, *Rhododendron spp.*, *Eucalyptus marginata*, *Fagus spp.*, *Juglans spp.*, *Pinus spp.*, *Prunus spp.*, o *Quercus spp.*

1.2.1. Ciclo biológico de *P. cinnamomi*.

Para comprender mejor cómo actúa este patógeno, es conveniente conocer su ciclo de vida y las diferentes estrategias de supervivencia que es capaz de desarrollar. En estado vegetativo, *P. cinnamomi* forma un micelio de hifas finas, hialinas, de estructura coraloide y con protuberancias (EPPO, 2004), por las que se le identifica fácilmente. Este micelio desarrolla estructuras de reproducción asexual, que corresponden a esporangios elipsoidales no papilados (figura 1). Los esporangios pueden germinar directamente en condiciones favorables generando nuevas hifas, o generan zoosporas biflageladas (principales formas infectivas), ante determinadas condiciones ambientales como descenso de la temperatura, alto contenido hídrico, alto potencial iónico o aireación (Chen y Zentmyer, 1970). Y también desarrolla una fase sexual, en la que se generan oosporas tras la unión de anteridios y oogonios de cadenas diferentes (heterotálica), de las que actualmente se conocen sólo dos (A1 y A2), siendo la A2 la más ampliamente extendida a nivel mundial (EPPO, 2004). También pueden producirse oosporas por cruzamientos interespecíficos de cadenas opuestas, por ejemplo, con *P. cryptogea*. La cadena A2 puede actuar como homotálica cuando es elicitada con extractos de raíces de algunas plantas hospedantes (EPPO, 2004).

Los esporangios necesitan condiciones favorables de humedad y oxigenación para generarse (Davison y Tay, 1986), con una temperatura óptima entre 22 y 26 °C (Ayers, 1971). Aunque poco se sabe de cómo afecta la disponibilidad de nutrientes en el medio, algunos autores han observado que una baja disponibilidad de nutrientes apoyada por la presencia de iones en el medio, favorece la proliferación de esporangios en cultivo puro del micelio (Chen y Zentmyer, 1969 y 1970; Ayers, 1971).

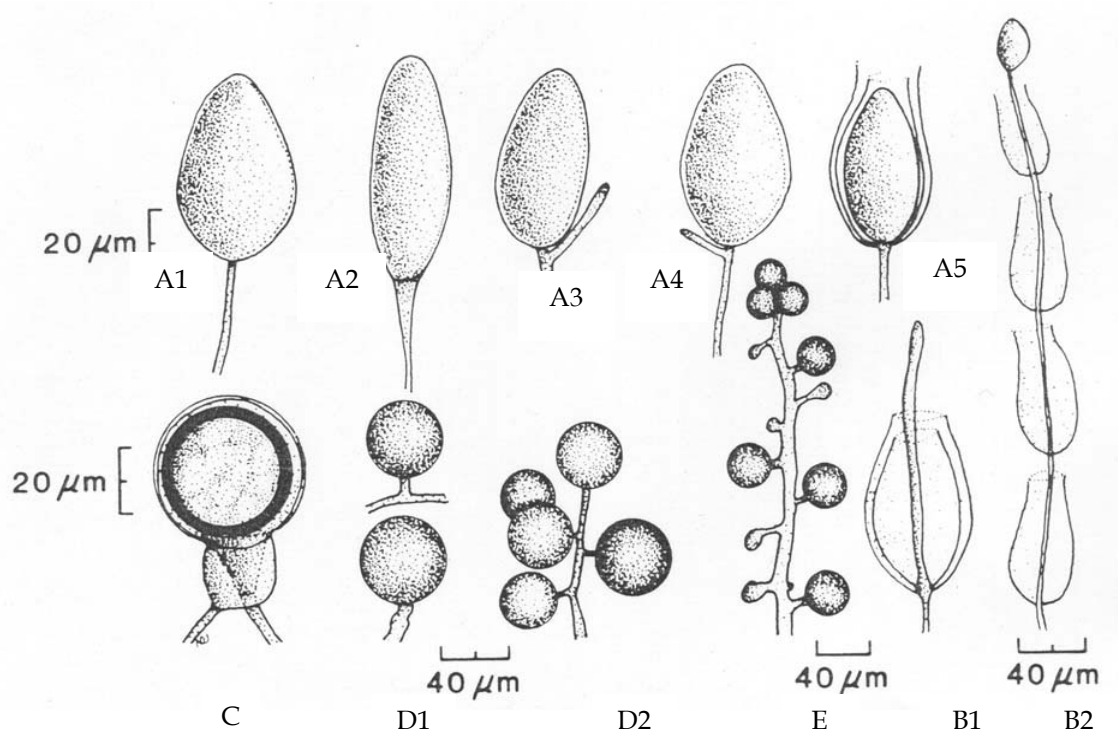


Figura 1. Morfología de *P. cinnamomi*. (A) Esporangios no papilados, (B) proliferación de esporangios, (C) oogonio globoso, anteridio y oospora, (D) clamidiosporas globosas y (E) numerosas protuberancias hifales. (Dibujado por A. Vaziri; en Erwin y Ribeiro, 1996)

Cada esporangio (50-100 μm de diámetro) llega a producir alrededor de 20 a 30 zoosporas biflageladas (<15 μm de diámetro), las cuales permiten infectar raíces sanas, a través de cualquier película de agua en contacto con el tejido, aunque también pueden infectar otras zonas de la planta, como las hojas o los troncos, a través de las heridas (Linaldeddu *et al.*, 2009). En suelos con alto contenido de agua, las zoosporas son capaces de sobrevivir alrededor de 4 días (Hardham 2001). Cuando las condiciones del sustrato son desfavorables (generalmente, suelos secos), el micelio desarrolla otro tipo de esporas, las clamidiosporas (41 μm de diámetro). Son estructuras de resistencia capaces de permanecer hasta 6 años, en el tejido de las plantas hospedantes o en suelos con un mínimo contenido de agua (O'gara *et al.*, 2005). A la llegada de las condiciones favorables, las clamidiosporas eclosionan generando nuevas hifas de las que rápidamente, surgirán nuevas clamidiosporas y esporangios, los

cuales producirán nuevas zoosporas con las que seguir infectando otras partes de la planta o nuevos huéspedes (Hardham, 2005; O'gara *et al.*, 2005).

La reproducción sexual de *P. cinnamomi*, requiere de la interconexión de las estructuras femeninas (oogonios) y las masculinas (anteridios). El anteridio suele situarse por debajo del oogonio, rodeando el delgado peciolo que une a éste con la hifa correspondiente. Tras la unión de ambas estructuras, el oogonio desarrolla protuberancias alrededor que son características de esta especie, dando lugar a la oospora (30 µm de diámetro aproximadamente), mientras que el anteridio suele reducirse formando una especie de soporte en la base de la oospora (figura 1-C). Al igual que las clamidiosporas, las oosporas también son estructuras de resistencia, que bien pueden germinar originando nuevo micelio, o bien pueden permanecer en un tejido infectado durante largos periodos de tiempo, aunque generalmente, más cortos que las clamidiosporas (O'gara *et al.*, 2005). Aunque esto último es poco habitual y, en los cortes histológicos de tejidos infectados, lo más frecuente es encontrar esporangios y clamidiosporas, con su correspondiente micelio (EPPO, 2004).

1.2.2. El proceso infectivo de *P. cinnamomi*.

Aunque todas las estructuras de reproducción asexual (esporangios, clamidiosporas y zoosporas), así como de reproducción sexual (oosporas), han demostrado tener capacidad infectiva, se considera a las zoosporas las principales estructuras con capacidad de infección (O'gara *et al.*, 2005).

El proceso infectivo se inicia con la toma de contacto del patógeno con las plantas. Cuando una zoospora se adhiere a la cutícula de las raíces, pierde los flagelos y se enquistando produciendo una pared celular (figura 2). Posteriormente, genera un tubo germinativo, que acaba en una protuberancia llamada apresorio.

Esta estructura ejerce una marcada presión sobre la superficie del huésped, de la cual crece la hifa de penetración, que secreta una variedad de enzimas para la degradación de la pared celular y maceración de los tejidos de la planta. Una vez que se ha producido la invasión del tejido por la hifa de penetración, se establece una relación parasitaria continuada patógeno-huésped, que le proporciona al oomiceto los nutrientes necesarios para su crecimiento (Mendgen *et al.* 1996).

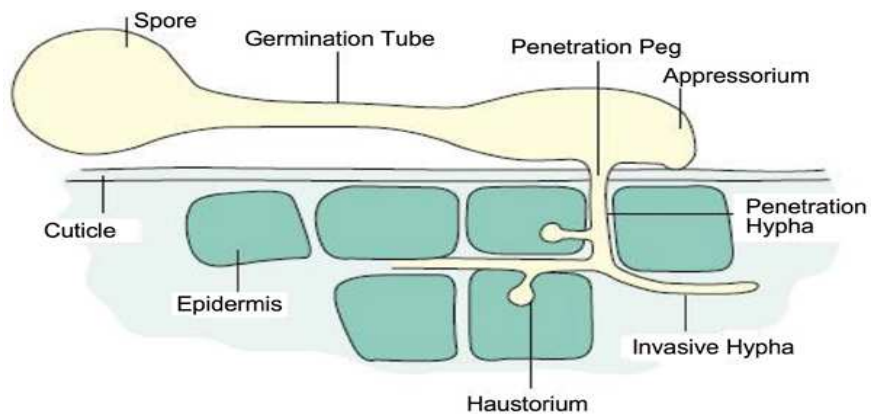


Figura 2. Esquema de la fase infectiva de una zoospora de *P. cinnamomi* en el tejido de la planta huésped (Meng *et al.*, 2009).

La formación de apresorios y la invasión de las hifas en los tejidos de las raíces, provoca el estrangulamiento de las mismas debido al colapso de los vasos conductores, lo que termina por originar la pudrición local o total de las raíces infectadas.

La pérdida de raíces funcionales origina el llamado decaimiento progresivo del árbol, que además de la marchitez comentada con anterioridad, está caracterizado por otros síntomas generales como la caída de las hojas, dejando desprovistas a las ramas, las cuales mueren progresivamente producto del avance de la enfermedad (figura 3).

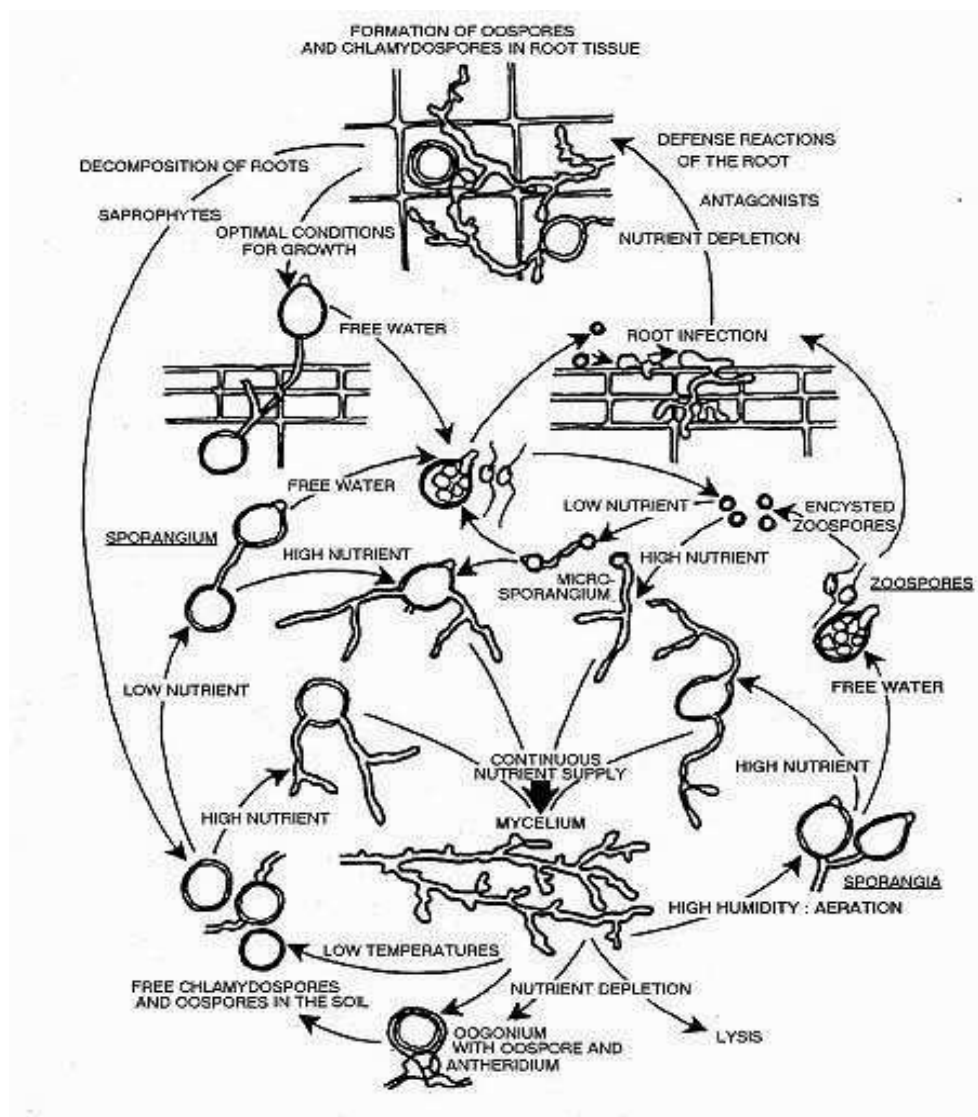


Figura 3. Ciclo de vida de especies de *Phytophthora* en suelo y tejidos vegetales afectados. Esquema realizado por Thomas Jung, adaptado de Ribeiro *et al.*, 1978.

En algunos casos, el avance de la enfermedad es tan rápido que no da tiempo al desprendimiento de las hojas, quedando marchitas en el árbol; en las ramas que logran una mayor supervivencia, es frecuente la producción de hojas más pequeñas de lo normal, de color verde pálido, amarillento o marchito. Además, la corteza de los frutos suele tornarse más brillante (Erwin y Ribeiro, 1996).

El manejo en cultivo puro de *P. cinnamomi*, permite obtener cualquiera de las estructuras reproductoras, con la correspondiente modificación de las

condiciones ambientales y de cultivo. Chen y Zentmyer (1969 y 1970) propusieron el medio V8 entre otros, como el más adecuado para el crecimiento vegetativo de micelio de *P. cinnamomi*, en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Los protocolos descritos por estos autores, incluidas algunas modificaciones posteriores, siguen siendo reconocidos por la EPPO en materia de investigación para la prevención, detección y control de infecciones causadas por *P. cinnamomi* en plantas (EPPO, 2004). El cultivo continuado en el medio de cultivo V8 en condiciones de oscuridad, suele llevar asociada la formación de oosporas y clamidiosporas, mientras que la escasez de los nutrientes y el cambio en las condiciones ambientales de luz y temperatura, propicia la formación de esporangios. Para que se diferencien y liberen las zoosporas, es necesario un descenso de la temperatura ambiental del cultivo.

1.3. MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES FORESTALES

1.3.1. 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

podría 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.

Los métodos de **regeneración** de plantas *in vitro* siguen una de estas dos vías: la organogénesis o la embriogénesis somática. La primera vía es la más clásica y de uso más generalizado desde los inicios de las técnicas de micropropagación. La segunda vía, la embriogénesis somática, se ha configurado posteriormente como otra opción más para la regeneración de plantas en especies forestales. Esta segunda vía presenta unas elevadas tasas de multiplicación mediante embriogénesis secundaria o recurrente (Fernández Guijarro *et al.*, 1995). Por otra parte, los cultivos embriogénicos suelen presentar una aceptable capacidad para la criopreservación, manteniendo todo su potencial de propagación (Park *et al.*, 1998). En la actualidad existen publicados protocolos de regeneración por embriogénesis somática para un gran número

especies forestales, tanto coníferas (Haggman *et al.*, 1999; Filonova *et al.*, 2000) como frondosas (Endemann y Wilhelm, 1999; Xing *et al.*, 1999). Se ha tratado esta vía de regeneración en algunas especies ibéricas, entre ellas *Q. suber* (Toribio y Celestino, 1989; Bueno *et al.*, 1992; Celestino *et al.*, 1999), *Q. robur* (Cuenca *et al.*, 1999) y *Pinus nigra* (Radojevic *et al.*, 1999). Pero entre los problemas más importantes de esta vía de regeneración, se encuentra la necesidad de lograr cultivos sincrónicos, mejorar el proceso de maduración y lograr una mayor estabilidad genética.

La regeneración de plantas vía organogénesis, mediante la inducción de las yemas axilares y su posterior enraizamiento, se presenta como una opción estable, que permite salvar entre otros, los problemas de estabilidad genética que presenta la embriogénesis somática (Frampton *et al.*, 1998; Deshpande *et al.*, 1998). No obstante, entre sus dificultades, destaca la necesidad de lograr la clonación a partir de tejidos procedentes de árboles adultos (Merkle, 1995) o, la obtención de plántulas que ofrezcan una mejor respuesta en la fase de aclimatación (adaptación de las condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*). En este sentido, es fácil encontrar numerosos trabajos de regeneración de plantas forestales vía organogénesis, que tratan específicamente el efecto de determinados factores de cultivo en cualquiera de sus fases, así como el tratamiento previo para rejuvenecer el material original (Manzanera y Pardos, 1990; Romano y Martins Louçao, 1992; Vieitez *et al.*, 1993 y 1994; Vengadesan y Pijut, 2009; Liñán *et al.*, 2011).

1.3.2. 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*.

° 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.

° 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).

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.

Los reguladores de crecimiento los 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 3-acético), 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 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

Las citoquininas actúan sobre el proceso de división celular, favoreciendo la diferenciación de tallos principalmente, y la proliferación de meristemas 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 (2-isopenteniladenina), la quinetina, la zeatina y el tidiazurón.

Las giberelinas son habitualmente utilizadas en medios de cultivo para promover el alargamiento de los entrenudos, y el crecimiento de los meristemas y yemas, inhibiendo la inducción adventicia de los brotes y raíces (Pierik, 1987). La giberelina más utilizada es el ácido giberélico (GA_3).

En cuanto al ácido abscísico, se usa sobretodo, 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.

1.3.3. 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 meristemas 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. Así por ejemplo, se han obtenido brotes tiernos de algunos *Quercus* entre otras especies, mediante el estaquillado de ramas de un árbol adulto (Manzanera y Pardos, 1990; Chalupa, 1993; Vieitez *et al.*, 1993; Carrasquinho de Freitas, 2002). 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. Mediante esta metodología se han logrado brotes tiernos también en algunos *Quercus* (Romano y Martins Loução, 1992; Evers *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1994), que incluso, han mostrado mayor capacidad de enraizamiento *in vitro* que explantes obtenidos tras la maduración de embriones somáticos (Evers *et al.*, 1993). La brotación de las yemas laterales puede verse favorecida por la aplicación de fitohormonas que rompan la latencia de las mismas (Yang y Read, 1997) o, en el caso de *Q. suber*, mediante tratamiento previo en frío antes de la inducción (Romano *et al.*, 1992).

Otra forma de obtener material vegetal en estado juvenil, es mediante la germinación de semillas, aprovechando el epicotilo e hipocotilo para obtener segmentos nodales, o bien, los brotes nuevos una vez formada la planta completamente. Esto ha sido descrito para muchas especies forestales, entre ellas algunos *Quercus* (Pardos, 1982; Chalupa, 1993; Vieitez *et al.*, 1993; Puddephat *et al.*, 1999; Vengadesan y Pijut, 2009; Liñán *et al.*, 2011).

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, meristemas, etc.), así como su tamaño, estado fisiológico y juvenilidad. Pero también es importante elegir el método de desinfección para tener controlados los posibles contaminantes. Por lo general, resulta demasiado costoso controlar los contaminantes internos sin comprometer la viabilidad de los tejidos, por lo que se recurre a seleccionar material original lo más limpio posible y, realizar una desinfección superficial que dañe lo menos posible el material vegetal que va a ser implantado. En la desinfección superficial de los explantes, se usan desinfectantes como el etanol, los hipocloritos de calcio y sodio, soluciones de fungicidas sistémicos y jabones entre otros, variando las concentraciones y tiempos de exposición a los mismos en función de la especie y origen del material vegetal. Es frecuente en los

primeros días de implantación, que los tejidos muestren síntomas de reacción adversas a las nuevas condiciones, siendo una de las más comunes, la aparición de exudados. Estos son originados por efecto de la oxidación del tejido debido a la desinfección, o por reacción a las condiciones y medios de cultivo. Esos exudados suelen estar constituidos por compuestos fenólicos, fácilmente notables porque provocan el oscurecimiento del medio de cultivo o “*browning*”, causando la degradación progresiva de los tejidos adyacentes debido a su efecto oxidativo (Romano y Martins Louçao, 1992). Generalmente, este problema suele solucionarse con cambios frecuentes de medio de cultivo, aunque en otros casos, como el del cultivo de *Q. suber*, puede ser conveniente recurrir a la aplicación de antioxidantes (Romano y Martins Louçao, 1992) o variar las condiciones de cultivo, como por ejemplo, mantener los explantes con baja intensidad lumínica, para evitar los efectos excesivos de la foto-oxidación.

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).

Teóricamente, una vez establecida cualquier planta en cultivo *in vitro*, podría ser mantenida indefinidamente en la fase de multiplicación si se dieran las condiciones adecuadas (Debergh y Read, 1991). Sin embargo, diversos factores van haciendo que los tejidos y estructuras vegetales pierdan vigor,

capacidad de crecimiento y estabilidad genética a lo largo de los subcultivos, haciendo necesaria la re-implantación de nuevo material vegetal cada cierto tiempo, que puede variar en función de las especies vegetales y las condiciones de cultivo. La propia variabilidad genética del material vegetal y el uso incorrecto o excesivo de reguladores de crecimiento y de otros factores de cultivo (luz, temperatura, ingredientes de los medios de cultivo, etc.), propician la disminución de la estabilidad fenotípica, que se manifiesta principalmente, por la aparición de fenómenos de hiper-hidratación o vitrificación (Pierik, 1990) e, incluso, de brotes deformes.

---	+++	→ Rizogénesis en segmentos nodales
--	++	→ Inducción de la embriogénesis
-	+	→ Formación de raíces adventicias en <i>callos</i>
Citoquininas	Auxinas	→ Iniciación de <i>callos</i>
+	-	→ Formación de brotes adventicios
++	--	→ Proliferación de brotes axilares
+++	---	

Figura 4. Efectos del balance de auxinas y citoquininas en los procesos de regeneración de plantas *in vitro* (Adaptado de George y Sherrington, 1984).

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 (figura 4). El uso de las citoquininas está bastante diversificado, aunque en los *Quercus* la más usada es el 6-BAP, mientras que de las auxinas, la más usada con los *Quercus* en esta fase son el AIA y el ANA (El Kbiach *et al.*, 2001).

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

tallos 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. En muchas especies, la capacidad de enraizar de los brotes generados en la fase de multiplicación, es muy dependiente del tamaño de esos brotes (Toribio y Celestino, 1989), por lo que pueden requerir una etapa previa de alargamiento de los tallos, lo que se consigue normalmente transfiriéndolos a un medio de cultivo sin citoquininas, lo que además, ayuda a eliminar el efecto inhibitorio de éstas sobre la rizogénesis.

El enraizamiento de los brotes puede hacerse *in vitro* o *ex vitro*. El enraizamiento *ex vitro* ha sido usado con éxito en especies forestales como *Ulmus minor* (Conde *et al.*, 2008), *Juglans spp.* (Leslie *et al.*, 2005) o *Quercus robur* (Meier Dinkel *et al.*, 1993) entre otras y, consiste en el enraizamiento directo en el sustrato de aclimatación. Tanto en un caso como en otro, la aplicación de auxinas para inducir la formación de raíces, suele hacerse mediante inmersión de la base de los brotes en una solución concentrada ("*dipping*"), o bien mediante la dosificación en el medio de cultivo o el sustrato de aclimatación. En algunas especies se han logrado mejorar los porcentajes de enraizamiento sometiendo a los explantes a un periodo de oscuridad (Sánchez *et al.*, 1996; Fotopoulus y Sotiropoulus, 2005; Sharma *et al.*, 2007), lo que está relacionado principalmente con la fotosensibilidad de las auxinas (Hangarter y Stasinopoulos, 1991).

En el caso concreto de los *Quercus*, varios trabajos han comparado ambos métodos de aplicación de las auxinas para enraizar, con resultados positivos en

ambos, dependiendo fundamentalmente de la especie (Toribio y Celestino, 1989; Manzanera y Pardos, 1992; Romano *et al.*, 1992; Vieitez *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 1996).

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*. Entre esas deficiencias se encuentran la morfología anormal de las hojas con excesiva apertura estomática y baja actividad fotosintética, la falta de sustancias de reserva, la deficiente conexión vascular entre raíces y parte aérea (especialmente cuando la regeneración procede de callo) y, la falta de funcionalidad de las raíces, debido principalmente, a la escasez de pelos absorbentes (Agramonte *et al.*, 1998).

La principal causa de mortalidad durante la aclimatación es el estrés hídrico que resulta de la excesiva transpiración estomática y cuticular en relación a la cantidad de agua absorbida por las raíces (Sha Valli Khan *et al.*, 1998). Para la disminución de la transpiración, sea cuticular o estomática, pueden ser aplicadas sustancias antitranspirantes en las hojas o mantener las plántulas en atmósferas con alta humedad relativa durante las primeras semanas de aclimatación. Las estrategias para conseguir un buen sistema radical, son muy variadas, como por ejemplo, el uso de sustratos porosos que permitan la formación de raíces con un mayor número de pelos absorbentes, como por ejemplo, la perlita, la vermiculita o la fibra de coco. En este tipo de sustratos, en los que suelen quedar numerosos espacios aireados entre las partículas o agregados del sustrato una vez humedecido éste, las raíces se

endurecen y adquieren un aspecto más natural, ya que comienzan a lignificarse, desarrollan raíces secundarias y mayor cantidad de pelos absorbentes que en los medios semisólidos o gelificados. Otras estrategias son el enraizamiento en los sustratos de aclimatación, el uso de compuestos en los medios de enraizamiento que favorezcan la acumulación de sustancias de reserva, la introducción de hongos micorrizantes en los sustratos de aclimatación, etc. Así por ejemplo, en *Quercus euboica*, se han descrito mejoras en la aclimatación con sustrato natural respecto a un sustrato orgánico comercial (Kartsonas y Papafotiou, 2007), que atribuyen a la más que probable presencia de hongos micorrízicos en el sustrato natural.

La metodología que con mayor frecuencia se ha descrito en la bibliografía para la gran mayoría de las especies, consiste en disponer las plántulas enraizadas en recipientes con un sustrato formado por mezcla de sustrato orgánico (turba, compost, corteza de pino, fibra de coco) y algún sustrato inerte (perlita, vermiculita, etc.), cubriéndolas con un plástico y manteniéndolas en cámara de cultivo durante algunas semanas, adaptándolas progresivamente a condiciones de mayor aireación y luminosidad, hasta su paso final a un invernadero (Toribio y Celestino, 1989; Manzanera y Pardos, 1990; Romano *et al.*, 1992; Chalupa, 1993; Purohit *et al.*, 2002a,b; Kartsonas y Papafotiou, 2007; Vengadesan y Pijut, 2009;). En el invernadero, deberán sufrir otro periodo de adaptación, consistente generalmente en procesos de endurecimiento de la planta como paso previo a su traslado al campo.

No obstante, se han utilizado algunas variantes o metodologías diferentes en otras plantas leñosas, que pudieran resultar interesantes tanto para los *Quercus* como para otros géneros. Así por ejemplo, se ha utilizado una sencilla mejora en la aclimatación de *Olea maderensis*, consistente en introducir la maceta de plástico con la planta enraizada y su correspondiente sustrato, en un recipiente de vidrio, manteniendo éstos en cámara de cultivo (Brito *et al.*, 2009). La ventaja de esta mejora, son en realidad dos: por un lado, se puede esterilizar el sustrato y mantenerlo dentro del recipiente de vidrio. Y por otro

lado, se mantiene la plántula en unas condiciones de alta humedad relativa durante los primeros días tras su paso a maceta.

Por otro lado, Kadlecek *et al.*, (2001), trabajando con *Nicotiana tabacum*, probaron la capacidad de aclimatación de plántulas crecidas *in vitro* con diferente concentración de sacarosa y con diferente intensidad lumínica. Concluyeron que la presencia de una fuente de carbono en el medio de cultivo no es estrictamente necesaria, ya que fueron capaces de crecer plántulas en ausencia de dicha fuente de carbono, aunque resulta claramente beneficiosa para el éxito en la fase de aclimatación. Este beneficio, probablemente sea debido a que la presencia de dicha fuente de carbono permite a la planta poder incorporar una mayor cantidad de carbono estructural y acumular sustancias de reserva, que resultarán esenciales en la fase de aclimatación hasta que la planta sea capaz de adaptarse definitivamente a las nuevas condiciones. Pero además, otra conclusión que obtuvieron es que exponer las plántulas durante el cultivo *in vitro* a intensidades lumínicas mayores a las que normalmente se utilizan (60-100 $\mu\text{moles}/\text{m}^2\cdot\text{s}$), puede favorecer el posterior desarrollo de las mismas en la fase de aclimatación, siempre y cuando no se comprometa el desarrollo normalizado de la plántula, ya que el exceso de intensidad lumínica también puede originar otros problemas, como por ejemplo, los derivados de la foto-oxidación e incluso, vitrificaciones.

También se ha observado, que la adicción de ácido abscísico en el sustrato inmediatamente después del trasplante a condiciones *ex vitro*, reduce la conductancia estomática en plántulas de *Nicotiana tabacum* (Pospíšilová *et al.*, 1998) y, por tanto, reduce las pérdidas netas de agua en la planta durante los primeros días de aclimatación. En este mismo sentido, otras mejoras que se han desarrollado para la reducción de las pérdidas de agua durante la aclimatación, han sido por ejemplo, la adicción de paclobutrazol (Smith *et al.*, 1992b) o, la disminución del potencial osmótico del medio de cultivo mediante la adicción de polietilén-glicol (Zaid y Hughes, 1995) o también, de sorbitol (Bahmani *et al.*, 2009).

1.4. INOCULACIÓN IN VITRO Y EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN.

Las ventajas que supone el cultivo *in vitro* tanto de plantas como de los microorganismos que pueden interaccionar con ella, ha permitido usar estos sistemas en el estudio de dicha interacción, ya sea a nivel fisiológico, bioquímico o genético, desde hace algunas décadas. Estos sistemas han permitido ampliar los conocimientos acerca de las bases moleculares de la interacción entre plantas y patógenos, o entre plantas y microorganismos simbióticos, habiendo llegado a ser capaces de mejorar cultivos de plantas mediante la simbiosis *in vitro* con microorganismos beneficiosos (Martins, 2008; Smith and Read, 2008), hacer las plantas más resistentes al ataque de patógenos (Sánchez-Zabala *et al.*, 2009), mejorar las repoblaciones forestales con plantas micorrizadas y rizobacterias (Díez *et al.*, 2000, Zhu *et al.*, 2010), incluso, de utilizar esos mismos microorganismos para transformar genéticamente una planta, o para hacer que produzca determinadas sustancias de interés, ajenas de forma natural a la propia planta .

No obstante lo anterior, siguen existiendo numerosas incógnitas en las relaciones básicas entre plantas y microorganismos, así como en la extensión de los resultados de estudios *in vitro* a condiciones *ex vitro*. Algunas tan básicas como los problemas originados por los microorganismos patógenos, muchas veces derivados de los propios cambios naturales de los mismos que de forma espontánea los hace más agresivos frente a sus hospedantes, o bien, porque el desplazamiento de sus hábitats naturales (donde podrían encontrarse controlados por las condiciones ambientales o la presencia de predadores naturales) hacia hábitats más favorables, les permite proliferar con mayor intensidad. En otros casos, son las diferencias estructurales y fisiológicas entre genotipos o especies, lo que hace que unas sean más tolerantes o resistentes que otras.

Las técnicas de cultivo *in vitro* y testado, tienen un gran interés en la búsqueda de cultivares tolerantes ó resistentes a la presencia de un determinado microorganismo patógeno (Cuenca *et al.*, 2010; McPherson *et al.*, 2014; Valencia *et al.*, 2014). De este modo, los sistemas de cultivo *in vitro*, permiten establecer test de resistencia o tolerancia de una planta frente a la presencia de un patógeno, de forma rápida, segura y más económica que si esos test se realizaran directamente en campo. Aunque no están exentos de inconvenientes, como por ejemplo, la dificultad para establecer *in vitro* los cultivos tanto de la especie vegetal como del microorganismo, qué metodología seguir para la correcta infección de las plantas por el microorganismo, la elección de parámetros adecuados que reflejen las diferencias en las respuestas de los distintos genotipos de la especie vegetal frente al patógeno, o la reproducibilidad de los resultados una vez que los genotipos seleccionados son cultivados en condiciones *ex vitro*.

Una vez salvado el primer escollo, que es el de establecer *in vitro* tanto la especie vegetal como el microorganismo de interés, los esfuerzos se centran en el diseño experimental. Y en este sentido, podemos encontrar en la bibliografía gran variedad de metodologías, en función del ciclo de vida del microorganismo y de cómo se suele establecer la interacción planta-patógeno en la naturaleza.

En el caso de *Phytophthora*, es un patógeno presente en el suelo que se dispersa a través del agua libre presente en el mismo (EPPO, 2004). Por tanto, infecta principalmente a las raíces de las plantas (Cahill *et al.*, 1993; Robin *et al.*, 2001).

Dada la diversidad de estructuras de este patógeno que han demostrado su eficacia en los ensayos de infección en diferentes plantas, podemos encontrar diversas metodologías relativas al modo de obtención de inóculo y de infección.

Así por ejemplo, una de las metodologías utilizadas frecuentemente consiste en la obtención de suspensiones puras de zoosporas, que son las estructuras que en última instancia, entran en contacto con las raíces de sus

hospedantes (un ejemplo ilustrativo puede verse en el enlace web <https://www.youtube.com/watch?v=PxF8OwDtJh0>). La obtención de suspensiones puras de zoosporas de *Phytophthora spp.*, pasa primeramente por la obtención de masa micelial para la producción de esporangios, que tras ser sometida de diferentes formas a un estrés abiótico (debido a cambios de temperatura, pH, contenido iónico del medio acuoso, contenido nutricional, etc.), han de ser filtradas tras un breve espacio de tiempo y en condiciones asépticas para su uso como inóculo puro (Chen y Zentmyer, 1970; Davison y Tay, 1986; Tuset *et al.*, 2001).

No obstante, las zoosporas libres tienen una corta vida útil, que complica los ensayos de inoculación. Por ello, buscando alternativas a la inoculación con suspensiones puras de zoosporas, se ha indicado en algún caso una mayor efectividad de la infección cuando se ha inoculado con zoosporas en fase de enquistamiento (Fraedrich *et al.*, 1989), dado que en esta fase, las zoosporas son más perdurables y por tanto, pueden estar disponibles para infestar en diferentes periodos, cuando encuentran condiciones favorables.

Por otro lado, desde que se documentara que la patogenicidad de muchos hongos dependía de la síntesis de una o varias toxinas, otra de las formas de inóculo ampliamente utilizadas en los test de resistencia/tolerancia, son los filtrados de cultivos puros de hongos. Por ejemplo, Rosati *et al.* (1989) mostraba la capacidad de producir la muerte en plantas de fresa cultivadas *in vitro*, a partir de filtrados estériles de cultivos puros de *Phytophthora cactorum*, sirviendo de método para la selección *in vitro* de cultivares resistentes al patógeno.

También han servido los homogenados de micelio del patógeno en cultivo puro, como por ejemplo, en el caso de la infección de plantas de encinas y alcornoques de 12 a 18 meses de edad con *P. cinnamomi* (Tuset *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2005; León-Sánchez, 2013). En un experimento posterior, Tuset *et al.* (2001), reproduce la infección de encinas y alcornoques jóvenes (entre otros *Quercus*) con suspensiones de zoosporas de *P. cinnamomi*, mostrando también la

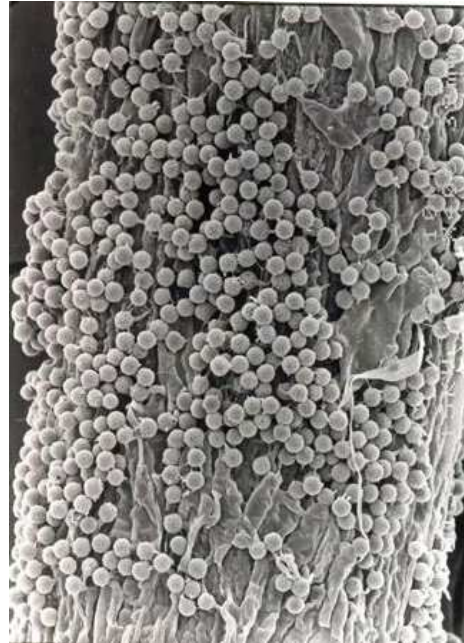
eficacia de esta metodología a la hora de causar síntomas y mortalidad en dichas plantas. Estos autores, señalan la aparición de síntomas de desecación, amarillamiento, marchitez y necrosis, bien en parte aérea o bien en raíces, como las principales diferencias entre las plantas inoculadas y las testigo, proponiendo la valoración de estos síntomas como los más adecuados para la diferenciación en test de tolerancia/sensibilidad, respecto a los relacionados con los pesos de masa vegetal entre plantas inoculadas y testigo. Tanto los autores citados como en otros casos similares (Sowik *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2002; Campanile *et al.*, 2007; León-Sánchez, 2013), emplean escalas arbitrarias con más o menos niveles de diferenciación, en función de los porcentajes observados de síntomas en la parte aérea y radical, siendo esos síntomas los más frecuentemente evaluados en los ensayos de infección.

Sin duda, los parámetros físicos son los más fácilmente cuantificables, porque pueden evaluarse a simple vista en la planta (Tuset *et al.*, 2001; Miranda Fontaiña *et al.*, 2005) y, pueden en muchos casos, no tener porqué suponer la destrucción de la planta, con el consiguiente beneficio que esto implica. Otra forma de cuantificar la infección o el grado de resistencia/tolerancia de un genotipo, es a través de parámetros fisiológicos como el estrés hídrico de la planta (Parke *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2009), la pérdida de conductancia estomática y capacidad fotosintética (Linaldeddu *et al.*, 2009), la síntesis de polifenoles (Turco *et al.*, 2004), la detección de enzimas implicadas en el estrés oxidativo como respuesta a la presencia del patógeno (Cahill *et al.*, 1993) o, el efecto sobre las plantas de elicinas obtenidas a partir de los microorganismos patógenos (Boissy *et al.*, 2010).

También la capacidad de resistencia/tolerancia de un genotipo, se ha relacionado con la penetrabilidad del patógeno a través de sus tejidos o la extensión del mismo por los vasos xilemáticos, habitualmente utilizados por los hongos para extenderse por el interior de la planta. En este sentido, las técnicas de microscopía ofrecen una muy buena herramienta para observar y analizar

cuantitativamente estos hechos, tanto con la microscopía óptica como electrónica (figura 5).

Figura 5. Zoosporas enquistadas de *Phytophthora cinnamomi* adheridas a la superficie de la raíz de una planta hospedadora. Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido. (Extraída de O'gara *et al.*, 2005)



Hasta tal punto, que no solo podemos confirmar la presencia del patógeno en el interior de los tejidos hospedadores, observar posibles cambios estructurales en los mismos (Maia *et al.*, 2008), identificar proteínas u otros compuestos que intervienen en la respuesta planta-patógeno o cuantificar la extensión colonizada de una superficie de dimensiones conocidas (Brummer *et al.*, 2002), sino que incluso es posible determinar las zonas infectadas y la densidad de la infección con una simple foto de microscopía óptica y las herramientas informáticas adecuadas para el tratamiento de la imagen digitalizada. Este último ejemplo es posible gracias a modelos como el descrito por Ruíz-Gómez *et al.*, (2012), en el que son capaces de separar imágenes de estructuras fúngicas por rangos de color presentes a diferente profundidad en una preparación, y establecer un mapa de situación de dichas estructuras que permite diferenciar aquellas que son superficiales, inter- o intracelulares, sin

necesidad de una tinción o un tratamiento específico para el contraste de la preparación microscópica.

Por otro lado, las técnicas moleculares, son otra gran herramienta en la detección y cuantificación de la infección en plantas por microorganismos. En este sentido, trabajos como el de Mercado-Blanco *et al* (2005), han mostrado que es posible cuantificar la cantidad de masa celular del patógeno en los tejidos hospedantes mediante técnicas de PCR. Otra gran aplicación de las técnicas moleculares es la identificación de la expresión de genes implicados en la interacción planta-patógeno (Coelho *et al.*, 2006 y 2011), que en muchos casos, guardan una notable similitud interespecífica y, por este mismo motivo, tras la secuenciación de su ADN, es posible relacionarlos más fácilmente con el tipo de respuesta al patógeno (Meng *et al.*, 2009).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El presente trabajo está englobado dentro del proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía P07-RNM 3108, que tiene por objetivo principal “la selección y propagación de genotipos de encina (*Quercus ilex*) y alcornoque (*Q. suber*) tolerantes/resistentes al oomiceto patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands.”

En el presente trabajo, los principales objetivos son:

- 1º. La mejora y elección de los protocolos para la micropropagación de individuos seleccionados de *Quercus suber* y *Q. ilex ssp. ballota*, y en concreto, la optimización de las distintas fases de la micropropagación de:
 - individuos adultos seleccionados en campo, procedentes de fincas adehesadas de la provincia de Huelva;
 - individuos jóvenes procedentes de semilla germinada en invernadero.
- 2º. El estudio de diferencias entre los clones micropropagados en la respuesta de tolerancia/resistencia frente a la infección con *P. cinnamomi*, en plantas de *Q. suber* inoculadas *in vitro*, mediante variables del estado sanitario, para poder establecer criterios de selección en la búsqueda de clones tolerantes/resistentes al patógeno.

Debido a la extensión de ambos objetivos, se ha visto conveniente abordar la metodología, los resultados y la discusión de cada uno, en capítulos diferentes.

El alcance de ambos objetivos se ha podido llevar a cabo por completo para el caso de *Q. suber*. Paralelamente, se iniciaron también los trabajos de micropropagación para *Q. ilex*, pero la extensión y dificultad de los mismos,

bien merecen una publicación paralela. No obstante, se han incluido en este trabajo los resultados de las pruebas para las primeras fases de su micropropagación, dado el paralelismo que presenta con *Q. suber*, por su implicación en la enfermedad de la "seca" o "decaimiento" en nuestro ámbito geográfico.

CAPITULO I:

MICROPROPAGACIÓN DE

Q. ILEX Y Q. SUBER

3.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1.1. Origen y preparación del material vegetal.

El material vegetal para la micropropagación consistió en segmentos nodales procedentes de brotes tiernos obtenidos, bien mediante inducción en ramas de individuos adultos seleccionados en campo, o bien de plantas jóvenes de 18 a 24 meses, germinadas en invernadero.

El material recolectado de individuos adultos consistió en 1 ó 2 ramas/árbol de un total de 50 alcornoques y 42 encinas, seleccionados en varias poblaciones de la provincia de Huelva. La recolección de ramas tuvo lugar desde junio de 2009 hasta mayo de 2010. Se cortaron ramas de una longitud total de 80 a 100cm, y de entre 2 y 4cm de diámetro. Se intentó que las ramas escogidas estuvieran en buen estado, descartando aquellas cuya corteza estaba demasiado envejecida o con heridas importantes. Siguiendo la metodología descrita por Romano y Martin-Loução (1992) con algunas modificaciones, cada rama fue troceada en estacas de 20 a 30 cm., siendo éstas guardadas en bolsas de plástico y mantenidas en frío hasta su llegada al laboratorio. Una vez allí, se trataron superficialmente con hipoclorito sódico (al 5% de cloro activo) durante 60 segundos y, al cabo de ese tiempo, se lavaron con agua corriente, utilizando un cepillo para eliminar los restos de líquenes y otras impurezas.

El material juvenil empleado consistió en 52 plántulas de alcornoque y 36 de encina, de entre 18 y 24 meses, germinadas en invernadero y seleccionadas a partir de un ensayo de resistencia/tolerancia al oomiceto *P. cinnamomi*, previo al presente trabajo (León Sánchez, 2010). Estas plantas procedían de semillas recogidas principalmente en la provincia de Huelva, aunque en otros casos, también se recogieron algunas del Algarve, Bajo y Alto Alentejo portugués, Cádiz y Sevilla.

3.1.2. Inducción de yemas laterales e implantación *in vitro*.

3.1.2.1. Efecto del tratamiento en frío y del régimen de temperatura en la inducción de yemas laterales en estacas de material adulto.

Para determinar las mejores condiciones de inducción de la brotación de las yemas laterales de las estacas, se comparó por un lado, el tratamiento previo en frío de las estacas durante 3 semanas, frente a la inducción directamente en cámara de cultivo y, por otro lado, el efecto de las diferentes condiciones de temperatura entre una cámara de cultivo y un umbráculo. Para ello se seleccionaron estacas de 6 encinas de la población de El Villar y, de 6 alcornoques de la población de Almonte, recogidas en junio de 2009, de tal manera que se dispusieron 9 estacas de cada individuo en tres variantes diferentes (tres estacas de 25cm aproximadamente por cada tratamiento e individuo).

A las estacas se le cortaron los extremos necrosados y se colocaron en bandejas de plástico con perlita (5cm de espesor aproximadamente), enterradas por el extremo basal (figura 6).



Figura 6. Estacas de *Q. suber* en bandeja con perlita para la inducción de la brotación de sus yemas.

La perlita fue humedecida periódicamente casi hasta saturación para mantener unas condiciones de alta humedad en torno a las estacas, manteniendo unas condiciones concretas en cada tratamiento como se describe a continuación:

Tratamiento	Pre-tratamiento	Lugar de inducción	Temperatura de inducción
Cam	N/A*	Cámara de cultivo	25°C/15°C (luz/oscuridad)
F-Cam	21 días a 4°C	Cámara de cultivo	25°C/15°C (luz/oscuridad)
F-Umb	21 días a 4°C	Umbráculo	<42°C/>18°C (día/noche)

*N/A: No aplicado ningún pre-tratamiento específico.

- Tratamiento “Cámara” (Cam): las estacas se mantuvieron en la cámara de cultivo bajo un fotoperiodo de 16h de luz, temperatura diurna de 25°C, nocturna de 15°C y, una humedad relativa del 80% aproximadamente.

- Tratamiento “Frío-cámara” (F-Cam): las estacas estuvieron un periodo de 21 días en frío (4°C), previamente a su mantenimiento en cámara, bajo las mismas condiciones que hemos descrito en el tratamiento anterior. Durante la permanencia en frío, las estacas estuvieron envueltas en una bolsa de polietileno y mantenidas en oscuridad.

- Tratamiento “Frío-umbráculo” (F-Umb): las estacas estuvieron un periodo previo de 21 días en frío tal y como se ha descrito en el tratamiento anterior, previamente a su mantenimiento en un umbráculo. La principal diferencia respecto a las estacas mantenidas en cámara es que en el umbráculo recibieron luz solar (aunque ésta esté reducida en un 50% debido al efecto sombra de la malla protectora del umbráculo). Además, teniendo en cuenta que estas pruebas fueron efectuadas durante el mes de junio, la temperatura fluctuó

entre mínimas registradas en 18°C y máximas de 42°C, mientras que el fotoperiodo fue similar al empleado en la cámara de cultivo. Para evitar las pérdidas de humedad por el efecto de aireación y, poder mantener una alta humedad relativa en torno a las estacas, éstas se montaron en cajones de poliestireno expandido, en lugar de bandejas como en las variantes anteriores.

3.1.2.2. Efecto del periodo de recogida en la inducción de yemas laterales en estacas de material adulto.

Fijado el mejor tratamiento de inducción, se trataron las estacas de 36 encinas y 48 alcornoques recogidas en diferentes localidades del centro y sur de la provincia de Huelva, a lo largo de 7 meses (tabla 3.1).

Tabla 3.1. Periodo de recogida y origen de las estacas de *Q.ilex* y *Q. suber*

Especie	Origen	Periodo de recogida	Nº de árboles seleccionados
Encina	Alosno	Nov-2009	7
	Niebla	Feb-2010	4
	Vva. Castillejos	Marzo-2010	4
	Sta. Bárbara	Abril-2010	9
	Zalamea	Mayo-2010	8
	El Villar	Mayo-2010	4
	Alcornoque	Beas-Valverde	Nov-2009
Almonte		Dic-2009	8
Niebla		Feb-2010	10
Vva. Castillejos		Marzo-2010	3
Tariquejo		Marzo-2010	7
Hinojos		Mayo-2010	6
Almonte		Mayo-2010	4

Las estacas se dispusieron en sus respectivas bandejas con perlita de igual forma que se ha descrito en la prueba anterior y en las mismas condiciones de cultivo (fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad, HR en torno al 80%), a excepción de la temperatura, que se ajustó en 28°C (diurna) y 24°C (nocturna). Solo en el caso de las estacas de alcornoque, se trataron previamente a 4°C y en oscuridad durante 21 días, tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

3.1.2.3. Inducción de la brotación en individuos juveniles.

Se seleccionaron 36 plántulas de encina y 52 de alcornoque de un ensayo anterior de León Sánchez (2010). En dicho ensayo, habían sido germinadas a partir semillas de 7 localidades diferentes para cada especie, en alveolos de 300cc. Para nuestro ensayo, se transfirieron con sus cepellones a cajas de "polispam" de 50 litros, con un sustrato a base de turba y perlita (10:1 v/v) y, se mantuvieron en condiciones de cámara de cultivo (28°C día/24°C noche, fotoperiodo de 16h de luz/8h de oscuridad y 6Wm⁻² de intensidad [tubos fluorescentes Philips 58W]) para inducir la brotación de sus yemas axilares y apicales. Se regaron periódicamente durante 6 meses aproximadamente, de manera que en estas condiciones, las yemas que lograron brotar fueron cortadas en segmentos nodales, los cuales se utilizaron para la implantación *in vitro* de los individuos seleccionados.

3.1.2.4. Efecto del medio de cultivo y del tipo de material de partida en la implantación de segmentos nodales.

Los brotes tiernos obtenidos tanto de las estacas de material adulto como de las plántulas juveniles, se desinfectaron en solución acuosa de hipoclorito

sódico (0,5% de cloro activo) durante 60 segundos, con una o dos gotas de solución tenso-activa (tween® 20).



Figura 7. Segmentos nodales de *Q. ilex* en fase de implantación, colocados en recipientes de 20ml de capacidad, con 5ml de medio de cultivo.

Seguidamente, se lavaron tres veces con agua desionizada autoclavada en la cabina de flujo laminar, donde posteriormente, fueron cortados en segmentos nodales con 1 o 2 yemas por segmento, y colocados en los correspondientes medios de cultivo, usando para ello vasos de polipropileno con tapa, de 30 ml de capacidad, con 5ml de medio de cultivo en cada uno (figura 7).

Se compararon los medios de cultivo basados en las formulaciones de Gresshoff y Doy (GD), Murashige y Skoog (MS), Gamborg B5 (GB5) y Woody Plant Medium (WPM) (tabla 3.2). Además, se diseñaron dos variantes del GB5, denominadas GBSO y GBCa.

Tabla 3.2. Composición de los medios de cultivo utilizados en la fase de implantación de segmentos nodales. (Cantidades expresadas en mg/L).

	MS	GD	WPM	GB5	GBSO	GBCa
<i>Macronutrientes</i>						
NH ₄ NO ₃	1650	1000	1400	-	-	-
KNO ₃	1900	1000	-	2500	2000*	2000*
K ₂ SO ₄	-	-	990	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	180	34,9	180,54	250	250	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	134	500*	134
KH ₂ PO ₄	170	300	170	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	241,3	471,26	-	*	500*
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	-	-	150	150	150
CaCl ₂ .H ₂ O	332,02	-	72,50	113,19	113,19	*
KCl	-	65	-	-	-	-
<i>Micronutrientes</i>						
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	0,3	8,6	2,0	2,0	2,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,25	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ .2H ₂ O	0,025	0,025	-	0,025	0,025	0,025
H ₃ BO ₃	6,20	0,3	6,20	3,0	3,0	3,0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,025	0,25	0,25	0,25	0,25
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	1	22,3	10,0	10,0	10,0
KI	0,83	0,83	-	0,75	0,75	0,75
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	27,85	27,85	27,85	27,85	27,85
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,25	37,25	37,25	37,25	37,25	37,25
<i>Vitaminas</i>						
Glicina	2,0	4,0	2,0	-	-	-
Tiamina	1,0	10,0	1,0	10,0	10,0	10,0
Ac. nicotínico	0,50	1,0	0,50	1,0	1,0	1,0
Piridoxina	0,50	1,0	0,50	1,0	1,0	1,0
Biotina	-	2,0	-	-	-	-
Myo-inositol	100	100	100	100	100	100

(*) Ingredientes que han sido modificados respecto a las recetas originales. (MS): Murashige y Skoog, 1962. (GD): Gresshoff y Doy, 1972. (WPM) Lloyd y McCown, 1980. (GB) Gamborg *et al.* 1968

Los medios de cultivo fueron suplementados con 30 g/L de sacarosa como fuente de carbono, 125 mg/L de carbón activo y, 5,5 g/L de Plant-Agar

(Duchefa). El pH se ajustó en 5.75 antes de autoclavar, proceso llevado a cabo durante 20 minutos a 121°C.

Para los segmentos nodales de encina, se compararon los 7 medios de cultivo descritos en la tabla 3.2, empleando 459 segmentos nodales de las estacas de 33 individuos adultos, así como 62 segmentos nodales obtenidos de 25 plántulas juveniles.

Para los de alcornoque, se compararon los medios GD y MS en una prueba preliminar, utilizando 183 segmentos nodales obtenidos en las estacas de los seis individuos adultos utilizados en la primera prueba de inducción, dispuestos de forma equitativa en ambos medios con respecto a cada individuo. Una vez seleccionado el mejor medio de la prueba preliminar para alcornoque, se realizó la implantación de segmentos nodales de 34 individuos adultos y, de 41 plántulas juveniles.

En todos los casos, los explantes se mantuvieron en una cámara de cultivo con una temperatura de 24 a 26°C, un fotoperiodo de 16h de luz/8h de oscuridad y, una intensidad de 6Wm⁻².

3.1.2.5. Análisis de los datos de inducción de yemas laterales e implantación *in vitro*.

Los resultados tanto en encina como en alcornoque, fueron analizados por separado para cada especie.

El efecto de los factores tratamiento de inducción e individuo en el primer apartado, así como el del periodo de recogida en el segundo apartado, en la inducción de estacas de material adulto, se compararon mediante análisis de varianza según el modelo ANOVA de un factor,

$$\chi_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij}$$

donde μ_i es la media para cada uno de los niveles del factor y , equivale a la media muestral más el efecto debido al factor ($\mu + T_{ij}$) y, ϵ es el posible error experimental de cada observación. El análisis fue realizado a través del programa estadístico SPSS 15.0. Para ello, se utilizaron como variables dependientes los datos recogidos semanalmente de los siguientes parámetros:

- **“Tiempo de aparición de las primeras yemas”**, entendido éste 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 la primera yema hasta que las estacas dejan de producir;
- **“Máximo número de yemas producidas”**, es el número máximo de yemas por cada 100 cm de estacas de cada individuo, en el momento de recuento;
- **“Total de brotes cortados”**, es el número total de brotes que han alcanzado un tamaño suficiente (1,5cm aproximadamente) para su uso en la implantación *in vitro*.
- **“Tamaño relativo de los brotes”**: cuando los brotes producidos por las estacas han sido suficientemente grandes, se han dividido en 2 ó más segmentos nodales aptos para la implantación. Por tanto, este parámetro se refiere al número de segmentos nodales que se han implantado por cada brote producido, siguiendo la siguiente escala: 0, si no se ha obtenido ningún segmento nodal apto para su implantación; 1, si al menos se ha obtenido 1 segmento nodal; 2, cuando de un brote se han obtenido dos segmentos nodales y, así sucesivamente.

El promedio de brotes obtenidos con respecto al origen en la inducción de material juvenil, se analizó mediante análisis de varianza siguiendo también un modelo ANOVA unifactorial.

Los resultados de implantación *in vitro* de encina se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA de dos factores realizado con SPSS), en función de los factores fijos “medio de cultivo” y “tipo de material de partida” (adulto/juvenil), así como la interacción entre ambos. Como variable dependiente, se empleó el porcentaje de supervivencia de los “brotes implantados no contaminados” (número de brotes vivos o no necrosados, respecto al total de brotes implantados no contaminados).

$$\chi_{ij} = \mu + T_i + \Gamma_j + I_{ij} + \varepsilon_{ij},$$

donde μ es la media muestral, T es el efecto debido al medio de cultivo, Γ es el efecto debido al tipo de material de partida (adulto/juvenil), I es el efecto debido a la interacción entre ambos factores y, ε es el error experimental en cada observación. El análisis estadístico fue realizado a través del programa estadístico SPSS.

En la prueba preliminar de implantación de segmentos nodales de alcornoque, analizada mediante ANOVA de un factor, tan solo se tuvo en cuenta el “medio de cultivo” como factor fijo, empleando los porcentajes de supervivencia de los “brotes implantados no contaminados” como variable dependiente.

Para el resto de brotes de alcornoque implantados, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA de un factor, en función de los factores fijos “periodo de recogida” (en el caso del material adulto) o “origen” (en el caso del material juvenil), así como el “tipo de material de partida” (adulto/juvenil). En este caso, se utilizaron como variables dependientes, tanto el porcentaje de contaminación de los “brotes implantados”, como el porcentaje de supervivencia de los “brotes implantados no contaminados”.

3.1.3. Multiplicación *in vitro* de segmentos nodales.

La fase de multiplicación se describe únicamente para los clones de alcornoque que fueron implantados con éxito en la fase anterior. En esta fase se comparó tanto el efecto conjunto de la formulación de sales minerales y la combinación de hormonas, como el efecto de la relación auxinas/citoquininas.

Tabla 3.3. Combinación de sales minerales y hormonas de los medios de cultivo utilizados para la fase de multiplicación de segmentos nodales de *Q. suber* y, los clones empleados con cada uno de ellos.

Medio de cultivo	Sales minerales	Citoquininas (mg/L)	Auxinas (mg/L)	Clones empleados
GD0,8	GD	0,5 (6-BAP ³)	0,2 (ANA) + 0,2 (AIB)	AHj-100; VCA-2; BAA-24; BAA-6, CoA-49; SALG-297
GD6,6	GD	0,3 (6-BAP)	2,0 (AIB)	AHj-103; ALMA-23; VCA-2; BVA-2; BAA-13; BAA-24; BAA-25; BAA-26; CoA-4;
MS0,8	MS	0,5 (6-BAP)	0,2 (ANA) + 0,2 (AIB)	AHj-100; AHj-102; AHj-103; ALMA-21; ALMA-23; BVA-2; BVA-3; BVA-4; BVA-5; NIA-2; NIA-6; NIA-7; TRA-1; TRA-12; TRA-14; TRA-15; TRA-2; TRA-4; VCA-2
MS1	MS	0,3 (6-BAP)	0,3 (AIB)	AHj-100; AHj-102; AHj-103; AHj-104; ALMA-21; ALMA-23; BVA-2; TRA-1; TRA-12; TRA-14; TRA-15; TRA-2; TRA-4; VCA-2
MS6,6	MS	0,3 (6-BAP)	2,0 (AIB)	AHj-103; ALMA-23; BVA-2; TRA-1; VCA-2, BAA-13; BAA-24; BAA-25; BAA-26; BAA-27; BAA-28; CoA-4; CoA-49; CoA-5; CoA-8; CoA-9; HEE-6; SAA-361; SALG-296; SALG-297; SALG-307; SBA-326
MS2	MS	1,0 (6-BAP)	2,0 (AIB)	ALMA-23; BVA-2; TRA-1; BAA-26; CoA-4; CoA-9; SAA-361; SALG-307
MS4	MS	1,0 (6-BAP)	4,0 (AIB)	BAA-24; BAA-25; BAA-26; BAA-27; CoA-4; CoA-49; CoA-5; CoA-9; HEE-6; SAA-361; SALG-296; SALG-297; SBA-326

GD, sales minerales de Gresshoff and Doy; MS; sales minerales de Murashige y Skoog; 6-BAP: 6-bencilaminopurina (Sigma B3408) ; ANA: Acido naftalen-acético (Sigma N0640); AIB : Acido indol-butírico (Sigma I5386)

Para ello se utilizaron los medios de cultivo descritos en la tabla 3.3, preparados en envases de vidrio de 150ml de capacidad, con 30ml de medio de cultivo en cada uno, en los que se cultivaron de 5 a 7 explantes por cada recipiente. En todos los casos, a estos medios se les añadió 30 g/L de sacarosa y

6 g/L de agar (Plant agar [Duchefa]). El pH se ajustó en 5,75 antes de ser autoclavados a 121°C durante 20 minutos.

El cambio a medio fresco (o subcultivo), se realizó cada tres semanas y fue llevado a cabo en cabina de flujo laminar. Los explantes se mantuvieron en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16h de luz / 8h de oscuridad, una intensidad lumínica de 6Wm⁻² y, una temperatura de entre 24 y 26 °C.

3.1.3.1. Efecto de las sales minerales y de la combinación hormonal.

Se comparó el efecto de dos formulaciones diferentes de sales minerales ampliamente utilizadas para micropropagación de *Quercus spp.* (GD y MS), así como el de dos combinaciones diferentes de hormonas (0,8 y 6,6 – ver tabla 3.3), las cuales se diferencian tanto en las auxinas empleadas como en la relación auxinas/citoquininas. En los cuatro medios resultantes, se utilizaron los explantes de los clones descritos en la tabla 3.3.

3.1.3.2. Efecto de la relación auxinas/citoquininas.

Seleccionadas las sales minerales con mejores resultados del ensayo anterior, se comparó el efecto de la relación entre auxinas y citoquininas de cinco medios de cultivo (MS0,8, MS1, MS2, MS4 y MS6,6), empleando para ello, los explantes de los clones descritos en la tabla 3.3.

3.1.3.3. Análisis de los datos de multiplicación.

Los resultados de multiplicación fueron recogidos tras los sucesivos subcultivos realizados cada tres semanas. Estos se analizaron mediante

ANOVA de dos factores (en el caso del apartado 3.1.3.1), en función de las “sales minerales” y la “combinación de hormonas” como factores fijos, o bien, mediante ANOVA de un factor (en el caso del apartado 3.1.3.2), en función de la “relación auxinas/citoquininas” como factor fijo. En ambos casos, se utilizó el test de Tukey para identificar los niveles significativamente diferentes dentro de cada factor. El análisis se llevó a cabo con el programa estadístico SPSS, empleando los parámetros “**tasa media de multiplicación**” (proporción de explantes obtenidos respecto a los iniciales en cada subcultivo) y “**porcentaje de mortalidad**” (proporción de explantes muertos en cada subcultivo, respecto a los inicialmente sembrados) como variables dependientes. En los resultado también se muestra la “**tasa máxima de multiplicación**” (tasa de multiplicación más alta obtenida por cada clon y medio de cultivo), simplemente como datos ilustrativos.

3.1.4. Enraizamiento de explantes *in vitro*.

Se compararon el efecto de la concentración de auxinas, la duración del tratamiento de rizogénesis, el tratamiento previo en medio libre de hormonas antes de inducir la rizogénesis y, el tratamiento en oscuridad constante durante los 7 primeros días de la inducción de la rizogénesis, sobre la capacidad de enraizamiento y la incidencia de necrosis apical.

Para ello, se utilizaron segmentos nodales de *Q. suber* procedentes de la fase de multiplicación, con una longitud de tallo de 2cm, cultivados en recipientes de vidrio de 150ml, conteniendo 30ml aproximadamente del medio de cultivo. Este, consistió en las sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (tabla 3.2), con los macronutrientes reducidos a la mitad de su concentración original, suplementados con sacarosa (40 g/L) y, gelificados con Plant Agar de Duchefa (6 g/L). El pH fue ajustado en 5,75 antes de autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Las plántulas fueron incubadas en cámara de cultivo

con un fotoperiodo de 16/8h (día/noche), temperatura de 24 a 26°C y, una intensidad de 6 Wm⁻².

3.1.4.1. Efecto de la concentración de auxina sobre la capacidad de enraizamiento y la incidencia de necrosis apical

Se han empleado 6 clones (BAA-24, BAA-26, CoA-47, CoA-9, HEE-6 y Salg-296), tomando al menos 15 explantes de cada clon y por cada medio de cultivo, para comparar el efecto de la concentración de auxinas en medios de cultivo suplementados con 3, 4 y 5 mg/L de ácido 3-indol-butírico (MSR3, MSR4 y MSR5 respectivamente), poniendo entre 1 y 4 explantes en cada recipiente con su medio de cultivo correspondiente y, recogiendo los resultados durante los 30 días siguientes.

3.1.4.2. Efecto de la duración del tratamiento con auxinas sobre la capacidad de enraizamiento y la incidencia de necrosis apical.

Se han empleado 5 clones (BAA-24, BAA-26, CoA-47, CoA-9 y HEE-6), tomando 15 o más explantes de cada uno, siendo sometidos a dos tratamientos: a) inmersión temporal o “*dipping*” de la base de los explantes durante 30 segundos en una solución concentrada de AIB (10 mg/L) siguiendo la metodología descrita por Manzanera y Pardos (1990); b), cultivo en el medio MSR4 (con 4 mg/L de AIB) durante 7, 15 ó 30 días. Los explantes tratados durante 7 ó 15 días en el medio MSR4, así como aquellos procedentes de “*dipping*”, fueron transferidos a un medio de cultivo libre de hormonas (MSRsh), una vez transcurrido el tratamiento, hasta los 30 días que duró la prueba.

3.1.4.3. Efecto del tratamiento previo en medio libre de hormonas sobre el enraizamiento en medios suplementados con auxinas

Se ha comparado el efecto del tratamiento de los explantes en medios libres de hormonas como paso previo a la inducción de la rizogénesis, respecto a la inducción de la misma directamente en medios de cultivo con auxinas. Para ello, se han empleado 166 explantes de 6 clones (BAA-24, BAA-26, CoA-47, HEE-6, Salg-296 y SBA-326), de manera que la mitad de los explantes de cada clon, han estado durante los 7 primeros días en medio de cultivo libre de hormonas (MSRsh), tras los cuales, fueron transferidos al medio MSR5 (con 5 mg/L de AIB), mientras que la otra mitad de los explantes fue cultivada directamente en el medio MSR5, hasta completar un periodo de inducción de 30 días totales en ambos casos, siempre en las mismas condiciones ambientales preestablecidas en la cámara de cultivo.

3.1.4.4. Efecto del tratamiento previo en oscuridad sobre el enraizamiento en medios suplementados con auxinas

Para comparar el efecto de la oscuridad en la inducción de la rizogénesis, se emplearon 194 explantes de 5 clones (BAA-26, CoA-47, CoA-9, HEE-6 y Salg-296), a los cuales se les indujo la rizogénesis en el medio MSR5 (con 5 mg/L de AIB). Una parte de los explantes fue sometida directamente a las condiciones ambientales preestablecidas de la cámara de cultivo, es decir, fotoperiodo de 16h de luz y 24°C de temperatura. Mientras que la parte restante, fue cubierta con una bolsa de polietileno negro para someterlos a condiciones de oscuridad durante los primeros 7 días de inducción de la rizogénesis, tras los cuales, se retiró la misma y se mantuvieron en las mismas condiciones de luz que el resto de explantes, hasta los 30 días en total, que duró la prueba para ambos tratamientos.

3.1.4.5. Análisis de los datos de enraizamiento

En los cuatro ensayos, el análisis de los datos obtenidos se realizó mediante ANOVA de dos factores, en función del “clon”, el “tratamiento” y la interacción entre ambas variables. El análisis de varianza fue acompañado del test de Tukey, ambos realizados con el programa estadístico SPSS, empleando los porcentajes de los siguientes parámetros como variables dependientes: “total de brotes enraizados”, “brotes enraizados viables” (sin necrosis apical) y, “brotes no enraizados” (con y sin necrosis apical).

3.2. RESULTADOS DE MICROPROPAGACIÓN EN *Q. ILEX*

3.2.1. Inducción de yemas laterales.

3.2.1.1. Efecto del tratamiento en frío y del régimen de temperatura en la inducción de yemas laterales de estacas de *Q. ilex*.

El análisis estadístico de los resultados reveló un efecto significativo del factor “tratamiento de inducción” sobre las variables dependientes “máximo número de yemas producidas” ($p < 0,004$) y “tiempo de producción de yemas” ($p < 0,008$), donde el tratamiento “cámara” (Cam) aportó los mejores resultados en ambos casos, seguido del tratamiento “frío-umbráculo” (F-Umb). También el promedio de “brotes cortados por día de producción de yemas” y el “tamaño relativo de los brotes cortados”, se vio influenciado por el tratamiento de inducción ($p < 0,039$ y $p < 0,012$ respectivamente). Para estos dos parámetros, el mejor tratamiento fue el F-Umb, seguido del tratamiento Cam con resultados muy próximos (tabla 3.4).

Los peores resultados mostrados por las estacas fueron con el tratamiento “frío-cámara” (F-Cam), donde destaca que en tres de los seis individuos testados (Evi-0, Evi-2 y Evi-3), no se llegó a observar desarrollo de yemas y, en otro de los tres restantes (Evi-1), las yemas desarrolladas no llegaron a producir brotes aptos para la implantación *in vitro*. Este tratamiento, presentó “tiempos de aparición de las primeras yemas” significativamente superiores a los otros dos tratamientos ($p < 0,044$), mientras que el “tiempo de producción de yemas” fue significativamente inferior ($p < 0,008$).

Esta prueba no reveló diferencias significativas respecto al factor individuo, salvo para el caso del parámetro “tiempo de producción de yemas” ($p < 0,001$), en el que destacó el individuo Evi-4 con valores entre 46 y 68 días, en función del tratamiento (tabla 3.4). No obstante, esa diferencia no guardó

ninguna correlación con el aspecto externo de los árboles de los que se obtuvieron las estacas, ya que 5 de ellos presentaban un aspecto vigoroso, con buen espesor de copa, mientras que solo el Evi-0,1 correspondía a un árbol afectado con varias ramas secas y bajo espesor de copa.

Tabla 3.4. Inducción de la brotación en estacas de *Q. ilex* en función del tratamiento.

Individuo	Trat. de induc.*	Tiempo de aparición de las 1 ^{as} yemas (días)	Máximo número de yemas producidas	Tiempo de producción de yemas (días)	Total de brotes cortados	Brotes cortados por día	Total de brotes implantados	Tamaño relativo de los brotes cortados
Evi-0,1	Cam	25	5	35	5	0,14	7	1,40
	F-Cam	36	2	18	2	0,11	2	1,00
	F-Umb	15	4	18	2	0,11	2	1,00
Evi-0	Cam	25	6	22	0	0,00	0	0
	F-Cam	-	0	-	0	0	0	0
	F-Umb	15	2	18	1	0,06	1	1,00
Evi-1	Cam	18	25	49	21	0,43	27	1,29
	F-Cam	47	1	5	0	0,00	0	0
	F-Umb	15	20	25	5	0,20	5	1,00
Evi-2	Cam	18	21	35	7	0,20	7	1,00
	F-Cam	-	0	-	0	0	0	0
	F-Umb	15	11	32	11	0,34	12	1,09
Evi-3	Cam	18	21	21	9	0,43	11	1,22
	F-Cam	-	0	-	0	0	0	0
	F-Umb	27	3	6	2	0,33	2	1,00
Evi-4	Cam	13	15	68	2	0,03	2	1,00
	F-Cam	15	2	46	2	0,04	2	1,00
	F-Umb	15	18	68	18	0,26	25	1,39
Promedio ± Error típico	Cam	19,5 ± 1,91 ^a	15,5 ± 3,42 ^a	38,3 ± 7,26 ^a	7,33 ± 3,04 ^a	0,21 ± 0,07 ^a	9,0 ± 3,94 ^a	0,99 ± 0,21 ^a
	F-Cam	32,7 ± 9,39 ^b	0,83 ± 0,40 ^{a,b}	23,0 ± 12,1 ^b	0,67 ± 0,42 ^a	0,03 ± 0,02 ^b	0,67 ± 0,42 ^a	0,33 ± 0,21 ^b
	F-Umb	17,0 ± 2,0 ^a	9,67 ± 3,23 ^b	27,8 ± 8,77 ^{a,b}	6,50 ± 2,74 ^a	0,22 ± 0,05 ^a	7,83 ± 3,81 ^a	1,08 ± 0,06 ^a
Nivel de signific. respecto al tratamiento**		0,044	0,004	0,008	0,166	0,039	0,215	0,012

(*) Cam= inducción en cámara; F-Cam= pre-tratamiento frío + inducción en cámara; F-Umb= pre-tratamiento frío + inducción en umbráculo. (**) Letras diferentes indican diferencias significativas mediante ANOVA unifactorial, $\alpha < 0,05$.

3.2.1.2. Efecto del periodo de recogida en la inducción de yemas laterales en estacas de *Q. ilex*.

Habiendo seleccionado el tratamiento Cam de la prueba anterior como el más idóneo para encina y, con las modificaciones indicadas en la metodología, se indujo la brotación en estacas de 36 individuos, obteniendo que el 100 % de las estacas, produjeron yemas y, en 27 de ellos, las yemas lograron producir segmentos nodales aptos para su implantación *in vitro*, lo que representa un 75% de individuos brotados. En todos los periodos de recogida, se lograron obtener segmentos nodales aptos para su implantación.

Tabla 3.5. Inducción de estacas de *Q. ilex* respecto al periodo de recogida y significación del análisis de varianza realizado con ANOVA unifactorial ($\alpha < 0,05$).

	Tiempo de aparición de las 1 ^{as} yemas (días)	Máximo número de yemas prod.	Tiempo de producción de yemas(días)	Total de brotes cortados	Brotes cortados por día	Total de brotes implant.	Tamaño relativo de los brotes
Promedio \pm error típico	13,70 \pm 1,31	22,53 \pm 2,85	32,24 \pm 3,27	8,50 \pm 1,54	0,34 \pm 0,07	9,32 \pm 1,73	1,07 \pm 0,02
Nivel de significación	0,014	0,134	0,014	0,590	0,286	0,596	0,392

*Resultados referidos a los valores obtenidos para cada parámetro en 100cm de longitud de las estacas de cada individuo.

El análisis de varianza de los resultados, reveló un efecto significativo del periodo de recogida sobre los parámetros “tiempo de aparición de las primeras yemas” ($p < 0,014$). Los promedios son muy similares en casi todos los periodos de recogida (figura 8), oscilando entre los 10 y los 14 días, salvo por el mes de marzo (26 días), en el que el promedio es significativamente superior por el valor atípico del tiempo que tardaron en aparecer las yemas de las estacas del individuo VCE-3 (54 días).

El análisis también reveló un efecto significativo del “tiempo de producción de yemas” ($p < 0,014$), diferenciando entre dos grupos de periodos, los formados por el mes de febrero, marzo y abril sin diferencias significativas

entre ellos y, el formado por los meses de noviembre y mayo, con resultados visiblemente inferiores a los otros tres periodos de recogida.

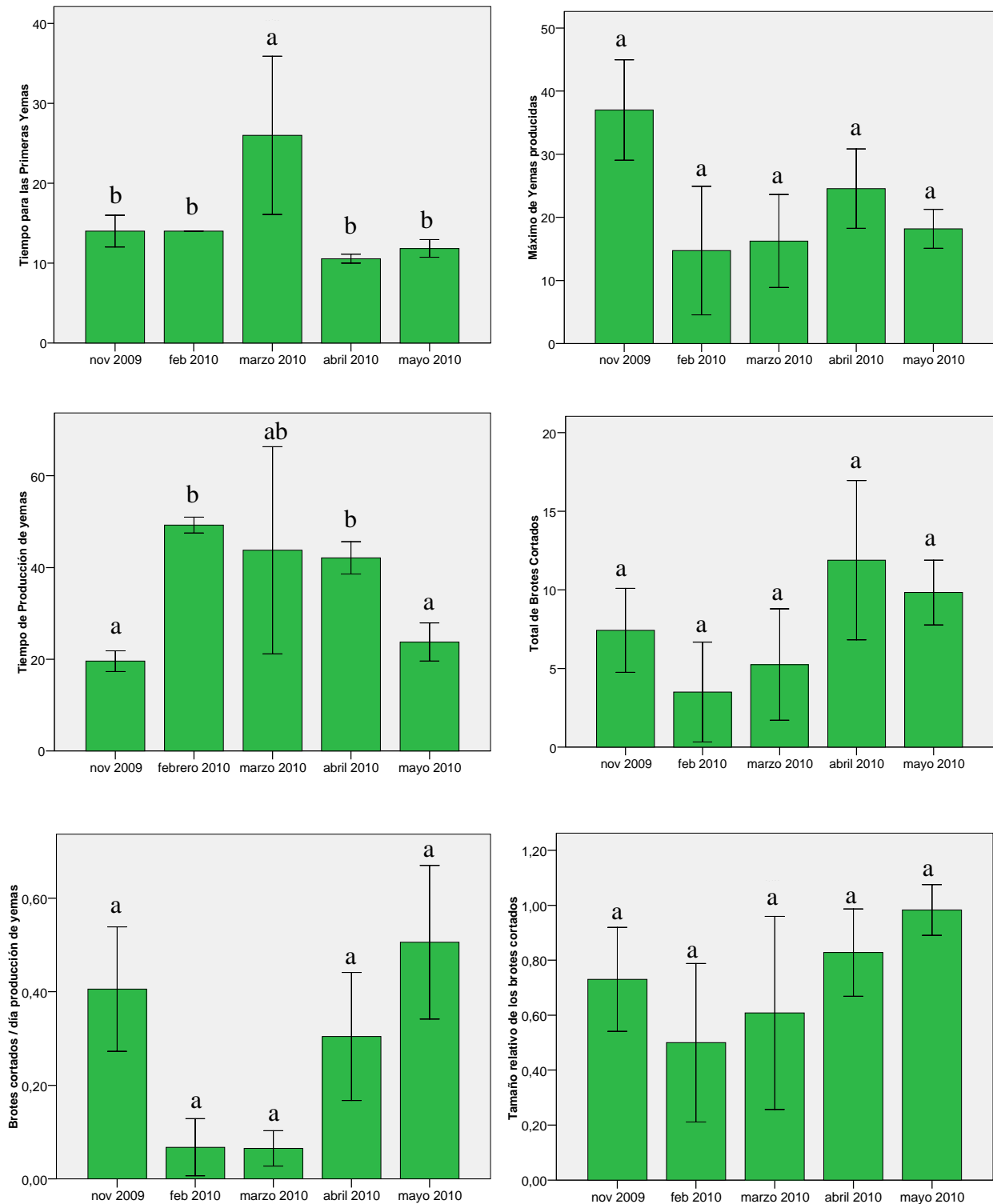


Figura 8. Promedios de los parámetros medidos en la inducción de yemas en estacas de encina, respecto al periodo de recogida. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

Para los parámetros “total de brotes cortados”, “brotes cortados por día” y “tamaño relativo de los brotes implantados”, el análisis no mostró diferencias significativas entre los periodos de recogida, aunque los promedios han sido más elevados en los meses de noviembre, abril y mayo, coincidiendo con los meses más cálidos de los comparados en esta prueba. Por otro lado, también se observó, que el promedio global para cada uno de los parámetros medidos, mejoró con respecto a los que ofreció el tratamiento de inducción Cam en la prueba anterior con las estacas de El Villar, que fueron recogidas durante el mes de junio de 2009 (tabla 3.4) e, inducidas en condiciones de temperatura diferentes (25°C con luz/15°C en oscuridad, frente a 28°C con luz/24°C en oscuridad establecidos para la presente prueba).

3.2.1.3. Inducción de la brotación en plántulas juveniles de *Q. ilex*.

Se obtuvieron brotes en 25 de las 36 plántulas inducidas, lo que representa el 68,57% de los individuos (tabla 3.6). Todas las plántulas inducidas de las localidades de Campofrío, Las Herrerías y Puebla de Guzmán, generaron brotes para la implantación. En el resto, el promedio varía desde el 40% presentado por las plántulas de Cortes de la Frontera, hasta el 71% de las de Paymogo, o el 67% de las de Zalamea la Real.

Los promedios globales de brotes obtenidos en función del origen, no presentaron diferencias significativas, variando desde los 1,5 brotes/planta de Huerto Ramírez, a los 4,0 brotes/planta de Cortes de la Frontera, siendo el promedio global de 2.5 brotes/planta.

En 15 de los 25 individuos brotados, solo se produjeron 1 ó 2 brotes. Destaca el CPE-7-(3) con 6 brotes producidos, así como el COE-31-(13), HEE-11-(18), PGE-6-(10) y ZRE-9-(6), con 5 brotes producidos cada uno, durante el periodo de inducción.

Tabla 3.6. Inducción de la brotación en plantas juveniles de *Q. ilex* bajo condiciones de cámara de cultivo.

Origen	Nº individuos inducidos	Nº Individuos brotados	Individuo	Brotos implantados*	Promedio y error típico por localidad**
Cortes de la Ftra.	5	2	COE-7-(13)	3	4,0 ± 1,0 ^a
			COE-31-(13)	5	
Campofrío	4	4	CPE-5-(13)	1	2,75 ± 1,11 ^a
			CPE-7-(3)	6	
			CPE-10-(6)	2	
			CPE-10-(13)	2	
Las Herrerías	3	3	HEE-2-(3)	1	2,33 ± 1,33 ^a
			HEE-10-(6)	1	
			HEE-11-(18)	5	
Huerto Ramírez	8	4	HRE-11-(18)	3	1,5 ± 0,5 ^a
			HRE-13-(10)	1	
			HRE-14-(10)	1	
			HRE-15-(10)	1	
Paymogo	7	5	PAYE-3-(13)	2	2,0 ± 0,55 ^a
			PAYE-5-(13)	2	
			PAYE-9-(3)	1	
			PAYE-9-(13)	1	
Puebla de Guzmán	3	3	PAYE10-(18)	4	3,0 ± 1,16 ^a
			PGE-4-(10)	1	
			PGE-6-(6)	3	
Zalamea la Real	6	4	PGE-6-(10)	5	2,75 ± 0,85 ^a
			ZRE-7-(18)	3	
			ZRE-8-(13)	1	
			ZRE-9-(6)	5	
			ZRE-12-(18)	2	
Totales	36	25		62	2,5 ± 0,33

(*) **Brotos implantados**: son los brotes que se desarrollaron hasta producir segmentos nodales aptos para su implantación *in vitro*. (**) Letras diferentes indican diferencias significativas mediante ANOVA de un factor ($\alpha < 0,05$).

3.2.1.4. Efecto del medio de cultivo y del tipo de material de partida en la implantación *in vitro* de segmentos nodales de *Q. ilex*.

De un total de 459 brotes implantados de material adulto, se contaminaron 176 (36,4% de los mismos), quedando 283 brotes libres de contaminantes. El análisis de varianza realizado respecto al medio de cultivo de esos 283 brotes de origen adulto (tabla 3.7), indicó un efecto significativo sobre

la supervivencia ($p < 0,046$), de modo que los medios de cultivo que aportaron los mejores promedios de supervivencia, fueron el GBSO, GBCa y MS (38,5%, 30,7% y 26,7% respectivamente), mientras que los peores fueron el GD y el WPM (6,5% y 10,3% respectivamente). En éstos últimos, los brotes sembrados de material adulto, produjeron gran cantidad de exudados que liberaban al medio de cultivo, desarrollando una rápida necrosis de los tejidos.

Tabla 3.7. Porcentajes de contaminación y supervivencia en la implantación de brotes de *Q. ilex* respecto al medio de cultivo y el tipo de material de partida.

Brotos de individuos adultos*				
Total de brotes implantados	Contaminados	Medio de cultivo*	Implantados no contaminados	% Supervivencia
445	176 (36,4 %)	MS	30	26,7 ± 4,0 ^{b,c}
		GD	31	6,5 ± 3,9 ^a
		WPM	117	10,3 ± 2,0 ^a
		GB5	79	17,7 ± 2,5 ^b
		GBCa	13	30,7 ± 6,1 ^c
		GBSO	13	38,5 ± 6,1 ^c
			283	15,9 ± 1,2 ^(a)
Brotos de individuos juveniles*				
Total de brotes implantados	Contaminados	Medio de cultivo	Implantados no contaminados	% Supervivencia
62	4 (6,5 %)	GBCa	28	78,6 ± 6,1 ^a
		GBSO	23	69,6 ± 8,0 ^a
		WPM	7	28,6 ± 18,4 ^b
			58	69,0 ± 5,2 ^(b)

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas mediante ANOVA de dos factores, ($\alpha < 0,05$).

(**) **MS**, Murashige y Skoog; **GD**, Gresshoff y Doy; **WPM**, woody plant médium; **GB5**, Gamborg con vitaminas B5; **GBCa**, Gamborg con 500mg/L de Ca(NO₃); **GBSO**, Gamborg con 500mg/L de (NH₄)₂SO₄

Los porcentajes más bajos de contaminación se registraron para los brotes de las estacas de Niebla (14,3%) y Alosno (17,3%), que fueron recogidas en el mes de febrero y noviembre respectivamente, mientras que los más altos, se registraron para los brotes de aquellas estacas recogidas en el mes de abril y

mayo, que correspondieron a las de Santa Bárbara (39,83%), Zalamea la Real (40,23%) y el Villar (46,98%).

Por su parte, de los 62 brotes de material juvenil implantados, tan solo 4 se contaminaron, lo que representa el 6,5% de los mismos (tabla 3.7). A diferencia del material adulto, estos contaminados no se han comparado respecto al periodo de recogida, ya que las plántulas de las que procedían los brotes fueron germinadas todas en la misma época y en semejantes condiciones ambientales.

El resto de brotes no contaminados (58), presentaron porcentajes de supervivencia con diferencias significativas respecto al medio de cultivo utilizado ($p < 0,045$). En este caso, se observó que el mejor medio de cultivo fue el GBCa con un 78,6% de supervivencia, seguido del GBSO con un 69,6%, destacando ambos respecto al tercero, que fue el WPM con un 28,6%. En los medios GBCa y GBSO se obtuvieron también los mejores porcentajes de supervivencia por los brotes de origen adulto (30,7%), aunque estos porcentajes equivalían a la mitad de los obtenidos por los brotes de origen juvenil.

El promedio global de supervivencia en material adulto fue de casi un 16% (o un 38,5% en el mejor de los medios de cultivo probados), mientras que en caso del material juvenil, llegó al 69% (casi 79% en el mejor medio de cultivo probado), diferencias que resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Además, cuando se compararon los porcentajes de supervivencia de brotes de origen adulto y juvenil exclusivamente en los medios GBCa y GBSO, el análisis de varianza también indicó un efecto significativo en función del origen de los brotes ($p < 0,003$), siendo el material juvenil el que mejor se ha comportado. Pero el análisis no resulta significativo en función del medio de cultivo ($p < 0,955$) ni de la interacción entre ambos factores ($p < 0,479$).

Superada la fase de implantación, las siguientes pruebas llevadas a cabo no permitieron establecer líneas de micropropagación mediante las yemas axilares y apicales de los brotes supervivientes, ya que éstos no respondieron adecuadamente a los medios de cultivo para multiplicación. En estos últimos,

se lograron hinchar las yemas axilares, incluso, que formaran callo en la base del brote en contacto con el medio de cultivo (figura 9), pero a pesar de numerosos cambios a medio fresco, las yemas no lograron desarrollarse para formar nuevos brotes y, acababan necrosándose y muriendo definitivamente.

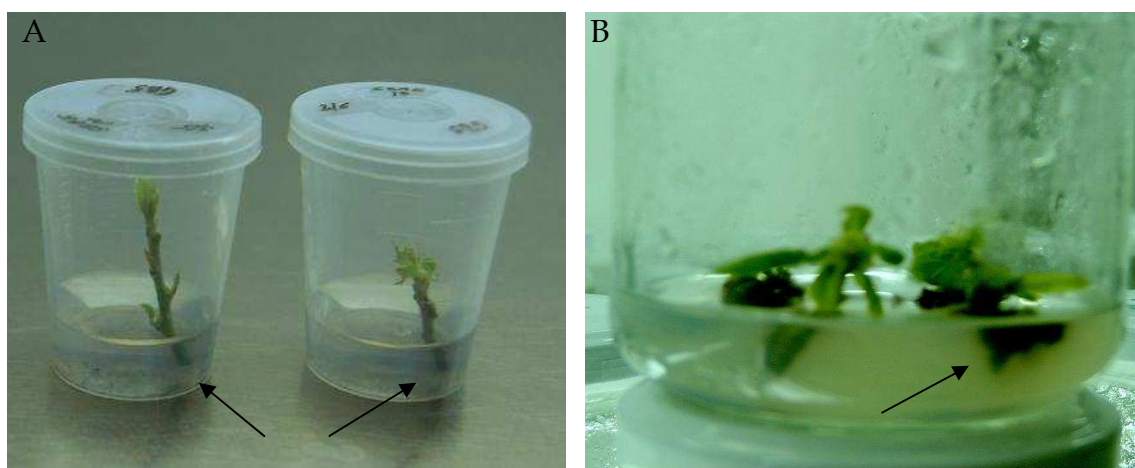


Figura 9. Brotes de encina en implantación (A) y en multiplicación (B). Las flechas indican zonas con exudados fenólicos.

3.3. RESULTADOS DE MICROPROPAGACIÓN EN *Q. SUBER*

3.3.1. Inducción de yemas laterales.

3.3.1.1. Efecto del tratamiento en frío y del régimen de temperatura en la inducción de yemas laterales de estacas de *Q. suber*.

El análisis estadístico mostró un efecto significativo del factor tratamiento de inducción sobre los parámetros “máximo número de yemas producidas” ($p < 0,049$), “tiempo de producción de yemas” ($p < 0,001$), “total de brotes cortados” ($p < 0,046$), “total de brotes implantados” ($p < 0,049$) y “tamaño relativo de los brotes” ($p < 0,012$), a partir de los resultados recogidos de las estacas de los 6 árboles utilizados en esta prueba (tabla 3.8). Ese efecto se vio reflejado entre los tratamientos que incluían un tratamiento previo en frío (F-Cam y F-Umb) y, el tratamiento de inducción sin tratamiento previo en frío (Cam), ya que entre los tratamientos F-Cam y F-Umb, no se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los parámetros medidos, así como tampoco se obtuvieron en función del factor individuo.

Por tanto, en los tratamientos F-Cam y F-Umb, se obtuvieron mejores resultados que para el tratamiento Cam. Además, se observó que en cuatro de los seis individuos testados, no se produjo ni un solo brote en las estacas sin tratamiento previo en frío y, en dos de esos cuatro individuos, ni siquiera se llegaron a visualizar yemas en crecimiento. En los promedios recogidos en la tabla 3.8, se observa que las estacas sometidas a tratamiento con frío, lograron cuadruplicar el “tiempo de producción de yemas”, respecto a las no tratadas previamente en frío.

Tabla 3.8. Inducción de la brotación en estacas de *Q. suber* en función del tratamiento.

Individuo	Trat. de induc.*	Tiempo de aparición primeras yemas (días)	Máximo número de yemas prod.	Tiempo de producción de yemas (días)	Total de brotes cortados	Brotes cortados por día	Total de brotes implant.	Tamaño relativo de los brotes
AAL-1	Cam	73	2	7	2	0,29	2	1,00
	F-Cam	19	7	21	18	0,86	32	1,78
	F-Umb	12	17	28	10	0,36	13	1,30
AAL-2	Cam	>90	0	-	0	0	0	0
	F-Cam	12	20	49	15	0,31	31	2,07
	F-Umb	19	7	35	7	0,20	11	1,57
AAL-3	Cam	24	6	14	0	0,00	0	0
	F-Cam	12	3	22	2	0,09	6	3,00
	F-Umb	12	6	22	0	0,00	0	0
AAL-4	Cam	19	13	19	0	0,00	0	0
	F-Cam	12	13	42	13	0,31	17	1,31
	F-Umb	12	7	28	4	0,14	9	2,25
AHj-100	Cam	>90	0	-	0	0	0	0
	F-Cam	12	10	21	2	0,10	2	1,00
	F-Umb	12	15	49	29	0,59	50	1,72
AHj-2	Cam	38	1	7	1	0,14	1	1,00
	F-Cam	19	12	28	4	0,14	5	1,25
	F-Umb	12	4	22	1	0,05	4	4,00
Promedio ± Error típico*	Cam	25,7 ± 11,2 ^a	3,7 ± 2,1 ^a	7,8 ± 3,1 ^a	0,5 ± 0,34 ^a	0,07 ± 0,05 ^a	0,50 ± 0,34 ^a	0,33 ± 0,21 ^a
	F-Cam	14,3 ± 1,5 ^a	10,8 ± 2,4 ^b	30,5 ± 5,0 ^b	9,0 ± 2,9 ^b	0,30 ± 0,12 ^a	15,50 ± 5,5 ^b	1,73 ± 0,3 ^b
	F-Umb	13,2 ± 1,2 ^a	9,3 ± 2,2 ^b	30,7 ± 4,2 ^b	8,5 ± 4,4 ^b	0,22 ± 0,09 ^a	14,50 ± 7,4 ^b	1,81 ± 0,54 ^b
Nivel de signific. respecto al tratamiento**		0,137	0,049	0,001	0,046	0,057	0,049	0,012

(*) Cam= inducción en cámara; F-Cam= pre-tratamiento frío + inducción en cámara; F-Umb= pre-tratamiento frío + inducción en umbráculo. (**) Letras diferentes indican diferencias significativas mediante ANOVA unifactorial, $\alpha < 0,05$.

3.3.1.2. Efecto del periodo de recogida en la inducción de yemas laterales en estacas de *Q. suber*.

Para comparar el efecto del periodo de recogida en la inducción de estacas de alcorcho, se seleccionó el tratamiento F-Cam de la prueba anterior

como el más idóneo, unido a modificaciones en las condiciones de temperatura ambiental, que pasaron a ser de 28°C con luz y 24°C en oscuridad. De los 48 individuos empleados, se obtuvieron yemas en 39 de ellos, lo que supone el 81,25% de los mismos. De esos 39 individuos, las yemas de 34 de ellos, produjeron segmentos nodales en todos los periodos de recogida ensayados, aptos para ser implantados *in vitro*, lo que representa el 71% respecto al total.

Tabla 3.9. Inducción de la brotación de estacas de *Q. suber* y significación del análisis estadístico realizado con ANOVA de un factor en función del periodo de recogida ($\alpha < 0,05$)

	Tiempo de aparición primeras yemas (días)	Máximo de yemas prod.	Tiempo de producción de yemas(días)	Total de brotes cortados	Brotes cortados por día	Total de brotes implant.	Tamaño relativo de los brotes
Promedio \pm error típico	14,0 \pm 1,7	16,3 \pm 2,0	32,6 \pm 1,9	12,9 \pm 2,8	0,5 \pm 0,1	18,8 \pm 4,6	1,35 \pm 0,07
Nivel de signific. respecto del Periodo de recogida	0,001	0,003	0,143	0,063	0,019	0,079	0,003

El análisis estadístico de los datos en función del periodo de recogida (tabla 3.9), permitió atribuir un efecto significativo de este factor sobre el “tiempo de aparición de las primeras yemas”, el “máximo de yemas producidas”, los “brotes cortados/día” y el “tamaño relativo de los brotes” ($p < 0,001$, $p < 0,003$, $p < 0,019$ y $p < 0,003$ respectivamente), de tal modo que, los mejores resultados los presentaron las estacas recogidas en los periodos de marzo y mayo, mientras que los peores, correspondieron a los promedios de las estacas recogidas en diciembre (figura 10).

El promedio de “tiempo de aparición de las primeras yemas” para las estacas recogidas en los meses de diciembre y febrero (invierno), triplicó al de las estacas recogidas en marzo y mayo (primavera). Sin embargo, el “tiempo de producción de yemas” se mantuvo estable entre los 30 y 35 días, a excepción de las estacas recogidas en el mes de diciembre, que presentaron un promedio muy inferior al resto de periodos. Además, cabe señalar que esta fecha presentó

mayor número de individuos en los que no se produjeron brotes ni yemas con respecto al resto de periodos de recogida.

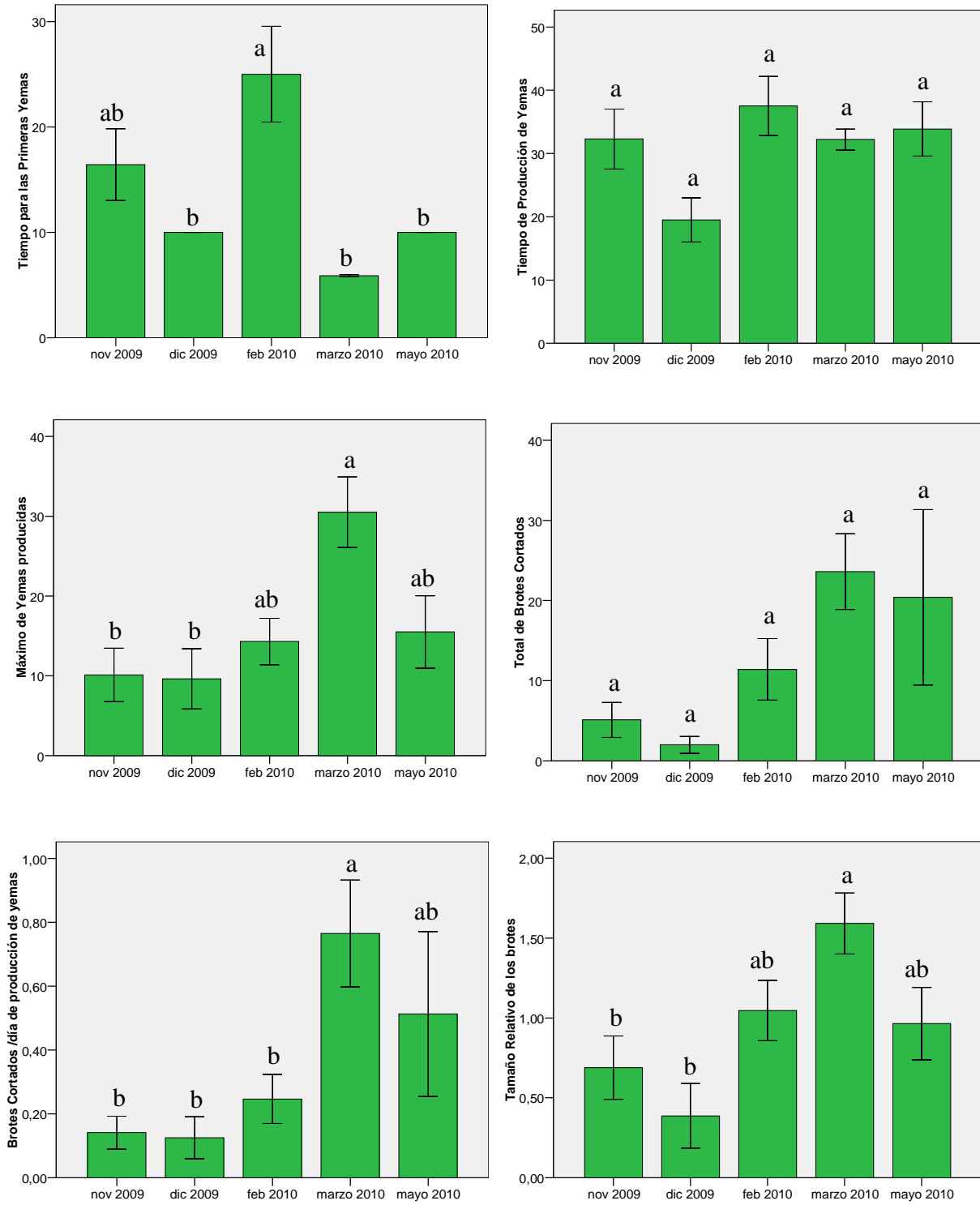


Figura 10. Promedios de los parámetros medidos en la inducción de yemas en estacas de *Q. suber*, respecto al periodo de recogida. Letras diferentes indican diferencias significativas mediante ANOVA de un factor ($\alpha < 0,05$).

Los parámetros “total de brotes cortados” y “total de brotes implantados”, presentaron una significación marginal, próxima al nivel de confianza considerado en el análisis. En ellos, también se ponen de manifiesto los mejores resultados de las estacas de marzo y mayo sobre las del resto de periodos.

Todos los promedios globales de esta prueba, mejoraron los promedios obtenidos para los mismos parámetros de la prueba anterior de tratamientos de inducción (correspondientes a estacas recogidas en junio de 2009 e inducida su brotación con diferente temperatura, 25°C con luz y 15°C en oscuridad), a excepción tan solo del “tamaño relativo de los brotes cortados”, que en esta prueba alcanzó un valor de 1,35, mientras que en la prueba del efecto de los tratamientos de inducción, alcanzó un valor de 1,73.

3.3.1.3. Inducción de la brotación en plantas juveniles de *Q. suber*.

De las 52 plantas juveniles trasplantadas y puestas en cámara de cultivo, se lograron obtener brotes en 41 de ellas, lo que representa el 78,82% de las plantas (tabla 3.10). En aquellas localidades con más de dos plántulas inducidas, los porcentajes de éxito en la brotación oscilaron entre el 76,5% de Cortes de la Frontera, hasta el 83,3% de Los Barrios, Alto Alentejo y Algarve.

El promedio global de brotes por planta fue de 4,98, el doble del resultado obtenido por las plántulas de encina. Estos promedios no presentaron diferencias significativas respecto al factor “localidad”. No obstante, los más altos fueron para Algarve (6,00) y Alto Alentejo portugués (5,60), mientras que los más bajos fueron para Cortes de la Frontera (4,60) y Los Barrios (4,77).

Tabla 3.10. Inducción la brotación en plantas juveniles de *Q. suber* en condiciones de cámara de cultivo.

Origen	Nº Individuos inducidos	Nº Individuos brotados	Individuo	Brotos implantados*	Promedio y error típico por localidad**
Los Barrios	18	15	BAA-3	1	4,60 ± 1,0 ^a
			BAA-6-(9)	7	
			BAA-6-(12)	8	
			BAA-7	8	
			BAA-9	1	
			BAA-13	4	
			BAA-24-(9)	2	
			BAA-24-(12)	5	
			BAA-25-(5)	2	
			BAA-25-(7)	1	
			BAA-25-(9)	16	
			BAA-26	8	
			BAA-27	1	
			BAA-28	3	
BAA-30	2				
Cast. Robl.	2	1	CRA-1	1	
Alto Alentejo	6	5	SAA-355	7	5,60 ± 1,73 ^a
			SAA-359	8	
			SAA-361-(5)	8	
			SAA-361-(7)	4	
			SAA-370	1	
Cortes de la Frontera	17	13	COA-2	2	4,77 ± 1,08 ^a
			COA-4	5	
			COA-5	5	
			COA-7	4	
			COA-8	5	
			COA-9	13	
			COA-43	2	
			COA-44	1	
			COA-45	4	
			COA-46	2	
			COA-47	10	
COA-49	5				
COA-50	4				
Las Herrerías	1	1	HEE-6-(7)	2	
Algarve	6	5	SALG-296-(7)	14	6,0 ± 1,73 ^a
			SALG-296-(9)	3	
			SALG-297-(5)	7	
			SALG-297-(9)	4	
			SALG-307	2	
Bajo Alentejo	2	1	SBA-326	12	
Totales	52	41		204	4,98 ± 0,57

(*) **Brotos implantados**: son los brotes que se desarrollaron hasta producir segmentos nodales aptos para su implantación *in vitro*. (**) Letras diferentes indican diferencias significativas mediante ANOVA ($\alpha < 0,05$).

Destacaron de entre todos, los individuos BAA-25-(9), CoA-9-(12), CoA-47-(9), Salg-296-(7) y SBA-326-(12), por su alta proporción de brotes producidos durante el periodo de inducción respecto al resto de individuos de sus respectivas familias.

3.3.1.4. Efecto del medio de cultivo en la implantación de segmentos nodales de *Q. suber*.

En la prueba preliminar de implantación de brotes de alcornoque, se obtuvieron semejantes porcentajes de supervivencia para los dos medios de cultivo empleados, GD y MS (tabla 3.11), situándose en torno al 75% en ambos casos, sin diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3.11. Porcentajes de contaminación y supervivencia en la implantación de brotes de *Q. suber* respecto al medio de cultivo.

Individuo	Nº Brotes implantados	% contaminados	Medio de cultivo*	Explantes muertos	Explantes supervivientes	% supervivencia
AAL-1	47	46,8	MS	5	9	64,3
			GD	4	7	63,6
AAL-2	42	35,7	MS	0	14	100
			GD	0	13	100
AAL-3	6	33,3	MS	1	1	50,0
			GD	0	2	100
AAL-4	26	11,5	MS	1	11	91,7
			GD	2	9	81,8
AHj-2	10	20,0	MS	0	4	100
			GD	1	3	75,0
AHj-100	52	26,9	MS	10	10	50,0
			GD	8	10	55,6
Totales	183	31,69 ± 4,21	MS	17	49	74,24 ± 9,81 ^a
			GD	15	44	74,58 ± 7,51 ^a

(*) MS, Murashige y Skoog; GD, Gresshoff y Doy;

(**) Letras diferentes indican diferencias significativas mediante ANOVA de un factor, ($\alpha < 0,05$).

No obstante, la siembra de los segmentos en el medio MS estuvo caracterizada por la aparición de exudados, fácilmente visibles por el oscurecimiento del medio en la zona adyacente a la base sumergida del segmento, que en algunos casos, originaron necrosis en los tejidos en contacto con el medio de cultivo. Sin embargo, la presencia de esos exudados no fue apreciada en aquellos segmentos sembrados en medio GD.

Otra diferencia entre ambos medios, fue la aparición de síntomas de hiperhidricidad en los brotes nuevos formados a partir de las yemas axilares de los segmentos nodales sembrados en MS, que sin embargo, no fueron observados en ninguno de los brotes formados a partir de los segmentos nodales sembrados en el medio GD.

3.3.1.5. Efecto del tipo de material de partida en la implantación de segmentos nodales de *Q. suber*.

Con los resultados de la prueba anterior, se escogió el medio GD para la implantación del resto de individuos adultos y juveniles seleccionados, cuyos resultados se resumen en la tabla 3.12. Así, de un total de 1105 brotes implantados, se contaminaron 300 (27,2% respecto al total implantados), siendo estadísticamente significativa ($p < 0,001$) la diferencia entre el porcentaje de contaminación del material adulto (29,9%) y juvenil (15,2%).

Para el material de origen adulto, las diferencias entre periodos de recogida respecto a la contaminación resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,015$), de manera que los mayores porcentajes de contaminación se obtuvieron en las estacas recogidas en febrero (42,2%), mientras que los más bajos correspondieron a las estacas recogidas en mayo (17,8%).

En el caso del material de origen juvenil, todas las plántulas procedían de germinación en invernadero en una misma época y condiciones de cultivo, por lo que las diferencias en cuanto a los porcentajes de contaminación, no serían comparables respecto al periodo de recogida. No obstante, el análisis

estadístico tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas respecto al origen de las semillas de las que germinaron.

Tabla 3.12. Porcentajes de contaminación y supervivencia en la implantación de brotes de *Q. suber* respecto al periodo de recogida (para material adulto) o el origen de la recogida (para material juvenil) y el tipo de material de partida.

Brotos de individuos adultos*					
Período de recogida	Nº Implantados	% Contaminados	Nº Implantados no contaminados	Nº explantes supervivientes	% Supervivencia
Nov '09	58	32,8 ± 13,3 ^{a,b}	39	34	87,2 ± 10,7 ^{a,b}
Dic '09	18	33,3 ± 16,8 ^{a,b}	12	12	100 ± 0,0 ^a
Feb '10	161	42,2 ± 11,4 ^a	93	56	60,2 ± 12,4 ^b
Marzo '10	344	34,6 ± 6,8 ^{a,b}	225	147	65,3 ± 7,5 ^b
Mayo '10	320	17,8 ± 5,4 ^b	263	128	48,7 ± 12,8 ^b
Totales	901	29,9 ± 4,7 ^(a)	632	377	59,7 ± 5,2 ^(a)

Brotos de individuos juveniles*					
Origen	Nº Implantados	% Contaminados	Nº Implantados no contaminados	Nº explantes supervivientes	% Supervivencia
Los Barrios	69	11,6 ± 7,3 ^a	61	40	65,6 ± 9,4 ^a
Cortes de la Ftra.	62	16,1 ± 6,1 ^a	52	31	59,6 ± 8,8 ^a
Alto Alentejo	28	14,3 ± 7,3 ^a	24	18	75 ± 13,8 ^a
Algarve	30	30,0 ± 8,8 ^a	21	15	71,4 ± 14,6 ^a
Castaño del Robledo	1	0 ± 0,0	1	1	100 ± 0,0 ^a
Las Herrerías	2	0 ± 0,0	2	2	100 ± 0,0 ^a
Bajo Alentejo	12	0 ± 0,0	12	6	50 ± 0,0 ^a
Totales	204	15,2 ± 3,8 ^(b)	173	113	65,3 ± 5,3 ^(a)

Datos de contaminación y supervivencia de brotes implantados en medio GD libre de hormonas, analizados mediante ANOVA de un factor en función del periodo de recogida (si es material adulto) o el origen (si es material juvenil). Los resultados globales de ambos parámetros (casillas sombreadas) se comparan en función del tipo de material de partida. (*) Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

Los porcentajes de supervivencia respecto al tipo de material de partida, no resultaron estadísticamente significativas y, oscilaron entre el 59,7% obtenido por el material adulto y, el 65,3% del material juvenil. En el caso de los brotes procedentes de las estacas de material adulto, el porcentaje de

supervivencia resultó estadísticamente significativo respecto al periodo de recogida ($p < 0,029$). Este porcentaje osciló entre el 48,7% de las estacas recogidas en mayo y, el 100% de las estacas recogidas en diciembre. Para los brotes procedentes de material juvenil, descartando aquellas localidades representadas por un solo individuo (Castaño del Robledo, Las Herrerías y Bajo Alentejo), el porcentaje de supervivencia no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al origen de sus semillas. Este porcentaje osciló entre el 59,6% de los brotes de Cortes de la Frontera y, el 75% de los brotes del Alto Alentejo portugués.

3.3.2. Multiplicación *in vitro* de explantes de *Q. suber*.

3.3.2.1. Efecto de las sales minerales y de la combinación hormonal en el medio de cultivo.

El análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores ha mostrado que existe un efecto significativo de la "combinación de sales minerales" y de la combinación de hormonas" sobre la "tasa media de multiplicación" (tabla 3.13).

Tabla 3.13. Nivel de significación del análisis estadístico realizado mediante ANOVA bifactorial respecto a los factores "sales minerales" y "combinación de hormonas" ($\alpha < 0,05$)

Variables dep.	% Mortalidad	Tasa Media de Multiplicación
Sales minerales*	0,070	0,001
Combinación de hormonas*	0,001	0,001
Interacción	0,066	0,352

Análisis realizado a partir de los resultados obtenidos en 130 explantes cultivados en medios con diferente combinación de sales minerales diferentes (**MS y GD**) y de hormonas (**0,8** [0.5mg/L de 6-BAP + 0.2mg/L de ANA + 0.2mg/L de AIB] y **6,6** [0.3mg/L de 6-BAP + 2.0mg/L de AIB]).

De las dos combinaciones de sales minerales en las que han estado cultivados los explantes, presentaron mejor "tasa media de multiplicación" (TMedM) en MS que en GD, ya que en los medios con sales GD, o bien apenas han superado la tasa 1 de multiplicación (tabla 3.14 y figura 11), lo que quiere decir que no ha habido prácticamente brotación, o bien, no la han superado, lo que indica pérdida del número inicial de explantes. En cambio, en los medios con sales MS, las "tasas medias de multiplicación" han sido de 1,43 en MS0,8 (relación aux/ck = 0,8) y 2,20 en MS6,6 (relación aux/ck = 6,6).

La "tasa máxima de multiplicación" en un medio de cultivo con sales GD la han presentado los explantes del clon BAA-26, con un valor de 1,43. En cambio, en el medio MS0,8, la "tasa máxima de multiplicación" fue de 4,0, obtenida por el clon NIA-2, mientras que en el medio MS6,6 fue de 6,0, obtenida por los explantes de dos clones, el BAA-27 y el CoA-9.

Tabla 3.14. Porcentaje de mortalidad y tasas media y máxima de multiplicación de *Q. suber* respecto a los factores "sales minerales" y "combinación de hormonas".

Medio de cultivo*	Aux/CK (mg/L)	Explantos iniciales	% Mort**	TMedM**	TMaxM**	Observaciones
GD0,8	0,4/0,5	10	37,5 ± 18,3 ^a	0,63 ± 0,18 ^a	1	Escaso crecimiento de los brotes
GD6,6	2,0/0,3	83	6,10 ± 4,47 ^b	1,09 ± 0,04 ^b	1,43 (BAA-26)	Escaso crecimiento, hojas amarillentas o con clorosis
MS0,8	0,4/0,5	263	15,6 ± 3,64 ^a	1,43 ± 0,08 ^c	4,0 (NIA-2)	Vitrificación, escaso crecimiento
MS6,6	2,0/0,3	1250	6,28 ± 1,65 ^b	2,20 ± 0,15 ^d	6,0 (BAA-27 y CoA-9)	Poca vitrificación, buen crecimiento y brotes elongados.

(*) **GD0,8** (sales GD con 0,5mg/L de 6-BAP + 0,2mg/L de ANA + 0,2mg/L de AIB); **GD6,6** (sales GD con 0,3mg/L de 6-BAP + 2mg/L de AIB); **MS0,8** (sales MS con 0,5mg/L de 6-BAP + 0,2mg/L de ANA + 0,2mg/L de AIB); **MS6,6** (sales MS con 0,3mg/L de 6-BAP + 2mg/L de AIB).

(**) % **Mort** (porcentaje de mortalidad); **TMedM** (Tasa media de multiplicación); **TMaxM** (Tasa máxima de multiplicación). Letras diferentes indican diferencias significativas mediante ANOVA ($\alpha < 0,05$).

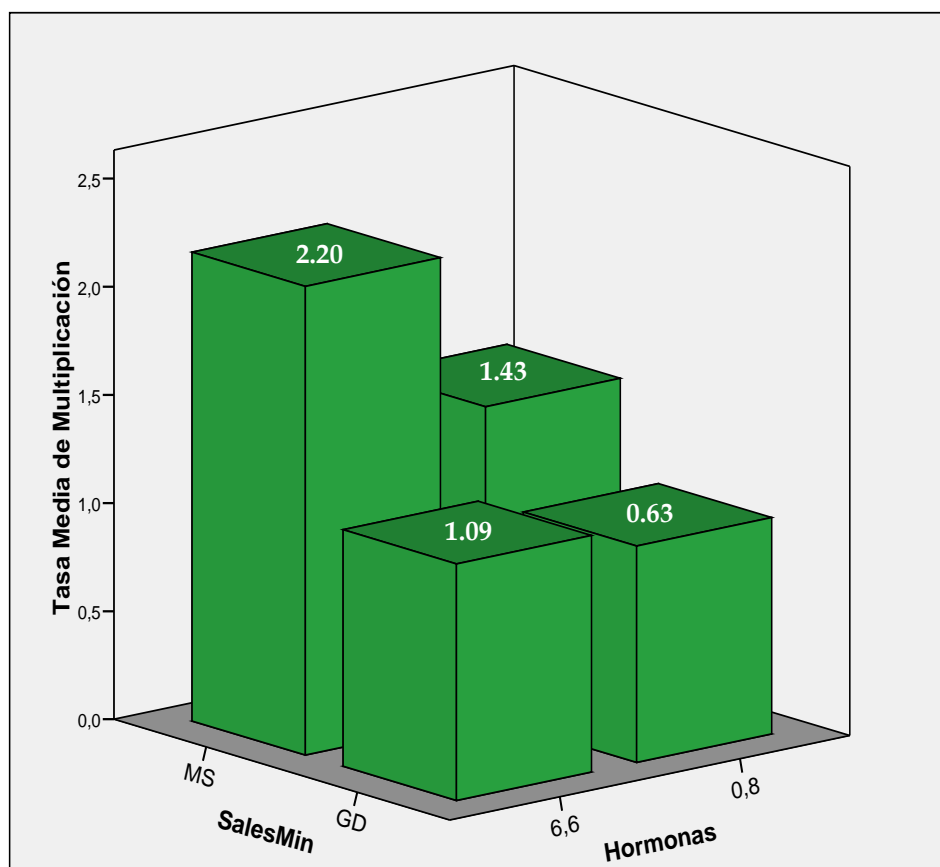


Figura 11. Tasa media de multiplicación de explantes de alcornoque en función de la combinación de sales minerales y la relación auxinas/citoquininas.

Las diferencias entre los “porcentajes de mortalidad”, también han resultado significativas en función de la “combinación de hormonas” empleada, pero no en función de las “sales minerales”, resultando que la “combinación de hormonas” con menor porcentaje de mortalidad ha sido la 6,6, situándose ligeramente por encima del 6% con ambas sales minerales, mientras que con la combinación 0,8, ha sido del 15,6% y 37,5% (respectivamente en función de las sales minerales empleadas, MS y GD).

La interacción entre los dos factores (sales minerales y relación de hormonas) no ha tenido un efecto significativo respecto a ninguno de los parámetros medidos, indicando con ello, que el efecto de las hormonas es independiente de la combinación de sales utilizada.

Por último, no aparecieron explantes con síntomas de vitrificación en los medios con sales GD, mientras que en los medios con sales MS, se observaron algunos casos, más frecuentes en el medio MS0,8, que en el MS6,6.

3.3.2.2. Efecto de la relación auxinas/citoquininas en el medio de cultivo.

Tanto la “relación de concentración entre auxinas y citoquininas” como la “concentración final de auxinas” en los medios de cultivo, presentaron efectos significativos sobre la “tasa media de multiplicación” (tabla 3.15) y, sobre los porcentajes de muerte o necrosis de los brotes (figura 12A).

Tabla 3.15. Nivel de significación del análisis estadístico realizado mediante ANOVA de un factor respecto a la “relación de concentración entre auxinas y citoquininas” en medios de cultivo con sales MS ($\alpha < 0,05$)

Variables dep.	% Mortalidad	TMedM
Nivel de signific. respecto de relación aux/ck	0,012	0,002

Análisis realizado a partir de los resultados obtenidos en 100 explantes cultivados en medios con sales MS y diferente combinación de hormonas (0.8, 1, 2, 4 y 6.6).

La “tasa media de multiplicación” aumentó respecto al incremento de la relación auxinas/citoquininas (tabla 3.16), siendo el medio MS6,6, el que mejor promedio rindió para este parámetro (2,21 explantes obtenidos por cada explante cultivado).

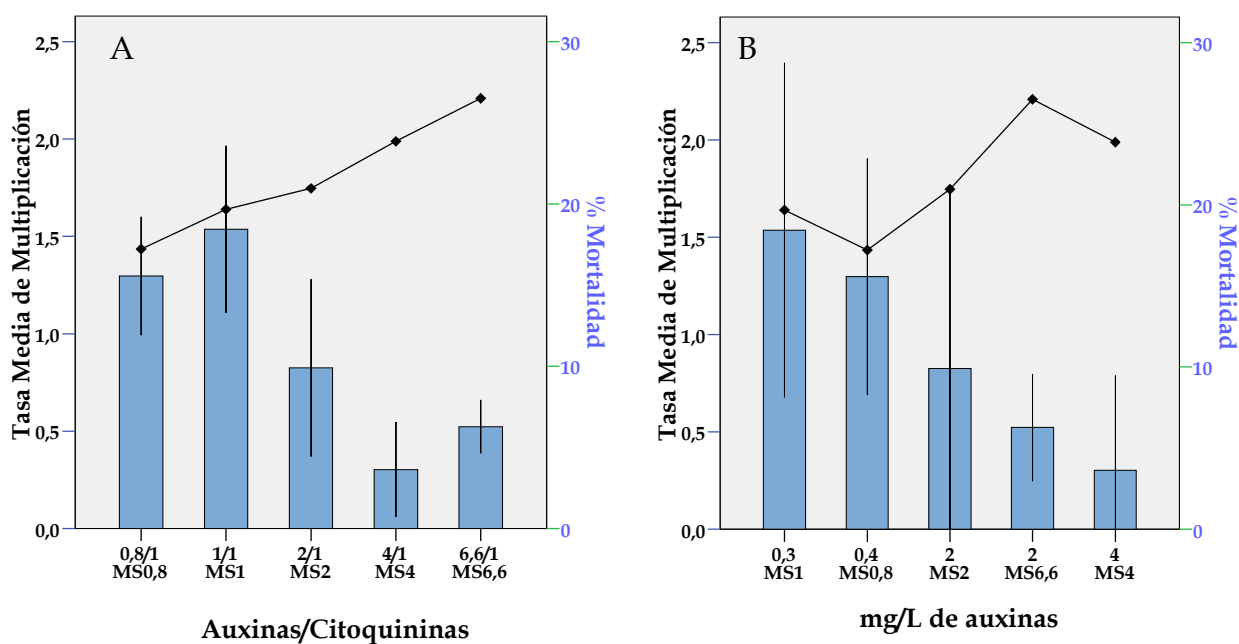


Figura 12. Tasa media de multiplicación (línea) y porcentaje de mortalidad (barras) en medio MS en función de la relación aux/ck (gráfico A) y de la concentración de auxinas en el medio de cultivo (gráfico B). **MS0,8** (0,2mg/L AIB + 0,2mg/L ANA + 0,5mg/L 6-BAP); **MS1** (0,3mg/L AIB + 0,3mg/L 6-BAP); **MS2** (2mg/L AIB + 1mg/L 6-BAP); **MS4** (4mg/L AIB + 1mg/L 6-BAP); **MS6,6** (2mg/L AIB + 0,3mg/L 6-BAP)

Tabla 3.16. Porcentaje de mortalidad (% Mort) y tasas media y máxima de multiplicación (TMedM y TMaxM respectivamente) de *Q. suber* en función de la relación de concentración de auxinas y citoquininas en medios de cultivo con sales MS.

Medio de cultivo*	Explantos iniciales	% Mort**	TMedM**	TMaxM	Observaciones
MS0,8	263	15,6 ± 3,6 ^{a,b}	1,43 ± 0,08 ^b	2,38 (NIA-2)	Vitrificación, escaso crecimiento
MS1	87	18,4 ± 5,2 ^a	1,64 ± 0,15 ^{a,b}	3,00 (AHj-102)	Vitrificación, algún brote elongado
MS2	73	9,9 ± 5,5 ^{a,b}	1,75 ± 0,25 ^{a,b}	4,40 (BAA-26)	Poca vitrificación, buen crecimiento y brotes elongados.
MS4	227	3,6 ± 2,9 ^b	1,99 ± 0,16 ^{a,b}	3,00 (SBA-326)	Buen crecimiento, ápices necróticos
MS6,6	1250	6,28 ± 1,65 ^{a,b}	2,21 ± 0,15 ^a	6,00	Poca vitrificación, buen crecimiento y brotes elongados.

(*)**MS0,8** (0,2mg/L AIB + 0,2mg/L ANA + 0,5mg/L 6-BAP); **MS1** (0,3mg/L AIB + 0,3mg/L 6-BAP); **MS2** (2mg/L AIB + 1mg/L 6-BAP); **MS4** (4mg/L AIB + 1mg/L 6-BAP); **MS6,6** (2mg/L AIB + 0,3mg/L 6-BAP).

(**)Letras diferentes indican diferencias significativas mediante ANOVA de un factor ($\alpha < 0,05$).

En este medio también se obtuvo la mayor “tasa máxima de multiplicación” con un valor de 6 explantes obtenidos por cada uno cultivado (tabla 3.16), tasa que correspondió a los clones BAA-27 y CoA-9. El caso opuesto fue el del medio de cultivo MS0,8, con una “tasa media de multiplicación” de 1,43 y, una “tasa máxima de multiplicación” de 2,38 que fue obtenida por el clon NIA-2.

El "porcentaje de mortalidad" no guardó una relación lineal con respecto al incremento de la relación auxinas/citoquininas, pero sí con la concentración final de auxinas en el medio de cultivo (figura 12B), de modo que disminuyó con relación al incremento de la concentración de auxinas, siendo el medio MS4, el que menor porcentaje de mortalidad registró. No obstante, en este medio, aparecieron algunos explantes con ápices necrosados, que no se observaron en ninguno de los demás medios de cultivo.

3.3.3. Enraizamiento *in vitro* de explantes de *Q. suber*.

3.3.3.1. Efecto de la concentración de auxina sobre la capacidad de enraizamiento y la incidencia de necrosis apical

El ANOVA de dos factores reveló un efecto significativo del factor clon sobre los porcentajes de “brotes globales enraizados” ($p < 0,024$), “brotes enraizados viables” ($p < 0,022$), “brotes enraizados con necrosis apical” ($p < 0,021$) y “brotes globales con necrosis apical” ($p < 0,001$) (tabla 3.17). En cambio, el factor concentración de auxina, sólo presentó efectos significativos sobre los porcentajes de “brotes enraizados con necrosis apical” ($p < 0,016$) y “brotes globales con necrosis apical” ($p < 0,010$). Mientras que la interacción entre ambos factores, no generó efectos significativos en ninguno de los cuatro parámetros medidos.

Tabla 3.17. Nivel de significación del ANOVA de dos factores en el enraizamiento *in vitro* de *Q. suber* respecto a los factores "concentración de auxina" y "clon" ($\alpha < 0,05$)

VARIABLES DEP.	% Global Enraizados	% Enraizados Viables	% Enraizados con Necrosis Apical	% Global con Necrosis Apical
Concentración de auxina*	0,261	0,978	0,016	0,010
Clon*	0,024	0,022	0,021	0,001
Interacción	0,789	0,602	0,613	0,923

(*) Análisis realizado a partir de los resultados obtenidos en 506 explantes de 6 clones diferentes distribuidos en los medios de enraizamiento MSR3, MSR4 y MSR5 (con 3, 4 y 5 mg/L de AIB respectivamente)

Tabla 3.18. Porcentajes de enraizamiento *in vitro* y error típico de 6 clones de *Q. suber* respecto a la concentración de ácido indol-butírico en el medio de cultivo.

Medios de cultivo*	MSR3	MSR4	MSR5
Brotos inducidos	124	256	126
% Global enraizados	42,3 ± 9,1 ^a	44,7 ± 6,2 ^a	57,3 ± 6,6 ^a
% Enraizados viables	39,0 ± 8,9 ^a	37,1 ± 5,9 ^a	41,1 ± 7,2 ^a
% Enraizados con necrosis apical	3,3 ± 1,7 ^a	7,6 ± 2,4 ^a	16,1 ± 4,6 ^b
% Global de brotes con necrosis apical	17,1 ± 7,8 ^a	26,2 ± 5,9 ^{a,b}	29,0 ± 8,8 ^b

Resultados obtenidos en 506 explantes de 6 clones diferentes repartidos en los medios de enraizamiento MSR3, MSR4 y MSR5 (con 3, 4 y 5 mg/L de AIB respectivamente). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

De forma general, el porcentaje de "brotos globales enraizados" varió entre un 42,3% en MSR3 y, un 57,3% en MSR5 (tabla 3.18), aumentando conforme aumentó la concentración de auxinas en el medio de cultivo, aunque tan solo siguieron este comportamiento los clones BAA-24 y BAA-26 (figura 13).

El clon con mayores porcentajes de “brotes globales enraizados” fue el Salg-296, que alcanzó el 79% en medio MSR3 y un 74% en MSR5.

El porcentaje de “brotes enraizados viables” varió entre el 37% en MSR4 y el 41% en MSR5, correspondiendo los mayores porcentajes al clon Salg-296, con un 79% en MSR3 y un 67% en MSR5). Este parámetro presentó diferencias respecto a los “brotes globales enraizados” tanto mayores cuanto mayor fue la concentración de auxinas en los medios de cultivo, debido al aumento progresivo de la incidencia de la necrosis apical, que varió entre un 3,3% en MSR3 y un 16,1% en MSR5, siendo significativa las diferencias entre los medios MSR3 y MSR4 frente al MSR5 ($p < 0,016$).

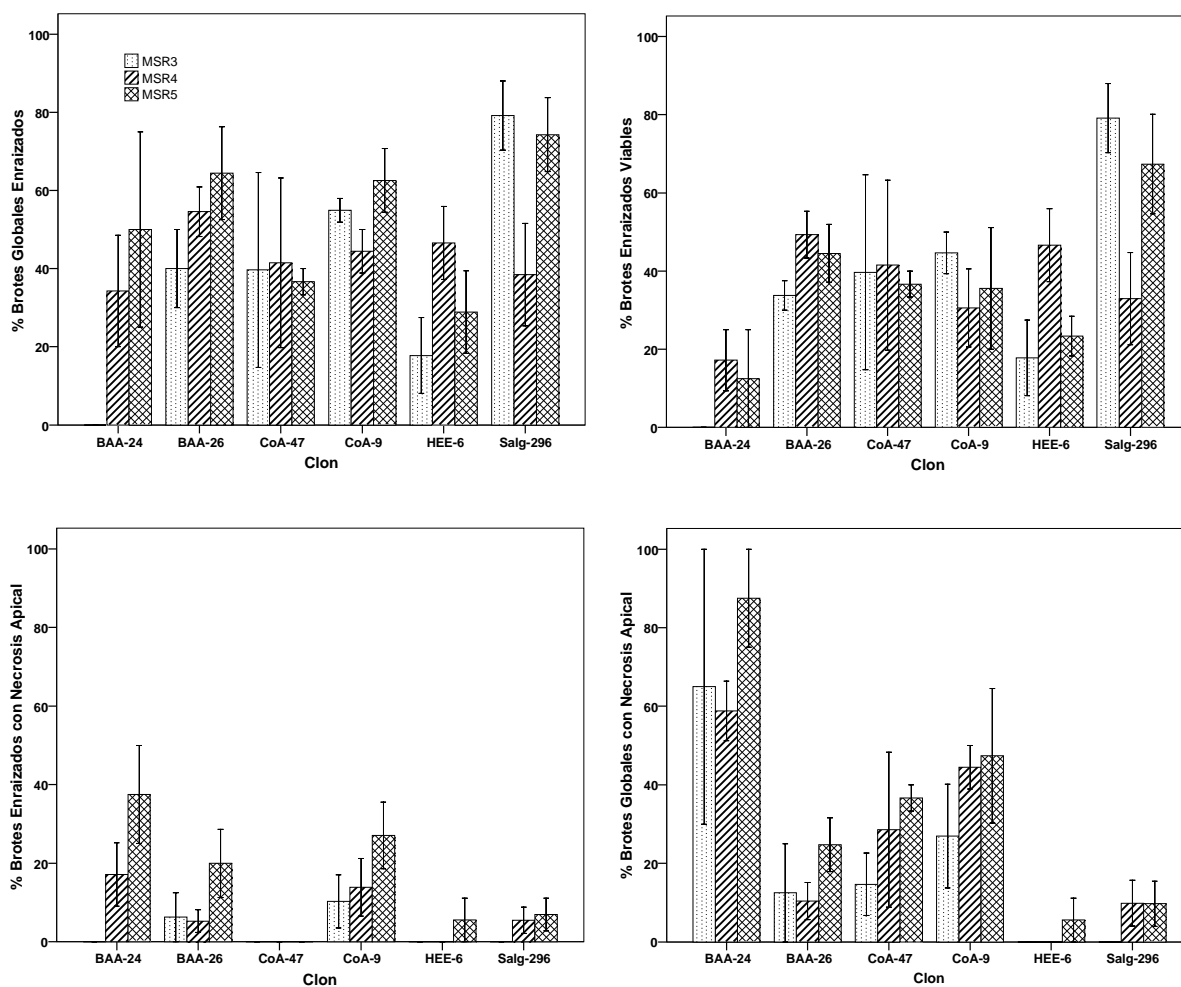


Figura 13. Porcentajes de enraizamiento y necrosis apical de explantes de *Q. suber* en función de la concentración de AIB en el medio de enraizamiento.

Ese comportamiento fue mostrado especialmente por los clones BAA-24, BAA-26 y CoA-9, que presentaron porcentajes de “brotes enraizados con necrosis apical” entre el 0% y el 10% en MSR3, entre el 10% y 20% en MSR4 y, entre el 20% y el 40% en MSR5 aproximadamente.

No obstante, el clon CoA-47 no presentó pérdidas por “brotes enraizados con necrosis apical” en ninguno de los tres medios de enraizamiento. El clon HEE-6, no las presentó ni en MSR3, ni en MSR4, mientras que el Salg-296, tan solo las presentó en MSR5.

El porcentaje de “brotes globales con necrosis apical”, también aumentó conforme aumentaba la concentración de auxinas en el medio de cultivo (figura 13), variando entre un 17,1% en MSR3 y un 39% en MSR5 y, afectando tanto a brotes enraizados como no enraizados. El clon BAA-24 fue el más afectado, con casi un 90% de “brotes globales con necrosis apical” en MSR5. En cambio, los menos afectados fueron los clones HEE-6 (6% en MSR5) y Salg-296 (alrededor del 10% tanto en MSR4 como MSR5).



Figura 14. Explantes de *Q. suber* enraizados en medio MSR4

3.3.3.2. Efecto de la duración del tratamiento con auxinas sobre la capacidad de enraizamiento y la incidencia de necrosis apical

El análisis estadístico mostró un efecto significativo tanto del factor duración del tratamiento como del clon, sobre los cuatro parámetros medidos (tabla 3.19), a excepción del porcentaje de “brotes enraizados con necrosis apical” que solo se vio influenciado significativamente por el factor clon. La interacción, en cambio, no mostró efectos significativos sobre ninguno de los cuatro parámetros.

Tabla 3.19. Nivel de significación del ANOVA de dos factores en enraizamiento *in vitro* de *Q. suber* respecto a los factores “duración del tratamiento” y “clon” ($\alpha < 0,05$)

Variables dep.	% Global Enraizados	% Enraizados Viables	% Enraizados con Necrosis Apical	% Global con Necrosis Apical
Duración del tratamiento*	0,014	0,014	0,535	0,027
Clon*	0,032	0,001	0,018	0,001
Interacción	0,198	0,198	0,745	0,761

(*) Análisis realizado a partir de los resultados obtenidos en 544 explantes de 5 clones diferentes distribuidos en los tratamientos de Dipping (30 segundos) o inducción en medio con auxina (MSR4) durante 7, 15 ó 30 días

Los mejores porcentajes de “brotes globales enraizados” y “brotes enraizados viables”, se obtuvieron cuando el tratamiento duró 15 días (64,0% y 50,4% respectivamente), siendo estadísticamente diferentes ($p < 0,014$ en ambos casos) tan solo con respecto al peor de los tratamientos, que fue el “dipping” (32,0% y 24% respectivamente) (tabla 3.20).

El porcentaje de “brotes enraizados con necrosis apical” no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,535$) y, varió entre el 7% presentado por los brotes tratados durante 30 días con la auxina y, el 13% presentado por los tratados durante 15 días. En cambio, el porcentaje de “brotes globales con necrosis apical” presentó valores entre el 24,8% del tratamiento con la auxina durante 15 días (sin diferencias

significativas respecto a los de 7 y 30 días, con 34,9% y 26,4% respectivamente) y, 64% del tratamiento mediante “dipping”, cuya diferencia con los otros tres tratamientos sí fue estadísticamente significativa ($p < 0,027$).

Tabla 3.20. Porcentajes de enraizamiento *in vitro* y error típico de 5 clones de *Q. suber* respecto a la duración de la inducción de la rizogénesis en MSR4.

Tratamiento*	Dipping	7 días	15 días	30 días
Brotos inducidos	100	102	127	215
% Global enraizados	32,0 ± 6,2 ^b	45,4 ± 8,2 ^{a,b}	64,0 ± 6,8 ^a	43,8 ± 4,6 ^{a,b}
% Enraizados viables	24,0 ± 7,4 ^b	37,2 ± 7,8 ^{a,b}	50,4 ± 6,3 ^a	36,8 ± 5,0 ^{a,b}
% Enraizados con necrosis apical	8,0 ± 2,3 ^a	8,2 ± 4,0 ^a	13,6 ± 3,7 ^a	7,0 ± 2,6 ^a
% Global de brotes con necrosis apical	64,0 ± 12,4 ^a	34,9 ± 12,0 ^b	24,8 ± 5,3 ^b	26,4 ± 6,0 ^b

(*) **Dipping** (inmersión durante 30 segundos en 10 mg/L de AIB); **7 ó 15 días** (inducción durante 7 ó 15 días en medio MSR4 y, traspaso a medio libre de hormonas hasta los 30 días); **30 días** (inducción durante 30 días en MSR4). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0,05$)

Los mayores porcentajes de “brotos globales enraizados” y “brotos enraizados viables” los presentó el clon CoA-9 (89% y 78% respectivamente), obtenidos con el tratamiento de 7 días y 15 días respectivamente. Este último, fue también el mejor tratamiento en los clones BAA-24, BAA-26 y CoA-47, tanto para el porcentaje de “brotos globales enraizados” (58%, 63% y 82% respectivamente) como el de “brotos enraizados viables” (39%, 57% y 69% respectivamente). En cambio, en el clon HEE-6, el tratamiento de 15 días fue el que peor porcentaje de “brotos globales enraizados” y “brotos enraizados viables” rindió (37% en ambos casos), mientras que en los demás tratamientos, esos porcentajes oscilaron en torno al 60%, siendo el mejor el de 7 días (68% para ambos porcentajes).

El tratamiento del “dipping”, que obtuvo el peor porcentaje global de “brotes globales enraizados” y “brotes enraizados viables”, no fue el peor en todos los clones, habiendo superado a otros tratamientos como en el caso de los clones BAA-24, CoA-9 y HEE-6.

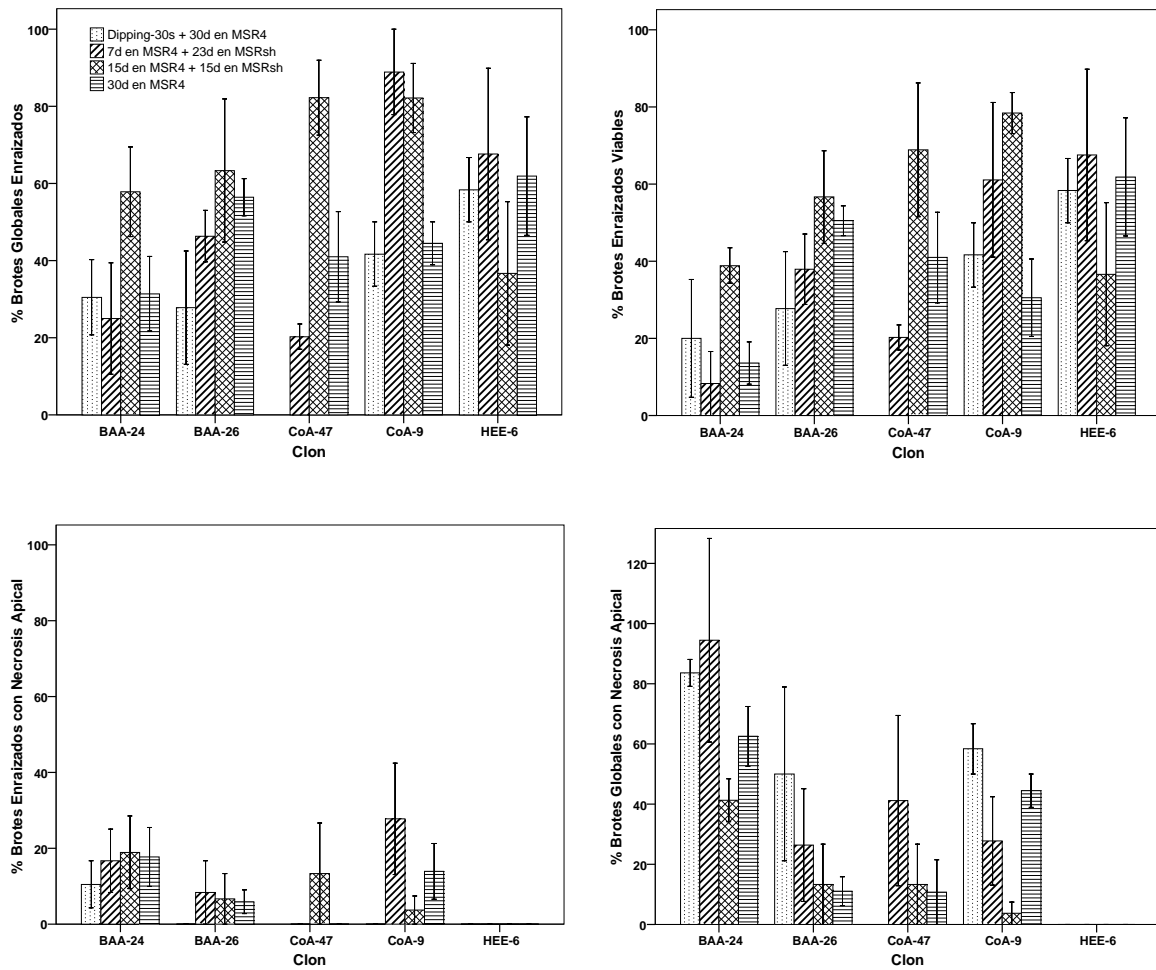


Figura 15. Porcentajes de enraizamiento y necrosis apical de explantes de *Q. suber* en función de la duración del tratamiento con AIB en medio de cultivo MSR4.

La incidencia de la necrosis apical, afectó de forma diferente según cada clon. Así, en el clon HEE-6 no se obtuvo ningún caso de necrosis apical independientemente de la duración del tratamiento, mientras que en el BAA-24, se obtuvieron porcentajes de “brotes globales con necrosis apical” del 94% y 84% en los tratamientos de 7 días y del “dipping”, siendo los mayores

registrados entre los cinco clones. No obstante, los porcentajes de “brotes enraizados con necrosis apical” del clon BAA-24 no guardaron proporción respecto a los “brotes globales con necrosis apical”, sino que presentaron variaciones entre el 13% y 20% aproximadamente. Tampoco se observó proporción entre los “brotes globales con necrosis apical” y los “brotes enraizados con necrosis apical” en los clones BAA-26 y CoA-47, para los que los porcentajes de “brotes globales con necrosis apical” descendieron progresivamente conforme aumentaba la duración del tratamiento de inducción, mientras que los porcentajes de “brotes enraizados con necrosis apical” no guardaron esa relación. Lo mismo ocurrió con el clon CoA-9, en el que además no se observó una relación entre la incidencia de la necrosis apical y la duración del tratamiento de inducción.

3.3.3.3. Efecto del tratamiento previo en medio libre de hormonas sobre la capacidad de enraizamiento y la incidencia de necrosis apical.

El análisis estadístico tan solo mostró un efecto significativo del factor “tratamiento previo en MSRsh” ($p < 0,001$) sobre el porcentaje de “brotes globales con necrosis apical”, pero no sobre el resto de parámetros medidos (tabla 3.21). En cambio, el factor “clon” y la interacción entre los dos factores sí mostraron efectos estadísticamente significativos sobre los cuatro parámetros ($p < 0,001$ en todos estos casos). El tratamiento previo de los explantes en MSRsh durante siete días previamente a la inducción del enraizamiento en MSR5, empeoró los porcentajes de “brotes globales enraizados” y “brotes enraizados viables” respecto al tratamiento directo en MSR5 (tabla 3.22). Así, el porcentaje de “brotes globales enraizados” se redujo en algo más de un 10% respecto al tratamiento directo en MSR5, mientras que en el caso de los “brotes enraizados viables”, se obtuvo un 36,8% en el “tratamiento previo en MSRsh”, frente al 41,1% obtenido en MSR5.

Tabla 3.21. Nivel de significación del ANOVA de dos factores en enraizamiento *in vitro* de *Q. suber* respecto a los factores “tratamiento previo en medio libre de hormonas” y “clon” ($\alpha < 0,05$)

Variables dep.	% Global Enraizados	% Enraizados Viables	% Enraizados con Necrosis Apical	% Global con Necrosis Apical
Tratamiento*	0,184	0,472	0,537	0,001
Clon	0,001	0,001	0,001	0,001
Interacción	0,001	0,001	0,001	0,001

(*) Análisis realizado a partir de los resultados obtenidos en 166 explantes de 6 clones diferentes distribuidos en los tratamientos de **7 días en MSRsh** (inducción durante 7 días en medio libre de hormonas y, traspaso a medio MSR5 hasta los 30 días) y, **MSR5** (inducción durante 30 días en MSR5). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0,05$)

Tabla 3.22. Porcentajes de enraizamiento *in vitro* y error típico de 6 clones de *Q. suber* respecto al tratamiento previo en medio de cultivo libre de hormonas.

Tratamiento*	MSR5	7 días en MSRsh + MSR5
Brotos inducidos	90	76
% Global enraizados	53,3 ± 1,6 ^a	44,7 ± 6,3 ^a
% Enraizados viables	41,1 ± 2,1 ^a	36,8 ± 5,0 ^a
% Enraizados con necrosis apical	12,2 ± 1,1 ^a	7,9 ± 2,6 ^a
% Global de brotes con necrosis apical	23,3 ± 2,2 ^a	18,4 ± 3,0 ^a

(*) Tratamiento: **7 días en MSRsh** (inducción durante 7 días en medio libre de hormonas y, traspaso a medio MSR5 hasta los 30 días) respecto a **MSR5** (inducción durante 30 días en MSR5). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0,05$)

El tratamiento previo en medio libre de hormonas también redujo la incidencia de necrosis apical en los explantes, de modo que el porcentaje de “brotos enraizados con necrosis” se redujo del 12,2% obtenido en el tratamiento directo en MSR5, al 7,9% obtenido con el tratamiento de 7 días en MSRsh. El porcentaje de “brotos globales con necrosis apical” también se redujo, pasando

del 23.3% obtenido en el tratamiento directo en MSR5, al 18,4% obtenido con el tratamiento de 7 días en MSRsh.

El comportamiento de los clones ha sido muy diferente frente a ambos tratamientos (figura 16). Así por ejemplo, los clones CoA-47, HEE-6, Salg-297 y SBA-326, mejoraron sus porcentajes de “brotes globales enraizados” con el tratamiento previo en MSRsh respecto al tratamiento directo en MSR5, llegando al 100% de “brotes globales enraizados” en el caso del clon SBA-326. Sin embargo, los clones BAA-24 y BAA-26, no produjeron ni un solo brote enraizado con el tratamiento previo en MSRsh, mientras que en el tratamiento directo en MSR5 obtuvieron un 50% y 60% respectivamente.

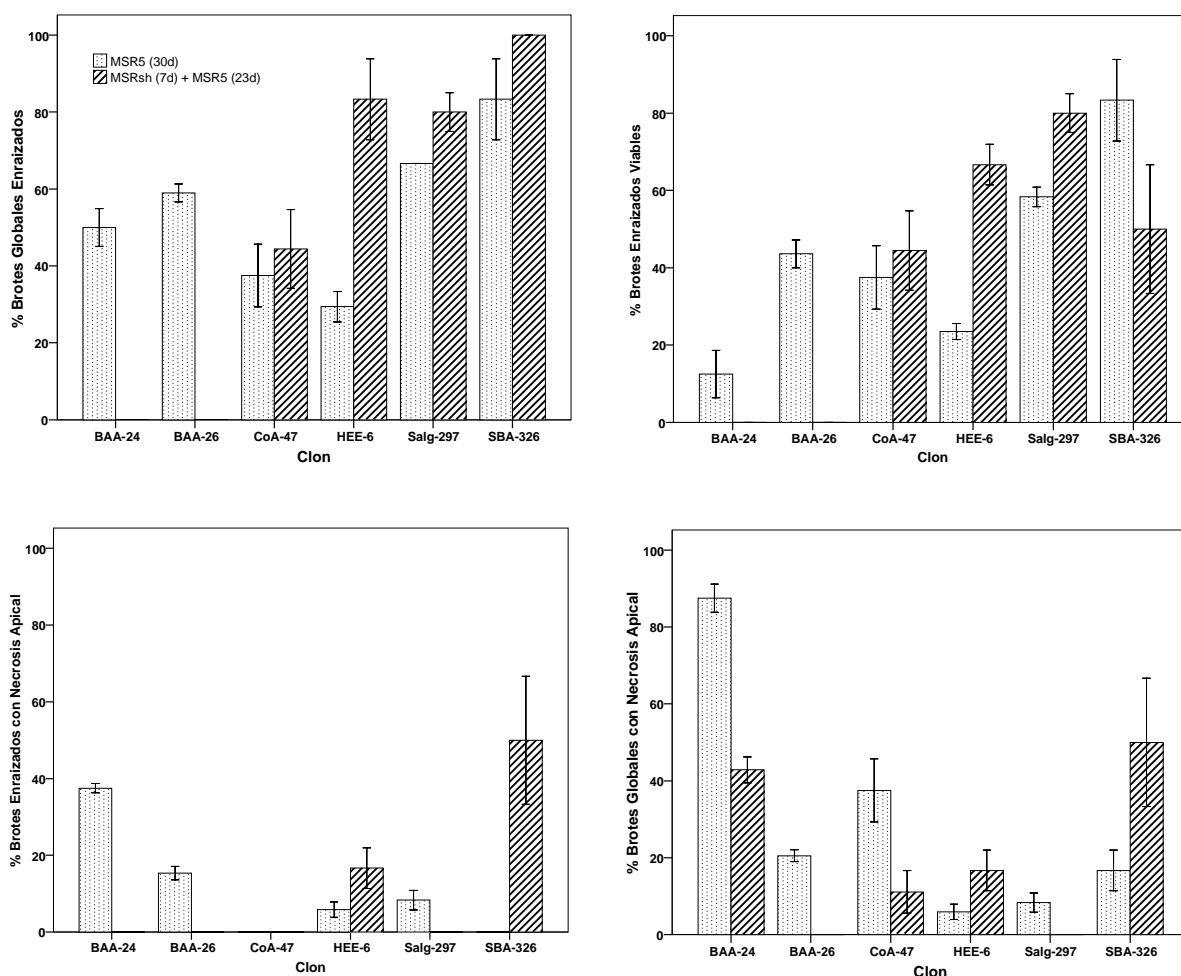


Figura 16. Porcentajes de enraizamiento y necrosis apical de explantos de *Q. suber* en función del tratamiento previo en MSRsh frente al tratamiento directo en medio MSR5.

En cuanto a la incidencia de la necrosis apical, también se hicieron notar las diferencias entre los clones frente a ambos tratamientos. Así por ejemplo, el clon SBA-326, que mostró una capacidad de enraizamiento en el tratamiento previo en MSRsh del 100%, también mostró una sensibilidad a la aparición de la necrosis apical del 50% de los brotes inducidos. Sin embargo, en el tratamiento directo en MSR5, para el que obtuvo un porcentaje de “brotes globales enraizados” del 83,3%, el porcentaje de “brotes globales con necrosis apical” fue del 16,7%, afectando tan solo a los brotes enraizados. También el clon HEE-6 mostró mayor sensibilidad a la aparición de necrosis apical cuando la rizogénesis fue inducida con tratamiento previo en MSRsh (16,7%), que en el tratamiento directo en MSR5 (5,9%), tanto si los brotes habían enraizado como si no.

En los clones BAA-24 y CoA-47, los porcentajes de “brotes globales con necrosis apical” fueron mayores en el tratamiento directo en MSR5 que con tratamiento previo en MSRsh, afectando de diferente forma en cada caso, en función de si se trataban de brotes enraizados o no. De hecho, en el clon CoA-47, no se produjo ningún caso de brotes con necrosis apical entre los brotes enraizados. En este sentido, también destacó el clon Salg-297, para el que las pérdidas por “brotes enraizados con necrosis apical” fueron tan solo del 8,3%, en el tratamiento directo en MSR5.

3.3.3.4. Efecto del tratamiento en oscuridad durante 7 días sobre la capacidad de enraizamiento y la incidencia de necrosis apical.

El factor tratamiento, así como el factor clon y la interacción entre ambos, mostraron efectos significativos en los cuatro parámetros medidos (tabla 3.23).

Tabla 3.23. Nivel de significación del ANOVA de dos factores en el enraizamiento *in vitro* de *Q. suber* respecto a los factores "tratamiento en oscuridad durante los 7 primeros días" y "clon" ($\alpha < 0,05$)

Variables dep.	% Global Enraizados	% Enraizados Viables	% Enraizados con Necrosis Apical	% Global con Necrosis Apical
Tratamiento*	0,001	0,008	0,001	0,001
Clon	0,001	0,001	0,001	0,001
Interacción	0,001	0,001	0,001	0,001

(*) Análisis realizado a partir de los resultados obtenidos en 194 explantes de 5 clones diferentes distribuidos en los tratamientos MSR5 (inducción durante 30 días en MSR5) y, 7 días en oscuridad (inducción durante 7 días en medio MSR5 en condiciones de oscuridad permanente).

El tratamiento en oscuridad continua durante los siete primeros días de la rizogénesis, logró mejorar los porcentajes de "brotes globales enraizados" en 4 de los 5 clones testados (BAA26-12, CoA47-9, HEE6-7 y Salg296-7), pero también provocó un aumento de "brotes enraizados con necrosis apical" del 13% aproximadamente (tabla 3.24). Dicho porcentaje obtuvo un valor del 28,1% para aquellos brotes que recibieron el tratamiento de oscuridad, frente al 15,7% de aquellos que no lo recibieron.

Tabla 3.24. Porcentajes de enraizamiento y error típico de 5 clones de *Q. suber* respecto al tratamiento en oscuridad durante los 7 primeros días de rizogénesis.

	MSR5	7 días oscuridad + MSR5
Brotes inducidos	116	78
% Global enraizados	58,9 ± 1,8 ^a	63,0 ± 1,4 ^b
% Enraizados viables	43,2 ± 2,1 ^a	34,8 ± 3,7 ^b
% Enraizados con necrosis apical	15,7 ± 1,3 ^a	28,1 ± 2,6 ^b
% Global de brotes con necrosis apical	23,8 ± 2,0 ^a	59,2 ± 4,0 ^b

(*) MSR5 (inducción durante 30 días en MSR5); 7 días en oscuridad (inducción durante 7 días en medio MSR5 en condiciones de oscuridad permanente). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0,05$)

El tratamiento en oscuridad tan solo benefició el aumento de los "brotes enraizados viables" de los clones BAA26-12 y HEE6-7 (figura 17), que varió del 43,6% y 23,5% respectivamente en el tratamiento sin oscuridad, al 50% y 100% respectivamente en el tratamiento con oscuridad. En los clones CoA47-9, CoA9-12 y Salg296-7, este porcentaje fue superior para aquellos brotes que no recibieron el tratamiento de oscuridad, con una variación estadísticamente significativa tan solo en el caso del clon CoA-47 (37,5% en el tratamiento sin oscuridad frente al 15% en el tratamiento con oscuridad continua).

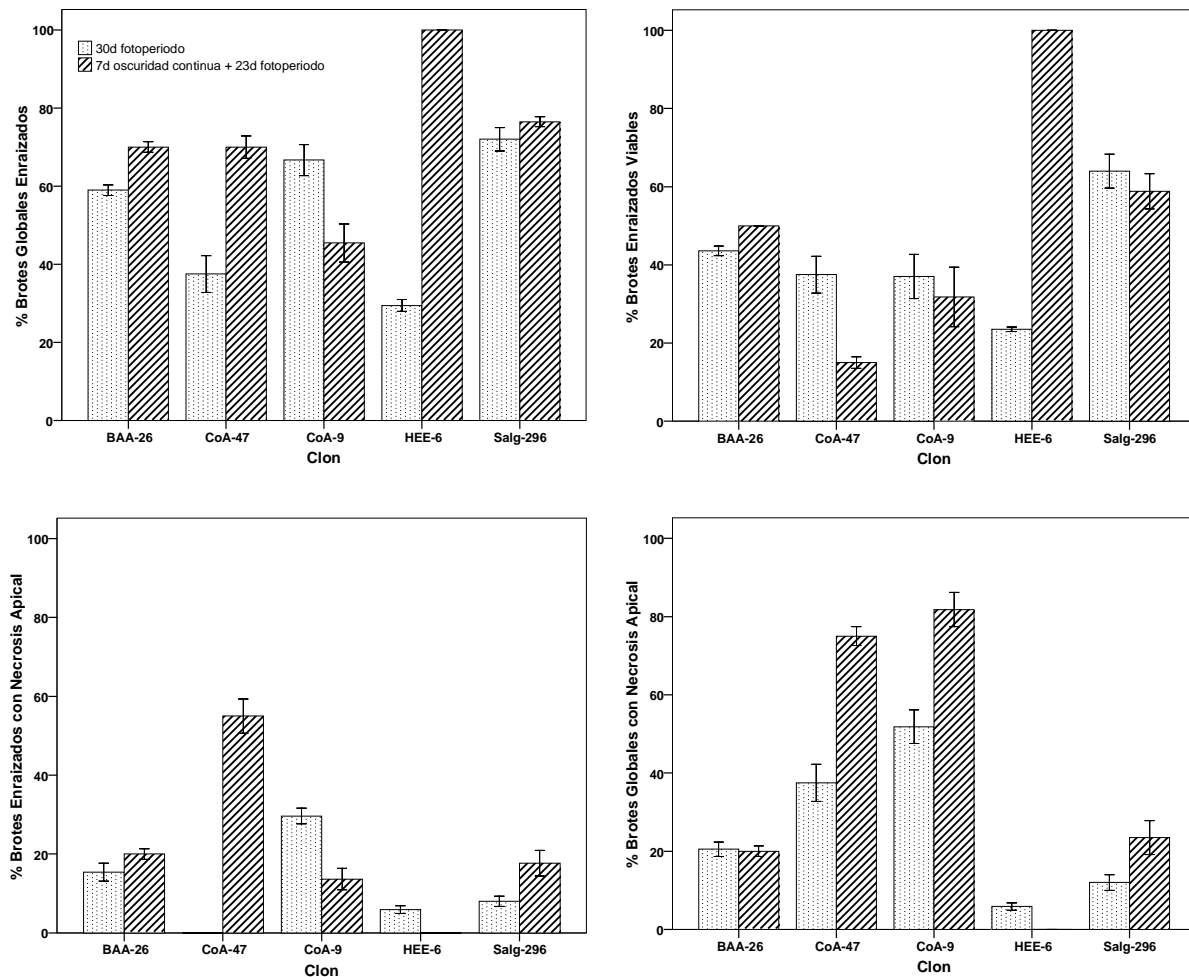


Figura 17. Porcentajes de enraizamiento y necrosis apical de explantos de *Q. suber* en función del tratamiento previo en oscuridad permanente durante los primeros 7 días de la rizogénesis frente al tratamiento directo con fotoperiodo.

El tratamiento previo en oscuridad en el clon HEE-6, produjo un 7,1% de brotes con necrosis apical, que afectó solo a brotes enraizados, mientras que en el resto de clones, se vieron afectados tanto brotes enraizados como no enraizados.

Los mayores porcentajes de “brotes globales con necrosis apical” se obtuvieron en los clones CoA-9 y CoA-47, con un 81,8% y 75% respectivamente para aquellos brotes que recibieron el tratamiento de oscuridad continua. Los menores porcentajes de “brotes globales con necrosis apical” correspondieron al clon HEE-6, que obtuvo un 5,9% en el tratamiento sin oscuridad continua, frente a un 0% en el tratamiento con oscuridad continua.

3.4. DISCUSIÓN.

Con la metodología de micropropagación seguida en el presente trabajo, se han conseguido obtener brotes en buen estado de juvenilidad aptos para la propagación *in vitro*, tanto de individuos seleccionados adultos como juveniles, de encina y de alcornoque. Si bien la capacidad de obtener brotes forzando la brotación de yemas en estacas de individuos adultos, ya fue demostrada con anterioridad para alcornoque (Manzanera y Pardos, 1990; Romano y Martín-Loução, 1992), es probablemente la primera vez que se describe en encina.

Inducción de la brotación en *Q. ilex*

En el caso concreto de las encinas, la micropropagación sólo fue posible llevarla a cabo hasta la fase de implantación, debido a que las pruebas de multiplicación no han aportado resultados positivos en ninguno de los casos, debido principalmente a la falta de reactividad de los explantes en los medios de cultivo y, a las condiciones ambientales ensayadas, requiriendo continuar con más pruebas y ensayos diferentes a partir de esa fase.

No obstante, las pruebas de inducción de la brotación de estacas de encina y su implantación *in vitro*, han aportado resultados positivos que permiten establecer la metodología desarrollada en este trabajo, como un método apropiado para iniciar la propagación y conservación *in vitro* de individuos adultos, que hasta el momento solo ha sido descrita a partir de la embriogénesis somática (Blasco *et al.*, 2013; Barra-Jiménez *et al.*, 2014).

De este modo, los resultados de la prueba de inducción de la brotación en estacas de encina, han mostrado que el tratamiento previo en frío, acorta el tiempo efectivo que las estacas están produciendo yemas y, disminuye la producción y el tamaño de los brotes, respecto a las no tratadas en frío. No obstante, la exposición a temperaturas máximas diurnas próximas a los 40°C

durante el mantenimiento posterior de las estacas, puede contrarrestar el efecto de letargo del tratamiento en frío, como se ha podido deducir por el paralelismo de los resultados entre los tratamientos “frío-umbráculo” y “cámara”.

En base a estas observaciones, el aumento de la temperatura de la cámara de cultivo (28° día/24° noche) para la inducción general de estacas respecto a la temperatura en la prueba de inducción (25° día/15° noche), ha mejorado los promedios de todos los parámetros medidos respecto al mejor tratamiento de la prueba de inducción, apoyando la idea anteriormente comentada de que la temperatura elevada, beneficia la brotación de las yemas laterales de las estacas de encina. De esta manera, fue posible obtener brotes de las estacas en cualquiera de los periodos en que se efectuó la recolección. No obstante, el periodo de recogida de las estacas influyó en la capacidad de brotación, que se reflejó principalmente, en el parámetro “tiempo de producción de yemas”. Para este parámetro, el periodo inicial e intermedio de la primavera, resultó más favorable para alargar el tiempo de producción de yemas en las estacas, que el periodo invernal o del final de la primavera. Estos resultados estarían indicando que la mayor capacidad para alargar el tiempo de producción de yemas inducidas, estaría justo en los meses siguientes a la salida del periodo invernal. Sin embargo, un alargamiento del periodo de producción de yemas, no conlleva una mayor producción global de brotes, sino que como hemos visto en los resultados, la producción de brotes va en aumento desde febrero a mayo, coincidiendo con un descenso del tiempo de producción de yemas a lo largo de esos cuatro meses. Es decir, que el aumento de las temperaturas diurnas y/o nocturnas, así como el aumento de las horas de luz del fotoperiodo natural a lo largo de la primavera, estarían favoreciendo una capacidad más rápida de producción de yemas inducidas en las estacas. El efecto de la luz ha sido demostrado en trabajos anteriores, como por ejemplo, en plantas de *Q. suber* y *Q. canariensis* (Marañón *et al.*, 2004), indicando cómo el aumento de la intensidad lumínica que recibían las plantas mantenidas en vivero favorecía la formación de yemas axilares.

En cuanto a la inducción de la brotación en plantas juveniles, el éxito ha sido ligeramente inferior (68,57%) al de la inducción en estacas (75%), con la dificultad añadida de que en más de la mitad de las plantas, tan solo se pudieron obtener 1 ó 2 brotes por planta, lo que sin duda supone un inconveniente en cuanto a la disponibilidad de brotes, frente a los obtenidos de las estacas de material adulto. No obstante, estas plantas fueron sometidas a inoculación con *P. cinnamomi* en vivero en los ensayos llevados a cabo por León Sánchez (2010), con la consiguiente manipulación de las mismas para la medida de parámetros fisiológicos, lo cual pudo haber influido en su capacidad de brotación para los ensayos llevados a cabo en el presente trabajo.

Implantación de *Q. ilex*

En la implantación, los brotes procedentes de material juvenil han mostrado mejor comportamiento, con mejores promedios de supervivencia, que los procedentes de estacas, lo que concuerda con los resultados en otros *Quercus* (Kartsonas y Papafotiou, 2007; Vieitez *et al.*, 1993; Manzanera y Pardos, 1992), indicando con ello, que la edad del material vegetal, aunque se consiga rejuvenecer, influye en la capacidad de respuesta durante su micropropagación. De hecho, en el único trabajo conocido hasta el momento en el que se describe el proceso completo de regeneración de plantas de encina a través de la micropropagación de yemas axilares (Liñán *et al.*, 2011), se emplea como material vegetal para la implantación, los hipocotilos y raíces de semillas recién germinadas.

Además de lo anterior, los porcentajes de contaminación han sido mucho más bajos en los explantes procedentes de material juvenil que en los de material adulto, lo cual, estaría relacionado con el mayor control de las condiciones de germinación y crecimiento de las plantas juveniles en invernadero, respecto al material adulto procedente de campo, como también

fuese puesto de manifiesto por ejemplo, por Mac Ansoir y Kabrianis (1993) con plantas de *Q. petraea*.

En cuanto a los medios de cultivo utilizados en la implantación, tanto para los explantes de material adulto como juvenil, los mejores medios han sido los dos modificados a partir de las sales Gamborg (GBCa y GBSO). En el caso del GBCa, la mejora ha consistido en una reducción del aporte de iones Cl⁻ (los cuales intervienen en procesos de osmorregulación y compensación de cargas iónicas, favoreciendo la acumulación de agua, además de intervenir en la apertura y cierre de los estomas), además de un aumento del ión Ca⁺² (elemento de unión esencial en paredes y membranas celulares) (George *et al.*, 2008). Por su parte, en el GBSO se ha aumentado la concentración de iones SO₄⁻² respecto a la formulación original, necesarios para la síntesis y ensamblado de las proteínas, siendo la disminución de clorofila en las hojas, uno de los primeros síntomas de su deficiencia. Estas modificaciones en ambos medios de cultivo, han permitido mejorar los promedios de supervivencia que han ofrecido otros medios, como los basados en las sales WPM, las cuales han sido recomendados para la implantación de segmentos nodales de encina (Liñán *et al.*, 2011). Incluso, mejoraron los promedios obtenidos por el medio basado en las sales minerales originales de Gamborg, llegando a duplicarlas en el caso del GBSO, indicando con ello la efectividad de dichas modificaciones.

Quizás en la línea de las modificaciones hechas en estos dos medios de cultivo, se requiera proseguir con más pruebas y ensayos, dado el elevado interés en la conservación y propagación de esta especie vegetal y, la enorme dificultad que su manipulación *in vitro* genera a partir de material adulto.

Inducción de la brotación en *Q. suber*

Las pruebas de inducción de material adulto de alcornoques, han mostrado que el tratamiento previo en frío mejoró la brotación de las estacas respecto al tratamiento sin frío, coincidiendo por tanto, con lo publicado por

otros autores también para alcornoque (Manzanera y Pardos, 1990; Romano y Martín-Loução, 1992). Pero además, el tratamiento previo en frío de las estacas durante 21 días, además de favorecer la producción de brotes, a diferencia de lo observado en las encinas, resulta esencial en algunos casos, ya que en los tratamientos sin frío, se obtuvieron casos de estacas que no produjeron ni un solo brote, mientras que sí los produjeron en el tratamiento con frío.

La temperatura diurna no influyó en la duración de la brotación ni en la producción de brotes entre las estacas previamente tratadas en frío, a tenor de la similitud de los resultados entre los tratamientos *F-Cam* y *F-Umb* en la prueba de inducción. Sin embargo, en la inducción global, para la que se aumentó la temperatura diurna de la cámara hasta los 28°C y la nocturna hasta los 24°C, se mejoraron los promedios de todos los parámetros, indicando con ello una temperatura óptima para la brotación que se situaría en el intervalo de temperaturas de la cámara (15°C noche/ 25°C día) y el umbráculo (18°C noche/ 42°C día). Estos resultados difieren de lo observado en encina, donde la temperatura del umbráculo resultó necesaria para contrarrestar los efectos del tratamiento previo en frío de las estacas, logrando con ello resultados semejantes a obtenidos por el tratamiento “cámara”, en el que las estacas no pasaron por un periodo previo en frío.

El único parámetro que no mejoró en alcornoque con el aumento de la temperatura en la cámara, fue el “tamaño relativo de los brotes cortados”, lo cual pudo ser debido simplemente a que la capacidad de alargamiento de los brotes se vio disminuida por el aumento en la producción de yemas laterales de las estacas, dado el elevado número de éstas que fue registrado.

Este comportamiento diferente de encinas y alcornoques respecto a la temperatura necesaria para su brotación, concuerda con el observado por los árboles adultos en campo, ya que la encina sucede a los alcornoques en latitudes inferiores y hacia zonas de interior en la franja mediterránea, mientras que los alcornoques son más comunes en latitudes más altas y en zonas de clima atlántico, donde los inviernos son más fríos y húmedos y, las

temperaturas estivales no son tan acusadas (López González, 2001; Rodríguez-Barbero, 2009).

Por otro lado, tanto en la prueba de tratamientos de inducción como en los resultados globales, aparecieron estacas de algunos alcornoques de las que no se obtuvieron brotes ni yemas. Estos árboles fueron de las localidades de Almonte, Beas, Niebla e Hinojos. En algunos casos correspondieron a estacas de árboles afectados por la “seca” o con deterioro similar, mientras que en otros correspondió a árboles frondosos y con buen aspecto. Del mismo modo que de las estacas de algunos árboles de esas mismas localidades que presentaban afectación por la “seca”, se pudieron obtener brotes tras su inducción, por lo que resulta difícil establecer una correlación entre el aspecto externo del árbol y, la capacidad para producir brotes y yemas a partir de sus ramas. Por tanto, aunque un árbol pudiera estar afectado por “seca” o por otras causas, puede mantener la capacidad de brotación y, se pueden obtener de él brotes aptos para su propagación.

En el caso de los árboles escogidos de Almonte y Beas, las estacas se recolectaron en los meses de noviembre y diciembre, por lo que podría existir además, un efecto estacional, de manera que pudo haber disminuido la capacidad de producción de yemas y brotes de estacas recolectadas en los meses de invierno principalmente. También en las estacas recogidas en el mes de mayo, se registraron individuos en los que no se llegaron a producir brotes aptos para su implantación *in vitro*, siendo las estacas del mes de marzo las únicas de las que se obtuvieron brotes para implantación de todos los individuos seleccionados. Este comportamiento se asemeja bastante al presentado por las encinas, en las que los meses más productivos correspondieron a los de primavera, yendo en aumento a medida que éstos se sucedían. Los tiempos para la aparición de las primeras yemas y el de producción de yemas, fueron bastante similares en el mejor de los tratamientos de inducción. Sin embargo, a diferencia de la encina, en las estacas de alcornoque se observó un mayor número total de brotes cortados e implantados, así como un mayor tamaño relativo de los mismos, lo que

concuera sin duda, con el mayor vigor en cuanto a crecimiento vegetativo que presentan los alcornoques frente a las encinas, en condiciones naturales.

No obstante, el hecho de haber podido obtener brotes en estado juvenil a partir de material adulto recolectado durante los meses más desfavorables del año, abre la posibilidad de obtenerlos posiblemente en cualquier época del mismo, como también indicaron Romano y Martín-Loução (1992).

En cuanto a la inducción de la brotación en plantas juveniles de alcornoque, el éxito ha sido muy similar al obtenido por la brotación en estaca (un 78,82% frente a un 73%, respectivamente), mediante los métodos de inducción empleados en el presente trabajo. En este caso, las plantas de alcornoque duplicaron el número de brotes producidos por planta respecto a las de encina, poniendo de manifiesto de nuevo, el mayor vigor de esta especie frente a la encina (Rodríguez-Barbero, 2009).

Implantación en *Q. suber*

En la implantación, aunque los dos medios de cultivo probados (GD y MS) han rendido similares porcentajes de supervivencia, ha resultado más idóneo el GD por el aspecto general de los explantes y la inexistencia de exudados en dicho medio, que sí han aparecido en el MS, coincidiendo con las observaciones de otros autores (Romano y Martín-Loução, 1992). Por su parte, el origen del material influyó en los porcentajes de contaminación, que han sido mayores en los explantes de origen adulto, lo que al igual que hemos visto en encina, estaría relacionado principalmente con el mayor control de las condiciones de germinación y crecimiento de las plantas juveniles en invernadero, respecto al material adulto procedente de campo. El que no hubieran diferencias significativas entre ambos tipos de material en cuanto a los promedios de los porcentajes de supervivencia, indica la similitud de ambos tipos de material en cuanto a su capacidad de responder al medio de cultivo y las condiciones ambientales durante la implantación *in vitro*. Resultados

similares obtuvieron Manzanera y Pardos (1990) comparando brotes de origen juvenil (brotes de plántulas germinadas de 3 meses) y adulto (brotes del árbol y brotes de ramas cortadas), señalando el éxito en la implantación con ambos tipos de material y, la independencia de éste respecto al medio de cultivo.

En cambio, en el caso concreto del material de origen adulto, el periodo de recogida influyó en los porcentajes de supervivencia, siendo mejores para aquellos brotes de estacas recogidas durante los meses de noviembre y diciembre. Todo parece indicar, que el estado de parada fisiológica, favorecería la capacidad de respuesta de los brotes cuando son implantados *in vitro*, a pesar de las dificultades que presentan las estacas recogidas en esos meses para inducir su brotación, como se ha visto anteriormente.

Multiplicación en *Q. suber*

Las pruebas con los medios de multiplicación han indicado un mejor comportamiento de los explantes en los medios con sales MS respecto a las sales GD, siendo la mejor combinación de hormonas y sales minerales la del medio MS6,6 (con 0,3mg/L de 6-BAP y 2,0mg/L de AIB). A diferencia de la relación de auxina/citoquinina empleada por otros autores en la multiplicación de *Quercus spp.* (Manzanera y Pardos, 1990; Schwarz y Schlarbaum, 1993; Vieitez *et al.*, 1993; El Kbiach *et al.*, 2002), en la que las auxinas estaban ausentes o en mucha menor proporción que las citoquininas, nuestros resultados en el presente trabajo han indicado que cuando se invierte esa relación, mejoran, no solo el aspecto de los explantes (con color más vivo y tallos elongados con proliferación de las yemas laterales), sino también las tasas de multiplicación, llegando hasta una tasa máxima de multiplicación de 6. Además, el aumento de la relación auxinas/citoquininas, favoreció el aumento de la tasa media de multiplicación, mientras que el aumento absoluto de la concentración de auxinas en el medio, estuvo correlacionado con el descenso en el porcentaje medio de mortalidad de los explantes. No obstante, a partir de 4 mg/L de AIB

en el medio de cultivo, empiezan a aparecer casos de necrosis apical en algunos clones más sensibles, siendo la concentración adecuada de AIB en los medios de cultivo, muy dependiente de cada genotipo o clon.

Por otro lado, otra ventaja de invertir la relación auxina/citoquinina respecto a los medios de cultivo tradicionales, es que con la baja concentración de citoquininas utilizada, se ha favorecido la posterior capacidad de enraizar de los explantes, ya que es sabido que las citoquininas residuales empleadas en los medios de multiplicación, pueden tener efecto inhibitorio sobre la rizogénesis (Sauvaire y Galzy, 1981). Resulta también determinante la auxina utilizada; Romano *et al.*, (1992) indicaban una mayor tasa de multiplicación *in vitro* de *Q. suber* empleando ácido indol-acético (AIA), significativamente diferente de las obtenidas con ácido indol-butírico (AIB) o ácido naftalén-acético (ANA), mientras que Pardos (1982) o Manzanera y Pardos (1990), proponían el uso del ANA en la multiplicación. Aunque no se han presentado resultados en este trabajo comparando estas auxinas en la fase de multiplicación, en pruebas preliminares realizadas en medios que contenían una de estas tres auxinas en combinación con el 6-BAP, tan solo se obtuvieron resultados satisfactorios con el AIB, mientras que con AIA y ANA, se obtuvo un elevado número de explantes con “*browning*” y necrosis de los tejidos.

Enraizamiento en *Q. suber*

Las pruebas de enraizamiento indicaron que la concentración de auxinas no influyó significativamente en la capacidad de enraizamiento, pero sí en la incidencia de la necrosis apical, considerándose una concentración idónea entre 3 y 4 mg/L. Concentraciones superiores o tratamientos de oscuridad durante la rizogénesis, aumentaron la incidencia de necrosis apical, problema que se da con frecuencia en el cultivo *in vitro* de especies leñosas (Vieitez *et al.*, 1989; Azofeifa, 2009) y, al que se le atribuyen diferentes causas, entre ellas, la exposición a elevadas concentraciones de hormonas (Bairu *et al.*, 2009). En

cambio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a porcentajes de brotes con necrosis apical entre los tratamientos de 7, 15 y 30 días, pero sí frente al tratamiento del “*dipping*” (en el que se sometía a los explantes a una inmersión de la base en una solución concentrada de AIB), por lo que la aparición de la necrosis apical podría estar más relacionada con la exposición a concentraciones demasiado elevadas de auxinas que a la duración de la exposición de las mismas durante la rizogénesis. Según Van Staden *et al.*, (2006), la aparición de necrosis apical y oxidación de los tejidos depende en mayor medida de las diferencias genéticas entre unas especies y otras, ya que se ha observado que un mismo regulador del crecimiento produce necrosis apical en unas especies y en otras no. Pero en aquellas especies en las que tiene efecto sobre la necrosis apical, éste suele aumentar a medida que aumenta la concentración de auxinas. Además, el papel de las auxinas en los medios de cultivo, puede alterar la producción y disponibilidad de citoquininas endógenas de los explantes cultivados *in vitro* (Bairu *et al.*, 2009). Por ello, la presencia de pequeñas concentraciones de citoquininas en los medios de enraizamiento, como indicaban Vieitez *et al.*, 1989 tanto en alcornoque como en castaño, suelen solventar eficientemente los problemas de necrosis apical. Esas alteraciones tendrían su origen principalmente en la concentración y tipo de las auxinas, como indica Bairu *et al.* (2009), más que en la duración de la exposición a las mismas.

En general, la combinación tanto de la concentración como de la duración del tratamiento con auxinas que mejores resultados proporcionó, fue la exposición de los explantes a medios con 4mg/L de AIB durante 15 días, coincidiendo con los resultados obtenidos por Duarte Gonçalves y Torres Rainho (1993), en micropropagación de alcornoque también. No obstante, la concentración óptima de hormonas es dependiente del genotipo o clon (Carrasquinho de Freitas, 2002), así como también influye el origen, adulto o juvenil, del material vegetal (Cordeiro *et al.*, 2001; Amisah y Bassuk, 2005). En este sentido, el material adulto ha originado mayores dificultades para inducir su enraizamiento *in vitro*, al tiempo que ha sido más propenso a presentar

necrosis apical, con respecto al material juvenil, como también fuese indicado por otros autores (Vieitez et al., 1989; Martin et al., 2007; Bairu et al., 2009).

La exposición de los explantes en medios libres de hormonas como paso previo a la inducción de la rizogénesis, ha reducido la incidencia de la necrosis apical que suele provocar la exposición a concentraciones relativamente elevadas de auxinas, siguiendo en la línea de los resultados obtenidos por otros autores, por ejemplo, en *Quercus robur* (Puddephat et al., 1999). Sin embargo, no ha servido para mejorar los porcentajes globales de enraizamiento, sugiriendo con ello llevar a cabo nuevas pruebas para obtener mayor rendimiento de esta potencial mejora en cuanto a las tasas de enraizamiento.

El tratamiento en oscuridad, indicado en algunos casos para mejorar el efecto de las auxinas o evitar problemas de foto-oxidación (Ribeiro et al., 1996; Azofeifa, 2009), tampoco mejoró los porcentajes de enraizamiento de alcornoques *in vitro*, ni se logró reducir la incidencia de la necrosis apical. Los resultados obtenidos sugieren en nuestro caso, que el tratamiento en oscuridad pudo potenciar el efecto de la auxina utilizada en los medios de cultivo, porque si bien no ha servido para aumentar las tasas de enraizamiento, sí ha tenido sin embargo, mayor efecto sobre la aparición del fenómeno de la necrosis apical que el tratamiento sin oscuridad.

Los diferentes clones (o genotipos) presentaron una gran variabilidad interclonal tanto en las tasas de enraizamiento como en las de necrosis apical, en cada una de las pruebas realizadas, reflejada por la significación mediante el análisis estadístico. Por este motivo, aunque en términos globales pueda verse reflejada una tendencia en los resultados en función del tratamiento, como ha ocurrido en la prueba del efecto de la concentración de auxinas, del efecto de la duración del tratamiento con auxina o del tratamiento en oscuridad en la inducción del enraizamiento, cada clon o genotipo debe ser ensayado para determinar cuáles son las mejores condiciones de cultivo para su enraizamiento.

Dentro de esa gran variabilidad interclonal, cabe destacar que se lograron alcanzar porcentajes de “brotes globales enraizados” del 100% en el

caso de los clones HEE-6 y SBA-326, o del 90% en el caso del CoA-9, igualando e incluso mejorando a los registrados en otros trabajos con *Q. suber*, en los que indican haber superado el 90% de éxito en el enraizamiento *in vitro* de alcornoques (Romano *et al.*, 1992; El Kbiach *et al.*, 2002). No obstante, en nuestro caso, se tuvo en cuenta que algunos de esos brotes enraizados no serían viables debido a la aparición de la necrosis apical, como en el caso del SBA, en el que el 50% de los brotes enraizados eran viables. Sin embargo, en el HEE-6 la incidencia de necrosis apical fue la más baja, llegando a obtener un 100% de “brotes enraizados viables” con el tratamiento previo en medio libre de hormonas antes de su inducción en medios de enraizamiento con AIB.

Por tanto, los resultados de enraizamiento obtenidos en el presente trabajo, pueden contribuir a mejorar la metodología de micropropagación mediante organogénesis de individuos adultos, genotipos o clones, que resultaran de interés por sus especiales características, en programas de propagación, conservación e investigación.

CAPITULO II:

INOCULACIÓN IN VITRO DE PLÁNTULAS DE
ALCORNOCQUE (*Quercus suber*, L.) CON
PHYTOPHTHORA CINNAMOMI

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.1. Origen de las cepas de *P. cinnamomi*.

Para la inoculación *in vitro* de plántulas de alcornoque, se dispuso de tres cepas diferentes de *P. cinnamomi*: las cepas P45 y P37, fueron facilitadas por la Unidade de Ciências y Tecnologías Agrarias de la Universidade do Algarve (Faro) y, procedían de aislados de terrenos muy afectados por la “seca” en la comarca del Andévalo Onubense (término municipal de San Bartolomé de la Torre, Huelva). La cepa P203 fue facilitada por el Servicio Agrario de la Excma. Diputación Provincial de Pontevedra, estación fitopatológica “Do Areeiro” (Pontevedra) y, procedía de aislados de alcornocales afectados por “seca”. La patogenicidad de las cepas utilizadas en este estudio fue testada y publicada por otros autores (Sánchez *et al*, 2000; Mansilla *et al*, 1993).

4.1.2. Cultivo de *P. cinnamomi*.

El micelio de *P. cinnamomi* fue crecido en placas Petri con medio de cultivo clarificado V8 semisólido (Miller 1955). Para la elaboración de este medio de cultivo, se utilizó el zumo de vegetales “V8 Juice Vegetable” (Campbell ®). Por cada litro de zumo, se añadieron 10,36g de carbonato cálcico (CaCO₃) y, se agitó la mezcla durante 30 minutos. Posteriormente, el preparado se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos a 25 °C de temperatura. Una vez centrifugado, se separó el sobrenadante, se hizo pasar por papel de filtro y, el volumen se enrasó con agua destilada a una proporción de 1/10 (100ml de sobrenadante filtrado por cada litro de disolución). Por último, se añadieron 15g/L de agar y, se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

Las placas con micelio se mantuvieron en cámara de cultivo en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 25 °C, realizando transferencias periódicas a medio fresco cada 30 días, de fragmentos de 0,25cm², para mantener los cultivos de micelio en crecimiento activo.

4.1.3. Origen y preparación de las plántulas de *Q. suber* para su inoculación *in vitro* con *P. cinnamomi*.

Las plantas empleadas consistieron en plántulas de *Q. suber* enraizadas *in vitro* en medio MSR4, que al cabo de 15 días, se transfirieron a recipientes similares, que contenían vermiculita y medio de cultivo líquido básico (sin hormonas de crecimiento), al que se denominó MSV. El medio básico estaba compuesto por las sales MS (con macronutrientes reducidos a la mitad de su concentración original), y sacarosa (30g/L). Los envases de vidrio contenían 50ml de vermiculita, la cual fue empapada hasta la superficie con el medio básico, pero sin llegar a saturar completamente el sustrato. Posteriormente, se autoclavaron a 121°C durante 20 minutos.

4.1.4. Preparación de inóculo de *P. cinnamomi* en medio V8 líquido.

La preparación del inóculo de *P. cinnamomi* para infestar las plántulas de alcornoque, se realizó a partir de una modificación del protocolo descrito por Chen y Zentmyer (1969, 1970). En nuestro caso, se utilizaron matraces de 500ml de capacidad, con 200ml de medio V8 líquido cada uno (2 matraces para cada cepa), del mismo modo descrito anteriormente para el medio V8 semisólido, pero sin agar. En cada matraz, se introdujo un fragmento de 1cm², con micelio fresco de *P. cinnamomi* del margen de una colonia crecida en medio V8

semisólido durante 10 a 12 días. Estos matraces se mantuvieron en agitación (a 50 rpm) en un agitador orbital (mod. IKA KS 260 basic), en condiciones de oscuridad y temperatura ambiental de 25°C, durante 6 días.

El tiempo de cultivo se estimó previamente tras la observación al microscopio de la evolución del micelio a lo largo de 10 días, teniendo en cuenta la densidad de estructuras de reproducción, siendo en su mayoría clamidiosporas, aunque de forma menos frecuente también se pudieron observar esporangios y zoosporas enquistadas.

4.1.5. Efecto de la dosis de inóculo de *P. cinnamomi* en plántulas de *Q. suber* inoculadas *in vitro*.

A partir de suspensiones de medio de V8 líquido (preparado tal y como se ha descrito en el apartado anterior) en las que habían estado creciendo cada una de las tres cepas de *P. cinnamomi* durante 6 días, se prepararon dos soluciones con diferente concentración del sobrenadante y, un blanco (o control) con agua desionizada autoclavada únicamente, tal y como se detalla a continuación:

Tabla 4.1. Dosis de inóculo empleadas para la infección *in vitro* de plántulas de *Q. suber*.

Dosis	Volumen inicial de suspensión de cultivo en V8	Volumen final de la solución de inóculo
0	0 (solo agua)	100 ml
1	6 μ l (2 μ l/cepa)	100 ml
2	6 ml (2ml/cepa)	100 ml

Las soluciones (o dosis) se prepararon en la cámara de flujo laminar, para evitar contaminaciones cruzadas, empleando agua desionizada autoclavada y utensilios previamente autoclavados también.

Cada dosis, fue probada en tres clones diferentes (SAA-361, SALG-297 y HEE-6), con 3 plántulas por cada clon y dosis. Se utilizaron para ello, plántulas enraizadas dispuestas en medio MSV, en el que habían sido mantenidas durante 15 días, para el desarrollo y endurecimiento de sus raíces.

La inoculación se llevó a cabo empapando la vermiculita con unos 35 ml de suspensión de inóculo por cada plántula, hasta 2 mm antes de la superficie de la misma. De esta manera, se simulaba un estado de encharcamiento similar al que se produciría en la naturaleza, que en este caso duraba tan solo unas 24 horas, quedando un sustrato húmedo y aireado pasado esas primeras horas.

A los 17 días de la inoculación, se valoró la aparición de síntomas visibles en la parte aérea de la planta y, el tiempo en aparecer y extenderse el micelio en la superficie del sustrato, mediante los siguientes parámetros:

- **Tmp1Mic:** Tiempo en aparecer micelio visible en el sustrato o sobre su superficie;
- **TmpMicTt:** Tiempo en extenderse totalmente el micelio por la superficie desde su aparición en el sustrato;
- **Tmp1Sint:** Tiempo en aparecer los primeros síntomas de afectación en la parte aérea de la plántula desde la inoculación;
- **TmpNecTt:** Tiempo en producirse la necrosis total de la parte aérea de la plántula desde el inicio de la prueba.
- **VelNecTt:** Tiempo en producirse la necrosis total de la parte aérea de la plántula desde la aparición de los primeros síntomas.
- **ExtSintA:** presencia o ausencia de extensión de los síntomas de necrosis en la parte aérea de la planta.
- **%NecTtA:** porcentaje total de necrosis en la parte aérea de la plántula.

4.1.6. Efecto del tiempo de inoculación sobre el estado sanitario de las plántulas de *Q. suber* inoculadas.

Con el fin de comparar los efectos a lo largo del periodo de inoculación *in vitro*, se observaron las diferencias tanto en la parte aérea como radical entre plántulas control e inoculadas, a los 6 y 14 días tras la inoculación. Se usaron 17 plántulas enraizadas *in vitro* del clon CoA-47, que habían estado previamente en medio MSV durante 15 días. Nueve de ellas fueron inoculadas con suspensión de inóculo de las tres cepas de *P. cinnamomi*, correspondiente a la dosis 2 y, a las otras 8 se les añadió una cantidad semejante de agua autoclavada, que fueron consideradas como control. De tal manera que a los 6 y 14 días tras la inoculación, se seleccionaron al azar 4 plántulas inoculadas y 4 control en cada muestreo. Por tanto, de cada plántula se dispuso de una medida no destructiva al inicio del ensayo y otra medida destructiva a los 6 ó 14 días tras la inoculación. Se tomaron observaciones y medidas de los siguientes parámetros:

- **LT:** longitud del tallo (mm)
- **PT:** peso fresco del tallo (mg)
- **DT:** diámetro del tallo (mm)
- **VT:** valoración del tallo. Se empleó una escala del 1 al 5 en función de la extensión de los síntomas de necrosis, de manera que, (1) equivale a un tallo totalmente verde y vigoroso; (2), corresponde a un tallo con alguna hoja necrosada o con manchas de necrosis; (3), corresponde a un tallo con un 50% de necrosis; (4), corresponde a un tallo que aún conserva alguna hoja o parte del tallo verde y; (5), corresponde a un tallo totalmente necrosado incluidas las hojas.
- **NH:** número de hojas
- **NR:** número de raíces

- **LR:** longitud de raíces (mm)
- **LRN:** longitud de raíces necrosadas (mm)
- **PR:** peso fresco de raíces (mg)
- **DR:** diámetro de raíz (mm). En este caso se obtuvieron los valores promedio del diámetro en tres zonas de la raíz, la zona 1 es la más próxima al callo; la zona 2 es la zona intermedia de la raíz y; la zona 3 es la zona distal o extremo de la raíz. El resultado mostrado en las tablas corresponde al promedio de la medida obtenida en las tres zonas de cada raíz.
- **PC:** peso fresco del callo (mg)
- **DC:** diámetro del callo. Se realizó una valoración visual, estableciendo una escala del 1 al 3, de forma que **(1)** corresponde a callo pequeño ($\varnothing < 2\text{mm}$), **(2)** corresponde a callos de grosor intermedio ($2 < \varnothing < 5\text{mm}$) y, **(3)** corresponde a callos gruesos ($\varnothing > 5\text{mm}$).

A partir de estos parámetros se obtuvieron las siguientes variables relativas:

- **ΔrelVT** (incremento relativo de la valoración del tallo): es el cociente entre el incremento de la valoración (final - inicial) y la valoración inicial.
- **ΔrelLT** (incremento relativo del tallo): es el cociente entre el incremento de la longitud del tallo (final - inicial) y la longitud inicial.
- **$\Delta\text{relN}^{\circ}\text{H}$** (incremento relativo del número de hojas): es el cociente entre el incremento del número de hojas (final - inicial) y las hojas iniciales.
- **PT/LT** : relación entre peso fresco y longitud del tallo
- **DenT** : densidad del tallo, es la relación entre el PT y el volumen promedio del tallo (sección promedio de tallo \times LT). $\text{DenT} = \text{PT} / ((\pi/4) \times \text{DT}^2) \times \text{LT}$
- **ΔrelLR** (incremento relativo de la longitud de raíces): es el cociente entre el incremento de la longitud de raíces (final - inicial) y la longitud inicial.

- $\Delta\text{relN}^{\circ}\text{R}$ (incremento relativo del número de raíces): es el cociente entre el incremento del número de raíces (final – inicial) y las raíces iniciales.
- PR/LR : relación entre peso fresco y longitud total de las raíces
- **DenR**: densidad de raíz, es la relación entre el PR y el volumen promedio de la raíz (sección promedio de raíz x LR). $\text{DenR}=\text{PR}/((\pi/4)\times\text{DR}^2)\times\text{LR}$
- LRN/LR : relación entre la longitud de raíz necrosada y la longitud total de raíz.

Las medidas de peso realizadas, se han referido en todos los casos a peso fresco, ya que gran parte de las muestras fueron empleadas en cultivos en medios específicos para comprobación de la infección (ver más adelante), así como para observaciones histológicas.

4.1.7. Efecto de la inoculación *in vitro* con *P. cinnamomi* sobre la capacidad de tolerancia/resistencia de clones de *Q. suber*.

Se inocularon *in vitro* un total de 64 explantes de 5 clones distintos de *Q. suber*. La inoculación se llevó a cabo tal y como se ha descrito en el apartado anterior, empleando la dosis 2 de suspensión de inóculo.

Tras la transferencia de las plántulas a medio MSV, se mantuvieron durante 15 días en las mismas condiciones de cultivo que en las fases anteriores. Al cabo de ese tiempo, dentro de la cabina de flujo laminar, se les añadió suspensión de inóculo a 2/3 de las plántulas de cada clon (42 plántulas) y, agua desionizada autoclavada al 1/3 restante (22 plántulas), empapando el sustrato hasta 2mm por debajo de la superficie. Posteriormente, las plántulas se volvieron a dejar en la cámara de cultivo durante los 15 días que duró el ensayo, en las mismas condiciones de cultivo con que habían sido mantenidas hasta el momento. Para comparar el efecto de la inoculación, se tomaron

observaciones de la parte aérea y radicular de cada plántula en el momento de ser transferidas al medio MSV y, al final del ensayo, utilizando los mismos parámetros descritos en el apartado anterior.

4.1.8. Re-aislamiento del patógeno en cultivo puro.

Para comprobar que las raíces de las plántulas estaban infectadas con *P. cinnamomi* y por tanto, se pudieran atribuir a dicha infección los síntomas observados en las plántulas tras la inoculación, se realizaron cultivos de las raíces, tallos y hojas de las plántulas infectadas y de los controles, una vez acabado el ensayo, en medio selectivo V8-NARPH (Jeffers y Martin, 1986). Para preparar este medio de cultivo, se elaboró el medio V8 semisólido como se ha descrito en el apartado 4.1.2. En el momento de autoclavar, por cada litro de medio de cultivo, se separó una pequeña (100ml aproximadamente), autoclavando en recipientes separados. Una vez que hubo descendido la temperatura hasta los 50°C aproximadamente tras el autoclavado y, antes de que solidificara, se añadieron los siguientes productos antibióticos en el volumen menor separado:

- Nistatina (disuelta previamente en DMSO) 30 mg/L
- Ampicilina sódica 250 mg/L
- Rifampicina (disuelta previamente en DMSO) 10 mg/L
- Penta-cloro-nitro-benceno 100 mg/L
- Himexazol 71 mg/L

La mezcla se agitó hasta disolver correctamente todos los antibióticos y se añadieron al resto del medio de cultivo, repartiéndolo en placas Petri de 9mm de diámetro, dentro de la cabina de flujo laminar.

4.1.9. Análisis de los resultados de inoculación.

Se recogieron datos tanto de la parte aérea como radical de todas las plántulas empleadas en el ensayo. En el caso de los parámetros o variables relacionadas con la parte aérea de la planta, los datos recogidos corresponden a observaciones realizadas a lo largo de los 15 días que duró la prueba, mientras que de la parte radical, sólo se tomaron observaciones al inicio y al final del ensayo (o bien en intervalos concretos según el ensayo), ya que las medidas suponían la extracción de la plantas del sustrato en el que estaban cultivadas.

Dado que algunas variables en las que se evaluó un tratamiento a lo largo del tiempo, no respondían a una distribución normal debido a que la probabilidad de que ocurra un suceso por efecto del tratamiento, aumenta con el tiempo, el análisis de varianza no sería el más indicado para esos casos. Es lo que ocurre con algunas de las variables de la parte aérea en los ensayos de inoculación, por lo que para analizar esas variables, se ha empleado el análisis de supervivencia. Este tipo de análisis permite la relación de una variable dependiente con la supervivencia de un grupo de individuos, o más concretamente, con el riesgo de que durante el transcurso de un periodo de tiempo, se produzca en ellos un suceso o evento. Estos análisis parten de los supuestos de que el suceso debe ser irreversible y debe poder ocurrir una sola vez, como ocurre con la aparición de la necrosis en nuestras plantas. Aquellos casos en los que no ocurre el suceso, se denominan “censurados” y, son tenidos en cuenta por el análisis para el cálculo de la probabilidad de que ocurra el suceso.

De esta manera, las variables Tmp1Mic, TmpMicTt y Tmp1Sint (tanto en la prueba de dosis como en la de capacidad de resistencia/tolerancia entre

clones) fueron analizadas mediante tablas de mortalidad (Bowers *et al.*, 1997; Rebasa, 2005), ya que en estos casos, se trata simplemente de evaluar la probabilidad de que ocurra un suceso a lo largo del tiempo, a partir de un mismo momento de tratamiento y sin que exista salida de individuos durante el transcurso del ensayo para estas variables. Para ello se definieron intervalos de tiempo de 3 días para agrupar los casos en los que ocurría el suceso (aparición de micelio o de síntomas de necrosis en la plántula) o no ocurría. En la prueba de dosis, se usó la “dosis” como factor fijo, mientras que en la de capacidad de resistencia/tolerancia, se utilizó el “clon” como factor fijo y el “tratamiento” como variable de estratificación para comparar los clones, empleando el estadístico de Wilcoxon-Gehan para el contraste de cada variable dependiente. El análisis mediante tablas de mortalidad sigue un modelo matemático que de forma simplificada se representaría con la fórmula,

$$S(t_i) = \sum_{t=1}^i k P (K = k_{t_i})$$

donde $S(t_i)$ es la esperanza de que ocurra un suceso en el momento t_i ; k es el valor esperado para un variable K dependiente del tiempo y P , es la función de probabilidad de que K obtenga el valor esperado en el momento t_i .

Por su parte, las variables TmpNecTt y VelNecTt (tanto en la prueba de dosis como en la de capacidad de resistencia/tolerancia entre clones), se analizaron mediante regresión de Kaplan-Meier (Rebasa, 2005; Camilli *et al.*, 2014), ya que este modelo tiene en cuenta aquellos individuos o casos que salen del ensayo (aquellos que alcanzaron la necrosis total antes de finalizar el ensayo), incluyéndolos en el análisis para el cálculo de la probabilidad de que ocurra el suceso que se estudia, en nuestro caso, la necrosis total de la planta. Para este modelo, se usó la “dosis” como factor fijo en la prueba de dosis, mientras que en la de capacidad de resistencia/tolerancia, se utilizó

alternativamente el “clon” y el “tratamiento” como factor fijo o factor de estratificación, para comparar el efecto sobre el clon o el tratamiento respectivamente, empleando el estadístico de Breslow para el contraste de cada variable dependiente. El modelo matemático que sigue el análisis de Kaplan-Meier se puede representar simplificada por la siguiente fórmula:

$$S(t_i) = \frac{r_i - m_i}{r_i} \cdot S(t_{i-1})$$

donde para cada instante de tiempo (t_i), la supervivencia (S) se calcula como la supervivencia en el instante anterior ($S_{t_{i-1}}$) multiplicada por la tasa de supervivencia en el instante i ($(r_i - m_i)/r_i$), siendo r_i el número de casos que continuaban en el estudio en el instante i (expuestos al riesgo) y, m_i , el número de casos que presentan el suceso o evento en ese instante i .

El resto de variables obtenidas de la parte aérea (ExtSintA y %NecTtA), así como los parámetros relacionados con la parte radical, se compararon mediante análisis de varianza, a través de un test ANOVA realizado con el programa estadístico SPSS, empleando el “tratamiento” y el “día” como factores fijos (caso de la prueba del efecto del tiempo de inoculación), o el “tratamiento” y el “clon” (caso de la prueba del efecto de la inoculación sobre la tolerancia/resistencia de diferentes clones), teniendo en cuenta en ambos casos, la interacción entre ambos factores. El contraste de los estadísticos globales de cada variable dependiente se llevó a cabo mediante el estadístico de Tukey.

4.2. RESULTADOS.

4.2.1. Efecto de la dosis de inóculo de *P. cinnamomi* en plántulas de *Q. suber* inoculadas *in vitro*.

La inoculación *in vitro* de las plántulas de alcornoque con *P. cinnamomi*, produjo como primera evidencia, la aparición de micelio en el sustrato y sobre la superficie del mismo. Este micelio se hizo visible durante los primeros días tras la inoculación, especialmente, tras el segundo y tercer día. Al cabo de los 17 días que duró la prueba, el micelio de *P. cinnamomi* había invadido totalmente la superficie del sustrato en la mayoría de casos. La aparición del micelio en los sustratos inoculados, no estuvo necesariamente asociada a la aparición de síntomas de afectación en las plántulas, sino que esos síntomas fueron apareciendo posteriormente, evolucionando progresivamente hasta llegar a una necrosis total de la plántula en la mitad de las plántulas inoculadas (en 9 de 18 plántulas inoculadas), con independencia de la dosis empleada. El síntoma más evidente del efecto de la inoculación fue la aparición de necrosis del tejido vegetal (tabla 4.2), en las hojas, en los ápices, en los tallos, o de forma generalizada en toda la parte aérea.

En algunos casos, esa necrosis fue precedida de síntomas de deshidratación y/o palidez de la coloración del tejido de la parte aérea, aunque en la mayoría de ellas, estos cambios fueron casi inapreciables a simple vista. Por su parte, en las plántulas control, se observaron algunos síntomas de necrosis (en 7 de las 9 plántulas), sobretodo en ápices, pero apenas presentaron evolución en los días que duró la prueba. Así como tampoco se observó aparición de micelio en el sustrato ni sobre su superficie.

Tabla 4.2. Efecto de la dosis de inóculo de *P. cinnamomi* en la sintomatología de la parte aérea de plantas de *Q. suber*.

Promedios y error típico							
Dosis	n*	Tmp1Mic (días)	TmpMicTt (días)	Tmp1Sint (días)	ExtSintA	VelNecTt (días)	Nº plantas nec. aérea
D0	9	-	-	4,29 ± 0,89 ^a	No	>17	0
D1	9	4,33 ± 0,90 ^b	13,33 ± 1,12 ^a	6,71 ± 1,02 ^a	Si	8,60 ± 1,86 ^a	7
D2	9	6,00 ± 1,46 ^a	10,05 ± 1,50 ^b	4,57 ± 0,97 ^a	Si	7,00 ± 1,92 ^a	6

Análisis estadístico					
Test estadístico	Tablas de mortalidad	Tablas de mortalidad	Tablas de mortalidad	ANOVA	Kaplan-Meier
Nivel de signif. respecto a la dosis	0,001	0,016	0,229	0,001	0,218

*n (número de plantas en cada nivel de dosis); **Tmp1Mic** (días en aparecer micelio en la superficie del sustrato); **TmpMicTt** (días en invadir el micelio totalmente la superficie del sustrato); **Tmp1Sint** (días en aparecer los primeros síntomas de necrosis); **ExtSintA** (extensión de los síntomas de necrosis en parte aérea); **VelNecTt** (días desde la aparición de necrosis hasta la necrosis total); **Nº plantas nec. aérea** (número de plantas que presentan síntomas de necrosis en la parte aérea).

El análisis de los resultados mostró diferencias significativas para TmpMicTt ($p < 0,016$) con respecto a la dosis utilizada (tabla 4.2). De este modo el desarrollo del micelio en los sustratos donde se aplicó la dosis 2 (D2) presentó un promedio de 4 días desde su aparición (Tmp1Sin) hasta la invasión total de la superficie del sustrato (TmpMicTt), mientras que en los que se aplicó la dosis 1 (D1), fue de 9 días, siendo por tanto, más rápido para la D2 que para la D1.

El número de plántulas afectadas por síntomas de necrosis en la parte aérea, fue casi idéntico tanto para la D1 como para la D2 (7 y 6 plantas respectivamente), así como aquellas que presentaron necrosis total de la parte aérea (5 y 4 plantas respectivamente). En cambio, el promedio de días que tardaron las plántulas en presentar los primeros síntomas, para la D1 fue de 6,71 días, mientras que para la D2 fue de 4,57 días, no representando diferencias significativas según el análisis estadístico. Por su parte, el promedio de días para una necrosis total de la parte aérea (VelNecTt) no presentó diferencias

estadísticamente significativas ($p < 0,218$) entre ambas dosis de inóculo, siendo de 8,6 días para la D1 y, de 7 días para la D2.

Con estos resultados, observamos que la dosis más alta afecta más rápidamente al desarrollo del micelio y, aunque en ambas dosis, el desarrollo de síntomas de necrosis en las plántulas se hizo evidente en el plazo establecido para el ensayo sin diferencias estadísticas entre ambas, el promedio de días para la necrosis total con la D2 fue menor que para la D1.

Los síntomas en la parte aérea de las plántulas inoculadas se localizaron principalmente en el ápice, extendiéndose progresivamente hacia el resto del tallo. En algunos casos, los síntomas empezaron a aparecer por las hojas, siendo menos frecuente que aparecieran de forma generalizada por todo el tallo.

Cabe mencionar, que la invasión total de la superficie del sustrato ha solido llevar asociada la invasión de la parte aérea de la planta, con la progresiva afectación de la misma, especialmente en la zona basal, es decir, en la zona de contacto con el micelio del patógeno, tanto en la D1 como en la D2. Esa afectación se ha manifestado por necrosis de la base del tallo y de las hojas basales, desde su peciolo hasta el extremo de la hoja, que luego se ha extendido progresivamente al resto de la parte aérea de la plántula.

4.2.2. Efecto del tiempo de inoculación sobre el estado sanitario de las plántulas de *Q. suber* inoculadas con *P. cinnamomi*.

Tanto el tratamiento de inoculación (Trat) como el tiempo transcurrido tras la inoculación (Día), mostraron una influencia significativa en algunos de los parámetros relacionados con la parte aérea y radical de las plántulas estudiadas (tabla 4.3).

Tabla 4.3. Nivel de significación del ANOVA de dos factores en la inoculación *in vitro* de *Q. suber* respecto a los factores "tratamiento" y "tiempo de inoculación" ($\alpha < 0,05$)

Parte aérea	Variables dep.	VT	Nº Hojas	PT (mg)	LT (mm)	DT (mm)
	Tratamiento	0,001	0,131	0,149	0,937	0,371
	Día	0,001	0,228	0,907	0,733	0,008
	Interacción	0,001	0,694	0,561	0,753	0,017

Parte radical	Variables dep.	PC (mg)	NºR	PR (mg)	LR (mm)	LRN (mm)	DR (mm)
	Tratamiento	0,008	0,395	0,002	0,001	0,001	0,962
	Día	0,424	0,210	0,307	0,014	0,464	0,927
	Interacción	0,260	0,502	0,625	0,316	0,454	0,393

(*) Análisis realizado a partir de los resultados obtenidos de 9 plántulas inoculadas y 8 plántulas control del clon C47, a los 6 y 14 días tras la inoculación de *P. cinnamomi* en MSV.

Tabla 4.4. Promedios y error típico de las variables relacionadas con el tamaño y estado sanitario de plántulas del clon C47 a los 6 y 14 días tras la inoculación.

Parte aérea	Trat	Día	n	VT	Nº Hojas	PT (mg)	LT (mm)	DT (mm)
	C	0	4	1,0 ± 0,0	9,8 ± 1,8		15,0 ± 1,5	
C	6	4	1,0 ± 0,0 ^a	9,5 ± 1,4 ^a	46,9 ± 9,3 ^a	15,0 ± 1,2 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	
I	0	4	1,0 ± 0,0	11,5 ± 0,3		14,8 ± 1,9		
I	6	4	1,0 ± 0,0 ^a	11,3 ± 0,6 ^a	59,2 ± 10,7 ^a	15,3 ± 2,9 ^a	0,9 ± 0,04 ^a	
C	0	4	1,0 ± 0,0	8,5 ± 0,7		15,0 ± 1,2		
C	14	4	1,3 ± 0,3 ^b	8,8 ± 0,6 ^a	45,3 ± 7,8 ^a	16,3 ± 1,8 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	
I	0	5	1,2 ± 0,2	10,6 ± 1,2		15,2 ± 1,8		
I	14	5	4,6 ± 0,4 ^c	9,8 ± 0,6 ^a	66,3 ± 9,9 ^a	15,8 ± 1,2 ^a	0,6 ± 0,03 ^b	

Parte radical	Trat	Día	n	PC (mg)	NºR	PR (mg)	LR (mm)	LRN (mm)	DR (mm)
	C	0	4			2,5 ± 0,8		16,5 ± 5,5	0
C	6	4		37,1 ± 12,4 ^a	2,8 ± 0,9 ^a	38,0 ± 5,5 ^a	82,0 ± 17,6 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,9 ± 0,1 ^a
I	0	4			3,3 ± 0,5		26,5 ± 8,2	0	
I	6	4		83,0 ± 16,7 ^b	4,0 ± 0,7 ^a	92,2 ± 17,2 ^b	175,0 ± 24,2 ^d	17,8 ± 2,6 ^b	0,8 ± 0,02 ^a
C	0	4			2,5 ± 1,3		16,8 ± 6,1	0	
C	14	4		25,3 ± 4,2 ^a	2,3 ± 0,9 ^a	31,0 ± 7,3 ^a	52,8 ± 16,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,1 ^a
I	0	5			2,6 ± 1,2		37,4 ± 9,3	0	
I	14	5		133,0 ± 37,1 ^b	2,4 ± 0,7 ^a	72,8 ± 13,9 ^b	112,0 ± 4,8 ^c	23,2 ± 5,6 ^b	0,9 ± 0,1 ^a

n (número de plántulas utilizadas por cada tratamiento y día); VT (valoración del tallo); PT (peso fresco del tallo); LT (longitud del tallo); DT (diámetro del tallo); PC (peso fresco del callo); NºR (número de raíces); PR (peso fresco de raíces); LR (Longitud de raíces); LRN (longitud de raíz necrosada); DR (diámetro promedio de las raíces). Aquellas variables para las que no existe un valor para el día 0, es porque no fue posible obtenerlo al tratarse de una medida destructiva. Las letras diferentes indican diferencias significativas mediante test de ANOVA ($\alpha < 0,05$)

La VT no presentó cambios significativos entre los dos tratamientos desde el día de la inoculación hasta el 6° día, ni en plántulas inoculadas ni en las plántulas control (tabla 4.4). En cambio, el deterioro es significativo al cabo de los 14 días ($p < 0,001$) en las plántulas inoculadas, donde se obtuvo una media de valoración de 4,6, mientras que en los controles se mantuvo con una valoración media de 1,3. A los 14 días, incluso en los controles aparecen algunos síntomas de deterioro respecto a los datos del día 0 (1,3 frente a 1,0), o los controles recogidos al 6° día (1,0). Sin embargo, como se mencionó en el apartado anterior, estos síntomas no mostraron progresión.

El número de hojas, el peso (PT) y la longitud de tallo (LT), no presentaron diferencias significativas respecto a ninguno de los dos factores ni su interacción. No obstante, cabe mencionar que las plántulas experimentaron un ligero crecimiento en longitud durante el periodo de prueba según las diferencias observadas entre los promedios obtenidos entre los días 0 y 6°, ó entre los 0 y 14° días, independientemente de que hubieran sido o no inoculadas con *P. cinnamomi*.

El DT presentó diferencias significativas respecto al tiempo y a la interacción de los dos factores ($p < 0,008$ y $p < 0,017$ respectivamente), de modo que, si bien no hay cambios significativos en el diámetro de las plántulas desde el inicio de la inoculación y el 6° día, respecto de ningún factor ni su interacción, a los 14 días, el promedio del diámetro de las plántulas inoculadas fue muy inferior (0,6mm) al presentado a los 6 días (0,9mm), o al de sus respectivos controles (0,8mm).

El PC no presentó diferencias significativas entre el 6° y 14° día de muestreo tras la inoculación, pero sí entre los tratamientos ($p < 0,008$), de manera que las plántulas inoculadas casi triplicaron el peso del callo al 6° día, y lo superaron en más de 5 veces a los 14 días tras la inoculación, respecto a los respectivos controles. Esto se correspondió con un gran desarrollo del callo, que partiendo de un promedio inicial de 2mm de diámetro, alcanzó más de 10mm a

los 14 días en las plantas inoculadas, mientras que en las plántulas control, los promedios oscilaron entre los 2mm iniciales y los 8mm a los 14 días.

La longitud de raíces (LR) aumentó significativamente con el transcurso de los días ($p < 0,014$), ya que tanto en los controles como en las plántulas inoculadas, se observó un aumento de dicha longitud tanto al 6° como al 14°, respecto al día 0. Además, las diferencias entre los tratamientos también fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$). La proporción con la que aumenta la longitud de las raíces entre controles y plántulas inoculadas va disminuyendo respecto al tiempo, es decir, que al 6° tras la inoculación fue de 6,6 en las inoculadas (175/26,5) y 5 en los controles (82/16,5), mientras que al 14° día tras la inoculación fue de 2,99 en las inoculadas (112/37,4) y 3,14 en los controles (52,8/16,8).

El PR tampoco presentó diferencias significativas entre el día 6° y 14° tras la inoculación, pero sí fueron significativas las diferencias entre los tratamientos ($p < 0,002$), de modo que el peso promedio de las raíces en las plántulas inoculadas estuvo en torno a 2,5 veces el peso promedio de las plántulas control, en ambos días de muestreo.

La LRN tan solo se vió influenciada significativamente por el factor tratamiento ($p < 0,001$), de forma que en los controles no se registró ningún fragmento con necrosis, mientras que en las plantas inoculadas sí que los hubo, independientemente del día de observación. Aunque el análisis estadístico no otorga diferencias significativas entre los dos días de observación tras la inoculación, los promedios globales apuntan a un importante aumento de la longitud necrosada del día 14° (23,2cm) respecto al 6° (17,8cm).

El número de raíces (N°R) y el diámetro de raíz (DR), no se vieron influenciados significativamente respecto al tratamiento ni respecto a la duración del mismo, durante el periodo que duró esta prueba, así como tampoco respecto a la interacción entre ambos factores.

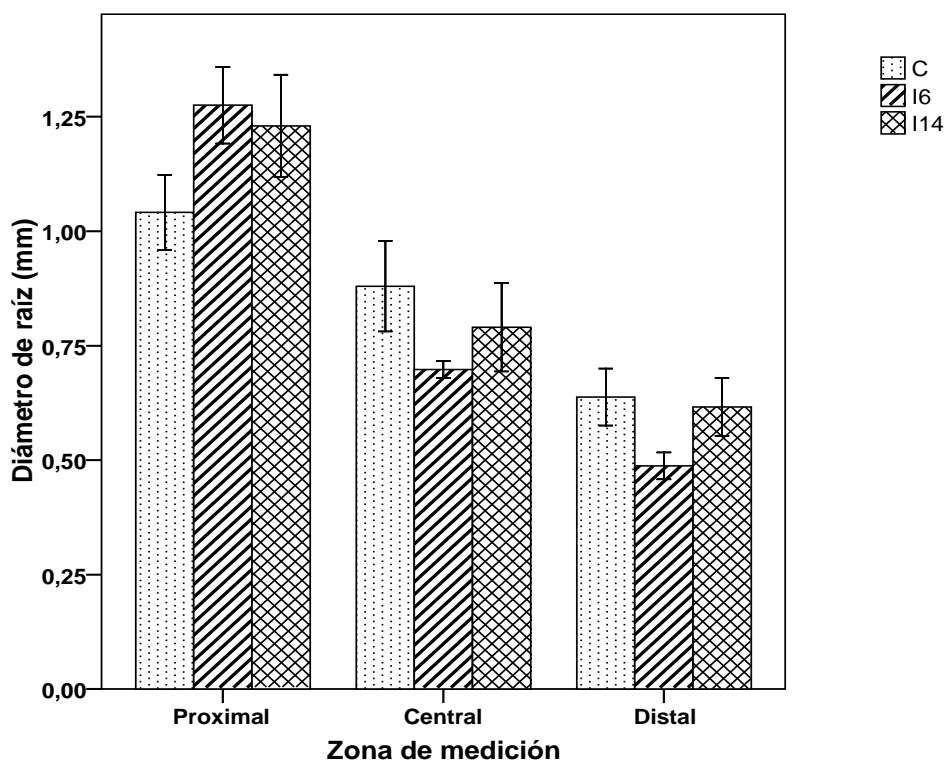


Figura 18. Diámetro de la raíz de las plántulas del clon C47 en función de la zona de medida. (C), plántulas control; (I6) e (I14) medida a los 6 y 14 días de inoculación respectivamente.

El valor promedio del diámetro de las raíces en las tres zonas donde fue medido (figura 18), fue superior en la zona proximal en las plántula inoculadas respecto a los controles, tanto a los 6 como a los 14 días tras la inoculación. En cambio, en la zona intermedia (central) y distal, dicho promedio descendió a los 6 días respecto a los controles, diferencia que desapareció a los 14 días.

La matriz de correlación de Pearson realizada con los parámetros relacionados con el desarrollo y estado sanitario de las plántulas control únicamente (tabla 4.5), indicó una correlación significativa y positiva entre las variables N°R y PR por un lado y, PT y N°H por otro. Esta última, estuvo correlacionada negativamente con el PC. El mismo análisis realizado únicamente para las plantas inoculadas (tabla 4.6), permitió observar una

correlación significativa y negativa entre VT y DT y, entre VT y LR. El N°R presentó una correlación significativa y positiva con LR y PR, al igual que ocurrió entre LT y PT y, PC y DR.

Tabla 4.5. Matriz de correlación de Pearson entre los parámetros del desarrollo y estado sanitario de plántulas control del clon C47 (n=8).

	VT	N°H	PT	LT	DT	PC	N°R	PR	LR	LNR	DR
VT	1										
N°H	0,168	1									
PT	0,136	0,717(*)	1								
LT	0,615	0,174	-0,003	1							
DT	0,560	-0,511	-0,379	0,275	1						
PC	-0,385	-0,797(*)	-0,555	-0,236	0,529	1					
N°R	-0,359	-0,302	-0,232	0,132	0,076	0,457	1				
PR	-0,443	0,014	0,164	0,042	-0,093	0,434	0,473	1			
LR	-0,340	-0,316	-0,339	0,209	0,268	0,638	0,902(**)	0,578	1		
LNR	.(a)	.(a)	.(a)	.(a)	.(a)	.(a)	.(a)	.(a)	.(a)	.(a)	
DR	0,024	-0,191	0,084	0,009	0,368	0,473	-0,289	0,529	0,001	.(a)	1

(*) La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral). (**) La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). (a) No se puede calcular porque al menos una variable es constante.

Tabla 4.6. Matriz de correlación de Pearson entre los parámetros del desarrollo y estado sanitario de plántulas del clon C47 inoculadas *in vitro* con *P. cinnamomi* (n=9).

	VT	N°H	PT	LT	DT	PC	N°R	PR	LR	LRN	DR
VT	1										
N°H	-0,614	1									
PT	0,218	0,214	1								
LT	-0,091	0,595	0,672(*)	1							
DT	-0,838(**)	0,500	-0,049	0,123	1						
PC	0,222	-0,350	0,168	0,125	-0,355	1					
N°R	-0,464	0,247	0,243	0,192	0,579	0,289	1				
PR	-0,457	0,398	-0,025	0,123	0,195	0,448	0,703(*)	1			
LR	-0,731(*)	0,562	0,139	0,238	0,626	-0,111	0,735(*)	0,613	1		
LRN	0,341	-0,152	0,372	-0,152	-0,370	-0,237	-0,515	-0,497	-0,224	1	
DR	0,054	0,015	0,191	0,465	-0,192	0,781(*)	0,178	0,411	-0,188	-0,474	1

(*) La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral). (**) La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

A fin de profundizar algo más en el análisis de estos resultados, se extrajeron algunas variables relativas (tabla 4.7 y 4.8), obtenidas bien a partir de los valores de cambio respecto a los valores iniciales de los parámetros medidos (ΔrelVT , $\Delta\text{relN}^\circ\text{H}$, ΔrelLT , $\Delta\text{relN}^\circ\text{R}$ y ΔrelLR), bien por combinación de los parámetros medidos (PT/LT, DenT, PR/LR, DenR y LRN/LR).

Tabla 4.7. Nivel de significación para las variables relativas obtenidas a partir de los datos del desarrollo y estado sanitario de plántulas del clon C47, obtenido mediante ANOVA bifactorial respecto al tratamiento, la duración y su interacción

		ΔrelVT	$\Delta\text{relN}^\circ\text{H}$	ΔrelLT	PT/LT	DenT
Parte aérea	Tratamiento	0,004	0,555	0,534	0,079	0,042
	Día	0,001	0,977	0,300	0,029	0,036
	Interacción	0,004	0,555	0,600	0,530	0,029
		$\Delta\text{relN}^\circ\text{R}$	ΔrelLR	PR/LR	DenR	LRN/LR
Parte radical	Tratamiento	0,140	0,522	0,990	0,909	0,001
	Día	0,037	0,261	0,225	0,155	0,155
	Interacción	0,254	0,855	0,830	0,243	0,155

(*) Análisis realizado a partir de los resultados obtenidos de 9 plántulas inoculadas y 8 plántulas control del clon C47, a los 6 y 14 días tras la inoculación. ΔrelVT (incremento relativo de la valoración del tallo); $\Delta\text{relN}^\circ\text{H}$ (incremento relativo del número de hojas); ΔrelLT (incremento relativo del tallo); PT (peso del tallo); LT (longitud del tallo); DenT (densidad del tallo); $\Delta\text{relN}^\circ\text{R}$ (incremento relativo del número de raíces); ΔrelLR (incremento relativo de la longitud de raíces); PR (peso de raíces); LR (longitud de raíces); DenR (densidad de raíz); LRN (longitud de raíz necrosada).

El incremento relativo de la valoración del tallo (ΔrelVT) presentó diferencias significativas respecto al factor tratamiento ($p < 0,004$), al factor día ($p < 0,001$) y a la interacción entre ambos factores ($p < 0,004$), reflejándose estas diferencias en el incremento respecto al día 14. Es decir, que a los 6 días, no se apreciaron cambios en la VT respecto a la valoración inicial, ni en las plántulas control ni en las inoculadas, ni tampoco entre ambos tratamientos. En cambio, a los 14 días, la VT en las plántulas control, experimentó un incremento relativo de 0,25 (empeora de 1 a 1,25) respecto a la valoración inicial, mientras que en las inoculadas esa valoración presentó un incremento relativo de 3,4 (empeora de

1,2 a 4.6), significativamente diferente del presentado por la plántulas control (0 y 0,2 a los 6 y 14 días respectivamente).

Tabla 4.8. Promedio y error típico tras la inoculación de las variables relativas relacionadas con el desarrollo y estado sanitario de plántulas del clon C47.

	Trat	Día	n	ΔrelVT	$\Delta\text{relN}^{\circ}\text{H}$	ΔrelLT	PT/LT (mg/mm)	DenT (mg/mm ³)
	Parte aérea	C	6	4	0,00 ± 0,00 ^c	-0,25 ± 0,25 ^a	0,0 ± 0,11 ^a	3,16 ± 0,62 ^{a,b}
I		6	4	0,00 ± 0,00 ^c	-0,25 ± 0,48 ^a	0,04 ± 0,07 ^a	3,83 ± 0,37 ^{a,b}	6,02 ± 0,84 ^b
C		14	4	0,25 ± 0,25 ^b	0,25 ± 0,25 ^a	0,08 ± 0,08 ^a	2,90 ± 0,43 ^b	6,18 ± 1,31 ^b
I		14	5	3,30 ± 0,70 ^a	-0,80 ± 1,36 ^a	0,07 ± 0,07 ^a	4,22 ± 0,55 ^a	16,30 ± 2,91 ^a
	Trat	Día	n	$\Delta\text{relN}^{\circ}\text{R}$	ΔrelLR	PR/LR (mg/mm)	DenR (mg/mm ³)	LRN/LR
	Parte radical	C	6	4	0,1 ± 0,06 ^a	3,97 ± 2,24 ^a	0,49 ± 0,06 ^a	0,84 ± 0,19 ^a
I		6	4	0,23 ± 0,15 ^a	5,60 ± 2,16 ^a	0,52 ± 0,06 ^a	1,00 ± 0,16 ^a	0,11 ± 0,03 ^a
C		14	4	-0,08 ± 0,08 ^b	2,14 ± 1,17 ^a	0,68 ± 0,21 ^a	1,24 ± 0,11 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
I		14	5	-0,05 ± 0,03 ^b	1,99 ± 1,79 ^a	0,65 ± 0,11 ^a	1,04 ± 0,12 ^a	0,21 ± 0,05 ^a

n (número de plántulas utilizadas); ΔrelVT (incremento relativo de la valoración del tallo); $\Delta\text{relN}^{\circ}\text{H}$ (incremento relativo del número de hojas); ΔrelLT (incremento relativo del tallo); PT (peso del tallo); LT (longitud del tallo); DenT (densidad del tallo); $\Delta\text{relN}^{\circ}\text{R}$ (incremento relativo del número de raíces); ΔrelLR (incremento relativo de la longitud de raíces); PR (peso de raíces); LR (longitud de raíces); DenR (densidad de raíz); LRN (longitud de raíz necrosada). Las letras diferentes indican diferencias significativas mediante test de ANOVA ($\alpha < 0,05$)

El incremento relativo del número de hojas ($\Delta\text{relN}^{\circ}\text{H}$) y el crecimiento relativo del tallo (ΔrelLT), no presentaron efectos significativos respecto a ninguno de los factores ni su interacción, ya que las variaciones respecto a los valores iniciales fueron prácticamente inexistentes.

En cuanto a la relación entre el peso y la longitud del tallo (PT/LT), los resultados reflejaron promedios sin diferencias significativas entre las plántulas inoculadas y las control, a los 6 días de la inoculación (3,16 y 3,83 mg/mm respectivamente). Sin embargo, esta relación disminuyó en los controles

pasados 14 días (2,90 mg/mm), mientras que en los inoculados aumentó significativamente ($p < 0,029$) hasta los 4,22 mg/mm.

La variable densidad del tallo (DenT) presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento ($p < 0,042$), a la duración del mismo ($p < 0,036$) y a la interacción entre ambos factores ($p < 0,029$). Los resultados no muestran variaciones significativas en los incrementos registrados tanto en plántulas control como inoculadas hasta los 6 días, incluyendo los incrementos en las plántulas control hasta los 14 días. En cambio, el incremento hasta los 14 días registrado en las plántulas inoculadas, se situó en 16,30 mg/mm³, significativamente diferente del resto de los bloques.

En la zona radical, tan solo la variable LRN/LR presentó diferencias significativas respecto al tratamiento, pero en cambio, no las presentó respecto a los días transcurridos tras la inoculación ni a la interacción entre ambos factores. Los valores fueron nulos en las plántulas control, ya que éstas no presentaron síntomas de necrosis radical, mientras que en las inoculadas fueron de 0,11 y 0,21 a los 6 y 14 días respectivamente, evidenciando un efecto acumulado de la necrosis con el paso de los días.

En cambio, la variable $\Delta \text{relN}^{\circ}\text{R}$ presentó diferencias estadísticamente diferentes respecto a la duración del tratamiento ($p < 0,037$), de modo que tanto en las plántulas control como en las inoculadas, se observó un incremento positivo hasta los 6 días (0,10 en plántulas control y 0,23 en las inoculadas). Sin embargo, a los 14 días tras la inoculación, el incremento presentado fue negativo (-0,08 y -0,05 respectivamente), sin que la diferencia entre tratamientos resultara estadísticamente significativa.

Para el resto de variables de la parte radical, no se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los dos factores (tratamiento y día) ni su interacción. No obstante, en el ΔrelLR se observó una tendencia a su disminución con respecto al tiempo, siendo más acusada en las plántulas inoculadas que en los controles.

Tampoco las variaciones en las variables PR/LR y DenR presentaron diferencias significativas respecto a los dos factores o su interacción.

4.2.3. Efecto de la inoculación *in vitro* con *P. cinnamomi* sobre la capacidad de tolerancia/resistencia de clones de *Q. suber*.

La inoculación con sobrenadante de cultivo líquido de *P. cinnamomi*, permitió establecer diferencias significativas, tanto en la parte aérea como radical de las plántulas, respecto al tratamiento así como también respecto a los clones de *Q. suber* enraizados e inoculados *in vitro*, en los 15 días establecidos para esta prueba.

Durante el desarrollo de la misma, se observó la aparición y crecimiento de micelio en el sustrato inoculado y sobre la superficie del mismo, que no apareció en los controles. Se trataba de un micelio blanco, denso, de iguales características que el de los aislados de *P. cinnamomi*, que en la zona superficial, comenzaba a aparecer generalmente por el borde próximo a la pared del recipiente y, progresivamente, iba llegando al centro de la superficie hasta invadir la plántula situada en él.

Todas las plántulas inoculadas han desarrollado micelio superficial y, todas llegaron a ver invadida de micelio la superficie del sustrato, a excepción de dos plántulas del clon H6. En estas dos plántulas, la progresión del micelio desde el borde exterior de la superficie del sustrato, no llegó a alcanzar a la plántula, aunque hubo tiempo suficiente para ello durante la duración de la prueba.

Los síntomas en la parte aérea de las plántulas, se analizaron separadamente para las plántulas inoculadas, ya que en los controles no se obtuvieron datos discretos para Tmp1Mic, TmpMicTt, TmpNecTt y VelNecTt. En el caso de las variables de las que sí se pudieron obtener datos discretos (Tmp1Sint, EstSint y %NecTtA), todas presentaron diferencias significativas en

relación al tratamiento, es decir, entre las plántulas inoculadas y los controles (tabla 4.9).

Tabla 4.9. Nivel de significación del análisis de supervivencia en variables de la parte aérea de plántulas de 5 clones de *Q. suber* respecto al tratamiento con *P. cinnamomi*, el clon y la interacción entre ambos factores.

Variable dependiente*	Test estadístico	Factor fijo	Bloque	Significación	Estadístico de contraste
Tmp1Mic	Tablas de mortalidad	Clon	C	Todos los casos censurados	No aplicable
			I	0,108	Wilcoxon (Gehan)
TmpMicTt	Tablas de mortalidad	Clon	C	Todos los casos censurados	No aplicable
			I	0,383	Wilcoxon (Gehan)
Tmp1Sint	Tablas de mortalidad	Tratamiento	C+I	0,001	Wilcoxon (Gehan)
		Clon	C	0,278	Wilcoxon (Gehan)
			I	0,028	Wilcoxon (Gehan)
ExtSint	ANOVA	Tratamiento	C+I	0,001	Tukey
		Clon	C+I	0,001	Tukey
		Interacción	C+I	0,001	Tukey
%NecTtA	ANOVA	Tratamiento	C+I	0,001	Tukey
		Clon	C+I	0,037	Tukey
		Interacción	C+I	0,662	Tukey
TmpNecTt	Kaplan-Meier	Tratamiento	C+I	0,001	Breslow
		Clon	C	0,417	Breslow
			I	0,005	Breslow
VelNecTt	Kaplan-Meier	Tratamiento	C+I	0,001	Breslow
		Clon	C	0,643	Breslow
			I	0,021	Breslow

***Tmp1Mic** (días en aparecer micelio en la superficie del sustrato); **TmpMicTt** (días en invadir el micelio totalmente la superficie del sustrato); **Tmp1Sint** (días en aparecer los primeros síntomas de necrosis); **ExtSint** (presencia o ausencia de extensión de síntomas); **%NecTtA** (porcentaje de necrosis total de la parte aérea en 15 días); **TmpNecTt** (días para aparición de necrosis total); **VelNecTt** (días en alcanzar la necrosis total desde la aparición de síntomas).

Tabla 4.10. Promedio y error típico de los parámetros relacionados con la sintomatología en la parte aérea de plántulas de 5 clones de *Q. suber* inoculadas con *P. cinnamomi*

Trat	Clon	Tmp1Mic (días)	TmpMicTt (días)	Tmp1Sint (días)	ExtSintA	%NecTtA	TmpNecTt (días)	VelNecTt (días)
C	B24	-	-	-	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ^c	-	-
	C4	-	-	-	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ^c	-	-
	C47	-	-	10 ± 2,95 ^{a,b}	0,6 ± 0,25 ^{b,c}	20 ± 20 ^c	>15	-
	H6	-	-	15 ± 2,60 ^a	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ^c	-	-
	S297	-	-	10 ± 5,13 ^{a,b}	0,33 ± 0,33 ^{b,c}	33 ± 33 ^c	>15	-
I	B24	3,6 ± 0,3 ^a	9,1 ± 0,96 ^a	5,8 ± 1,20 ^c	1,0 ± 0,0 ^a	80 ± 15 ^{a,b}	13,0 ± 1,56 ^{a,b}	7,2 ± 1,13 ^a
	C4	3,8 ± 0,8 ^a	11,7 ± 1,12 ^a	9,3 ± 0,42 ^b	1,0 ± 0,0 ^a	100 ± 0 ^a	14,8 ± 0,48 ^a	5,5 ± 0,22 ^b
	C47	4,0 ± 0,0 ^a	9,6 ± 0,78 ^a	5,3 ± 0,52 ^c	1,0 ± 0,0 ^a	100 ± 0 ^a	10,1 ± 0,92 ^b	4,8 ± 0,63 ^b
	H6	3,2 ± 0,29 ^a	9,8 ± 1,07 ^a	8,7 ± 1,48 ^b	1,0 ± 0,0 ^a	60 ± 16 ^{a,b}	15,7 ± 1,27 ^a	7,0 ± 0,97 ^a
	S297	3,4 ± 0,30 ^a	8,4 ± 0,87 ^a	5,7 ± 1,02 ^c	1,0 ± 0,0 ^a	100 ± 0 ^a	11,6 ± 1,02 ^b	5,9 ± 1,32 ^{a,b}

Tmp1Mic (días en aparecer micelio en la superficie del sustrato); **TmpMicTt** (días en invadir el micelio totalmente la superficie del sustrato); **Tmp1Sint** (días en aparecer los primeros síntomas de necrosis); **ExtSintA** (presencia o ausencia de extensión de síntomas, 0=ausencia, 1=presencia); **%NecTtA** (porcentaje de necrosis total de la parte aérea en 15 días); **TmpNecTt** (días para aparición de necrosis total); **VelNecTt** (días en alcanzar la necrosis total desde la aparición de síntomas). Letras diferentes en los promedios, indican diferencias significativas mediante análisis de supervivencia ó ANOVA ($\alpha < 0,05$)

La aparición de los primeros síntomas de necrosis (Tmp1Sint) fue más tardía para las plántulas control que en las inoculadas, con un promedio de 7 y 13 días respectivamente (tabla 4.10). No obstante, los síntomas de necrosis en las plántulas control fueron puntuales y, no se extendieron o lo hicieron mucho más lentamente que en el caso de las plántulas inoculadas, en las que en todos los casos, existió extensión de los síntomas de necrosis cuando éstos aparecieron en la parte aérea de la plántula.

El porcentaje de individuos con necrosis total de la parte aérea (%NecTtA) a lo largo del periodo de ensayo, presentó diferencias significativas entre plántulas inoculadas y controles ($p < 0,001$), y también entre los clones ($p < 0,037$), de modo que en las 22 plántulas control tan solo se han dado dos casos de necrosis total de la parte aérea (una plántula del clon C47 y otra del clon S297), mientras que de las 42 plántulas inoculadas, 36 presentaron necrosis

total al cabo de los 15 días. Tan solo quedaron 4 plántulas inoculadas del clon H6 y, 2 plántulas inoculadas del clon B24, con algunos síntomas de necrosis pero sin llegar a la necrosis total. Los clones C4, C47 y S297 serían los más sensibles en este aspecto, quedando el B24 con características intermedias entre el H6 y el resto (tabla 4.10).

Las variables de la parte aérea relacionadas con el tiempo, es decir, tiempo de aparición de los primeros síntomas (Tmp1Sint), tiempo en alcanzar la necrosis total de la parte aérea (TmpNecTt) y velocidad con que ésta es alcanzada (VelNecTt), resultaron tener todas efectos significativos respecto del tratamiento ($p < 0,001$, $p < 0,001$ y $p < 0,001$ respectivamente). Se observó que en los controles, los síntomas de necrosis comenzaron a aparecer a partir del día 10^o aproximadamente, tras el inicio de la prueba. Sin embargo, en las plántulas inoculadas, esos síntomas aparecieron entre el 5^o y 9^o día tras la inoculación, en función de cada clon.

En las plántulas inoculadas, la necrosis total se produjo entre los 5 y 7 días tras la aparición de los primeros síntomas (VelNecTt), lo que permitió que en la mayoría de los casos, las plántulas llegaran a necrosarse totalmente dentro de los 15 días de ensayo.

Estas variables permitieron además, establecer diferencias entre los clones a la hora de diferenciar patrones de respuesta frente a la inoculación. De este modo, en función de la variable Tmp1Sint, se han podido distinguir dos grupos de clones significativamente diferentes ($p < 0,028$); por un lado, el clon C4 y el H6, que tardaron un promedio de 9,3 y 8,7 días respectivamente, en presentar los primeros síntomas de necrosis; por otro lado, los otros tres clones (B24, C47 y S297) con valores entre los 5 y 6 días. Sin embargo, aunque el C4 tardó más que el resto en presentar síntomas de necrosis, cuando los tuvo, la VelNecTt promedio fue de 5,5 días, que junto con la del clon C47 (4,8 días), fueron significativamente más rápidas ($p < 0,021$) que las velocidades promedio de los clones B24 (7,2 días) y H6 (7,0 días).

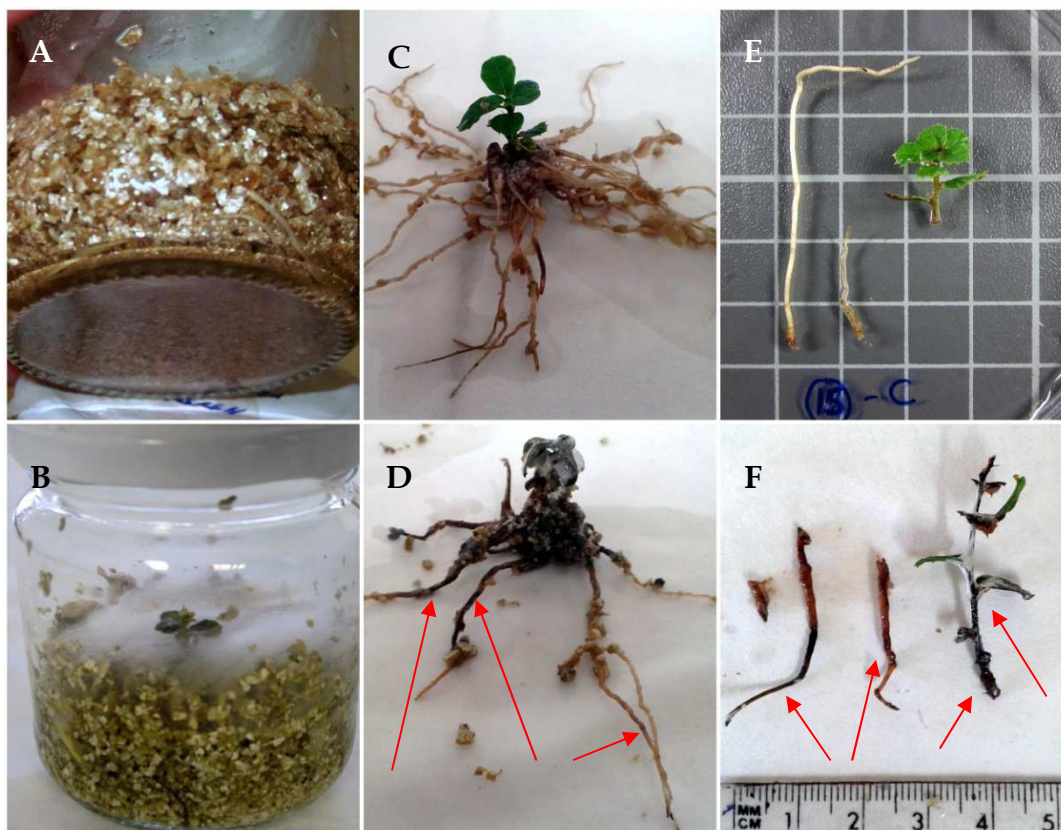


Figura 19. Imágenes comparativas entre plántulas control e inoculadas de *Q. suber*. **A**, raíz de plántula control en el sustrato donde sería inoculada; **B**, micelio crecido sobre la superficie del sustrato tras la inoculación; **C**, plántula control del clon C4; **D**, plántula inoculada del clon C4 tras 15 días inoculada; **E** y **F**, raíces y parte aérea de plántula control del clon C47 e inoculada del clon H6 respectivamente. Las flechas indican zonas necrosadas.

El clon S297 presentó un valor promedio de VelNecTt de 5,9 días, estadísticamente sin diferencias respecto a los demás clones. En suma, el TmpNecTt resultó ser más prolongado para los clones H6 y C4 (con 15,7 y 14,8 días respectivamente), estadísticamente diferentes de los más cortos ($p < 0,005$), que correspondieron a los clones C47 y S297 (con 10,1 y 11,6 días respectivamente), quedando el B24 (con un promedio de 13 días), sin diferencias significativas con respecto a los demás clones.

El análisis de los síntomas en la parte radical de las plántulas, mostró bastante homogeneidad para aquellos parámetros iniciales independientes de la

inoculación, como son el N°R inicial y la LR inicial (tabla 4.11), de manera que no se observaron diferencias significativas ni entre los clones, ni entre tratamientos, salvo en el caso del clon C4, el cual mostró un N°R inicial muy superior al resto de clones, lo que influyó también en una LR inicial muy superior al resto (figura 19-C).

Tabla 4.11. Nivel de significación del análisis de varianza de variables en la parte radical de plántulas de *Q. suber* respecto al tratamiento de inoculación con *P. cinnamomi*, el clon y la interacción entre ambos factores.

Factor	N°R inic*	Δ relN°R	LR final	Δ relLR	DR final	LRN	%LRN/LR
Tratamiento	0,284	0,950	0,019	0,036	0,812	0,001	0,001
Clon	0,001	0,005	0,001	0,005	0,092	0,050	0,023
Interacción	0,490	0,463	0,127	0,206	0,357	0,169	0,001

N°R inicial (número inicial de raíces); **Δ relN°R** (tasa de incremento del número de raíces); **LR final** (longitud total final de raíces); **Δ relLR** (tasa de incremento de la longitud de raíces en 15 días respecto a la longitud inicial); **DR final** (diámetro promedio de las raíces a los 15 días); **LRN** (longitud de raíz necrosada); **%LRN/LR** (porcentaje de longitud necrosada de raíz respecto a la longitud final).

El análisis estadístico del Δ relN°R (incremento del número de raíces respecto al número inicial de las mismas), mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al factor clon ($p < 0,005$), pero no respecto al factor tratamiento, ni a la interacción entre ambos. Dentro del bloque de las plántulas control, se observó que sus raíces, o no experimentaron cambios en cuanto al número a lo largo del ensayo, o éste pudo aumentar ligeramente, como en el caso de los clones C47, H6 y S297 (tabla 4.12), no representando diferencias significativas. Por tanto, las diferencias obtenidas para el factor clon, se debieron a las plántulas inoculadas, donde se observó que en tres de los cinco clones, el promedio del Δ relN°R presentó un valor negativo, indicando con ello que hubo pérdida global del número de raíces. Mientras que en el clon B24, se

obtuvo un $\Delta\text{reLN}^{\circ}\text{R}$ de 0,6, superior al obtenido por las plántulas control de este mismo clon (0,0).

Tabla 4.12. Promedio y error típico de los parámetros relacionados con la sintomatología en la zona radical de plántulas de 5 clones de *Q. suber* inoculadas con *P. cinnamomi*

Trat	Clon	NºR inic*	$\Delta\text{reLN}^{\circ}\text{R}$	LR final (cm)	ΔreLLR	DR final (mm)	LRN (cm)	%LRN/LR
C	B24	1,8 ± 0,8 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	3,1 ± 1,6 ^b	1,6 ± 0,6 ^a	1,5 ± 0,3 ^a	0,1 ± 0,1 ^d	4,0 ± 3,8 ^c
	C4	16,0 ± 7,2 ^b	0,0 ± 0,3 ^a	51,6 ± 40,3 ^a	2,5 ± 1,1 ^a	1,7 ± 0,3 ^a	0,7 ± 0,7 ^{c,d}	1,3 ± 1,3 ^c
	C47	3,0 ± 1,1 ^a	0,2 ± 0,21 ^a	17,7 ± 3,8 ^b	4,2 ± 1,4 ^a	1,4 ± 0,4 ^a	0,0 ± 0,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^c
	H6	2,4 ± 0,5 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	13,3 ± 2,5 ^b	2,9 ± 1,5 ^a	1,6 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,1 ^d	0,9 ± 0,9 ^c
	S297	3,0 ± 1,2 ^a	0,02 ± 0,2 ^a	14,7 ± 4,4 ^b	2,0 ± 0,8 ^a	2,3 ± 0,3 ^a	1,2 ± 0,7 ^c	8,1 ± 7,3 ^c
I	B24	2,0 ± 0,5 ^a	0,6 ± 0,4 ^a	6,2 ± 1,6 ^d	1,6 ± 0,4 ^c	1,7 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,2 ^b	10,4 ± 4,0 ^b
	C4	11,2 ± 2,2 ^b	-0,4 ± 0,1 ^b	19,2 ± 2,2 ^c	0,4 ± 0,1 ^b	1,2 ± 0,2 ^a	8,0 ± 2,0 ^a	41,4 ± 10,8 ^a
	C47	2,5 ± 0,6 ^a	-0,1 ± 0,1 ^{a,b}	6,8 ± 1,3 ^d	1,7 ± 0,8 ^c	2,0 ± 0,2 ^a	1,8 ± 0,8 ^b	26,2 ± 9,6 ^{a,b}
	H6	2,2 ± 0,5 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	7,7 ± 2,1 ^d	2,3 ± 0,5 ^c	1,7 ± 0,2 ^a	2,6 ± 0,8 ^b	33,7 ± 6,3 ^{a,b}
	S297	3,3 ± 1,0 ^a	-0,1 ± 0,1 ^{a,b}	11,9 ± 3,0 ^d	1,8 ± 0,5 ^c	2,1 ± 0,3 ^a	3,9 ± 2,3 ^{a,b}	33,1 ± 9,3 ^{a,b}

NºR inicial (número inicial de raíces); **$\Delta\text{reLN}^{\circ}\text{R}$** (tasa de incremento del número de raíces); **LR final** (longitud total final de raíces); **ΔreLLR** (tasa de incremento de la longitud de raíces en 15 días respecto a la longitud inicial); **DR final** (diámetro promedio de las raíces a los 15 días); **LRN** (longitud de raíz necrosada); **%LRN/LR** (porcentaje de longitud necrosada de raíz respecto a la longitud final). Las letras diferentes indican diferencias significativas mediante test de ANOVA ($\alpha < 0,05$)

Algo similar ocurrió con el incremento de la longitud de las raíces respecto a la longitud inicial (ΔreLLR). En este caso, las tasas de incremento de longitud fueron inferiores en las plántulas inoculadas ($p < 0,036$) que en sus respectivos controles.

No obstante, en el bloque de las plántulas control, las diferencias entre los clones no fueron significativas, pero sí en el bloque de las plántulas inoculadas ($p < 0,029$), de modo que, se diferenciaron dos grupos: por un lado, el clon C4, que presentó la menor tasa de incremento de la longitud de raíces (0,4) a pesar del alto número de raíces inicial y, por otro lado, el resto de clones,

entre los que destacó el clon H6 con una tasa de incremento de la longitud de raíces de 2,3.

También el C4 presentó el DR final más pequeño dentro del bloque de las plántulas inoculadas (1,2mm). Sin embargo, ese dato tan solo permitió diferenciarlo estadísticamente del clon S297 en este bloque (2,1mm), es decir, que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, ni entre los clones de forma global.

Las mayores diferencias se observaron en relación con la aparición de zonas necrosadas en las raíces, asociadas a la inoculación, lo que se reflejó en los parámetros LRN (longitud de raíz necrosada) y %LRN/LR (porcentaje relativo que representa la longitud necrosada respecto a la longitud final de raíces). El análisis estadístico para LRN, mostró diferencias significativas respecto al factor tratamiento ($p < 0,001$) y clon ($p < 0,050$) y, no respecto a la interacción entre ambos. Al analizar los clones por separado en función del tratamiento, se observó que no había diferencias significativas entre los clones de los controles, aunque hubieran aparecido ocasionalmente algunos fragmentos necrosados de raíz, cuyos promedios oscilaron entre 0,0cm (C47) y 1,2cm (S297). En cambio, sí las hubo entre los inoculados ($p < 0,006$), de modo que fueron éstos los que contribuyeron en mayor medida a las diferencias observadas de forma global por el análisis para el factor tratamiento. De este modo, el clon C4 fue el que presentó mayor promedio de LRN (8,0cm), mientras que el clon B24, fue el que menor promedio obtuvo (0,6cm). No obstante, como este parámetro estaba estrechamente relacionado con la LR, se analizó también la relación de la LRN respecto a la LR (%LRN/LR). En este caso, el análisis mostró efectos significativos del tratamiento ($p < 0,001$), del clon ($p < 0,023$) y de la interacción ($p < 0,001$) sobre la variable %LRN/LR, de modo que los porcentajes presentados por los clones de las plántulas inoculadas, fueron muy superiores a los presentados por los clones de las plántulas control. No obstante, al analizar por separado las diferencias entre clones por bloque de tratamiento, no se obtuvieron diferencias significativas entre los clones en las plántulas control, mientras que en el bloque de las plántulas inoculadas, el análisis sí mostró

diferencias significativas ($p < 0,031$), de modo que de nuevo, el clon B24 fue el que menor porcentaje de raíz necrosada presentó respecto a la LR (10,4%), mientras que el C4 fue el más afectado (41%), quedando los clones C47, H6 y S297 con valores intermedios entre ambos.

4.2.4. Re-aislamiento del patógeno en cultivo puro.

El cultivo de raíces, tallos y hojas en medio selectivo V8-NARPH de las plántulas de los clones del ensayo anterior, reveló la presencia del oomiceto en las estructuras de las plántulas inoculadas, mientras que en los controles no se observó crecimiento de micelio alguno en ninguno de los casos (tabla 4.13).

Tabla 4.13. Resultados del cultivo en medio selectivo V8-NARPH, de raíces y hojas de plántulas de 5 clones de *Q. suber*

Trat	Clon	Micelio en raíces	Micelio en tallo	Micelio en hojas
C	B24	-	-	-
	C4	-	-	-
	C47	-	-	-
	H6	-	-	-
	S297	-	-	-
I	B24	+	+	+
	C4	+	+	+
	C47	+	+	+
	H6	+	+	+
	S297	+	+	+

(+) Presencia de micelio; (-) ausencia de micelio. Fragmentos cultivados en medio selectivo V8-NARPH y mantenidos en cámara de cultivo a 24°C en condiciones de oscuridad.

En el caso de los fragmentos de raíz de las plantas inoculadas sembrados en dicho medio, el micelio comenzaba a aparecer principalmente por los

extremos de los fragmentos, extendiéndose posteriormente por el fragmento completo e invadiendo la superficie del medio de cultivo (figura 20). Por lo general, los fragmentos por los que comenzaba a crecer micelio, fueron los de la zona intermedia y basal de las raíces y, seguidos por los fragmentos de la zona apical.

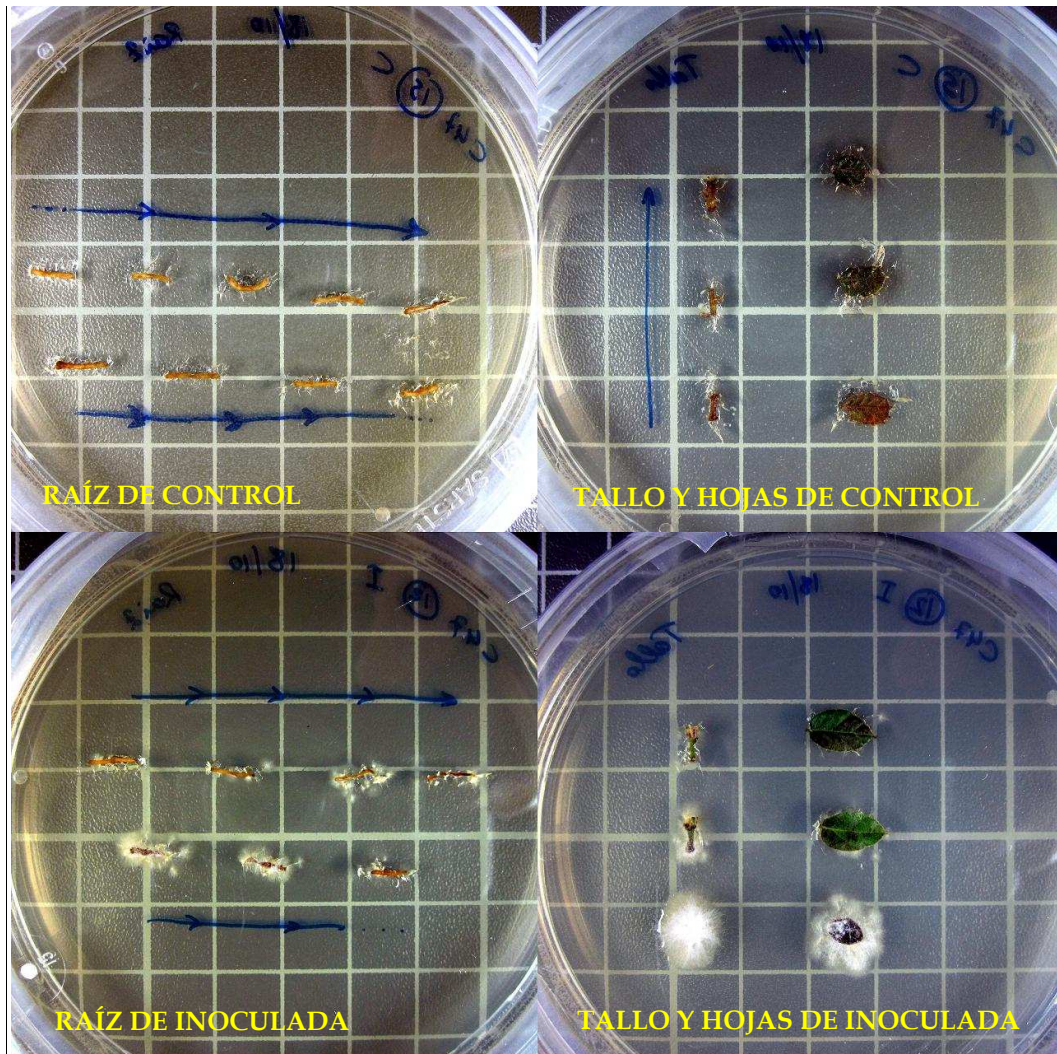


Figura 20. Cultivo en V8-NARPH de raíces, tallo y hojas procedentes de plántulas de *Q. suber* inoculadas *in vitro* con *P. cinnamomi*. La dirección de la flecha indica sentido desde la base hacia el ápice de la raíz o el tallo.

Observaciones similares presentaron los fragmentos de tallo cultivados en el medio selectivo, solo que en este caso, los fragmentos por los que comenzaba a crecer micelio por sus extremos, correspondían a los basales, y de forma progresiva, hacia los del ápice. En el caso de las hojas, el micelio comenzaba a aparecer por la base del peciolo, extendiéndose, como en el caso de las raíces y tallos, al resto de la hoja y, por toda la superficie del medio de cultivo tras varios días. Al igual que en el caso de los tallos y a diferencia de las raíces, fueron las hojas basales las que primero mostraron desarrollo del micelio, y así progresivamente hacia las del ápice.

4.3. DISCUSIÓN.

Diseño experimental

Los ensayos de inoculación *in vitro* llevados a cabo en el presente trabajo, han permitido definir parámetros del estado sanitario de las plántulas, a partir de los cuales, poder establecer diferencias entre distintos clones de *Q. suber* frente a la presencia de *P. cinnamomi* en sus raíces. Es por tanto, la primera vez que se describe un proceso como este en plántulas *in vitro* de alcornoque, con el fin de establecer las bases para programas de selección por su resistencia/tolerancia frente al patógeno.

La metodología de inoculación ha permitido alcanzar la mayoría de objetivos propuestos en el presente trabajo, dado que se han podido obtener resultados que permiten diferenciar genotipos, dentro de un plazo de tiempo relativamente corto. El hecho de haber podido re-aislar de nuevo el oomiceto patógeno a partir de las raíces infectadas, puso de manifiesto la efectividad de la infección y, por tanto, que los síntomas que aparecieron en las plantas inoculadas y no en los controles, serían atribuibles al efecto que el patógeno inoculado ejerció sobre las plántulas, compartiendo el criterio que pusiera de manifiesto Cuenta *et al.*, (2010) para el testado *in vitro* de plántulas de castaño (*Castanea sativa*) inoculadas con *P. cinnamomi*.

En este trabajo se consideró la infección de raíces como el método más viable, dado el escaso diámetro de los tallos y que el número y tamaño de las hojas de las plántulas *in vitro* fue muy variable, aunque en trabajos de otros autores también se indica la efectividad de la infección en hojas (Hüberli *et al.*, 2002; Denman *et al.*, 2005) y en tallos (Stukely y Crane, 1994; Rizzo *et al.*, 2002).

La obtención del inóculo puede resultar tanto más compleja en función de qué estructuras se deseen obtener. En el caso de la infección de raíces, el

éxito de la inoculación fue probada bien a partir de homogenados de micelio (Tuset *et al.*, 1996; León-Sánchez, 2013), bien a partir de filtrados de cultivos puros (Rosati *et al.*, 1989) o bien, a partir de las suspensiones de zoosporas móviles (Tuset *et al.*, 2001; Moralejo *et al.*, 2006) o en estado enquistado (Fraedrich, 1989).

En el presente trabajo, se optó por la suspensión filtrada de medio extracelular de un cultivo puro en medio V8 líquido de *P. cinnamomi*, ya que, coincidiendo con lo descrito en el boletín EPPO (2004), se observaba una mayor variedad de estructuras reproductoras disponibles para provocar la infección en las raíces de las plántulas (en su mayoría clamidiosporas, aunque de forma menos frecuente también se pudieron observar esporangios y zoosporas enquistadas), así como una menor complejidad a la hora de su preparación, en comparación con la obtención de suspensiones purificadas de zoosporas o de otras estructuras de reproducción.

De esta forma, ante la posibilidad de disponer de plántulas de alcornoque cultivadas *in vitro* en fase de propagación (fase de multiplicación), que es en la que comúnmente se mantienen los genotipos implantados *in vitro* mediante segmentos nodales, tan solo serían necesarios 60 días aproximadamente, para obtener los resultados de un ensayo de resistencia/tolerancia frente a *P. cinnamomi*, repartidos de la siguiente manera; de 25 a 30 días para enraizar las plántulas, 15 días para el endurecimiento de sus raíces, y 15 días para incubar tras la inoculación y obtener los resultados. Esta metodología permite la ventaja de acortar el tiempo de ensayo con respecto a inoculaciones en invernadero o en campo, en los que, por el hecho de disponer de plantas ya enraizadas con sistema radicular endurecido, se requiere de varios meses para poder observar síntomas aéreos relacionados con la infección (Maurel *et al.*, 2001; Robin *et al.*, 2001; Navarro-Cerrillo *et al.*, 2004).

De hecho, algunos autores como por ejemplo, Smith *et al.* (1992b), Tuset *et al.* (2001) y Navarro-Cerrillo *et al.* (2004), indicaban que las principales

afecciones de *P. cinnamomi* en las raíces de plantas de vivero y de campo, se producían en las raicillas y tejidos más absorbentes de las raíces, que son las formadas más recientemente, respecto a las raíces antiguas. Por ello, entre otras posibles causas, la sintomatología en la parte aérea de estas plantas no se visualiza hasta pasadas algunas semanas o meses.

En nuestro caso, las raíces de las plantas empleadas *in vitro* han mostrado una alta capacidad de absorción en prácticamente la totalidad de su longitud, debido a su juvenilidad y las especiales condiciones de cultivo. Prueba de ello es que los fragmentos proximales e intermedios de las raíces han sido los principalmente afectados por la inoculación, a diferencia de los fragmentos distales. Pero el hecho de que los fragmentos distales se hallan visto menos afectados podría tener su explicación en el tipo de sustrato y la forma de inóculo, así como en la intensidad de crecimiento de las raíces. Es decir, se sabe que una fase acuosa es necesaria para la movilidad de las zoosporas de *Phytophthora spp.* (EPPO, 2004), pero en nuestro caso, no se buscó especialmente la producción de zoosporas, sino de cualquier estructura reproductiva de *P. cinnamomi*. De esta manera, la infección dependería más del desarrollo del micelio y de las estructuras reproductivas asociadas al mismo. Dado que el desarrollo del micelio predominó en la zona ligeramente inferior a la superficie del sustrato, que es donde se encontraba el cambio de fase acuosa a fase aérea, pudo influir que esa zona fuese el principal foco de infección del oomiceto y, por tanto, afectara en mayor medida a las zonas intermedias y proximales de las raíces, respecto a las apicales (o distales) que estarían más sumergidas. Este hecho, simplemente demostraría que las zonas proximal e intermedia de las raíces también poseen alta capacidad de absorción, en comparación con la zona apical y subapical de la raíz, teniendo en cuenta en cualquier caso, que las raíces producidas *in vitro*, aún no están endurecidas.

El hecho de que nuestras plántulas se vieran afectadas principalmente en las zonas proximal e intermedia de las raíces, se deduce a partir de los fragmentos de raíz sembrados en medio selectivo. En ellos, el micelio siempre empezó a crecer por los extremos de los fragmentos proximales, seguido de los

intermedios y, en algunos casos, de los distales, como se mostró en la figura 20. Estos resultados parecen indicar que las infecciones habrían ocurrido primero en la zona basal e intermedia de las raíces, extendiéndose progresivamente hacia el resto de la plántula. Esa progresión también quedó patente en la zona aérea, donde se observó que había un gradiente de mayor presencia interna del oomiceto desde la zona basal de las estructuras aéreas (tallo y hojas) hasta la zona apical. Esta idea coincidiría con la encontrada por otros autores en relación a las infecciones con *Phytophthora spp.* (Weste y Cahill, 1982; Davison y Tay, 1995; Parke *et al.*, 2007) y, por tanto, con el mecanismo conocido de infección de este patógeno.

El origen interno y no superficial del micelio, quedaría demostrado por la forma de crecimiento del mismo, es decir, a partir de los extremos de los fragmentos de raíces y tallos sembrados en medio selectivo. Si la metodología llevada a cabo en este trabajo para preparar los fragmentos de raíz, tallo y hojas para el re-aislamiento del patógeno, no hubiera permitido eliminar los restos externos de los mismos, el crecimiento del micelio en el medio selectivo se hubiera iniciado desde cualquier punto de la superficie de dichos fragmentos, en lugar de hacerlo como lo ha hecho únicamente, desde los extremos.

Parámetros del desarrollo y el estado sanitario

Con una dosis de inóculo del 6% v/v (6 ml de sobrenadante del cultivo durante 6 días de *P. cinnamomi* en medio V8 líquido previamente diluido [1:10], diluidos en 94 ml de agua desionizada [dosis 2]) y, aplicando unos 35 ml de suspensión de inóculo por plántula, se pudieron obtener diferencias significativas entre tratamientos y entre clones, tras 15 días de incubación. Además, la dosis 2, presentó la ventaja respecto a la dosis 1 (6 µl de sobrenadante/100 ml de suspensión), de manifestar los síntomas de necrosis total con mayor rapidez, asegurando por tanto, un mayor número de plántulas con dicho síntoma dentro del plazo de ensayo. Esta ventaja permitió poder

establecer diferencias estadísticamente significativas en los ensayos realizados, considerándose la aparición y desarrollo de la necrosis, uno de los principales síntomas de la sensibilidad o tolerancia de un genotipo a la infección por *Phytophthora spp.* (Robin *et al.*, 2001; Tuset *et al.*, 2001; Tapias *et al.*, 2005; Linaldeddu *et al.*, 2009; Ruíz Gómez *et al.*, 2012).

La longitud de raíz necrosada (LRN) ha sido el parámetro que ha resultado más relevante respecto a los efectos que la inoculación ha tenido sobre las plántulas *in vitro* de *Q. suber* en el presente trabajo. Este parámetro fue en aumento con el transcurso del tiempo en las plantas inoculadas y no en los controles, como quedó patente en la prueba del efecto de la inoculación respecto al tiempo (factor "Día"), siendo también uno de los parámetros más importantes a la hora de diferenciar entre los clones de alcornoque en la prueba del efecto de la inoculación sobre la tolerancia/resistencia a *P. cinnamomi*. Este parámetro sirvió también en los trabajos de Miranda Fontaíña *et al.* (2005) para establecer diferenciaciones entre clones de castaño inoculados con dos cepas de *P. cinnamomi*, constituyendo uno de los principales factores a tener en cuenta para establecer una correlación entre la sensibilidad o tolerancia de dichos clones frente al patógeno, junto con la medida del diámetro de la podredumbre de la corona (típico síntoma en castaños) y el porcentaje de supervivencia de las plantas inoculadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo para la LRN en alcornoque fueron esperados. La sintomatología de las raíces afectadas se caracterizó por la pérdida de turgencia en las zonas afectadas, el progresivo estrechamiento acompañado al mismo tiempo del oscurecimiento de dichas zonas, hasta acabar como un fragmento algo deprimido y necrosado. Síntomas que, junto con el pardeamiento de los tejidos internos tanto en tallo como en raíces, las hojas cloróticas y marchitas, el decaimiento de la copa debido a la podredumbre radical, los cánceres en el tallo, la podredumbre de la corona de la raíz o del corazón del tallo, son habituales en plantas afectadas por *P. cinnamomi* (EPPO, 2004). La sintomatología varía en función de la especie de planta infestada por

este patógeno. Como ejemplo, Fraedrich *et al.*, (1989) observaron que el grado de afectación en las raíces (necrosis radical) de dos especies diferentes de pino (una tolerante y otra sensible), no presentaba diferencias estadísticamente significativas frente a la infección con zoosporas de *P. cinnamomi*. Sin embargo, sí las encontraron en el porcentaje de raíces laterales infectadas respecto a la concentración de inóculo, de modo que la especie más sensible presentaba mayores porcentajes de raíces infectadas con concentraciones bajas de inóculo.

Además de la LRN, otros parámetros radicales que también mostraron efectos significativos debidos a los factores “clon” y “tratamiento” en el presente trabajo, fueron la longitud de raíces (LR), así como el incremento de su número ($\Delta\text{relN}^{\circ}\text{R}$), ambos correlacionados entre sí.

Las diferencias mostradas por la LR en la prueba del efecto de la inoculación respecto al tiempo, indicarían que las plántulas siguen desarrollando sus raíces en longitud, independientemente del tratamiento. No obstante, la tasa de incremento de la LR (ΔrelLR), no varió en la misma proporción desde los 0 a los 6 días (21 días en total) que desde los 0 hasta los 14 días tras la inoculación (29 días en total), sino que descendió en el segundo periodo, del mismo modo que fue observado para el $\Delta\text{relN}^{\circ}\text{R}$ (aunque en este caso se obtuvo un incremento negativo a los 14 días), indicando con ello, una pérdida del número de raíces y una disminución de la tasa de incremento de la longitud de las raíces con respecto al tiempo. A diferencia de estos resultados en las plántulas inoculadas *in vitro*, León Sánchez *et al.* (2015), observaron que la inoculación con *P. cinnamomi* de plantas de 3 meses germinadas en vivero, estimulaba la formación de raíces nuevas más largas y delgadas que las presentes en el sistema radical antes de la inoculación. Esa diferencia mostrada por las plántulas inoculadas *in vitro*, parece no estar causada solo por la inoculación, ya que afecta tanto a plántulas control como inoculadas, sino que también podría estar relacionada, con la disminución de la disponibilidad de nutrientes en el sustrato (valga recordar que antes de la inoculación, las plántulas experimentaron un periodo de endurecimiento y desarrollo radicular

en vermiculita durante 15 días, que junto a los del ensayo, sumaron aproximadamente 30 días en el mismo sustrato) o incluso, la acumulación de compuestos fenólicos en el medio extracelular como consecuencia del propio metabolismo de la planta (Cahill *et al.*, 1993; Lozoya-Saldaña *et al.*, 2007; Ockels *et al.*, 2007). En las plantas inoculadas en vivero, estos factores apenas tendrían alguna influencia, ya que los compuestos fenólicos serían arrastrados por el drenaje del agua de riego y, el metabolismo de las plantas en vivero no es tan dependiente del sustrato como lo es en las plantas cultivadas *in vitro*.

No obstante y aunque el análisis de los resultados para ΔrelLR no mostró diferencias significativas respecto al tratamiento ni el factor día en la prueba del efecto del tiempo, la tendencia de los promedios globales es a que el ΔrelLR fuese menor en las plántulas inoculadas que en las plántulas control a los 14 días tras la inoculación. En el ensayo de comparación de clones, las diferencias respecto al factor clon sí son significativas y, confirman esta tendencia. En cambio, a los 6 días, observamos que el ΔrelLR es mayor en las plántulas inoculadas que en los controles en la prueba del efecto de la inoculación sobre el tiempo, aunque este hecho puede tener su causa en el mayor promedio del número de raíces inicial y la longitud inicial presentado por las plántulas inoculadas frente a las plántulas control. Esa diferencia en el ΔrelLR entre el día 6^o y el 14^o tras la inoculación, también podría tener su explicación teniendo en cuenta la evolución de la inoculación. Es decir, en la prueba de diferenciación de los clones frente a la inoculación, se observó que los primeros síntomas de la necrosis en la parte aérea, comenzaban a presentarse a partir de los 5 días tras la inoculación (promedio a los 7 días). De modo que, la valoración de parámetros como el ΔrelLR hasta los 6 días tanto en plántulas control como inoculadas, tiene sentido que fuese positiva, mientras que a partir de la aparición de los primeros síntomas de necrosis, dicha valoración comenzaría a descender, debido al acuse de los síntomas de la inoculación.

Además, todos los clones empleados experimentaron una disminución del ΔrelLR en las plántulas inoculadas respecto a los respectivos controles. Sin

embargo, el clon H6 presentó el mayor ΔrelLR dentro del bloque de plántulas inoculadas (2,3) al cabo de 15 días tras la inoculación, y el B24, no experimentó cambios respecto al control (1,6 de promedio en controles y plántulas inoculadas), siendo los dos clones que mostraron mayor tolerancia ante la presencia de *P. cinnamomi*. Estos resultados estarían muy relacionados con los obtenidos por León-Sánchez (2013), que observó que aunque se producía una disminución del peso de raíces tras la infección en alcornoques de 18 meses inoculadas con *P. cinnamomi*, éstos compensaban la disminución del peso de raíces nuevas con el incremento de la longitud de estas, dando como resultado, la formación de raíces más delgadas y ramificadas durante el primer mes de infección. En nuestro caso, este hecho se manifestaría por el ΔrelLR mostrado por los clones considerados más tolerantes a la presencia de *P. cinnamomi*. Apoyada esta idea además, porque en estos dos clones, el número de raíces ($N^{\circ}\text{R}$), o bien se mantuvo estable en las plántulas inoculadas respecto a sus controles (como en el H6), o bien presentó un $\Delta\text{relN}^{\circ}\text{R}$, mayor incluso que sus respectivos controles (como en el B24), mientras que el resto de clones sufrieron pérdidas del $N^{\circ}\text{R}$.

La inoculación no pareció tener influencia en las variaciones del PR, ya que ni la relación PR/LR, ni la variable DenR, presentaron efectos debidos al tratamiento o la duración del mismo. Por el contrario, el PR estuvo correlacionado con la LR, cuyas variaciones sí dependieron del tratamiento y las diferencias entre clones en la prueba del efecto de la inoculación sobre la resistencia/tolerancia a *P. cinnamomi*.

Por otro lado, el único parámetro de medida directa en la parte aérea que permitió establecer diferencias entre los tratamientos, fue la valoración del tallo (VT). Junto con la medida del diámetro del tallo (DT), fueron también los únicos parámetros que mostraron diferencias respecto al tiempo de inoculación. El hecho de que el resto de parámetros de esta zona no hayan mostrado cambios significativos, indica que salvo por su aspecto y diámetro, la parte aérea de las plántulas no experimenta grandes cambios durante el periodo de la

inoculación, coincidiendo con las observaciones de León Sánchez (2013), que no observó cambios significativos en periodos de 30 a 45 días, en el crecimiento de tallos de plantas de alcornoque de 18 meses respecto a la inoculación con *P. cinnamomi*. Así como también coinciden con las de Tuset *et al.* (2001), en las que no indicaban diferencias entre tratamientos durante 50 días respecto al desarrollo y crecimiento de tallos de 5 especies de *Quercus* (entre ellas *Q. suber*) inoculadas con *P. cinnamomi* en invernadero.

La VT estuvo correlacionada negativamente con el DT y la LR en las plántulas inoculadas, según el test de correlación de Pearson. Este fue el único caso de correlación entre parámetros de la parte aérea y radical de las plantas en el presente trabajo. Ante la hipótesis de que la aparición de síntomas visibles de necrosis en el tallo, pudiera emplearse como parámetro que refleje un alto grado de correlación con la afectación que la plántula estaría sufriendo en sus raíces, cabría esperar que la VT estuviera correlacionada con la LRN. Este hecho no se ha producido con nuestros resultados, posiblemente porque los dos procesos se produjeron a distinta velocidad, o quizá también, porque habría que tener en cuenta la proporción LNR/LR.

En este sentido, las variaciones del número de hojas entre clones, tratamientos o la duración de la inoculación, no fue un parámetro significativo, quizás por la corta duración de los ensayos. Sin embargo, la relación de densidad del tallo (DenT) sí se comportó como un parámetro diferenciador, como también fuese indicado por Miranda Fontaíña *et al.*, (2005) en ensayos con castaños inoculados en vivero con *P. cinnamomi*.

Comparación entre clones

Por otra parte, el desarrollo de micelio en el sustrato y los tiempos empleados en la aparición y desarrollo de los síntomas aéreos, también han servido como parámetros diferenciadores respecto a los factores “tratamiento”

y “clon” (genotipo). De este modo, los clones se pudieron clasificar en dos grupos en función del tiempo promedio de aparición de los primeros síntomas de necrosis (Tmp1Sint) y, del tiempo promedio necesario para alcanzar una necrosis total (TmpNecTt). Los clones H6 y C4 destacaron por presentar un tiempo más prolongado para la aparición de los primeros síntomas de necrosis y, necesitaron alrededor de 5 días más que los clones peor valorados, para alcanzar la necrosis total, siendo estos parámetros muy dependientes del factor tratamiento, como demostró el análisis estadístico, ya que estas diferencias entre clones fueron observadas en las plántulas inoculadas y no en sus respectivos controles.

Otros parámetros que también aportaron un aspecto interesante de la capacidad de respuesta de los clones frente a *P. cinnamomi*, fueron los relacionados con el porcentaje de plántulas con necrosis total y la velocidad en alcanzar la necrosis total. Es decir, cuando las plántulas comenzaban a presentar síntomas de necrosis, no todas evolucionaban igual, sino que en los clones H6 y B24, no se llegó a alcanzar en 100% de plántulas con necrosis total dentro del plazo de ensayo, mientras que en el resto de clones sí se alcanzó. Además, la velocidad en estos dos clones para alcanzar una necrosis total de la parte aérea, fue aproximadamente dos días superior a la del resto de clones.

Debido a que en todos los clones se obtuvieron casos de plántulas que alcanzaron la necrosis total dentro del plazo del ensayo, no se puede concluir que existiera una resistencia al patógeno en aquellos que mejores promedios presentaron (H6, C4 y B24), pero estos parámetros relacionados con la evolución de los síntomas de necrosis, sí aportan información sobre las diferencias en el comportamiento de los diferentes clones respecto al patógeno y, en suma, estarían indicando una mayor capacidad de resistencia o tolerancia ante el contacto con el patógeno, en aquellos clones con mejores promedios.

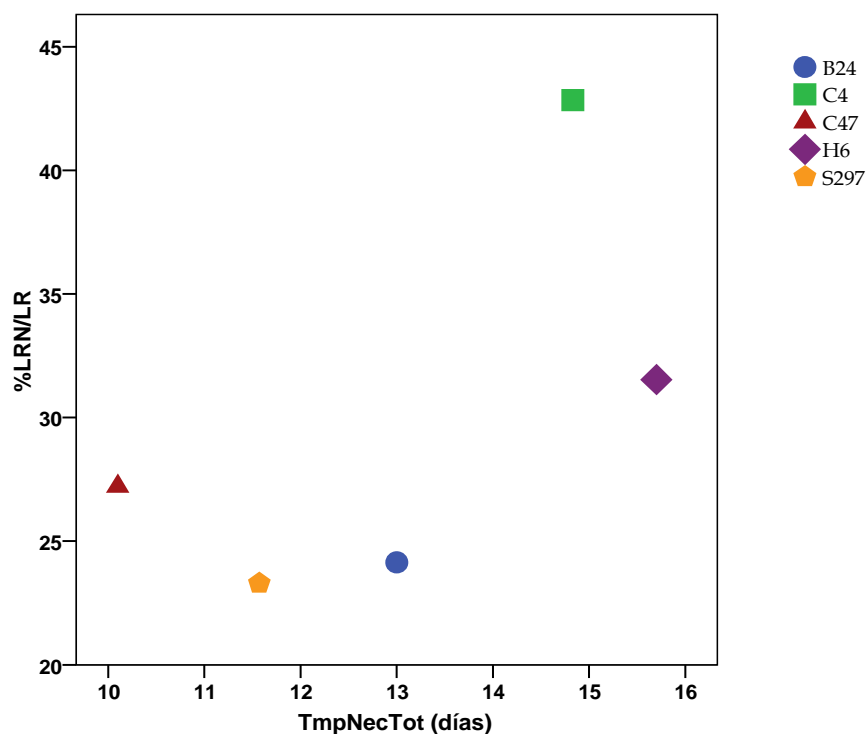
Todas estas diferencias en el comportamiento de los clones ante la presencia del patógeno *P. cinnamomi*, ponen de manifiesto la variabilidad en las posibilidades de mecanismos de defensa de las plantas (y en concreto de los *Quercus*), frente al mismo, propuestos en las últimas décadas por diferentes

autores, que van desde mecanismos implicados en la síntesis de barreras estructurales (Cahill *et al.*, 1993; Hardham *et al.*, 2008); mecanismos de regulación de los parámetros fisiológicos alterados por la invasión del patógeno (Maurel *et al.*, 2001; Robin *et al.*, 2001; León-Sánchez, 2013); hasta mecanismos de modulación genética que intervienen en la síntesis de proteínas y enzimas implicadas en las cascadas de defensa y, de estrés oxidativo y muerte celular (Takemoto *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2006; Hardham *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2011).

No obstante, el objetivo del presente trabajo no era tanto profundizar en los mecanismos de defensa de las plantas de alcornoque, sino más bien el análisis de aquellos parámetros que pudieran permitir diferenciar la mayor resistencia o tolerancia de unos genotipos frente a otros.

En este sentido, tanto los parámetros de la parte aérea como de la radical, han mostrado algún grado de correlación (según los análisis del test de Pearson), dentro de cada una de las partes de la planta, así como entre ambas partes en el caso de algunos de ellos, como ya se ha mencionado en apartados anteriores. Aún así, el hecho de cada uno muestre un aspecto diferente del modo en que se comporta cada clon, hace que se deba tener en cuenta un conjunto amplio de ellos para realizar una correcta interpretación de los resultados.

A modo de resumen, la representación gráfica de los dos parámetros más representativos tanto de la parte aérea como radical, el %LRN/LR y el TmpNecTt, entre los que no se observó una correlación estadísticamente significativa según el test de Pearson, ilustra la posición de cada clon frente a la que denominaríamos franja de clones altamente sensible (cuadrante superior izquierdo) y, franja de clones resistentes o altamente tolerantes (cuadrante inferior derecho).



El clon que más se aproxima a la zona de clones altamente tolerante, es el clon H6, seguido del clon B24, aunque con características diferenciadas sobre el H6. El resto, se sitúa en la zona de alta sensibilidad a presentar necrosis total de la parte aérea, aun cuando el %LRN/LR, es más bajo que en otros clones.

En resumen, el clon H6 fue el que menos afectado se vio en la zona aérea, ya que en 4 de las 10 plántulas inoculadas, no se llegó a observar necrosis total en el periodo de ensayo. Además, fue el único clon en el que el micelio no fue capaz de invadir totalmente la superficie del sustrato en dos de las 10 plántulas inoculadas. Su Tmp1Sint fue el segundo más alto, junto con el del C4. Pero a diferencia de éste, la VelNecTt fue también la segunda más alta (por debajo tan solo del B24), lo que le llevó a ser el clon con mayor TmpNecTt. En relación a la zona radical, presentó valores intermedios en cuanto a la LRN y el %LRN/LR. No obstante, fue el que mayor Δ relLR presentó, por lo que se deduce que a pesar de estar afectadas sus raíces, no pierde capacidad de desarrollarlas y, esas afecciones son de las que muestran menos correlación con la parte aérea. Por

ello, resulta un interesante candidato para programas de mejora genética y repoblación, coincidiendo con los resultados obtenidos por León Sánchez (2013), que situaba al progenitor del que procedía la semilla de este clon como el individuo mejor valorado en su test de tolerancia/sensibilidad, con alto grado de tolerancia.

Por su parte, el clon B24 fue el menos afectado por necrosis en sus raíces, ya que la LRN y el %LRN/LR fueron los más bajos de los cinco clones. La aparición de los síntomas aéreos (Tmp1Sint y TmpNecTt) presentó valores intermedios respecto a los otros clones, sin embargo, la VelNecTt fue la más alta, es decir, el que más días tardó en llegar a la necrosis total. Este comportamiento es interesante porque es de los clones que menos se ven afectados en sus raíces y, que presentan más dificultad para permitir el desarrollo de los síntomas habituales causados por *P. cinnamomi*. De hecho, junto con el H6, fue de los que en alguna de las plántulas inoculadas, no llegaron a una necrosis total de la parte aérea en los 15 días de ensayo. Además, el progenitor del que procedía su semilla, fue valorado como un genotipo “moderadamente tolerante” en el ranking de León Sánchez (2013).

El clon S297, presentó la segunda mayor LRN, y un %LRN/LR intermedio entre los 5 clones. Estas afecciones en las raíces se vieron reflejadas en valores bajos de Tmp1Sint y VelNecTt, es decir, que aparecieron muy pronto y se desarrollaron relativamente rápidos en comparación con los demás clones. En este caso, el progenitor del que procedía este individuo, fue clasificado por León Sánchez (2013) como uno de los genotipos con “alto grado de tolerancia”. De manera que, las diferencias mostradas en nuestro test de inoculación *in vitro*, podrían tener su origen probablemente en la aportación genética que hiciera su segundo progenitor (desconocido), o bien, en otros posibles factores.

El clon C4, cuyo progenitor del que se obtuvo la semilla fue también clasificado como uno de los que mayor grado de tolerancia presentaron a *P. cinnamomi* en los test de León Sánchez, fue el que mayor LRN y %LRN/LR presentó. A pesar de ello, fue el que más tardó en presentar los primeros síntomas en la parte aérea, pero cuando los presentó, éstos se desarrollaron

rápidamente hasta una necrosis total. Por tanto, es uno de los clones potencialmente sensibles a *P. cinnamomi*.

El clon C47 sería quizás el peor valorado en su conjunto, ya que si bien los valores de LRN y %LRN/LR son los segundos mejores, el Tmp1Sint es el más corto, la VelNecTt la más rápida y, el TmpNecTt también el más corto. Por lo que se deduce que con relativamente poca afección que sufran sus raíces, la parte aérea se ve rápidamente afectada. Estos resultados coinciden con los del progenitor de este clon, clasificado por León Sánchez (2013) como un genotipo “susceptible” en su test de tolerancia/sensibilidad a *P. cinnamomi*.

Las diferencias en la clasificación de los genotipos del presente trabajo respecto a la clasificación de las progenies de las que proceden (León-Sánchez, 2013) pueden tener varias causas, entre las que destacar la contribución del progenitor donante de polen de cada individuo (en el trabajo de León Sánchez se emplean progenies formadas por individuos con diferente genotipo pero con un progenitor común); también las diferencias de sensibilidad de las plántulas al patógeno en función de la metodología empleada (plántulas inoculadas *in vitro* en nuestro caso frente a plántulas de 18 meses inoculadas en vivero); así como las condiciones de cultivo en ambos ambientes, que podrían influir de forma diferente en la capacidad de proliferación y de infección del patógeno.

CONCLUSIONES FINALES

5. CONCLUSIONES FINALES

La regeneración de plantas vía micropropagación, es un mecanismo válido y posible para la obtención de clones de alcornoques seleccionados.

1. Las posibilidades de micropropagación de material adulto de encina, siguen siendo muy limitadas, aunque se utilice material vegetal procedente de brotes tiernos, bien de estacas de árboles adultos, bien de plántulas germinadas con 1 año de edad. Las mejores condiciones para la inducción de brotes viables para la implantación *in vitro* son temperaturas elevadas no precedidas de frío.

2. En la fase de implantación y establecimiento de encina, los medios con mayor contenido en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y, menor contenido en CaCl_2 , mejoran considerablemente la capacidad de reacción y supervivencia de los tejidos adultos de encina *in vitro*.

3. En alcornoque, la inducción de la brotación de yemas viables para la implantación *in vitro* es posible a partir de plantas juveniles y de individuos adultos, mejorando en este segundo caso cuando el material es recolectado en meses cálidos. Temperaturas de inducción moderadamente altas precedidas de un periodo frío (21 días a 4°C), rinden un mayor número de yemas viables.

4. El medio GD sin reguladores de crecimiento proporcionó las mejores tasas de implantación en alcornoque, mientras que en la multiplicación fue el medio MS. El aumento de la relación auxinas/citoquininas de los medios de multiplicación, mejora los promedios de brotación y, genera menor incidencia de brotes con deformidades y con necrosis.

5. Para el enraizamiento *in vitro* de alcornoque, tanto la concentración de auxina óptima como el periodo de rizogénesis resultaron muy dependientes del clon o genotipo empleado, estando situada la primera entre 3 y 4mg/L, mientras que el periodo óptimo de inducción fue de 15 días. Tiempos más prolongados de inducción de la rizogénesis, tratamientos de oscuridad o el "dipping", aumentan la incidencia de necrosis apical. No obstante, el

tratamiento previo en medios libre de hormonas antes de la rizogénesis, disminuye este fenómeno.

6. Existe un efecto del genotipo tanto en la capacidad de enraizamiento como en la sensibilidad a desarrollar necrosis apical. En este sentido, destacaron los clones CoA-47, HEE-6 y CoA-9.

7. Es posible infestar raíces de plantas *in vitro* de alcornoque y, poner de manifiesto diferencias entre los clones en cuanto a la respuesta frente al patógeno *Phytophthora cinnamomi*.

8. Para establecer una correcta clasificación entre clones por su resistencia/tolerancia al patógeno, es conveniente tener en cuenta un conjunto de parámetros. A partir de nuestros resultados, se proponen los siguientes parámetros tanto de la parte aérea de las plántulas (tiempo en presentar la necrosis total, porcentaje de individuos con necrosis total, tiempo en presentar los primeros síntomas de necrosis y la velocidad con que se alcanza la necrosis total desde la aparición de los primeros síntomas), como de la radical (el porcentaje de raíz necrosada respecto a la longitud total de la raíz, el incremento de longitud de las raíces y el incremento del número de raíces), ya que han proporcionado diferencias significativas entre clones.

9. La clasificación del grado de tolerancia de los clones ensayados muestra un importante paralelismo con la clasificación de las progenies de las que se han obtenido, llevada a cabo por León Sánchez (2013).

Por tanto, esta metodología constituye un precedente para futuros programas de selección de genotipos de alcornoque, por su tolerancia o sensibilidad al patógeno *Phytophthora cinnamomi*.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- **Abelleira, A.**; Pintos Varela, C.; Mansilla Vázquez, J.P. (1996). "*Phytophthora cinnamomi* (Rands), **Tinta del castaño**", ficha nº 58. En: *Fichas de diagnóstico en laboratorio de organismos nocivos de los vegetales*. MAPA-Madrid.
- **Agramonte, D.**; Jiménez, F.; Dita, M.A. (1998). "Aclimatización". En: *Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología*. Pérez Ponce, J.N. (Ed.), Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de Plantas, pp.193-205.
- **Alvarado Rosales, D.**; Saavedra Romero, L.L.; Almaraz Sánchez, A. (2008). "Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands., asociado al encino (*Quercus spp.*) en Tecoaapa, Guerrero, México". *Agrociencia*, **42**: 565-572
- **Amissah, N.**; Bassuk, N. (2002). "Severe cutback of stock plant influences rooting in shoots of *Quercus bicolor* and *Quercus macrocarpa*", **55**: 436-438
- **Ayers, W.A.** (1971). "Induction of sporangia in *Phytophthora cinnamomi* by a substance from bacteria and soil". *Canadian Journal of Microbiology*, **17**: 1517-1523
- **Azofeifa, A.** (2009). "Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*". *Agronomía Mesoamericana*, **20** (1): 153-175.
- **Bahmani, R.**; Karami, O.; Gholami, M. (2009). "Influence of carbon sources and their concentrations on rooting and hyperhydricity of apple rootstock MM.106". *World Applied Sciences Journal* **6**, **11**: 1513-1517.
- **Bairu, M.W.**; Stirk, W.A.; Van Staden, J. (2009). "Factors contributing to *in vitro* shoot-tip necrosis and their physiological interactions". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **98**: 239-248
- **Ballester, A.**; San-José, M.C.; Vidal, N., Fernández Lorenzo, J.L.; Vieitez, A.M., (1999). "Anatomical and biochemical events during the rooting *in vitro* of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut". *Annals of Botany*, **83**: 619-629.
- **Barceló Muñoz, A.**; Simón Pérez, E.; Encina, C.L.; Pliego Alfaro, F., (1999). "Effect of mineral formulations on proliferation and rooting of *Quercus robur* NL100A and NL100R". En: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest*

- Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 251-253.
- **Barra Jiménez**, A.; Blasco, M.; Ruiz Galea, M.; Celestino, C.; Alegre, J.; Arrilaga, I.; Toribio, M. (2014). "Cloning mature holm oak trees by somatic embryogenesis". *Trees*, 28: 657-667
 - **Bernardo**, S.; Majada, J.P.; Astorga, R.; Rodríguez, R., (1999). "Effect of hormonal balance on propagation, rooting and micrografting of *Eucalyptus globulus*". En: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 237-243
 - **Blanco Castro**, Emilio. (1998) "Los Bosques Ibéricos: Una interpretación geobotánica", Barcelona, Ed. Planeta.
 - **Blasco**, M.; Barra Jiménez, A.; Brisa, C.; Corredoira, E.; Segura, J.; Toribio, M.; Arrilaga, L. (2013). "Somatic embryogenesis in holm oak male catkins". *Plant Growth Regul.*, **71**: 261-270.
 - **Boissy**, G.; De la Fonte, E.; Kahn, R.; Huet, J.C.; Bricogne, G.; Pernollet, J.C.; Brunie, S. (2010). "Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins". *Structure*, **15**: 1429-1439.
 - **Bonga**, J.; **Von Aderkas**, P. (1992). "In vitro culture tree. Forestry Sciences". Vol. 38. Dordrecht. Klumer Academic Publishers. Netherlands, 236 p.
 - **Bowers**, N.L.; Gerber, H.U.; Hickman, J.C.; Jones, D.A.; Nesbitt, C.J. (1997). "Actuarial Mathematics". *Society of Actuaries*, Illinois, USA.
 - **Brasier**, C. M. (1992). Oak mortality in Iberia. *Nature London* **360**, 539.
 - **Brasier**, C. M. (1993). "*Phytophthora cinnamomi* as a contributory factor in European oak declines". In: *Proceedings of the International Congress. Recent advances in studies on oak decline*. N. Luisi, P. Lerario & A. Vannini, Eds. Pp. 49-57.
 - **Brasier**, C. M.; Robredo, F.; Ferraz, J. F. P. (1993). "Evidence for *P. cinnamomi* involvement in Iberian oak decline". *Plant Pathology*, **42**: 140-145.

- **Brasier, C.M.** (1996). “*Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change”. *Ann. Sci. Forest*, **53**: 347- 358.
- **Brito, G.; Costa, A.; Coelho, C.; Santos, C.** (2009). “Large-scale field acclimatization of *Olea maderensis* micropropagated plants: morphological and physiological survey”. *Trees*, **23**: 1019–1031.
- **Brito de Carvalho, J. H.** (1993). “«Stress» do Sobreiro e da Azinheira ou Doença de Lopes Pimentel”. CIDER, Univ. Algarve, Faro. 24 pp.
- **Brummer, M., Arend, M.; Fromm, J.; Schlenzig, A.; Obwald, W.F.** (2002). “Ultrastructural changes and immunocytochemical localization of the elicitor quercinin in *Quercus robur* L. roots infected with *Phytophthora quercina*”. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **61**: 109-120
- **Bueno, M.A.; Astorga, R.; Manzanera, J.A.,** (1992). “Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*”. *Physiologia Plantarum*, **85**: 30-34.
- **CABI**, (1991). “*Distribution maps of plant diseases*”. Nº 302. CAB International, Wallingford (GB).
- **Cahill, D.M.; Bennett, I.J.; McComb, J.A.** (1993). “Mechanism of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in clonal, micropropagated *Eucalyptus marginata*”. *Plant Pathology*, **42**: 865-872
- **Camilli, S.J.; Duncan, I.; London, R.L.** (2014). “Models for quantifying risk”. *ACTEX Academic Series*, Winsted, Conn., (6ª ed), 524 pp.
- **Campanile, G.; Ruscelli, A.; Luisi, N.** (2007). “Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and *in planta* tests”. *European Journal of Plant Pathology*, **117**: 237-246
- **Carrasquinho de Freitas, M.I.** (2002). “Propagação vegetativa de sobreiros seleccionados”. *Silva Lusitana*, **10**: 17-52
- **Chalupa, V.** (1993). “Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture”. *Ann. Sci. Forest*, **50**: 295-307
- **Chen, D.W.; Zentmyer, A.G.** (1969). “Axenic production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi*”. *Phytopathology*, **59**: 1021

- **Chen**, D.W.; Zentmyer, A.G. (1970). "Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture". *Mycologia*, **62** (2): 397-402.
- **Chu IYE**. (1992). "Perspectives of micropropagation industry". En: *Transplant production systems*. Kurata, K., Kozai, T. (Eds). Kluwer Academic, Amsterdam, pp. 137-150
- **Celestino**, C.; Fernández Guijarro, B.; Hernández, I.; Molinas, M.; Puigderrajols, P.; Martínez, I.; Hornero, J.; Gallego, F.J.; Manjón, J.L.; Díez, J.; Toribio, M., (1999). "Somatic embryogenesis in cork oak (*Quercus suber* L.)". En: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 195-197.
- **Cobos**, J.M.; Montoya, R.; Tuset, J.J. (1993). "New damages to the *Quercus* woodlands in Spain. Preliminary evaluation of the possible implication of *Phytophthora cinnamomi*". In: *Proceedings of an International Congress. Recent advances in studies on oak decline*. Luisi, N.; Lerario, P. & Vannini, A. (Eds.) Pp. 163-170, Putignano (Brindisi), Italia.
- **Coelho**, A. C.; Horta, M.; Neves, D.; Cravador, A. (2006). "Involvement of a cinnamyl alcohol dehydrogenase of *Quercus suber* in the defense response to infection by *Phytophthora cinnamomi*". *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **69**: 62-72.
- **Coelho**, A. C.; Horta, M.; Ebadzad, G.; Cravador, A. (2011). "*Quercus suber*-*Phytophthora cinnamomi* interaction: a hypothetical molecular mechanism model". *New Zealand Journal of Forestry Science*, **41**: 143-157.
- **Collins**, B.R.; Parke, J.L.; Lachenbrunch, B.; Hansen, E.M. (2009). "The effects of *Phytophthora ramorum* infection on hydraulic conductivity and tylosis formation in tanoak sapwood". *Canadian Journal of Forest Research*, **39**: 1766-1776.
- **Conde**, P.; Sousa, A.; Costa, A.; Santos, C. (2008). "A protocol for *Ulmus minor* Mill. micropropagation and acclimatization". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **92**: 113-119

- **Cordeiro, S.**; Moreira, C.; Ferreira, R.P.; Carvalho, J.P.F.; Pinto, T.M.S.; Torres Pereira, J.M.G. (2005). "Propagação vegetativa por estacaria do sobreiro (*Quercus suber* L.)". *Silva Lusitana*, **9**: 199-203
- **Cuenca, B.**; San José, M.C.; Martínez, M.T.; Ballester, A.; Vieitez, A.M., (1999). "Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L." *Plant Cell Reports*, **18**: 538-543
- **Cuenca, B.**; Ocaña, L.; Salinero, M.C.; Pintos, C.; Mansilla, J.P.; Rial, C. (2010) "Selection of *Castanea sativa* Mill., for resistance to *Phytophthora cinnamomi*: micropropagation and testing of selected clones". *Acta horticulturae*, **866**: 111-119.
- **Davison, E.M.**; **Tay, F.C.S.** (1986). "The effect of aeration on colony diameter, sporangium production and zoospore germination of *Phytophthora cinnamomi*". *New Phytologist*, **103**: 735-744.
- **Davison, E.M.**; **Tay, F.C.S.** (1995). "Predictions of where minimal damage of jarrah roots could result in tree death". *New Phytologist*, **131**: 393-401.
- **Deberg, P.C.**; **Read, P. E.** (1991). "Micropropagation". In: *Micropropagation Technology and Application*. (Deberg, P.C. & Zimmerman, R.) II edition. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands, 1-13 p.
- **Denman, S.**; Kirk, S.A.; Brasier, C.M.; Webber, J.F. (2005). "In vitro leaf inoculation studies as an indication of tree foliage susceptibility to *Phytophthora ramorum* in the UK". *Plant Pathology*, **54**: 512-521
- **Denny, H.** (2002). "Defence mechanisms in seed plants". En: "*Plants*", Irene Ridge (Eds.). Oxford University Press, pp. 292-303
- **Desphande, S.R.**; Josekutty, P.C.; Prathapasenan, G. (1998). "Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa*". *Plant Cell Reports*, **17**: 571-573.
- **DiCosmo, F.**; **Misawa, M.** (1995). "Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production". *Biotechnology Advances*, **13**: 425-453
- **Díez, J.**; Manjón, J.L.; Kovács, G.M.; Celestino, C.; Toribio, M. (2000). "Mycorrhization of vitroplants raised from somatic embryos of cork oak (*Quercus suber*, L.)". *Applied Soil Ecology*, **15**: 119-123

- **Domínguez** Nevado, Luis; Sánchez Osorio, Israel; López Pantoja, Gloria; Sánchez García, Iñigo; Zaragoza, Juan. (2008). "Foresia de Mesochelifer Fradei Vachon, 1940 (Pseudoscorpiones: Cheliferidae), Sobre coleópteros Cerambícidos en el sur de España. Nuevos registros para la especie". *Revista Ibérica de Aracnología*, **16**: 71-81
- **Duarte Gonçalves**, J.C; **Torres Rainho**, C. (1993). "Efecto de algunos macro nutrientes y del AIB en el enraizamiento in vitro del alcornoque (*Q. suber* L.) y en su posterior aclimatación". En: Congreso Forestal Español, Tomo II. Ponencias y Comunicaciones. Lourizán, 1993. pp. 331-336
- **El Kbiach**, M.L.; Lamarti, A.; Badoc, A. (2001). "Culture *in vitro* du chêne-liege (*Quercus suber* L.)". *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **140**: 89-110
- **El Kbiach**, M.L.; Lamarti, A.; Abdali, A.; Badoc, A. (2002). "Culture *in vitro* des bourgeons axillaires de chêne-liege (*Quercus suber* L.)". *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **141**: 105-116
- **EPPO** (1998). "Distribution maps of quarantine pests for Europe". N° **231**, *CAB International*, Wallingford (GB)
- **EPPO** (2004). "Diagnostic protocols for regulated pests". *EPPO Bulletin* N° **34**, pp. 201-207
- **Endemann**, M.; **Wilhelm**, E., (1999). "Factors influencing the induction and viability of somatic embryos of *Quercus robur* L". *Biologia Plantarum*, **42**: 499-504.
- **Erwin**, D.C.; Ribeiro, O.K. (1996). "*Phytophthora* diseases worldwide". American Phytopathological Society, St. Paul, USA.
- **Evers**, P.; Vermeer, E.; Van Eeden, S. (1993). "Rejuvenation of *Quercus robur*". *Ann. Sci. Forest*, **50**: 330-335
- **Fernández** Escobar, R.; Gallego, F. J.; Benlloch, M.; Membrillo, J.; Infante, J., y Pérez de Algaba, A. (1999). "Treatment of oak decline using pressurized injection capsules of antifungal materials". *Eur. J. For. Path.*, **29**: 29-38.
- **Fernández** Guijarro, B.; Celestino, C.; Toribio, M., (1995). "Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic

- embryos from leaves of *Quercus suber* L". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **41**: 99-106.
- **Fernández** Rebollo, M^a Pilar; Navarro Cerrillo, Rafael M^a; Sánchez Solana, J.E.; Trapero Casas, Antonio; Sánchez Hernández, Esperanza. (2003). "Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía". *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, **29** (1), 87-108
 - **Fernández** Rebollo, M.P.; Carbonero Muñoz, M.D.; Sánchez Hernández, M.E.; Serrano Moral, M.; Vicente Domínguez, M.; Trapero Casas, A; López Pantoja, G.; Domínguez Nevado, L. (2007). "El estado del arbolado en las Dehesas Andaluzas. Podredumbre Radical e Incidencia de Cerambícidos Xilófagos". *Informes, Estudios, Trabajos y Dictámenes*.
 - **Filonova**, L.H.; Bozhkov, P.V.; Arnold, S. Von, (2000). "Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking". *Journal of Experimental Botany*, **51**: 249-264.
 - **Fotopoulos**, S.; **Sotiropoulos**, T.E. (2005). "In vitro rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period". *Agronomy Research*, **3**(1): 3-8.
 - **Fraedrich**, S.W.; Tainter, F.H.; Miller, A.E. (1989). "Zoospore inoculum density of *Phytophthora cinnamomi* and the infection of lateral root tips of shortleaf and loblolly pine". *Phytopathology*, **79**: 1109-1113.
 - **Frampton**, L.J.; Amerson, H.V.; Leach, G.N., (1998). "Tissue culture method affects *ex vitro* growth and development of loblolly pine". *New Forests*, **16**: 125-138.
 - **Galiana**, A.; Tibok, A.; Duhoux, E. (1991). "In vitro propagation of the nitrogen-fixing tree-legume *Acacia mangium* Willd". *Plant and Soil*, **135**: 151-159
 - **Gamborg**, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. (1968). "Nutrient requirements of a suspension culture of soybean root cells". *Exp. Cell. Res.*, **50**: 151-156.

- **George, E.F.; Hall, M.A.; De Klerk, P.D.** (2008). "The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro- nutrients". En: *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition, Springer, p. 65 - 113.
- **George, E.F.; Sherrington, P.D.** (1984). "Plant propagation by tissue culture". Eversly, England: Eastern Press, p. 29 - 38.
- **Gil Pelegrín, E.; Camarero, J.J; Navarro Cerrillo, R.; Fernández Cancio, A.** (2008). "Drought and Forest Decline in the Iberian Peninsula: A Simple Explanation for a Complex Phenomenom". En: *Droughts: Causes, Effects and Predictions*. (Ed) Nova Science Publishers. ISBN: 978-1-60456-285-9
- **Gresshoff, P.M.; Doy, C.H.** (1972). "Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato)". *Planta*, **107**: 161-170
- **Haggaman, H.; Jokela, A.; Krajnakova, J.; Kauppi, A.; Niemi, K.; Aronen, T.,** (1999). "Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction". *Journal of Experimental Botany*, **50**: 1769-1778.
- **Hangarter, R.P.; Stasinopoulos, T.C.** (1991). "Regression of plant tissue culture growth by light is caused by photochemical change in the culture medium". *Plant Science*, **79**: 253-257
- **Hardham, A.R.** (2001). "The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity". *Australasian Plant Pathology*, **30**: 91-98.
- **Hardham, A.R.** (2005). "Pathogen profile: *Phytophthora cinnamomi*". *Molecular Plant Pathology*, **6** (6): 589-604
- **Hardham, A.R.** (2008). "Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of *Arabidopsis* epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack". *BMC Plant Biology*, **8**: 63-77
- **Hartmann, H.T.; Kester, T.T.; Davies, T.T.** (1990). "*Plant propagation*". Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- **Horta, M.; Sousa, N; Coelho, A.C.; Neves, D.; Cravador, A.** (2008). "In vitro and in vivo quantification of elicitor expression in *Phytophthora cinnamomi*". *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **73**: 48-57.

- **Hüberli, D.**; Tommerup, I.C.; Colquhoun, I.J.; Hardy, G.E. (2002). "Evaluation of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in seed-grown trees and clonal lines of *Eucalyptus marginata* inoculated in lateral branches and roots". *Plant Pathology*, **51**: 435-442.
- **Jeffers, S.N.**; Martin, B. (1986). "Comparision of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species". *Plant Disease*, **70**: 1038-1043
- **Kadlecek, P.**; Tichá, I.; Haisel, D.; Capková, V.; Schäfer, C. (2001). "Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth". *Plant Science*, **161**: 695-701.
- **Kartsonas, E.**; **Papafotiou, M.** (2007). "Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece". *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **90**: 111-116.
- **León Sánchez, I.** (2010). "Estudio de parámetros fisiológicos y morfológicos en base a la dosis de inóculo, en plantas de *Quercus ilex* y *Quercus suber*, infectadas con *Phytophthora cinnamomi*". Trabajo de investigación del programa de doctorado de "Gestión y Salud Ambiental" del bienio 2008-2010. Universidad de Huelva, España.
- **León Sánchez, I.** (2013). "Selección de progenies de encina (*Quercus ilex* L. spp. *ballota*) y alcornoque (*Quercus suber* L.) tolerantes al patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands". Tesis Doctoral del Dpto. Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, España.
- **León Sánchez, I.**; García, J.J.; Fernández, M.; Vázquez Piqué, F. J.; Tápias, R. (2015). "Differences in the growth of roots infected with *Phytophthora cinnamomi* Rands in *Quercus ilex* L. and *Q. suber* L seedlings". (Pendiente de publicación).
- **Leopold, A.C.** (1987). "Contemplations on hormones as biological regulators". In: *Hormone action in plant development - a critical appraisal*. Hoad, G.V.; Lenton, J.R.; Jackson, M.B.; Atkin, R.K. (Eds). London, UK: Butterworths, p. 3-15.

- **Leslie, C.A.**; Hackett, W.P.; Bujazha, D.; Hirbod, S.; McGranahan, G.H. (2005). Adventitious rooting and clonal plant production of hybrid walnut (*Junglans*) rootstock selections. *Acta Hortoculturae* (ISHS), **705**: 325-328
- **Linaldeddu, B.T.**; Sirca, C.; Spano, D.; Franceschini, A. (2009). "Physiological responses of cork and holm oak to infection by fungal pathogens involved in oak decline". *Forest Pathology*, **39**: 232-238
- **Liñán, J.**; Cantos, M.; Troncoso, J.; García, J.L.; Fernández, A.; Troncoso, A. (2011). "Some propagation methods for cloning holm oak (*Quercus ilex* L.) plants". *Central European Journal of Biology*, **6** (3): 359-364
- **Lloyd G.B.**; **McCown B.H.** (1980). "Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture". *B. Int. Plant Prop. Soc. Proc.*, **30**: 421.
- **López González, G.** (2007). "Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica". Mundiprensa Eds., Madrid, pp. 894. ISBN: 9788484763123.
- **López Pantoja, G.**; Domínguez Nevado, L.; Sánchez Osorio, I. (2008). "Mark-recapture estimates of the survival and recapture rates of *Cerambyx welensii* Küster (Coleoptera Cerambycidae) in a cork oak dehesa in Huelva (Spain)". *Central European Journal of Biology*, **3** (4): 431-441
- **Lozoya-Saldaña, H.**; Ribera-Hinojosa, R.; Colinas-León, M.T. (2007). "Fenoles, peroxidasas y fenilalanina amonio-liasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mout. De Bary)". *Agrociencia*, **41**: 479-489.
- **Mac Antsaïr, S.**; Kabrianis, M. (1993). "Establishment of explant from 200-year old *Quercus petraea* in culture". *Ann. Sci. Forest*, **50**: 336-339
- **Maia, I.**; Medeira, C.; Melo, E.; Cravador, A. (2008). "*Quercus suber* infected by *Phytophthora cinnamomi*. Effects at cellular level of cinnamomin on roots, stem and leaves". *Microscopy and Microanalysis*, **14** (S3): 146-147.
- **Mansilla, J.P.**; Pintos, C.; Salinero, M.C. (1993). "Aislamiento e identificación en la provincia de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* Rands. como patógeno de viña". *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas*, **19**: 541-549

- **Manzanera, J.A.; Pardos, J.A.** (1990). "Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L.". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **21**: 1-8
- **Marañón, T.; Villar, R.; Quero, J.L.; Pérez Ramos, I.M.** (2004). "Análisis del crecimiento de plántulas de *Quercus suber* y *Q. canariensis*: experimentos en campo y de invernadero". *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, **20**: 87-92.
- **Martin, K.P.; Zhang, C.L.; Slater, A.; Madassery, J.** (2007). "Control of shoot necrosis and plant death during micropropagation of banana and plantains (*Musa spp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **88**: 51-59.
- **Martins, A.** (2008). "In vitro mycorrhization of micropropagated plants: Studies on *Castanea sativa* Mill". In: *Mycorrhizae, Sustainable Agriculture and Forestry*. Siddiqui, Z.A.; Akhtar, M.S. and Futai, K. (Eds.). Springer Netherlands, p. 321-336
- **Maurel, M., Robin, C.; Capron, G.; Desprez-Loustau, M.L.** (2001). "Effects of root damage associated with *Phytophthora cinnamomi* on water relations, biomass accumulation, mineral nutrition and vulnerability to water deficit of five oak and chesnut species". *Forest Pathology*, **31**: 353-369
- **McDonald, K.A.; Jackman, A.P.** (1989). "Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures". *Plant Cell Rep.*, **8**: 455-458
- **McPherson, B.A.; Mory, S.R.; Opiyo, S.O.; Conrad, A.O.; Wood, D.L.; Bonello, P.** (2014). "Association between resistance to an introduced invasive pathogen and phenolic compounds that may serve as biomarkers in native oaks". *Forest ecology and management*, **312**: 154-160.
- **Meier Dinkel, A.; Becker, B.; Duckstein, D.** (1993). "Micropropagation and *ex vitro* rooting of several clones of late-flushing *Quercus robur* L.". *Ann. Sci. Forest*, **50**: 319-322
- **Mendgen, K.; Hahn, M.; Deising, H.** (1996). "Morphogenesis and mechanism of penetration by plant pathogenic fungi". *Ann. Rev. Phytopathol*, **34**: 367-386.
- **Meng, S.; Torto-Alalibo, T.; Chibucos, M.C.; Tyler, B.M.; Dean, R.A.** (2009). "Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant

- pathogens, described with Gene Ontology terms". *BMC Microbiology*, **9** (Suppl. I): S7.
- **Mercado Blanco**, J.; Collado Romero, M.; Rodríguez Jurado, D.; Jiménez Díaz, R.M. (2005). "Aplicación de técnicas moleculares para determinar la incidencia y extensión de la colonización de plantas de olivo por los patotipos de *Verticillium dahliae*". *Olivae: revista oficial del Consejo Oleícola Internacional*, **104**: 36-45
 - **Merkle**, S.A., (1995). "Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees". *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, **1**: 112-121.
 - **Miller**, P.M. (1955). "V-8 juice agar as a purpose medium for fungi and bacteria". *Phytopathology*, **45**: 461-462
 - **Miranda Fontañña**, M.E.; Fernández López, J.; Vettrano, A.M.; Vannini, A. (2005). "Resistance of *Castanea* clones to *Phytophthora cinnamomi*: testing and genetic control". *Silvae Genetica*, **56**: 11-21
 - **Misawa**, M. (1985). "Production of useful plant metabolites". En: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Fiechter, A. (Eds). Berlin, Springer-Verlag, p 59-88
 - **Montoya**, R. (1981). "Silvicultura mediterránea de los suelos pseudogley". *Bol. Estac. Cen.Ecol.* **10**: 3-10.
 - **Montoya**, J. M. (1992). "Mortandad de *Quercus*, la perspectiva silvícola y los antecedentes climáticos". *Ecología*, **6**: 123-130.
 - **Moreira**, A.C.; Caetano, P.; Correia, S.; Brasier, C. M.; Ferraz, J. F. P. (1993). "*P. Cinnamomi* associated with cork oak decline in southern Portugal". *Abstracts of the 6th International Congress of Plant Pathology*, Montreal, Canada.
 - **Murashige**, T.; **Skoog**, F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiologia Plantarum*, **15**: 473-497
 - **Murashige**, T. (1974). "Plant propagation through tissue cultures". *Ann. Rev. Plant Physiology*, **25**: 135-166
 - **Navarro** R.M., Fernández P., Ruíz J.M. (2000a). "Evaluación de los daños producidos por la Seca de especies del género *Quercus spp.* en Andalucía".

- Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.
- **Navarro** R.M., Fernandez P., Ruiz J.M. (2000b). "Manual de campo para el Inventario de Daños sobre masas de *Quercus* sp. afectadas de daños de Seca". servicio de Ordenacion de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.
 - **Navarro Cerrillo**, R.M.; Gallo Ibáñez, L.; Sánchez Hernández, M.E.; Fernández Rebollo, P.; Trapero Casas, A. (2004). "Efecto de distintas fertilizaciones de fósforo en la resistencia de brinzales de encina y alcornoque a *Phytophthora cinnamomi* Rands". *Invest. Agrar.: Sistemas de Recursos Forestales*, **13**: 550-558.
 - **Ockels**, F.S.; Eyles, A.; MacPherson, B.A.; Wood, D.L.; Bonello, P. (2007). "Phenolic chemistry of coast live oak response to *Phytophthora ramorum* infection". *Journal of Chemical Ecology*, **33**: 1721-1732
 - **O'gara**, E.; Howard, K.; Wilson, B and Hardy, GEstJ. (2005) "Management of *Phytophthora cinnamomi* for Biodiversity Conservation in Australia: Part 2. National Best Practice Guidelines. A report funded by the Commonwealth Government Department of the Environment and Heritage by the Centre for *Phytophthora* Science and Management, Murdoch University, Western Australia.
 - **Orellana**, P.A. (1998). "Propagación vía organogénesis". En: *Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología*. Pérez Ponce, J.N. (Ed.), Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de Plantas, p.151-178.
 - **Oskman Caldentey**, K-M.; Inzé, D. (2004). "Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites". *Trends in Plant Science*, **9**: 433-440
 - **Pardos**, J.A. (1982). "In vitro plants formation from stem pieces of *Quercus suber* L." Coll. Int.: *Culture in vitro des essences forestières*. Fontaineblau, France, (1981). AFOCEL (Association Forêt-Cellulose) pp.186-190
 - **Park**, Y.S.; Barret, J.D.; Bonga, J.M., (1998). "Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control

- and stability of cryopreserved clones". *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **34**: 231-239.
- **Parke**, J.L.; Oh, E.; Voelker, S.; Hansen, E.M.; Buckles, G.; Lachenbruch, B. (2007). "Phytophthora ramorum colonizes tanoak xylem and is associated with reduced stem water transport". *Phytopathology*, **12**: 1558-1567
 - **Pierik**, R.L.M. (1987). "In vitro culture of higher plants". Martinus Nijhoff (Eds), Dordrecht, pp 183-230
 - **Pierik**, R. L.M. (1990). "Rejuvenation and micropropagation". *Newsletter* **62**: 11-21.
 - **Pospíšilová**, J.; Wilhelmová, N.; Synková, H.; Catský, J.; Krebs, D.; Tichá, I.; Hanáčková, B.; Snopek, J. (1998). "Acclimatization of tobacco plantlets to ex vitro conditions as affected by application of abscisic acid". *J. Exp. Bot.*, **49**: 863-869.
 - **Puddephat**, J.; Alderson, P.G.; Wright, N.A. (1999). "In vitro root induction in axillary microshoots of *Quercus robur* L.". *Ann. Appl. Biol.*, **134**: 233-239
 - **Purohit**, V.K.; Tamta, S.; Chandra, S.; Vyas, P.; Palni, L.M.S.; Nandi, S.K. (2002a). "In vitro multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*: important Himalayan oaks". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **69**: 121-133
 - **Purohit**, V.K.; Palni, L.M.S.; Nandi, S.K.; Rikhari, H.C. (2002b). "In vitro regeneration of *Quercus floribunda* Lindl. through cotyledonary nodes: an important tree of Central Himalaya". *Current Science*, **83**: 312-316
 - **Radojevic**, L.; Álvarez, C.; Fraga, M.F.; Rodríguez, R., (1999). "Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* Arn. ssp. *salzmannii* embryos". *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, **35**: 206-209.
 - **Ragazzi**, A.; Fedi, I. D.; Mesturino, L. (1989). "The oak decline: a new problem in Italy". *Eur. J. For. Path.* **19**: 105-110.
 - **Ragazzi**, A.; Vagniluca, S.; Moricca, S. (1995). "European expansion of oak decline: involved microorganisms and methodological approaches". *Phytopathologia Mediterranea*, **34**: 207-226.

- **Rands**, R.D. (1922). "Stripe canker of Cinnamon caused by *Phytophthora cinnamomi* n. sp." *Mededelingen van het Instituut voor Plantenziekten*, **54**: 53 pp.
- **Rebasa**, P. (2005). "Conceptos básicos del análisis de supervivencia". *Cir. Esp.* **78** (4): 222-230
- **Ribeiro**, O. K. (1978). "A source book of the genus *Phytophthora*". Ed. J. Cramer. Vaduz, Liechtenstein, 417 pp. ISBN: 3-7682-1200-9
- **Ribeiro**, M.M.; Amâncio, S.; Quilhó, T.; Graça, J.; Rodrigues, J.; Mata, I. (1996). "Alterações estruturais da base de estacas de sobreiro (*Quercus suber* L.) em enraizamento, após escurecimento e AIB". *Simpósio de Propagação Vegetativa de Espécies Lenhosas*. Castelo Branco, 18 a 20 de Abril de 1996, pp.170-180.
- **Rizzo**, D.M.; Garbelotto, M.; Davidson, J.M.; Slaughter, G.W., Koike, S.T. (2002). "*Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California". *Plant Disease*, **86**: 205-214.
- **Robin**, C.; Desprez-Loustau, M. L.; Capron G.; Delatour, C. (1998). "First record in France and pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oak". *Annales Des Sciencies Forestières*, **55**: 69- 83.
- **Robin**, C.; Capron, G.; Desprez-Loustau, M.L. (2001). "Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak". *Plant Pathology*, **50**: 708-716.
- **Rodríguez-Barbero**, C.I. (2009). "Fenología de *Q. ilex* y *Q. suber* en una dehesa del centro peninsular". Proyecto fin de carrera de la Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal. Universidad Politécnica de Madrid.
- **Rodríguez Estévez**, V; Mata Moreno, C. (2002). "Ganadería sostenible en Andalucía. Papel de la dehesa en la nueva PAC". En: Libro Blanco de la Agricultura y el Desarrollo Rural. Eds. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Secretaría General Técnica). ISBN: 84-491-0590-0, pp. 848.
- **Romano**, A.; **Martin Louçao**, M.A. (1992). "Micropropagation of mature cork oak (*Quercus suber* L.): Establishment problems". *Scientia gerundensis*, **18**: 17-27

- **Romano, A.**; Noronha, C.; Martins Louçao, M.A. (1992). "Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L.". *Annals of Botany*, **70**: 531-536
- **Romero, M.A.**; Sánchez, J.E.; Jiménez, J.J.; Belbarhi, L.; Trapero, A.; Lefort, F.; Sánchez, M.E. (2007). "New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in south-west Spain and Portugal". *Journal of Phytopathology*, **155**: 289-295
- **Rosati, P.**; Messetti, B.; Gagioli, D.; Lovato, A. (1989) "Screening for *Phytophthora cactorum* resistance with culture filtrates of the fungus". *Acta Horticulturae*, **265**: 123-128
- **Rossmann, A.Y.**; Palm, M.E. (2006). "Why are *Phytophthora* and other oomycota not true fungi". *Outlooks on Pest Management*, **17** (5): 217-219.
- **Ruíz Gómez, F.J.**; Sánchez Cuesta, R.; Navarro Cerrillo, R.M.; Pérez de Luque, A. (2012). "A method to quantify infection and colonization of holm oak (*Quercus ilex*) roots by *Phytophthora cinnamomi*". *Plant Methods*, **8**: 39-48
- **Sánchez, M.C.**; San José, M.C.; Ballester, A.; Vieitez, A.M. (1996). "Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. Rubra* shoots derived from mature trees". *Tree Physiology*, **16**: 673-680
- **Sánchez, M.E.**; Caetano, P.; Ferraz, J.; Trapero Casas, A. (2000). "El decaimiento y muerte de encinas en tres dehesas de la provincia de Huelva". *Bol. San. Veg. Plagas*, **26**: 447-464
- **Sánchez, M.E.**; Caetano, P.; Ferraz, J.; Trapero, A. (2002). "*Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain". *Forest Pathology*, **32**: 5-18
- **Sánchez, M.E.**; Andicoberry, S.; Trapero Casas, A. (2005). "Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *Ballota*". *Forest Pathology*, **35**: 115-125
- **Sánchez Zabala, J.**; Arana, O.; Ortega, U.; Robredo, A.; Majada, J.; Iturritxa, E.; Duñabeitia, M. (2009). "Efecto de la micorrización en la respuesta de *Pinus pinaster* a la inoculación con *Fusarium circinatum*". En: Montes y sociedad: Saber qué hacer. V Congreso Forestal Español. Ávila, Septiembre 2009.

- **San Miguel Ayanz, A.** (1994). "La dehesa española. Origen, tipología, características y gestión". Fundación Conde del Valle de Salazar, Madrid.
- **Sauvaire, D.; Galzy, R.** (1981). "In vitro micropropagation of sugarcane by cuttings". *L'agronomie Tropicale*, **1**: 65-68
- **Schwarz, O.J.; Schlarbaum, S.E.** (1993). "Axillary bud proliferation of 2 North American oak species: *Quercus alba* and *Quercus rubra*". *Ann. Sci. Forest*, **50**: 340-343
- **Sharma, T.; Modgil, M.; Thakur, M.** (2007). "Factor affecting induction and development of *in vitro* rooting in apple rootstocks". *Indian Journal of Experimentak Biology*, **45**: 824-829
- **Sha Valli Khan, P.S.; Evers, D.; Hausman, J.F.** (1999). "Stomatal characteristic and water relations of *in vitro* grown *Quercus robur* NL 100 in relation to acclimatization". *Silvae Genetica*, **48**: 83-87
- **Shearer, B. L.; Tippet, J.T.** (1989). "Jarrah dieback: the dynamics and management of *Phytophthora cinnamomi* in the Jarrah (*Eucalyptus marginata*) forest of south-western Australia". Departament of Conservation and Land Management, Western Australia. *Research Bulletin*, **3**: 1-76.
- **Smith, E.F.; Gribaudo, I.; Roberts, A.V.; Mottely, J.** (1992a). "Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevines". *Hort. Sci.*, **27**: 111-113
- **Smith, I.M.; Dunez, J.; Lelliot, R.A.; Phillips, D.H.; Archer, S.A.** "Manual de enfermedades de las plantas". Ed. Mundi-Prensa, Madrid (1992b), 671pp.
- **Smith, S.E.; Read, D.J.** (2008). In: "Mycorrhizal symbiosis". 3rd Edition, San Diego, USA.
- **Soria, S.; López, M.** (1997). "Presencia, sintomatología y daños de *Erwinia quercina* en España y su posible relación con la seca de la encina". *Ecología* **11**: 295-301.
- **Sowik, I.; Bielenin, A.; Michalczuk, L.** (2001). "In vitro testing of strawberry resistance to *Verticillium dahliae* and *Phytophthora cactorum*". *Scientia Horticulturae*, **88**: 31-40.

- **Stafford**, A.; Morris, P.; Fowler, M.W. (1986). "Plant cell biotechnology: a perspective". *Enzyme Microb. Technology*, **8**: 19-23
- **Stukely**, M.J.C.; **Crane**, C.E. (1994). "Genetically based resistance of *Eucalyptus marginata* to *Phytophthora cinnamomi*". *Phytopathology*, **84**: 650-656
- **Takemoto**, D.; Hardham, A.R.; Jones, D.A. (2005). "Differences in cell death induction by *Phytophthora* elicitors are determined by signal components downstream of MAP Kinase Kinase in different species of *Nicotiana* and cultivars of *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*". *Plant Physiology*, **138**: 1491-1504.
- **Tápias**, R.; Fernández, M.; Salvador, L.; Santana, R.; García, J.; Alcuña, M.M.; José, V.; Inchusta, A.; Vázquez, J.; Torres, E.; Cravador, A. (2008). "Physiological effect of *Phytophthora cinnamomi* infestations in *Quercus suber* seedlings". In: *SUBERWOOD 2005 Conference. New challenges for integration of cork oak forest and products*. Pag. 267-277. ISBN: 978-84-96826.
- **Tápias**, R.; Fernández, M.; Sáenz, A.; Alcuña, M.M.; José, V.; Inchusta, A.; Moreira, A.C.; Cravador, A. (2005). "Variabilidad de la resistencia/tolerancia de plántulas de encina (*Quercus ilex* subsp. *Ballota* L.) al patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands. Evaluación de supervivencia y crecimiento". *IV Congreso Forestal Español*. Zaragoza, Septiembre 2004.
- **Toribio**, M.; **Celestino**, C. (1989). "Cultivo *in vitro* de alcornoque". *Scientia gerundensis*, **15**: 11-21
- **Toribio**, M.; **Celestino**, C. (2000). "El uso de la Biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales". *Invest. Agrar.: Sistema de Recursos Forestales*, Fuera de serie nº2: 249-260
- **Torres Juan**, J. (1985). "El *Hypoxylon mediterraneum* (De Not) Mill y su comportamiento en los encinares y alcornocales andaluces". *Bol. San. Veg. Plagas*, **11**: 185- 191.
- **Trapero**, A.; Romero, M.A.; Sánchez, J.E.; Sánchez, M.E. (2006). "La seca de encinas y alcornoques en Andalucía: decaimiento y enfermedad". *Bol. Inf. Cideu*, **1**: 7-14.

- **Trapero Casas, A.**; Jiménez Díaz, R.M. (1985). "Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in Southern Spain". *Phytopathology*, **75**: 1146-1151.
- **Turco, E.**; Close, T.J.; Fenton, R.D.; Ragazzi, A. (2004). "Synthesis of dehidrin-like proteins in *Quercus ilex* L. and *Quercus cerris* L. seedlings subjected to water stress and infection with *Phytophthora cinnamomi*". *Physiological and Molecular Pathology*, **65**: 137-144.
- **Tuset, J.J.**; Hinarejos, C.; Mira, J.L.; Cobos, J.M. (1996). "Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la seca de encinas y alcornoques". *Bot. San. Veg. Plagas*, **22**: 491-499
- **Tuset, J.J.**; Cots, F.; Hinarejos, C.; Mira, J.L. (2001). "Suspensiones de zoosporas de *Phytophthora cinnamomi* que causan la seca en cinco especies de *Quercus mediterráneos*". *Bot. San. Veg. Plagas*, **27**: 103-115
- **Valencia, L.D.C.**; Pascual, C.B.; Delfin, E.F. (2014). "In vitro selection of pineapple cv. 'Queen' with resistance to culture filtrate of *Phytophthora cinnamomi* Rands". *Philippine journal of crop science*, **39** (1): 58-66.
- **Vannini, A.**; Valentini, R.; Luisi, N. (1996). "Impact of drought and *Hypoxylon mediterraneum* on oak decline in the Mediterranean region". *Ann. Sci. For* **53**: 753- 760.
- **Vengadesan, G.**; Pijut, P.M. (2009). "In vitro propagation of northern red oak (*Quercus rubra*, L.)". *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, **45**: 474-482
- **Vieitez, A.M.**; Sánchez, C.; San José, M.C. (1989). "Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak". *Scientia Horticulturae*, **41**: 151-159
- **Vieitez, A.M.**; Pintos, F.; San José, M.C.; Ballester, A. (1993). "In vitro shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L.". *Tree Physiology*, **12**: 107-1117
- **Vieitez, A.M.**; Sánchez, M.C.; Amo Marco, J.B.; Ballester, A., (1994). "Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **37**: 287-295.

- **Wagner, F.; Vogelmann, H.** (1977). "Cultivation of plant cell cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites". En: *Plant tissue culture and its biotechnological application*. Barz, W.; Reinhard, E. and Zenk, M.H. (Eds). Springer Verlag, Berlin, New York, p. 245-252
- **Weste, G.; Cahill, D.M.** (1982). "Changes in root tissue associated with infection by *Phytophthora cinnamomi*". *Phytopathologische Zeitschrift*, **103**: 97-108
- **Xing, Z.Z.; Powell, W.A.; Maynard, C.A.,** (1999). "Development and germination of American chestnut somatic embryos". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **57**: 47-55.
- **Yang, G.; Read, P.E.** (1997). "In vitro shoot proliferation of 5-leaf aralia explants from field grown plants and forced dormant stems". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **47**: 289-291
- **Zaid, A.; Hughes, H.G.** (1995). "Water loss and polyethylene glycol-mediated acclimatization of *in vitro*-grown seedlings of five cultivars of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plantlets". *Plant Cell Rep.* **14**: 385-388.
- **Zentmeyer, G. A.** (1980). "*Phytophthora cinnamomi* and diseases it causes". *American Phytopathological Society Monograph*, **10**: 1-96.
- **Zentmeyer, G.A.** (1983). "The world of *Phytophthora*". En: *Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. Erwin, D.C.; Bartnicki-Garcia, S. and Tsao, P.H. eds. pp. 1-8, American Phytopathological Society, St. Paul, USA.
- **Zhu, L-H.; Wu, X-Q.; Qu, H-Y.; Ji, J.; Ye, J-R.** (2010). "Micropropagation of *Pinus massoniana* and mycorrhiza formation *in vitro*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **102**: 121-128.

