



INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES IRNAS



Universidad Mayor de San Simón

FACULTAD DE AGRONOMIA - ESCUELA TECNICA SUPERIOR DE AGRONOMIA

MEJORA DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE LAS ESPECIES
ANDALUZAS AMENAZADAS:

Euonymus latifolius, *Buxus sempervirens*, *Cotoneaster granatensis* y
Rhododendron ponticum subsp. baeticum.

Nelson Charles Peredo Chavez



Agradecimientos:

Al Dr. D. Antonio Troncoso de Arce, Profesor de investigación de C.S.I.C. (I.R.N.A.S.), Mi enorme respeto y admiración por su apoyo constante durante mi estancia en el centro, así como su dirección, consejos y experiencia, que me sirvieron para realizar con éxito el presente trabajo de investigación.

Al Dr. D. Manuel Cantos Barragán, Titulado Técnico Especializado del C.S.I.C. (I.R.N.A.S.), Quiero expresarle mi mas eterna gratitud por todo su apoyo así como mi enorme satisfacción de sentirme honrado de haber trabajado bajo su dirección, por su dedicación y orientación profesional y por trasmitirme su calidad humana inigualable.

A Dña. Juana Liñan Benjumea, Titulado Técnico Especializado del C.S.I.C. (I.R.N.A.S.), Por su aprecio y su desinteresada disponibilidad en todo momento para superar dudas y dificultades y por su gran calidad humana.

Al Msc. Ing. Juan Villarroel Solis Director Académico de la Facultad de Agronomía por su constante apoyo y consejos para poder realizar el presente curso internacional, sin el cual no hubiera podido realizarlo.

A la Dr. Nancy Antelo Selada por su cariño y afecto asía mi persona, por apoyarme en los momentos mas difíciles que sin ello no hubiera podido realizar el presente curso internacional.

A mis compañeros y amigos Javier Tronco , Sara Sanz cuya invaluable amistad y apoyo los llevare en mi por siempre.

Al Dr. Luis Clemente Salas Director del **I.R.N.A.S.** por su apoyo y desmedro por toda su disponibilidad así como su valor humano en apoyarnos en todo momento durante nuestra estancia en el **I.R.N.A.S.**

A la Agencia Española de Cooperación Internacional **A.E.C.I.** por haberme dado la oportunidad y a ser realidad mi participación en el presente Curso internacional.

A toda mi familia por quererme y alentarme a seguir con mis estudios. A Rieni , Natalia y Eliana por su cariño y constante aliento.

Quiero dedicar este trabajo a mis hermanos Pánfilo, Guido, Domytila, Leonarda, David Hugo, Edson y Hernán por todo su apoyo y aprecio que me demuestran. A mis padres Benigna y Florentino por su dedicación y lucha constante en conseguir la felicidad de sus hijos.

Muy especialmente a Serapia y Ignacio mis abuelos y Juan Peredo Jaimes porque su recuerdo permanecerá conmigo por siempre.

Indice General	Pg.
1 Introducción	1
1.1 Sostenibilidad Forestal. Espacios Protegidos	2
1.2 Propagación	2
1.3 Cultivo de Tejidos Vegetales <i>in vitro</i>	3
1.3.1 Características generales	3
1.3.1.1 Material Vegetal	4
1.3.1.2 Ambiente Químico: El medio de cultivo	6
1.3.1.3 Ambiente Físico: Condiciones Ambientales	8
1.3.1.3.1 Asepsia	8
1.3.1.4 Ambiente Físico: condiciones de incubación	10
1.3.1.4.1 Necesidades de Luz	11
1.3.1.4.2 Influencia de la temperatura	12
1.3.2 Micropropagación	13
1.3.4 Germinación <i>in vitro</i> de semillas	17
1.3.4.1 El cultivo <i>in vitro</i> aplicado a la mejora Forestal	18
1.4 Material vegetal objeto del presente trabajo	20
1.4.1 Buxus sempervirens	20
1.4.1.1 Descripción Botánica	20
1.4.1.2 Distribución geográfica	21
1.4.1.3 Comportamiento ecológico	21
1.4.1.4 Interés económico y etnobotánico	22
1.4.1.5 Riesgos y agentes de perturbación	22
1.4.2 Cotoneaster granatensis	23
1.4.2.1 Descripción	23
1.4.2.2 Distribución y demografía	24
1.4.2.3 Riesgos y agentes de perturbación	24
1.4.2.4 Tratamientos Pregerminativos	24
1.4.3 Euonymus latifolius	25
1.4.3.1 Descripción	25
1.4.3.2 Distribución geográfica	26
1.4.4 Rhododendron ponticum subsp. baeticum	27
1.4.4.1 Descripción Botánica	27
1.4.4.2 Distribución y demografía	29
1.4.4.3 Amenazas	30
1.4.4.4 Interés económico y etnobotánico	30
1.4.4.5 Medidas de conservación	31
1.4.4.6 Biología de la reproducción	31
1.4.4.7 Antecedentes sobre el cultivo <i>in vitro</i> de material vegetal de Rhododendron	32
II OBJETIVOS	33
III MATERIALES Y METODOS	33
III.1 Buxus sempervirens	33
III.1.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	33
III.1.2 Germinación en semillero	33
III.1.3 Germinación de semillas con endocarpo <i>in vitro</i>	35
III.1.4 Cultivo de semillas desnudas <i>in vitro</i>	37
III.1.5 Diseño experimental	38
III.2 Cotoneaster granatensis	38

III.2.1	Material vegetal y condiciones de cultivo	38
III.2.2	Germinación en semillero	38
III.2.3	Germinación de semillas con endocarpo <i>in vitro</i>	39
III.2.4	Cultivo de semillas desnudas sin endocarpo <i>in vitro</i>	40
III.2.5	Diseño Experimental	42
III.3	<i>Euonymus latifolius</i>	42
III.3.1	Material vegetal y condiciones de cultivo	42
III.3.2	Germinación en semillero	42
III.3.3	Germinación de semillas <i>in vitro</i>	43
III.3.4	Cultivo de embriones <i>in vitro</i>	43
III.3.4.1	Influencia del medio del medio de cultivo sobre el desarrollo de embriones	43
III. 3.5	Diseño experimental	44
III.3.5	Influencia del contenido de sacarosa del medio de cultivo sobre el desarrollo de embriones	
III.3.5.1	Influencia del contenido de Glicina del medio de cultivo sobre el desarrollo de embriones	45
III.3.6	Material vegetal	45
III.3.6.1	Condiciones de crecimiento	45
III.3.6.2	Método de establecimiento de los embriones <i>in vitro</i>	46
III.3.6.3	Diseño experimental y análisis de datos	46
III.3.6.4	Tratamientos y parámetros evaluados	46
III.3.6.5	Toma de datos	47
III.4	<i>Rhodendron ponticum</i> subsp. <i>baeticum</i>	47
III.4.1	Materiales y Métodos	47
III.4.1.1	Cultivo de semilla <i>in vitro</i>	47
III.4.1.2	Medios de cultivo	47
III.4.1.3	Diseño experimental	48
IV.	Resultados y Discusión	49
IV.1	<i>Buxus sempervirens</i>	49
IV.1.1	Germinación en bandeja	49
IV.1.2	Germinación de semillas con cubierta <i>in vitro</i>	49
IV.1.3	Cultivo de semillas sin cubierta <i>in vitro</i>	50
IV.2	<i>Cotoneaster granatensis</i>	51
IV.2.1	Germinación en bandeja	51
IV.2.2	Germinación de semillas con endocarpo <i>in vitro</i>	51
IV.2.3	Cultivo de semillas desnudas <i>in vitro</i>	52
IV.3.	<i>Euonymus latifolius</i>	54
IV.3.1	Germinación en bandeja	54
IV.3.2	Siembra de semillas <i>in vitro</i>	55
IV.3.3	Cultivo de embriones <i>in vitro</i>	56
IV.3.4	Efecto de la concentración de sacarosa sobre el desarrollo y crecimiento de embriones <i>in vitro</i> de <i>Euonymus latifolius</i> .	58
IV.3.5	Efecto de la concentración de glicina sobre el desarrollo y crecimiento de embriones <i>in vitro</i> de <i>Euonymus latifolius</i> .	62
IV.4	<i>Rhododendron ponticum</i> subsp. <i>baeticum</i>	68
IV.4.1	Cultivo de semillas <i>in vitro</i>	68
V.	Bibliografía	71

MEJORA DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE LAS ESPECIES ANDALUZAS AMENAZADAS: *Euonymus latifolius*, *Buxus sempervirens*, *Cotoneaster granatensis* y *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*.

I.- INTRODUCCION

I.1 SOSTENIBILIDAD FORESTAL. ESPACIOS PROTEGIDOS.

La conservación y el desarrollo sostenible de los bosques son temas esenciales dentro de algunas políticas comunes vigentes, como las de desarrollo rural, medio ambiente y otras.

Los principios de la utilización sostenible de los bosques se definen y aplican en el marco de programas forestales nacionales, regionales, gobiernos autónomos o mediante otros instrumentos de los estados miembros de la UE.

Según la información suministrada por el plan Forestal Español, la superficie forestal, una vez actualizados los datos del inventario Forestal Nacional en su tercera fase (1997-2002), asciende a 26.273.235 hectáreas, equivalentes al 51.93% del territorio español. Aunque este porcentaje es superior al de la mayoría de los países Europeos, a diferencia de estos, una buena parte de la superficie forestal de España carece de árboles ya que tan solo el 56% (14.732.247 hectáreas) de la superficie forestal esta arbolada y se la puede considerar, en consecuencia, como bosque.

La Comunidad Autónoma de Andalucía es la segunda en superficie protegida ascendiendo ésta a 4.325.378 hectáreas equivalentes al 16.46% del territorio Español.

En ella se encuentran 82 espacios naturales en diferentes escalas de protección, garantizando así la conservación de una buena parte de su flora. Entre ellos se pueden destacar el Parque Natural de Cazorla, Segura y Las Villas, el de Sierra Nevada y, uno de los más extensos, el Parque Natural "Los Alcornocales" con una superficie 170.025 hectáreas cubriendo buena parte del Campo de Gibraltar. En los citados se han recolectado semillas de las especies estudiadas en el presente trabajo.

I.2 PROPAGACIÓN

Las especies vegetales superiores se pueden propagar por vía sexual o reproducción, o por vía vegetativa o multiplicación. En el primer caso, la nueva planta se obtiene por germinación de una semilla que se formó de la unión de una célula masculina con una femenina, cada una de ellas con su dotación cromosómica propia. Significa esto, que la planta hija no reproducirá íntegros los caracteres genéticos del padre o de la madre, sino que, salvando la dominancia entre parentales, será una fusión de los caracteres de ambos. A veces, la flor de la que procede la semilla es hermafrodita, es decir que posee órgano femenino y masculino hábiles y que por tanto se puede producir autofecundación (fecundación del óvulo con polen de la misma flor). No obstante, y debido a fenómenos de heterocigosis, la planta hija no suele ser idéntica al parental. En consecuencia, por propagación sexual (reproducción) se suele obtener una planta hija distinta a cada uno de los genitores, lo cual significa un aumento de la diversidad genética o biodiversidad. Esta variabilidad es una condición importante para la supervivencia de poblaciones forestales, ya que un exceso de individuos genéticamente semejantes es un riesgo elevado ante una situación de adversidad. Por ello, la reproducción es un sistema conveniente en la propagación de plantas de bosque.

Sin embargo, bastantes plantas forestales no responden a las técnicas de reproducción debido a que existen semillas que germinan muy mal e incluso no lo hacen. Esto puede ser debido a malformaciones, fenómenos de dormancia o desequilibrios entre la maduración del fruto y el embrión. Frecuentemente, la cubierta seminal (testa o endocarpo) es la responsable de la mala respuesta, bien porque al ser excesivamente dura e impermeable constituye una barrera a la salida del embrión y al intercambio de gases y agua con el exterior, o porque en ella se acumulan inhibidores de tipo hormonal. Se utilizan distintos procedimientos para disminuir los efectos de esta dormición, como ingestión por animales, tratamientos con ácidos o bases, frío, tratamientos con auxinas o giberelinas etc., que no siempre producen los resultados deseados. Otras veces, la acumulación de inhibidores se produce en el endospermo que rodea al embrión, con lo que aún son mayores las dificultades para eliminarlas. Por otra parte, también se puede producir un desfase entre el grado de maduración del embrión y los tejidos que lo rodean, lo que retrasa mucho la germinación.

La eliminación de la cubierta seminal cuando es ese el foco de la dormición, o también del endospermo, si existe endodormancia, quedando entonces el embrión aislado, son las técnicas que eliminan más drásticamente las dificultades de la germinación.

En ambos casos, es decir, tanto para que la semilla desnuda o el embrión aislado resistan el proceso germinativo, es necesario utilizar otros métodos. Entre éstos se puede destacar el cultivo *in vitro*.

I.3.- Cultivos de tejidos vegetales in vitro.

I.3.1. Características generales.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* consiste en el desarrollo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles y aisladas (dentro de un contenedor transparente), de células o tejidos vegetales. Se basa en los principios de autonomía (capacidad para vivir aislada) y totipotencia (capacidad de regenerar una planta completa) de la célula vegetal.

El término cultivo *in vitro* es un término muy genérico referido a una determinada metodología, de amplias utilidades prácticas en el campo de la Biología Vegetal.

Aunque ya en 1902 Haberland intentó el desarrollo *in vitro* de *Lamium purpureum*, es en los últimos 50 años, cuando los conocimientos acerca del uso y aplicaciones del cultivo de plantas *in vitro* ha crecido rápidamente.

Como se ha definido, en sentido amplio el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se refiere al crecimiento y desarrollo de órganos o secciones, tejidos, células o protoplastos, sobre un medio nutritivo y en condiciones de asepsia.

El desarrollo histórico de la técnica del cultivo *in vitro* de tejidos va estrechamente ligado a los intentos por probar experimentalmente la teoría de la totipotencia (capacidad que tienen las células vegetales nucleadas de regenerar parte de la planta (raíz, tallo, hojas, órganos) o la planta completa de la que proviene. El comportamiento totipotente de las células aisladas se ha probado sobradamente en un gran número de especies, sin embargo no se puede afirmar que todas las células vegetales con núcleo sean totipotentes, pues depende del grado de especialización de las mismas, es decir, la totipotencia, cualidad inherente de las células

vegetales, está más reprimida cuanto mayor es el grado de madurez del tejido a que pertenece.

Una de las ventajas del cultivo *in vitro* es la propagación clonal durante todo el año de individuos o variedades interesantes, consiguiendo además elevadas tasas de multiplicación partiendo de poco material, en poco tiempo y en un espacio reducido.

El objetivo de la técnica de cultivo *in vitro* es dirigir el crecimiento y desarrollo del explanto manipulando su entorno, en consecuencia, los factores que influyen en el éxito del cultivo son: el material vegetal, el medio de cultivo y las condiciones ambientales.

I.3.1.1 - Material vegetal.

Como material vegetal de partida, se puede emplear cualquier parte de la planta (Figura 1): semillas, flores, tallos, óvulos, trozo de planta con yemas, microsporas, meristemos (grupo de células en división pertenecientes a un tejido joven y que, por tanto, se hallan en lugares de crecimiento de la planta como son los extremos de la raíz o del brote apical), embriones, callo (masa desorganizada de células de tipo parenquimático), suspensiones celulares (células independientes, no organizadas en tejidos mantenidas en un medio líquido), protoplastos (estructuras obtenidas por digestión enzimática de la pared de la célula).

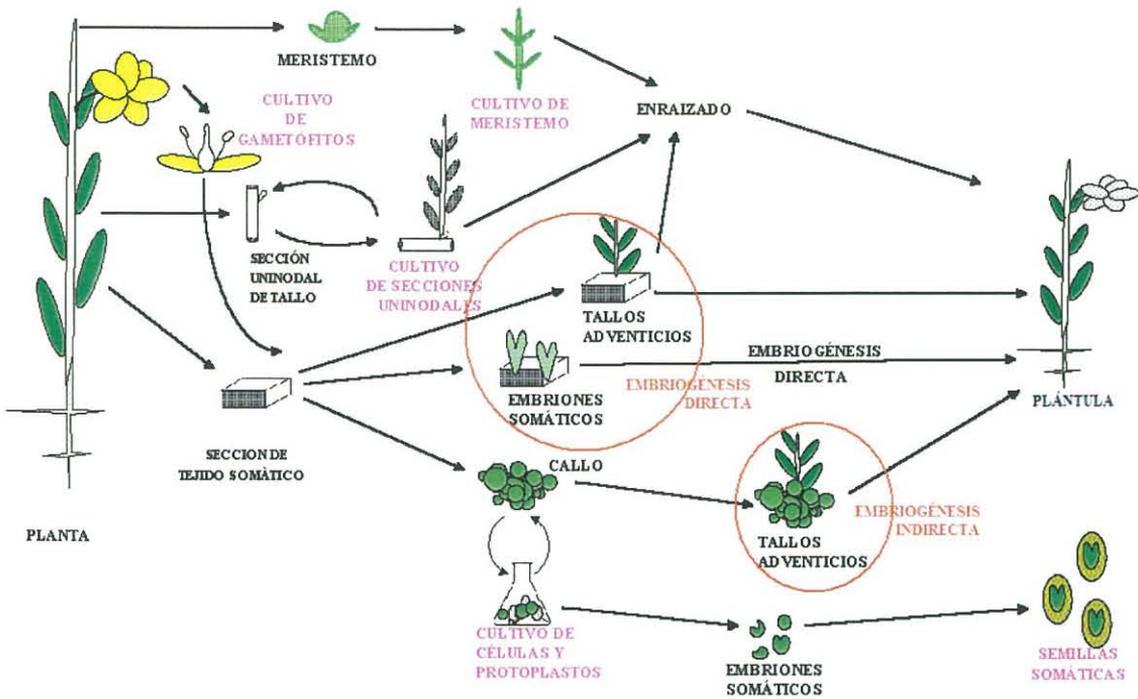


Figura 1. Resumen de los principales tipos de cultivo in vitro.

El estudio de cualquier fenómeno biológico en condiciones de laboratorio exige reproducir de la forma más aproximada posible todos los factores que se dan en la naturaleza que inciden en el fenómeno estudiado. Este principio general se aplica, en consecuencia, también al cultivo *in vitro* de plantas. Sin embargo, reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el biotopo de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que son responsables directos del comportamiento de la planta en condiciones naturales. Cuando no se usa la planta completa, lo que por otra parte es lo habitual en el cultivo *in vitro* como se ha comentado, sino con una parte de la misma (explanto), a la dificultad de reproducir las condiciones naturales se debe añadir que desaparecen muchos mecanismos reguladores que se presentan en las plantas enteras. Por ello los explantos cultivados *in vitro* son especialmente sensibles a la acción de determinados agentes como los nutricionales, ambientales (luz, temperatura, fotoperíodo) incluso a contaminantes fáciles de combatir en condiciones naturales. Esta sensibilidad puede traducirse en la aparición de carencias y toxicidades exageradas si no se fijan muy estrechamente las condiciones de cultivo.

En resumen, el cultivo *in vitro* de plantas superiores es una técnica que exige un control absoluto del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explanto. Conviene, por tanto, conocer cuales son los principales factores que conforman el ambiente del explanto y que deberán ser controlados.

Con finalidad puramente descriptiva se puede clasificar los principales factores que afectarán al desarrollo del cultivo *in vitro* como:

I.3.1.2 Ambiente químico: El medio de cultivo.

El medio nutritivo constituye un factor fundamental en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ya que además de proporcionar a éstos los nutrientes necesarios para su desarrollo, les sirve de soporte físico.

El medio de cultivo se puede definir como una solución acuosa que contiene una parte mineral, que aporta a la misma macro (N, P, K, Ca, Mg, y Fe) y micronutrientes (Zn, B, Mn, Cu, I, Co, Ni, Al y Mo) y una parte orgánica (azúcares, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento). Esta solución acuosa está solidificada en la mayor parte de los casos por una sustancia denominada agar. El agar necesita un calentamiento hasta casi ebullición (80 °C) durante algunos minutos para poder disolverse en el medio nutritivo. Al enfriarse hace que el sustrato adquiera una consistencia sólida. Sin embargo, el agar, aunque su uso es muy generalizado, presenta algunos inconvenientes, como ofrecer una aireación insuficiente al sistema radicular, lo que puede llegar a inhibir su desarrollo normal.

Las plántulas cultivadas *in vitro*, aunque tienen color verde debido a que poseen clorofila, su función fotosintética está muy reducida. Por ello es necesario suplementar el medio con una fuente de carbono. Generalmente se usan azúcares, normalmente sacarosa (1-3%), aunque también se pueden usar otros como manitol y glucosa.

Los azúcares secundarios (mio-inositol) mejoran la división celular y participan en la formación de la pared celular.

En el desarrollo de tejidos vegetales *in vitro* son fundamentales las vitaminas del grupo B. Así la B1 (*tiamina*), mantiene los ápices caulinares y la B6 o *piridoxina*, es importante en el

metabolismo de los aminoácidos. La *biotina* es un cofactor de la actividad auxínica. El *pantotenato* de Ca es fundamental en la respiración.

La *vitamina C* o *ácido ascórbico* es un antioxidante. También se incluyen, a veces, el ácido nicotínico o vitamina PP y el *ácido fólico*.

Aunque generalmente la fuente de nitrógeno del medio es, como se ha indicado, tanto en forma de ión amonio como nitrato, algunos autores han llamado la atención sobre el uso de aminoácidos para optimizar el medio de cultivo, por ejemplo Waris (1962) afirmó que los aminoácidos leucina y glicina tiene efectos muy profundos en la morfogénesis. Por otra parte es interesante observar que la glicina es un constituyente normal de los suplementos orgánicos de White (White, 1963; Sing. et al, 1981) motivo principal por el que White utilizó extracto de levadura indicando su efecto especialmente beneficioso en los cultivos de raíces de tomate, donde la glicina representaba alrededor del 0.5% de su contenido de aminoácidos de dicho extracto de levadura. Por otro lado, la glicina es el aminoácido cuya molécula es la de menor tamaño, tiene un único átomo de hidrogeno en su cadena lateral, este tamaño reducido le facilitaría su mejor absorción por los tejidos.

Los **reguladores de crecimiento** son aquéllos compuestos orgánicos que, en pequeñas cantidades, inhiben, promueven o modifican algún proceso fisiológico que a su vez origina la inhibición o estímulo del crecimiento y la organogénesis. En el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se usan con mayor frecuencia:

- Auxinas; Afectan al crecimiento y división celular e intervienen en la formación de callos y raíces.
- Citoquininas; provocan la neoformación de yemas adventicias y suprimen la dominancia apical. Tienen una acción estimulante de la morfogénesis.

pH

Como se ha indicado, cuando se prepara un medio de cultivo, después de añadir todos sus componentes y antes de autoclavar, se procede a ajustar el pH final al valor deseado,

añadiendo OHNa 0.1 N o HCl 0.1 N al medio. El pH final del medio de cultivo es un factor importante por diversas razones:

- Valores bajos, inferiores a 3.5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos.
- El valor del pH puede afectar a la solubilidad de algunos componentes del medio de cultivo.
- Puede afectar a la absorción de determinados nutrientes por parte del explanto (por ejemplo la absorción de iones NO_3^- aumenta con la acidez del medio).
- El valor del pH puede afectar al pH del citoplasma y, como consecuencia, a la actividad de muchos enzimas.

En general, en la mayoría de situaciones se trabaja con un pH entre 5.2 y 5.8.

Una vez ajustado el pH del medio, este sufrirá una ligera acidificación durante el proceso de esterilización en autoclave, para, después, evolucionar nuevamente durante el período del cultivo, de forma que se irá acidificando progresivamente como resultado de la absorción diferencial de algunos componentes del sustrato, así como por la excreción de exudados por parte del explanto.

I.3.1.3 Ambiente físico: Condiciones ambientales.

I.3.1.3.1 Asepsia:

La primera condición para el éxito de un cultivo *in vitro* es la asepsia, ya que los medios en que se desarrolla el tejido vegetal son muy favorables para la proliferación de bacterias y hongos. Esta proliferación está causada fundamentalmente por los microorganismos en suspensión residentes en el aire, por los propios tejidos vegetales, el medio de cultivo y la propia persona que realiza el experimento (piel, respiración,...). En consecuencia, se impone la necesidad de la eliminación total de los microorganismos mediante técnicas que no dañen los tejidos. Por lo tanto, se deben respetar escrupulosamente los tiempos y niveles de esterilización.

Para la esterilización del medio de cultivo se pueden elegir entre varios métodos que se engloban en dos:

- a) Destrucción física de los microorganismos, utilizando aire seco, vapor de agua, luz ultravioleta o radiación gamma. Temperatura-presión.
- b) Eliminación física de los microorganismos por filtración.

Lo más frecuente es la esterilización del conjunto formado por los recipientes, donde va contenido el medio de cultivo, tapados con los tapones correspondientes. Esta esterilización se realiza en autoclave por medio de vapor de agua a presión durante un periodo de 20 minutos a 120° C de temperatura. Este procedimiento de esterilización mediante calor húmedo a presión también se usa para esterilizar el papel de filtro sobre el que se maneja el material. En el caso del instrumental para la manipulación del material vegetal en cámara de flujo laminar, como pinzas, bisturís, etc., se usa un horno a 250° C (figura 2).

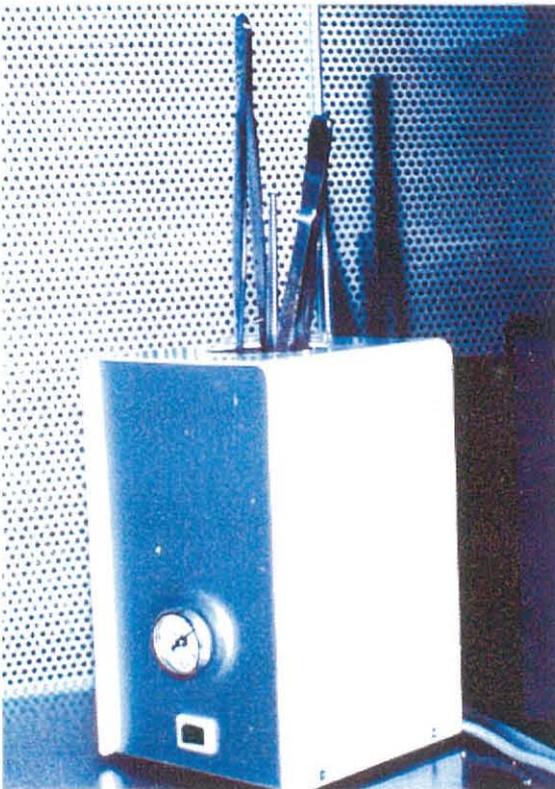


Figura 2. Horno para esterilización del material en cámara de flujo laminar.

Toda la manipulación, subcultivos, siembras en medio fresco etc., se deben llevar a cabo mediante el uso de sistemas de filtración de aire forzado, utilizando filtros especiales

que impiden el paso de los agentes contaminantes (cámara de flujo laminar figura 3). Esta cámara es una cabina en forma generalmente prismática con una única cara libre (la frontal) que da acceso al interior, donde se localiza la superficie de trabajo. La esterilidad de la zona de trabajo se consigue porque se hace circular a través del interior de la cámara una corriente de aire que previamente ha sido microfiltrada no dejando pasar partículas de diámetro superior a 0,22 micras. Para evitar que el aire del exterior pueda entrar en la cámara de flujo sin pasar previamente por los filtros, se impulsa el aire desde el filtro en dirección al exterior, con lo cual el aire siempre circula del interior al exterior de la cámara y nunca al revés, creando un flujo continuo, que en el caso del cultivo *in vitro* de plantas es en forma horizontal (figura 3).

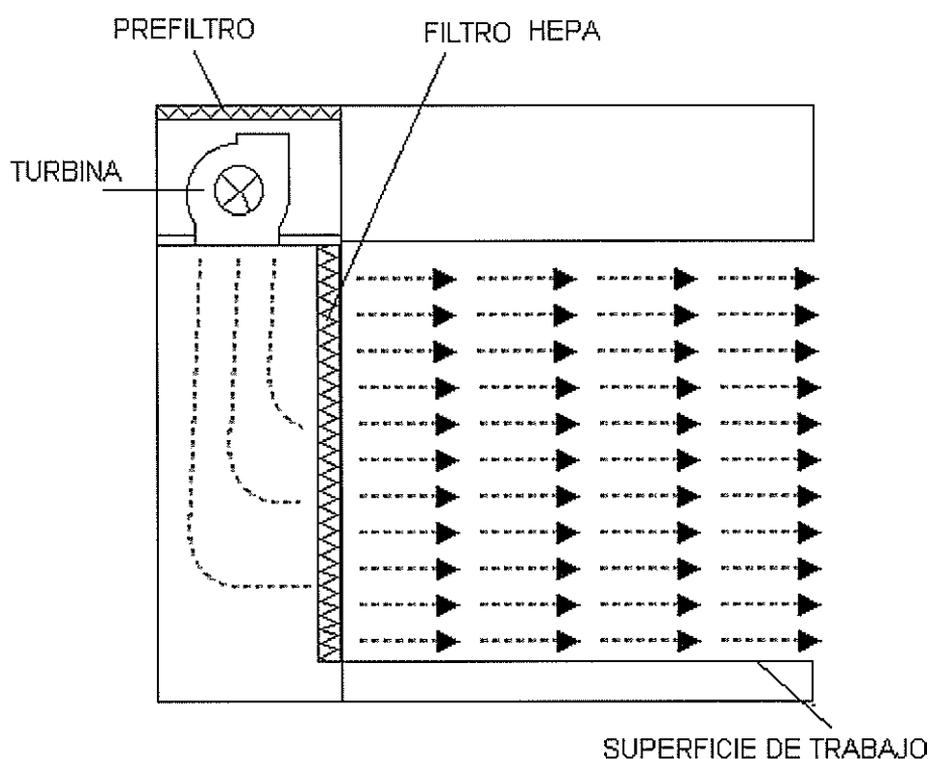


Figura 3. Esquema de una cámara de flujo laminar horizontal.

I.3.1.4 Ambiente físico: Condiciones de incubación.

Los factores físicos con mayor influencia sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* son: la iluminación y la temperatura, ya que la humedad dentro del recipiente de cultivo está a saturación. Dado que las medidas preventivas para evitar la contaminación requieren un

intercambio mínimo con el exterior , la concentración de gases (oxígeno, dióxido de carbono, etileno...) dentro del contenedor empieza a tener relevancia cuando la duración en esas condiciones es excesivamente prolongada, con lo que se provoca que algunos de esos gases como el etileno comiencen a mostrar niveles tóxicos. En caso contrario, (duración entre 1 y 2 meses) los niveles de oxígeno y CO₂ suelen ser adecuados para un buen desarrollo de la parte aérea.

I.3.1.4.1 Necesidades de luz

La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos y en ello radica la importancia de controlar este factor en los cultivos *in vitro*.

La iluminación puede descomponer en tres parámetros: la intensidad, la duración y la calidad de la luz.

La intensidad (potencia luminosa por unidad de superficie) viene expresada en W.m⁻² o μEm⁻²s⁻¹, y habitualmente, en las cámaras de cultivo de tejidos, varía de 25 a 125 μEm⁻²s⁻¹ (5 a 25 W.m⁻² ; 1000 a 5000 lux;). Se sabe que una baja intensidad favorece la formación de callo, mientras que una intensidad alta fortifica y desarrolla los tallos.

La duración de la iluminación se entiende como la alternancia diaria de los ciclos de luz (fotoperiodo) con los de oscuridad . Algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización,...) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta. De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explanto cultivado *in vitro* afecta a su desarrollo. En la práctica la mayor parte de los cultivos *in vitro* se desarrollan con un fotoperiodo de 16 a 18 horas por día.

La calidad de la luz es esencial para las plantas, ya que la clorofila y los demás pigmentos fotosintéticos captan la energía contenida en diferentes radiaciones para incorporarla a las diversas reacciones químicas que constituyen el proceso. Pero la luz también puede intervenir en otros procesos fisiológicos, como el fototropismo, la germinación, la floración,...Todos estos fenómenos no son producidos en igual medida por todos los tipos de luz (radiaciones de cualquier longitud de onda) sino que algunas

radiaciones concretas tienen un efecto notable mientras que otras tienen poco o ningún efecto. Por ello, es necesario conocer el espectro de la radiación que es activo en el proceso fisiológico estudiado. La cámara de cultivo deberá reproducir lo mejor posible ese espectro de luz activo, por lo tanto conviene conocer cuál es el espectro que emiten nuestras fuentes de luz y en qué medida se adapta éste a las necesidades de nuestro cultivo.

1.3.1.4.2 Influencia de la temperatura.

La temperatura a la que está expuesto el explanto cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y, por consiguiente es un factor fundamental a controlar. En general, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo. Este intervalo puede variar en función del genotipo, del órgano del que se ha obtenido el explanto, de la época del año, de la edad de la planta madre, del fotoperíodo, etc. Sin embargo, determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo *in vitro* puede ser un proceso muy laborioso que, además, exige gran cantidad de cámaras de cultivo reguladas de forma diferente. Afortunadamente, y para la mayoría de situaciones, se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 y 28^o C.

Para controlar la luz y temperatura el cultivo *in vitro* se realiza dentro de espacios denominados cámaras de cultivo (figura 4).

La temperatura de la cámara de cultivo viene afectada por la temperatura ambiente de la sala donde se sitúa y el calor generado por las fuentes de luz de que dispone. El control de la temperatura a la que se desarrolla el cultivo *in vitro* se efectúa mediante un sistema de refrigeración-calefacción controlado a través de un termostato. El sistema de refrigeración-calefacción debe estar correctamente dimensionado a fin de conseguir que la temperatura en toda la zona de cultivo se mantenga dentro de los límites deseados.

Las cámaras de cultivo están especialmente diseñadas con estanterías metálicas adecuadas, en donde se colocan los cultivos, con estantes de madera, cristal o malla metálica que permitan la iluminación necesaria, normalmente suministrada mediante tubos fluorescentes adaptados a la estructura metálica de la propia estantería.

I.3.2 Micropropagación.

Esta técnica es una de las primeras aplicaciones del cultivo *in vitro* debido a que presenta una serie de ventajas tales como la mejora y selección genética mediante la disminución del tiempo de selección de plantas de interés la obtención de organismos haploides y líneas puras o la regeneración a partir de protoplastos y una rápida propagación clonal. También es interesante destacar la producción de metabolitos secundarios, que pueden ser productos farmacológicos (antibióticos o antivirales) en biorreactores incluso transformando genéticamente el material vegetal para producir el metabolito deseado .

La micropropagación consiste en tomar de la planta madre un órgano o un trozo de éste, lo que se denomina "explantos", generalmente pequeño en relación al tamaño de la planta, y bajo condiciones asépticas, someterlo a sucesivos cultivos *in vitro* hasta obtener nuevas plantas semejantes a la inicial. El tejido de partida pueden ser meristemos apicales, ápices caulinares o de yemas. Los ápices caulinares comprenden las regiones más apicales del brote en crecimiento (0.5 – 2 cm de longitud). El cultivo de yemas se inicia a partir de yemas terminales o axilares (nudo), generalmente unidas a un segmento de tallo. Asimismo, se puede realizar micropropagación por inducción de embriones adventicios o embriogénesis somática. Tanto el cultivo de yemas como de embriones somáticos pueden realizarse, bien directamente sobre los explantos (fragmentos de tejidos u órganos) aislados de la planta madre, o indirectamente a partir de tejidos de callo o cultivo de células en suspensión, que han sido obtenidas por la proliferación de células de los explantos iniciales.

En el proceso de micropropagación o multiplicación *in vitro* de las plantas se pueden establecer cuatro etapas (figura 5):

- Etapa 0: Preparación del material madre.
- Etapa 1: Establecimiento en cultivo aséptico.
- Etapa 2: Producción de propágulos apropiados (Multiplicación de brotes).
- Etapa 3: Preparación de los propágulos para su transferencia a tierra (Enraizamiento).
- Etapa 4: Transferencia al ambiente natural.

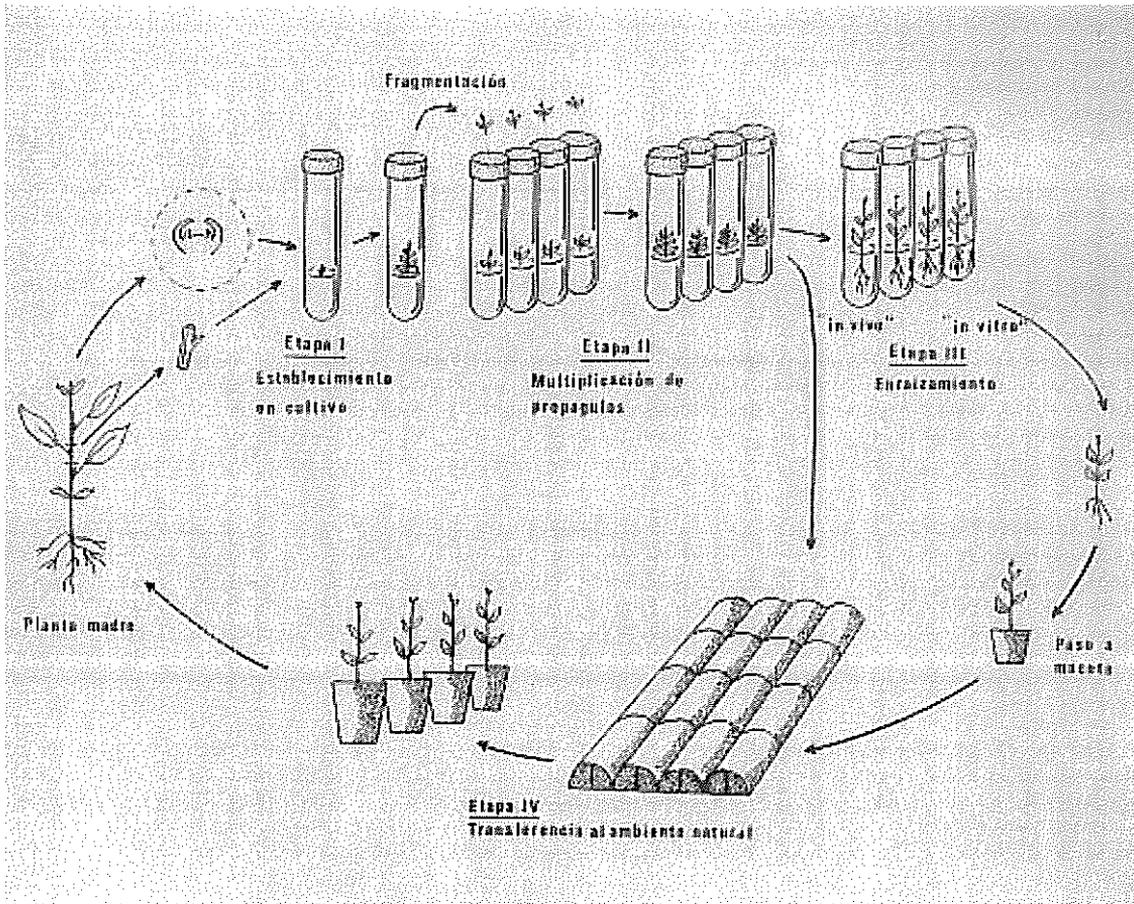


Figura 5. Esquema de las Etapas de la Micropropagación

Etapa 0: Preparación del material madre.

La planta original, que condiciona todo el cultivo ulterior, debe presentar las mejores características agronómicas y sanitarias, para contar con un material de partida en las mejores condiciones posibles. En general, se comportan mejor los explantos si proceden de plantas madres cultivadas en invernadero.

Etapa 1: Establecimiento en cultivo aséptico.

La etapa inicial en el proceso de micropropagación es obtener un cultivo aséptico del material vegetal seleccionado. Por consiguiente, se requiere que los explantos sean transferidos al medio de cultivo convenientemente desinfectados y además que se inicie un desarrollo apropiado, es decir, que se comience el crecimiento del ápice caulinar o yema, o se dé la formación del callo. Esta etapa se considera

satisfactoria si un número adecuado de explantos sobrevive sin contaminación y se mantiene en crecimiento.

Para la total eliminación de las fuentes de infección del material vegetal se usan agentes esterilizantes, generalmente, después de un lavado prolongado del mismo con agua y detergente suave, etanol 70%, de hipoclorito sódico (ClONa), siendo conveniente añadir a la disolución algunas gotas de un mojante, por ejemplo Tween 20 para eliminar la tensión superficial y favorecer la acción del hipoclorito. Transcurrido el tiempo de acción, es imprescindible su eliminación mediante repetidos lavados con agua estéril (Figura 6).

En casos excepcionales de un material excesivamente contaminado (semillas) se puede usar, otros tipos de productos más agresivos (mercurobutol, bicloruro de mercurio).



Figura 6. Proceso de esterilización del material vegetal para su establecimiento *in vitro*.

Etapa 2: Producción de propágulos apropiados (Multiplicación de brotes).

El objetivo de esta etapa es llevar a cabo la multiplicación de órganos y estructuras capaces de dar lugar a nuevas plantas completas. Estas estructuras pueden ser nuevos brotes axilares o adventicios, o bien embriones. Los brotes producidos en

esta etapa se consideran propágulos, es decir, pueden utilizarse para propagar una nueva planta o cultivarse de nuevo con el fin de multiplicarse e incrementar su número.

Etapa 3: Preparación de los propágulos para su transferencia a tierra (Enraizamiento).

Los brotes o pequeñas plántulas (si proceden de embriones) producidos en la etapa anterior, son muy pequeños e incapaces de sobrevivir en el suelo. En esta etapa se pretende la obtención de plantitas que puedan ser eficientes autotróficamente. Esta fase incluye el enraizamiento *in vitro* o *ex vitro* de los brotes antes de su transferencia al suelo.

Etapa 4: Transferencia al ambiente natural.

Si no se lleva a cabo debidamente esta transferencia, puede originarse una gran pérdida de plantas, debido a dos razones:

- Los brotes desarrollados en cultivo se forman bajo condiciones de elevada humedad y baja intensidad luminosa. Como consecuencia hay menos formación de ceras epicuticulares, lo que determina, en las plantas cultivadas *in vitro*, una rápida pérdida de agua al ser pasadas a las condiciones ambientales del exterior.
- Cuando se suministra sacarosa u otro carbohidrato al medio de cultivo, y las condiciones son de baja intensidad luminosa, las plantas así obtenidas no dependen de su propia fotosíntesis. Esto determina que precisen de un periodo de varios días de adaptación que le permitan ser capaces de producir sus propias fuentes de carbono y nitrógeno reducido, es decir, ser autótrofas.

En la práctica las plantas obtenidas en la etapa 3 se trasplantan a un medio de emisión radicular con buen drenaje, manteniéndolas durante un periodo mas o menos largo en condiciones de elevada humedad y baja luminosidad, bien sea por riego o

mediante la protección de cubiertas o túneles de plástico. Posteriormente, la humedad se irá rebajando paulatinamente hasta que se complete el endurecimiento de la planta a las condiciones del exterior.

I.3.4. Germinación in vitro de semillas.

El cultivo in vitro puede mejorar sensiblemente la germinación de la semilla completa de cualquier especie, en particular en lo que se refiere al adelanto del proceso, dado que los factores físicos ofrecidos por este método, en especial humedad y temperatura, procuran unas condiciones constantes que favorecen dicho proceso. Además, la planta obtenida se desarrolla en un medio estéril que facilita la experimentación posterior mediante el uso de estas técnicas.

Esta aplicación, tanto en germinación convencional como en germinación de embriones puede solventar el fenómeno natural denominado latencia que se puede definir como un estado de inactividad biológica, que se manifiesta por el retraso temporal de la germinación de las semillas. Hasta el punto de que las semillas producidas por algunas especies nunca germinan en la naturaleza, o lo hacen con gran dificultad. Ello es debido probablemente a ciertos tipos de latencias recalcitrantes.

Las tres causas concretas que motivan la dormancia son la barrera mecánica de la cubierta de la semilla (exolatencia) el efecto del endospermo (endolatencia) y la inmadurez del embrión. De esta forma, en muchas especies solamente es durmiente la semilla intacta, pudiendo ser el embrión "no durmiente", ya que la dormancia viene impuesta por la cubierta. Sin embargo, en semillas que necesitan un período de frío, el embrión se mantiene "durmiente" incluso cuando se desprovee a la semilla de la cubierta. En el primer caso, aparte del efecto físico de tener que traspasar una cubierta dura, la presencia de la cubierta modifica el intercambio gaseoso entre el embrión y el medio externo. Por ello, la importancia de la interferencia con la absorción de oxígeno en la dormancia de ciertas semillas y el efecto físico de la cubierta deben tenerse en cuenta junto con factores hormonales que pueden inhibir o promover la germinación.

Dentro de las posibilidades ya apuntadas, muchos autores han considerado la presencia del endocarpo leñoso como la principal causa de la dormancia, por ser, al menos una barrera mecánica que impide temporalmente la salida del embrión. En el olivo, otra Oleaceae, varios autores (Lagarda, Martín y Polito, (1983) y Crisosto y Sutter (1985)) han defendido esta

hipótesis. Otros como Mitrakos y Diamantoglou (1984), indican además, que el endocarpo impide la hidratación y oxigenación. Lambardi et al. (1994). Parece ser, que la semilla de olivo exhibe una dormancia que está causada por factores que residen al menos en el endospermo, ya que, el uso de semillas desnudas, sin endocarpo, mejora sensiblemente la germinación. Troncoso et al. (1998), redujeron a 45 días, con altos porcentajes, la germinación de las variedades *Picual*, *Galego* y *Gordal* utilizando semillas sin cubierta.

I.3.4. El cultivo in vitro aplicado a la mejora forestal

El cultivo in vitro de tejidos vegetales se aplica con creciente interés en el ámbito forestal, donde se emplea en combinación con las técnicas convencionales, con fines de mejora de la propagación.

Las técnicas de cultivo in vitro ofrecen ventajas (puntos A y B) e inconvenientes (puntos C y D), al ser aplicadas a especies forestales en general, representativas de un entorno, vulnerables o en vías de extinción:

- A.- Permiten la obtención de un gran número de unidades en un pequeño espacio y un corto período de tiempo.
- B.- Son adecuadas para especies recalcitrantes a su propagación con métodos convencionales.
- C.- Imposibilidad, en la mayoría de los casos, de establecer una fase 0 de plantas madres, que reúnan condiciones fitosanitarias adecuadas. Consecuentemente se produce una elevada proporción de fracasos iniciales.
- D.- Sistema costoso y que requiere especialmente el mantenimiento de la estabilidad genética y del potencial regenerativo.

Fue el francés Gautheret quien obtuvo por vez primera callo a partir de la proliferación in vitro del cambium de explantos de *Salix caprea* (1934) y asimismo mostró la formación de elementos vasculares en el callo neoformado; como también la aparición de yemas adventicias sobre tejido cambial, de *Ulmus campestris* (1940). Por otra parte Gioelli (1938) observó que en ocasiones se formaban raíces sobre el callo de *Salix caprea*.

Aunque muchos autores han trabajado en gran variedad de medios, con carácter general los más usados en especies forestales han sido los recomendados por Winton (1976), Mott (1981) y Sommer y Caldas (1981), partiendo la mayoría de los investigadores del medio de Murashige y Skoog (1962), con algunas variantes. La característica más sobresaliente de estos medios es que son extremadamente ricos en nutrientes, ya que han de formar una situación de heteromorfismo en el material vegetal y soportar una proliferación muy activa. El tipo y cantidad de fuente nitrogenada, es especialmente importante, no sólo para el crecimiento, sino para las manifestaciones de organogénesis (Minocha, 1981). En términos generales puede decirse que la incorporación de una fuente de carbono –generalmente sacarosa– y de varios cofactores orgánicos (vitaminas) al medio basal –tiamina, piridoxina, ácido nicotínico– unidos a la adición de una auxina y una citoquinina, en concentraciones y proporciones muy variables, constituye la práctica de uso más generalizado.

Una vez estudiado el medio de cultivo, uno de los factores que condicionan en mayor medida las respuestas morfogénicas es el tipo de explanto empleado, habiéndose utilizado: semillas, embriones, hojas cotiledonares, porciones de tallo, hipocótilo y epicótilo, segmentos nodales de tallo, yemas porciones de cambium y órganos florales. En términos generales, la edad del tejido y, especialmente, la edad de la planta donante condicionan las respuestas obtenidas en la propagación vegetativa convencional. En la propagación de Angiospermas, no fue hasta 1968 cuando Winton, trabajando con *P. tremuloides*, obtuvo la primera planta de naturaleza arbórea *in vitro*. Desde entonces se han estudiado una gran cantidad de técnicas en la micropropagación de diferentes tejidos de un gran número de especies forestales. Desde géneros como Pópulus (*P. nigra*, *P. canescens*, *P. tremula* y otros), Quercus (*Q. rubra*, *Q. suber*), Betula (*B. papyrifera* y *B. alleghanensis*), diferentes especies de Eucalyptus y también el género Prunus aparecen recogidas ampliamente en la bibliografía. Entre las Fagáceas encontramos el castaño, y también se han obtenido respuestas organogénicas y en algunos casos regeneración de plantas enteras en otras especies arbóreas como *Salix babylonica* L., *Morus alba* y *Tectona grandis*.

I.4 Material vegetal objeto del presente trabajo.

I.4.1. *Buxus sempervirens*.

Seleccionada en el presente estudio por ser una especie catalogada como vulnerable en el Libro Rojo de Especies Protegidas y Amenazadas de Andalucía (2000), para reforzar las poblaciones naturales en las Sierras Béticas Orientales en bosques caducifolios sobre sustrato calizo de las provincias andaluzas de Almería, Granada, Jaén.

I.4.1.1 Descripción botánica-

Buxus sempervirens L., Sp. Pl. 983 (1753). Arbusto o subarbusto de (0,5) 1-5 (8) m. erecto, densamente foliado, muy ramoso. Las ramas poseen entrenudos pelosos a lo largo de dos bandas opuestas, siendo las adultas glabras, con la corteza resquebrajada, amarillenta. Las hojas son opuestas muy coriáceas y lustrosas, de contorno aovado – elíptico de color verde oscuro brillante por el haz y verde amarillento por el envés, con pecíolo corto. Las flores en glomérulos en axilas de las hojas superiores, con una flor femenina central con pistilo terminado en 3 estilos persistentes, rodeadas de muchas flores masculinas sésiles con 4 pétalos los amarillentos 4 estambres opuestos a ellos. La floración va de marzo a mayo y fructifica a lo largo del verano.

La fructificación es abundante pudiéndose recoger el fruto mediante ordeño. El fruto es una cápsula de 8- 11 x 6 -8 mm. ovoidea, rematada en 3 cuernecillos muy característicos (estilos persistentes) de 1,5- 2,5 mm, abriéndose por 3 valvas. Semilla lisa, de color negro y brillante de 5- 6 x 2,5 –3 mm, carúncula de 0.5 x 1,5 mm, de forma alargada- fusiforme.





Figura 7.- Algunos aspectos descriptivos de *Buxus sempervirens*

I.4.1.2 Distribución geográfica

Buxus sempervirens se encuentra en Europa central y meridional, Asia occidental y Africa del norte. Se presenta de forma abundante en el cuadrante nororiental de la península Ibérica especialmente Pirineos y cordilleras catalanas, alcanzando de forma más localizada el sistema Ibérico y Sierras del levante hacia el sudeste. En el tercio occidental de la península se encuentra naturalizado desde antiguo. Sus localidades más meridionales se sitúan en Andalucía, en pleno dominio de la región Mediterránea, de forma disyunta a los macizos peninsulares colindantes con la región eurosiberiana. Esto le confiere una gran singularidad, incrementando su amplitud ecológica y dando lugar a diferentes comunidades edafo - dependientes. En la sierra Cazorla, Segura y las Villas forma masas importantes; está citado como raro en barrancos de la sierra de Castril; abundante tan solo en la Serrezuela de Bedmar de todo el macizo de Mágina; presente en las sierras del suroeste de Jaén (La Pandera y Grajales) mostrando según zonas coberturas variables; en Sierra de Gádor se señala en 3 localidades de forma más puntual.

I.4.1.3 Comportamiento ecológico

El boj es una especie calcícola, de requerimientos hídricos elevados, presente en altitudes comprendidas entre 400–1700 m. Asociada en Andalucía generalmente a bosques

caducifolios de quejigal o aceral, con suelos profundos y humificados y con sotobosque de *Buxus*. Se puede observar la presencia constante de *Daphne laureola* L., *Quercus faginea* Lam., *Acer granatense* Boiss., *Amenlanchier ovalis* Medik.

No es raro encontrarlo también en suelos esqueléticos de roquedos y murallones calizos ya que presenta una gran resistencia a los de esta naturaleza, siempre que sean umbrosos y suficientemente frescos, asociados a pinares de *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* (Dunal) Franco y *Juniperus phoenicea* L. En este caso su cobertura es menor alcanzando sólo un 25 a 50%.

I.4.1.4 Interés económico y etnobotánico

Uno de los usos de mayor interés etnobotánico del boj ha sido su utilización desde la época romana en jardinería por su follaje siempre verde, denso y por admitir bien la poda. Su madera es dura y fácil de trabajar, apreciada en ebanistería y para hacer objetos domésticos. Una vez seca se agrieta con facilidad.

Entre los principios activos las hojas y corteza de las raíces contienen un alcaloide muy tóxico (buxina), usado como febrífugo, emético laxante, sudorífico, narcótico. Por su toxicidad, no es conveniente utilizarlo como remedio casero. Una dosis elevada puede resultar muy tóxica. Se ha usado como sustituto de la quinina, en el tratamiento de la malaria.

El boj está considerado como un sucedáneo menos efectivo de la corteza de quina de la que tanto se habla en tratamientos contra la malaria, aunque por su acción sudorífica resulta útil en tratamientos depurativos del organismo generalmente asociado a otras plantas como la fumaría, la raíz de zarzaparrilla o el mismo diente de león.

I.4.1.5 Riesgos y agentes de perturbación

Buxus sempervirens debe ponderarse especialmente en las evaluaciones de impacto ambiental y evitar cualquier daño en las comunidades silvestres regulando la extracción de madera, ramas etc. Es conveniente establecer colecciones de germoplasma y viveros de propagación con la intención de promocionar el uso de germoplasma autóctono en cultivos ornamentales, e incrementar el número de accesiones de localidades diferentes en el banco de germoplasma vegetal andaluz.

I.4.2.2. Distribución y demografía

Cotoneaster granatensis es exclusiva de las sierras Béticas, desde la Sierra de Grazalema (Cádiz) hasta la Sierra de Aitana (Alicante). En Sierra Nevada es frecuente, existiendo al menos en 10 localidades, con un número de individuos estimado entre 5000 y 10000.

Vive en bosquetes caducifolios, habitualmente en barrancos y zonas umbrosas con orientación norte, aunque también puede colonizar grietas y escarpes rocosos, preferentemente en sustrato calizo; convive con quejigos *Quercus faginea*, arce granadino *Acer opalus* subsp. *granatense*, mostajo (*Sorbus aria*), tejo (*Taxus baccata*), pino silvestre *Pinus sylvestris* subsp. *nevadensis*, madreSelva arbórea *Lonicera arborea*, agracejo *Berberis hispanica*, cerezo de Santa Lucía (*Prunus mahaleb*), endrino (*Prunus spinosa*), escaramujos *Rosa spp.* majuelo (*Crataegus monogyna*), rascaviejas (*Adenocarpus decorticans*), durillo agrio (*Amenlanchier ovalis*), etc. Entre los 1500 y 2000 m de altitud, en el piso supramediterráneo.

I.4.2.3 Riesgos y agentes de perturbación

En Sierra Nevada los bosquetes caducifolios tienen una gran biodiversidad y un carácter relictico, ya que son propios de condiciones climáticas más frescas y lluviosas; por ello están relegados a zonas con microclimas particularmente favorables. Su conservación debe ser prioritaria, ya que si deterioran no vuelven a regenerarse, siendo sustituidos por plantas perennifolias, como la encina, mejor adaptadas a las condiciones actuales.

El ganado impide la regeneración natural de las poblaciones al consumir sistemáticamente todos los individuos jóvenes en las zonas más afectadas.

I.4.2.4. Tratamientos pregerminativos

El guillomo presenta una gran dificultad para germinar debido a la dureza e impermeabilidad de la cubierta seminal y las condiciones del embrión.

Según Young & Young (1999), El tratamiento pre-germinativo recomendado para el género *Cotoneaster* es la escarificación ácida seguida de una estratificación fría durante 3 –4 meses para promover la germinación.

La especie tiene un bastante interés en repoblación forestal, se cultiva en vivero en envase forestal de 300 cc. para planta tipo 1-0, obteniéndose un tamaño final variable entre 15-30 cm. su cultivo a raíz desnuda es menos frecuente, aunque puede cultivarse en eras planta tipo 1-1 si se desea una tamaño mayor, entre 40-80 cm, aunque su destino en este caso es la jardinería o las repoblaciones especiales.

I.4.3 *Euonymus latifolius*

Los criterios de selección para especie son al ser una especie clasificada como en peligro de extinción por Libro Rojo de Especies Protegidas y Amenazadas de Andalucía (2000), y el reforzamiento de las poblaciones naturales Sierras Béticas Orientales de Jaén, sobre suelos calizos.

I.4.3.1 Descripción

Conocida como bonetero es una especie perteneciente a la familia Celastraceae de carácter relictico en España. Sus poblaciones presentan escaso número de individuos y están refugiadas en microhábitats favorables. Está sometida a la acción de los herbívoros.

***Euonymus latifolius* (L.) Millar, Gard. Dict. Ed.8, nº 2 1768.** Es un arbusto de 2-3 m, o arbolito de hasta 7 m, caducifolio. Hojas de 6-13 (16) x 3.5 –7 cm, opuestas, obovadas o elípticas, acuminadas, serruladas.



Figura 9.- Algunos aspectos morfológicos de *Euonymus latifolius*.

Inflorescencias en cimas largamente pedunculadas, con 5- 10 (15) flores pentámeras o tetrámeras, hermafroditas; pétalos de hasta 3 mm, verdosos o teñidos de rosa o de púrpura; ovario supero. Fruto capsular de 1,5 – 2 cm, con (4) 5 lóculos aquillados en el dorso, de color rojo brillante en la madurez. Las semillas están rodeadas por un arilo anaranjado o rojizo.

I.4.3.2 Distribución geográfica

Euonymus latifolius se encuentra distribuido en Europa (hasta el Cáucaso), región Irano – Turánica y Norte de África (Atlas Medio, Atlas tellense y cabilia). En España, se encuentra en las Sierras de Cazorla y Segura (Jaén) y en la Sierra de Javalambre (Teruel).

Suele encontrarse refugiado en zonas frescas y umbrías, generalmente cerca de agua de montaña formando parte del bosque de galería, o bien al abrigo de paredones rocosos o en el interior de las grietas de torcales. Algunas de las especies acompañantes son: *Ulmus glabra*, *Acer granatense*, *A. monspessulanum*, *Amenlanchier ovalis*, *Buxus sempervirens*, *Clematis vitalba*, *Corylus avellana*, *Dhapne laureola*, *Festuca gautieri*, *Fraxinus angustifolia*, *Hederá helix*, *Hepatica nobilis*, *Ilex aquifolium*, *Juniperus communis*, *J. sabina*, *Ligustrum vulgare*, *Quercus faginea*, *Sorbus aria*, *Taxus baccata*, *Viburnum tinus*, etc. El rango altitudinal oscila entre 720-1900 m.

Esta especie es típica de climas húmedos, las flores son hermafroditas y suelen ser polinizadas por insectos, sobre todo dípteros (Calliphoridae, Muscidae y Tachinidae). La proporción de flores que producen frutos maduros es bastante baja, un 20% aproximadamente.

La dispersión de las semillas la realizan aves frugívoras (petirrojos), por lo que puede tener gran alcance, aunque la escasez de hábitats apropiados dificulta su propagación. Las semillas son viables aún perteneciendo a poblaciones de un sólo individuo, pero el porcentaje de germinación es muy bajo. No está claro si existe algún tipo de reproducción vegetativa. No se han detectado plagas o enfermedades.

El efecto de las amenazas para la especie está potenciado por su escasa capacidad de propagación. Cualquier cambio que disminuya las condiciones de humedad del hábitat supone una lenta declinación de sus efectivos. Los herbívoros impiden la regeneración natural, al consumir rebrotes y plántulas.

Como medidas de conservación de la especie existen semillas en el banco de germoplasma Vegetal Andaluz y en el de Vadillo – Castril (Sierra de Cazorla, Jaén).

Entre las medidas propuestas para la conservación de *Euonymus latifolius* están la reducción de la carga ganadera, la vigilancia y seguimiento de las poblaciones. Aconsejando el Libro Rojo de Especies Protegidas y Amenazadas de Andalucía (2000) continuar el estudio biológico debido a las enormes dificultades que manifiesta la propagación convencional.

Por tanto el empleo del cultivo de embriones in vitro es una alternativa para superar las dificultades antes mencionadas de los métodos tradicionales reduciendo o eliminando la latencia de las semillas, permitiendo a su vez estudiar los requerimientos nutricionales de los embriones en su desarrollo y la obtención de plántulas viables.

1.4.4 Rhododendron ponticum* Subsp. *baeticum

Esta subespecie perteneciente a la familia Ericaceae se considera de especial interés debido a ser un paleoendemismo del Sur de España (Parque Natural de los Alcornocales) y Portugal (Sierras de Monchique y Caramulo) protegido y catalogado como en peligro de extinción (Arroyo y Mejías, 1999). En el Parque Natural de los Alcornocales las poblaciones de *R. ponticum baeticum* están constituidos por individuos viejos con pocas plantas jóvenes formadas por acodos circunstanciales. A veces se observan algunas plantitas originadas por germinación pero que no suelen progresar. Estos hechos indican que *R. ponticum baeticum* presenta dificultades importantes a la regeneración, que se ven agravadas por los efectos de otras circunstancias (desmontes, rozas, fuegos, etc..).

1.4.4.1. Descripción botánica:

Rhododendron ponticum Subsp. *baeticum* (Boiss & Reuter) Hand. Mazz Arbusto perennifolio, lauroide, de hasta 7 m. de altura, inicialmente de crecimiento monopódico, posteriormente simpódico. Frecuentemente con una cepa o lignotubérculo muy desarrollado del que surgen varios troncos. Corteza lisa; ramas jóvenes glabras ; posee hojas

de 3-6 x 6-16 cm., enteras, coriáceas, elíptico-lanceoladas con nervio central marcado; pecíolo muy corto. De floración primaveral, entre mediados de marzo y mediados de junio, sus inflorescencias son terminales, en racimos corimbiformes de 8-21 flores; brácteas bien desarrolladas que protegen los botones hasta el momento de la floración. Pedicelos alargados. Cáliz verdoso con 5 sépalos de 1-2 mm.; corola de hasta 6 cm de diámetro, campanulada, con 5 lóbulos, ligeramente zigomorfa, rosado- púrpúrea con un área clara y un canal nectarífero en el lóbulo superior, garganta pilosa. Las flores producen gran cantidad de néctar y son polinizadas por gran variedad de insectos: polillas nocturnas y diurnas, moscas (Sírfidos y Bombílidos), abejas y abejorros, aunque estos últimos son los más frecuentes, también son muy frecuentes Coleópteros pequeños de la familia Nitidulidae. El androceo de flor posee 10 estambres, con filamentos curvados muy alargados, pelosos en la base; antera con dos tecas de dehiscencia poricida. Ovario ovoideo, glabro, generalmente con 5 carpelos, con un nectario en su base; estilo exerto. No existe un mecanismo de incompatibilidad genética, pero las flores necesitan la visita de los insectos para que se produzca la polinización, debido a la gran separación entre anteras y estigmas. El porcentaje de fructificación en condiciones naturales es inferior a 15 %, mientras que la adición de polen lo incrementa hasta un 60%. El fruto es una cápsula oblongoidea u ovoidea de hasta 2,5 cm, con dehiscencia septicida. Semillas oblongo – ovoideas, de aproximadamente 1 – 1,5 mm, superficie estriada, con un pequeño grupo de escamas alargadas en cada extremo $2n = 26$. El numero medio de semillas por fruto en condiciones naturales es de unas 120. El desarrollo de la cápsula comienza inmediatamente tras la floración, no alcanzando la madurez hasta otoño. No obstante, en cada planta las cápsulas van abriendo a un ritmo lento, observándose durante todo el invierno muchas aún no abiertas. Parte importante de las semillas se libera inmediatamente tras la apertura de las cápsulas, pero un cierto número de ellas permanece en su parte basal durante muchos meses.



Figura 10. Aspectos morfológicos de *Rhododendron ponticum*

El ciclo vegetativo es prolongado, pero el máximo desarrollo se produce entre el momento de la máxima floración y una semana después de terminada ésta.

I.4.4.2. Distribución y demografía:

Como se ha comentado es una especie de distribución paleoendémica en la Península Ibérica. Esta presente en el sur de Cádiz (Sierras del Algibe, Campo de Gibraltar) y en el extremo occidental de la provincia de Málaga, constituyendo un componente característico de la vegetación del subsector algbico. Su distribución se completa con las pequeñas poblaciones de las sierra de Monchique y Caramulo en Portugal.

En su área española es un taxon relativamente abundante. Las poblaciones están constituidas sobre todo por individuos adultos de gran tamaño cuya edad es difícil de estimar. En el Parque Natural “Los Alcornocales” presenta una zonación altitudinal cuya cota mínima se encuentra en los 340 m. y la máxima en los 860 m. Por tanto, su altitud media en la zona es de 600 m.; apareciendo la máxima abundancia del taxon en las sierras de Aljibe, sobre los 700 m.

Los numerosísimos valles presentes en Los Alcornocales dan lugar a la creación de bosques en galerías, localmente conocidos como “canutos” con condiciones climáticas y ambientales diferenciadas que originan formaciones vegetales diversas.

Estas formaciones suponen auténticos bosques subtropicales, hoy en día desaparecidos del continente europeo salvo en Turquía y España. Los canutos encierran, sin lugar a dudas, lo más importante de la flor del parque, ya que en su seno se forma un microclima especial caracterizado por la existencia de una elevada humedad edáfica, una umbría permanente, una temperatura muy constante y suave a lo largo de todo el año junto con una altísima humedad ambiental. También albergan estos enclaves, como hemos señalado en el apartado 3, numerosas especies endémicas, raras o amenazadas, entre las que se encuentra el rododendron.

Los canutos más importantes se encuentran localizados invariablemente en la zona Sur del parque, en los Barrios, Algeciras, Tarifa y en menor medida, Castellar de la Frontera. Especialmente protegidos están los canutos de la cabecera del río de la Miel, el canuto de en medio del arrollo de San Carlos del Tiradero y del arrollo de la Hoya. Merece una especial atención el canuto del salado en Jimena de la Frontera.

I.4.4.3 Amenazas

Aunque como se ha indicado, este taxón es relativamente frecuente dentro del Parque Natural “Los Alcornocales”, lo cual debe ser una garantía de conservación, existe algunos riesgos derivados de características intrínsecas de su biología y de perturbaciones ambientales. Como ya hemos visto, la biología de la especie impone una tasa extremadamente lenta de regeneración de las poblaciones. Esto implica que la desaparición de las plantas no pueda prácticamente reponerse. Si la perturbación es suave y solo implica daño, no muerte, la regeneración de las plantas es notable, mientras se mantenga las condiciones ambientales propicias: radicación escasa, humedad constante y sustrato ácido. En consecuencia los factores de amenaza son: desmonte de riberas y aclaramiento del dosel arbóreo, captaciones de agua incontroladas y modificación de las características físico - químicas del agua de los arroyos por vertido directo por labores realizadas en las cuencas. Otras perturbaciones de origen más natural como la predación o la patogénesis son escasas. Las orugas de lepidópteros (*Cosmia* sp.) realizan alguna predación, que unida a la infección por hongos (*Gloeosporium* sp.) provoca un daño que alguna poblaciones llega al 8% de la superficie foliar.

I.4.4.4. Interés económico etnobotánico

Rhododendron ponticum es un taxon emblemático del Parque Natural de los Alcornocales, siendo la única espermatofita considerada oficialmente como amenazada en peligro de extinción de toda su flora. A pesar de la alta toxicidad de todas las planta, no se conoce ningún estudio sobre su utilidad fitoquímica potencial. Más aparente e inmediata puede ser su posible utilización como especie ornamental dada la vistosidad de sus flores y su porte. No obstante su uso ornamental está fuertemente restringido por la necesidad de su un sustrato ácido y la escasa tolerancia a la sequía. En la actualidad su principal interés económico reside en su vistosidad en condiciones naturales que provoca cierto turismo de carácter ecológico, incluso desde zonas alejadas.

I.4.4.5 Medidas de conservación

Las cuencas en que aparece este taxon deben de ser inalteradas al menos hasta la altitud en que deja de aparecer. Debido a la lenta regeneración y que una perturbación catastrófica, natural o artificial, pueda ocurrir, es muy conveniente la disposición de un banco de propágulos para reponer las poblaciones o parte de ellas. Pudiéndose utilizar para ello el estaquillado para la repoblación de la especie y buscar alternativas como la propagación in vitro para la posterior reimplantación y repoblación en el medio natural.

I.4.4.6 Biología de la reproducción:

En las poblaciones de *Rhododendron ponticum* del sur de Cádiz, la reproducción abundante de flores, presencia de polinizadores y un sistema de fecundación auto-compatible permiten una producción elevada de frutos y semillas, suficiente para alcanzar un nivel de reproducción sexual activa.

La germinación de las semillas ocurre durante todo el año, excepto en verano, en muy pocas poblaciones y en condiciones ecológicas muy precisas, sobre lugares permanentemente húmedos pero sin encharcamientos, como superficies cubiertas por musgos y hepáticas.

Por ello la obtención de nuevos individuos mediante reproducción sexual parece ser muy escaso, existiendo numerosas poblaciones donde no se a observado germinación ni establecimiento de plántulas. En otras poblaciones aparece plántulas con cierta abundancia, pero la presencia de individuos de mas de 2-3 años es virtualmente nula.

Al respecto Mandujano (1996) menciona que el estudio detenido del proceso sexual pone de manifiesto su complejidad por muy distintas razones, las cuales pueden ser agrupadas en dos conjuntos: a) Existe poco reclutamiento debido a una baja producción de semillas por razones genéticas o ecológicas. b) Ausencia de la fase de germinación o establecimiento de las semillas debido a razones ambientales.

La multiplicación vegetativa no es frecuente pero ocurre en los lugares húmedos y en plantas de mayor edad, por acodo ocasional de las ramas externas. Es decir, la aparición de nuevos individuos no se produce únicamente a partir de semillas producidas mediante

reproducción sexual, sino que también ocurre por reproducción asexual y por multiplicación vegetativa por acodo.

I.4.4.7 Antecedentes sobre el cultivo in vitro de material vegetal de Rhododendron.

De acuerdo con Anderson (1978). el empleo de técnicas de cultivo de tejidos in vitro han sido beneficiosos para la obtención e introducción de nuevos cultivares de Rhododendron acortando el ciclo de mejora y la de obtención de la plántulas viables de 10 a 3 años.

Actualmente la irrupción de Rhododendron spp. en el mercado floral y hortícola ha desencadenado un gran numero de publicaciones e investigaciones acerca de técnicas de propagación y micropropagación in vivo e in vitro. (Kytz y Briggs, 1979; Strode et.al, 1979; Wong, 1981). Sin embargo, la utilización de la tecnología del cultivo de tejidos a niveles comerciales esta limitada, por su alto coste , por ello el esfuerzo para establecer protocolos eficientes y los medios óptimos para sustentar los costes iniciales.

Experiencias realizadas en cultivo in vitro nos evidencian sobre las posibilidades de obtención de plántulas viables de *Rhododendron ponticum* tales afirmaciones se deben a trabajos publicados como es el caso propagación *in vitro* de cultivares de Rhododendron procedente de callo o brotes” (Bojarczuc y Spethmann, 1994) quienes obtuvieron los mejores crecimientos en un medio nutritivo de Anderson con 4 mgL^{-1} de AIA y 15 mgL^{-1} de 2 ip.

El empleo del medio Anderson sin reguladores de crecimiento para la germinación aséptica de las semillas de *Rhododendron ponticum* permitió alcanzar hasta un 90 % de la germinación en condiciones *in vitro* (Cantos, 2004). Además en dicho trabajo, se pudo observar que la interacción hormonal en presencia del medio producía la estímulo de callo en los explantos al añadir 15 mgL^{-1} de 2 iP y 4 mgL^{-1} de AIA. En cambio esta observación no se produjo en ausencia de reguladores de crecimiento, obteniendo plántulas viables en condiciones externas al realizar una inmersión basal rápida de los explantos obtenidos en una solución hidro-alcohólica de AIB (500 y 1000 ppm) inmediatamente antes del proceso de aclimatación .

II.- OBJETIVOS

Este estudio pretende la mejora de la germinación de semillas de *Buxus sempervirens*, *Cotoneaster granatensis* y *Euonymus latifolius* mediante la comparación de métodos germinativos *ex vitro* e *in vitro*. Respecto a *Rhododendron ponticum subsp. baeticum*, se persigue acometer nuevos ensayos de germinación de semillas *in vitro* y estudiar el efecto sobre las plántulas obtenidas de los reguladores de crecimiento.

III.- MATERIALES Y METODOS.

III.1 Buxus sempervirens.

III.1.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Como fuente inicial de material se emplearon semillas maduras conservadas a 4°C durante un periodo de 30 días. Las semillas certificadas se cosecharon el día 03/07/04 por la Empresa de Gestión Medioambiental (EGMASA) que las clasificó bajo el código 660075-0583.

III.1.2 Germinación en semillero.-

Sé empleó como semillero una bandeja con 40 alvéolos rellenos con un sustrato de turba (figura 11), en cada uno de los alvéolos se sembró una semilla a una profundidad de 0.5 cm., su distribución se indica en la tabla 2 de acuerdo con los tratamientos correspondientes (tabla 1). Se pusieron un total de 10 semillas por tratamiento.

Tabla 1.: Descripción de tratamientos

Tratamientos	Descripción
T1	Semillas completas
T2	Semilla completa + tratamiento anticriptogámico (Benomil 0.6gL ⁻¹) durante 20 min.
T3	Semilla escarificadas (golpeadas con martillo hasta quebrarlas)
T4	Semilla escarificada (golpeadas con martillo hasta quebrarlas) + tratamiento anticriptogámico (Benomil 0.6gL ⁻¹) durante 20 min.



Figura 11.- Semilleros de alvéolos con sustrato de turba.

Tabla 2. Distribución de tratamientos en bandeja

0	A	B	C	D	E	F	G
1							
2		T1					
3					T2		
4							
5		T3					
6				T6			
7							

La bandeja con las semillas se colocó en cámara de ambiente controlado a 25°C, 111 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ manteniéndose la humedad del sustrato mediante riegos semanales.

III.1.3.- Germinación de semillas con endocarpo *in vitro*.

Para este propósito, semillas del mismo lote usado para la siembra en bandeja fueron sometidas a un tratamiento desinfectante previo a su establecimiento *in vitro*. Para ello, se preparó una disolución de hipoclorito de sodio al 7% y ácido clorhídrico 3.3 ml, bajo cabina extractora de gases para eliminar los gases tóxicos. El tiempo de permanencia en esas condiciones fue de 45 minutos.

Posteriormente en la cámara de flujo laminar (figura 12) se introdujeron las semillas en la solución esterilizante anterior a la que se añadieron 3 gotas de Tween 20 y, bajo agitación continua, se mantuvo el conjunto a temperatura de 40°C por un período de 35 min.

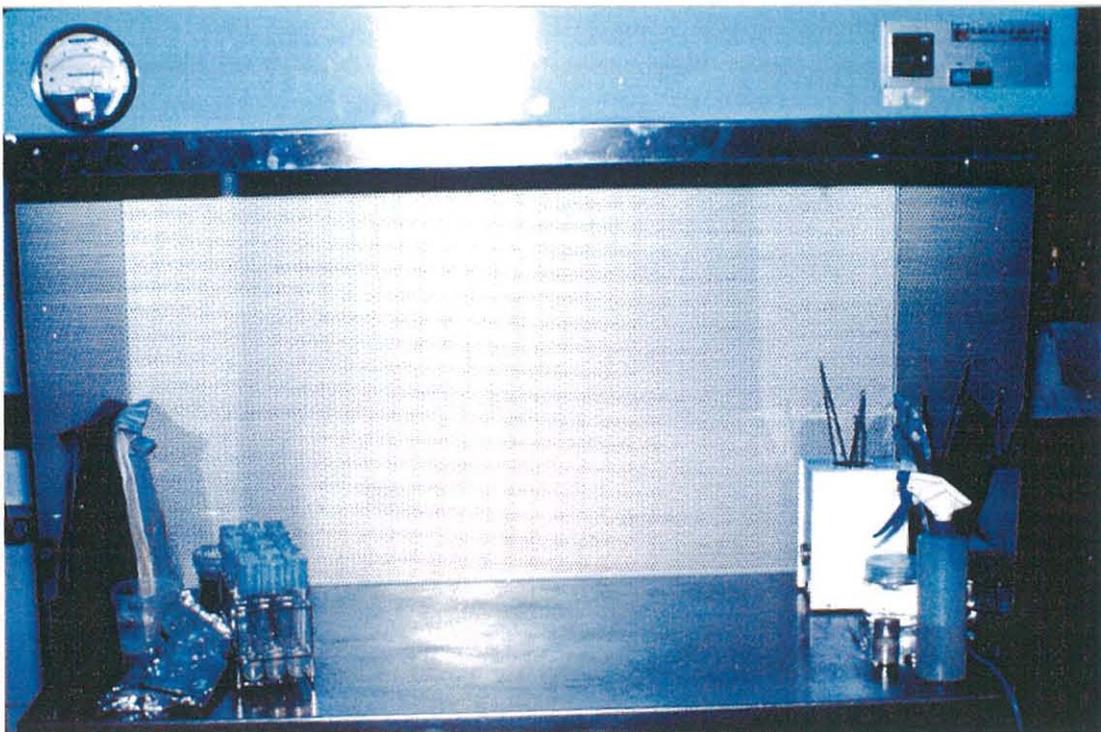


Figura 12. Cámara de flujo laminar horizontal.

Seguidamente se realizaron 3 lavados con agua estéril durante 10 minutos cada uno y, finalmente se sembraron *in vitro* en los diferentes tratamientos descritos en la **Tabla (3)**.

Tabla 3.- Descripción de tratamientos utilizados en la siembra *in vitro* de semillas con endocarpo.

Tratamientos	Descripción	Nº de semillas
T1	Base sólida de Agar +AG3 (2 mgL ⁻¹)	15
T2	Base sólida de Agar	15
T3	Base líquida de agua + AG3(2 mgL ⁻¹)	15
T4	Base líquida de agua	15

Una vez sembradas se depositaron en la cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de 16 horas luz y 25°C de temperatura. Figura 4



Figura 4.- Cámara de cultivo instalada en el IRNAS.

III.1.4.-Cultivo de semillas sin cubierta *in vitro*.-

Para el establecimiento *in vitro* de las semillas desnudas se realizó previamente la escarificación de la semilla eliminando parte del endocarpo con la ayuda de un martillo mediante un golpe suave a la misma que dejaba al exterior parte de la semilla desnuda. Posteriormente se depositaron éstas en tubos Eppendorf estériles que contenían 0.5 ml de una solución de alcohol al 50% (v/v) durante quince minutos. Posteriormente en la cámara de flujo laminar las semillas se sumergieron en otra solución de hipoclorito de sodio al 0.02% (v/v) otros quince minutos. Seguidamente se realizaron tres enjuagues consecutivos en agua estéril de tres minutos cada uno, para luego proceder a su incubación en los diferentes tratamientos.

La base de los medios de cultivo empleados fueron: **a)** sales de Murashige y Skoog (1962) a 1/3 de concentración enriquecidas en un primer tratamiento (T1) con una fuente de sacarosa al 2%; **b)** sales de VID (Troncoso 1991) enriquecidas en un primer tratamiento (T2) con: reguladores de crecimiento (BAP 0.072 mgL^{-1} y ANA 0.024 mgL^{-1}) y sacarosa al 2.5%. Un segundo tratamiento (T3) con $\frac{1}{2}$ concentración de sales del medio VID más sacarosa (2.5%) sin reguladores de crecimiento. Como agente gelificante se empleó agar a una concentración de 5 gL^{-1} . Una vez preparados de esta forma los substratos se procedió al ajuste del pH entre 5.73 y 5.75 con soluciones diluidas de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico 1N. El medio se esterilizó en autoclave (figura 13) a 121°C de temperatura durante 15 minutos y presión de 1 atmósfera. Se emplearon 10 semillas en cada uno de los tratamientos, las cuales fueron cultivadas en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de 25°C de temperatura con fotoperíodo de 16 horas de luz fría y una intensidad lumínica de 2000 lux.



Figura 13.- Autoclave

Tabla 4. Descripción de los tratamientos: MS Murashige y Skoog; BAP 6-bencilaminopurina; ANA ácido &- naftalen-acético

Tratamientos	Medios de Cultivo	Reguladores de crecimiento		Nº de semillas sin cubierta
T1	MS 1/3 de concentración	Sin reguladores de crecimiento		15
T2	Medio VID	BAP	ANA	15
		0.024	0.072	
T3	VID ½ concentración	Sin reguladores de crecimiento		15

III.1.5 Diseño experimental.- Para la fase de establecimiento de las semillas desnudas cultivadas in vitro de *Buxus sempervirens* se empleó un diseño completamente aleatorio, cada unidad experimental estuvo constituida por una semilla por contenedor. Los parámetros evaluados han sido: a) porcentaje de germinación b) porcentaje de supervivencia y c) porcentaje de contaminación.

III.2.- *Cotoneaster granatensis*

III.2.1.- Material vegetal y condiciones de cultivo

Como fuente inicial se emplearon semillas maduras conservadas previamente a 4°C durante 30 días. Las semillas certificadas procedieron de la cosecha 04/08/05 y fueron facilitadas por EGMASA con el número de registro 554010/0556.

III.2.2.- Germinación en bandeja

Se empleó una bandeja con 40 alvéolos rellenos con un sustrato de turba (figura 11), en cada alveolo se sembró una semilla a una profundidad de 0.5 cm para favorecer su germinación. La distribución se realizó según el esquema de la tabla 6 de acuerdo con los tratamientos correspondientes tabla 5. Se pusieron un total de 10 semillas por tratamiento.

Tabla 5: Descripción de tratamientos de semillas completas de *Cotoneaster granatensis* en bandejas.

Tratamientos	Descripción
T1	Semillas completas
T2	Semilla completa + tratamiento anticriptogámico (Benomil 0.6 gL ⁻¹ .) Por 20 min.
T3	Semilla escarificadas (parte del endocarpo eliminado por corte con un corta uñas en la parte distal)
T4	Semilla escarificada (parte del endocarpo eliminado por corte con un corta uñas en la parte dista) +tratamiento anticriptogámico (Benomil 0.6gL ⁻¹) Por 20 min.

Tabla 6: Distribución de tratamientos en bandeja de alvéolos

0	A	B	C	D	E	F	G
1							
2		T1					
3					T2		
4							
5		T3					
6					T4		
7							

La bandeja se colocó en una cámara de ambiente controlado a 25°C manteniéndose la humedad del sustrato mediante riegos semanales.

III.2.3.- Germinación de semillas con endocarpo in vitro.

Semillas del mismo lote usado para la siembra en bandeja se sometieron a un tratamiento desinfectante previo a su establecimiento in vitro. Para ello, se preparó la solución de hipoclorito de sodio y ácido clorhídrico de la misma forma que la indicada en el apartado III.1.3, todo el proceso de esterilización de la semilla coincide, asimismo, con el descrito en dicho apartado.

Los diferentes tratamientos y número de semillas sin endocarpo se indican en la tabla 7.

Tabla 7.- Descripción de tratamientos realizados *in vitro* con semillas completas de *Cotoneaster granatensis*..

Tratamientos	Descripción	N. SEMILLAS
T1	Base sólida de Agar +AG3 (1.5 mgL ⁻¹)	15
T2	Base sólida de Agar	15
T3	Base líquida de agua + AG3(1.5 mgL ⁻¹)	15
T4	Base líquida de agua	15

Las condiciones del cultivo fueron las mismas que para el ensayo de *Buxus sempervirens*, es decir, 16 horas luz y a 25°C de temperatura.

III.2.4.- Cultivo de semillas sin cubierta *in vitro*

Para el establecimiento *in vitro* se realizó previamente la escarificación de la semilla que consistió en eliminar parte del endocarpo con la ayuda de un corta uñas manual. Cada semilla desnuda se depositó durante 15 minutos en un tubo eppendorf estéril que contenía 0.5 ml de una solución de alcohol al 50% (v/v). Posteriormente, en la cámara de flujo laminar las semillas se sumergieron en otra solución de hipoclorito de sodio al 0.02% (v/v) durante otros 15 minutos, seguidamente se realizaron tres enjuagues consecutivos de agua estéril durante tres minutos cada uno, para luego proceder a su incubación en los diferentes medios.

Tabla 8. Descripción de los tratamientos: MS Murashige y Skoog; C.H. Caseína Hidrolizada; BAP (6-bencilaminopurina); ANA ácido &- naftalen-acético

Tratamientos	Medios de Cultivo	Reguladores de crecimiento		Nº de semillas sin cubierta
		BAP mgL ⁻¹	ANA mgL ⁻¹	
T1	MS 100% + C.H.	0.5	1.0	15
T2	MS 1/3 de concentración	Sin reguladores de crecimiento		15
T3	Medio VID	0.024	0.072	15
T4	VID ½ concentración	Sin reguladores de crecimiento		15

La base de los medios de cultivo empleados fueron (tabla 8): **a)** sales de Murashige y Skoog (1962) enriquecidas en un primer tratamiento (**T1**) con una fuente de aminoácidos (hidrolizado de caseína C.H.) y reguladores de crecimiento (tabla 8); sacarosa al 2%. Un segundo tratamiento (**T2**) con 1/3 de concentración de sales MS; sacarosa al 2%; sales de **VID** (Troncoso 1991) (**T3**) enriquecidas con reguladores de crecimiento (tabla 8), sacarosa al 2.5% y un último tratamiento (**T4**) con medio VID a ½ concentración, sacarosa al 2.5% sin reguladores de crecimiento. Como agente gelificante se empleó agar a una concentración de 5gL^{-1} . Una vez preparado el substrato se procedió al ajuste del pH. a 5.73-5.75 con soluciones diluidas de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico 1N. Al igual que en casos anteriores, se distribuyeron (figura 14) 10 ml de cada una de los medios en tubos de vidrio de 150x25, tapados con tapones de polipropileno, resistentes al autoclave.



Figura 14.- Dosificación del medio de cultivo en tubos de ensayo.

La esterilización del conjunto se efectuó en autoclave a 121°C de temperatura durante 15 minutos y presión de 1 atmósfera. Se emplearon 10 semillas en cada uno de los tratamientos, el conjunto se cultivó en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas a 25°C de temperatura con fotoperiodo de 16 horas de luz fría y una intensidad lumínica de 2000 lux.

III.2.5. Diseño experimental

Para la fase de establecimiento de las semillas sin cubierta cultivadas in vitro de *Cotoneaster granatensis* se empleó un diseño completamente aleatorio, cada unidad experimental fue una semilla por contenedor, el número de repeticiones fue homogéneo para cada uno de los tratamientos. Al igual que en el caso de *Buxus* los parámetros evaluados fueron: a) porcentaje de germinación b) porcentaje de supervivencia y c) porcentaje de contaminación.

III.3 Euonymus latifolius

III.3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

El material empleado como fuente inicial fueron semillas maduras conservadas a 4°C por un periodo de 30 días previos a su uso. Al igual que en los casos anteriores, las semillas procedían de los viveros forestales de EGMASA con número de identificación 660082/-0799 y fueron recogidas el 1 de septiembre de 1995.

III.3.2.- Germinación en bandeja

Se empleo una bandeja con alvéolos rellenos con un sustrato de turba, seguidamente se sembraron las semillas a una profundidad de 0.5 cm., para favorecer su germinación, su distribución se realizó de acuerdo a los tratamientos descritos en la tabla 9. El número de semillas sembradas por tratamiento fue 10 en la forma en que se describe en la tabla 10.

Tabla 9. Descripción de tratamientos

Tratamientos	Descripción
T1	Semilla completa
T2	Semilla completa + tratamiento desinfectante (Benomil 0.6 mgL ⁻¹) por 20 min.
T3	Semilla escarificada sin tratamiento
T4	Semilla escarificada + tratamiento desinfectante (Benomil 0.6 mgL ⁻¹) por 20 min.

dentro de la cámara de flujo laminar. Seguidamente, se realizaron tres enjuagues consecutivos de agua estéril por un período de tres minutos cada uno. Posteriormente se procedió a su escisión con la ayuda de un escarpelo y seguidamente se sembraron en los medios de cultivo descritos a continuación.

Se seleccionaron 2 medios de base para el cultivo de embriones: a) Sales de Murashige y Skoog (1962) y VID (Troncoso 1991) a ambos medios se le adicionó sacarosa 2% y agar bacteriológico, 5gL⁻¹ como agente gelificante. Una vez preparada la solución del cultivo se procedió al ajuste del pH a 5.73-5.75 con soluciones diluidas de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico a 1N. Para luego ser esterilizado en autoclave a 121°C de temperatura durante 15 minutos y presión de 1 atmósfera.

Se emplearon 10 embriones para cada uno de los tratamientos descritos en la tabla 12.

Tabla 12. Descripción de los tratamientos: MS Murashige y Skoog; C.H. Caseína Hidrolizada; BAP 6-bencilaminopurina ANA ácido &- naftalenacético IBA: ácido 3-indolbutírico ; COMP. reguladores VID completos.

Tratamientos	Medios de Cultivo	Reguladores de crecimiento	
		BAP mgL ⁻¹	ANA mgL ⁻¹
T1	MS 100% + C.H.	0.5	1.0
		Sin reguladores de crecimiento	
T2	MS 1/3 de concentración	Sin reguladores de crecimiento	
T4	Medio VID	0.072	0.024
T5	Medio VID ½ concentración	Sin reguladores de crecimiento	

Los embriones se cultivaron en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas a 25°C de temperatura con fotoperiodo de 16 horas de luz fría y a una intensidad lumínica de 2000 lux.

III.3.5. Diseño experimental

Para la fase de establecimiento de los embriones in vitro de *Euonymus latifolius* se utilizo un diseño completamente aleatorio, analizando los datos y verificando la homogeneidad de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de 0,01. Cada unidad experimental estuvo constituida por un embrión por contenedor, el número de repeticiones fue homogéneo para cada uno de los tratamientos. Los parámetros evaluados comprendieron:

a) porcentaje de germinación b) porcentaje de mortandad c) porcentaje de contaminación d) longitud de la plántula e) longitud de la raíz.

III.3.5.1. Influencia del contenido de sacarosa del medio de cultivo sobre el desarrollo de embriones.

Se emplearon semillas del mismo lote que en el experimento anterior.

La base del medio de cultivo empleado para el experimento comprendió: sales de Murashige y Skoog 1/3 de concentración en tres niveles de sacarosa a) **T1** (1.5%); b) **T2** (2%) y c) **T3** (2.5%).

Siguiendo los protocolos anteriores de establecimiento, se llevaron 10 embriones a cada uno de los tratamientos y posteriormente a la cámara de crecimiento bajo condiciones controladas a 25°C de temperatura con foto período de 16 horas de luz y una intensidad lumínica de 2000 lux.

III.3.5.2. Influencia del contenido de glicina del medio de cultivo sobre el desarrollo de embriones.

III.3.6. Material vegetal

Las semillas procedían del mismo lote usado en los experimentos anteriores, con la diferencia que éstas se almacenaron por un periodo de 90 días a 4°C previos al aislamiento aséptico de los embriones en los diferentes tratamientos.

III.3.6.1. Condiciones de crecimiento.

Para todos los experimentos se utilizó un medio base de Murashige & Skoog (MS) a 1/3 de concentración suplementado con vitaminas (100 mgL⁻¹ mio-inositol; 0,10 mgL⁻¹ tiamina-HCl **B1** ; 0.5 mgL⁻¹ piridoxina-HCl **B6**) una fuente de sacarosa al 2% , como gelificante agar a una concentración de 5 gr/l. El pH de los medios se ajustó a 5,7 con soluciones diluidas de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico 1N.

Las plantas de los distintos experimentos fueron incubadas en cámara de cultivo a 25°C de temperatura con fotoperiodo de 16 horas de luz y una intensidad lumínica de 2000 lux.

III.3.6.2. Método de establecimiento de los embriones *in vitro*.

Para el establecimiento de los embriones *in vitro* se realizó la esterilización de las semillas por inmersión de las mismas en etanol al 90% (v/v) durante 5 minutos. Posteriormente se realizó un lavado en una solución de hipoclorito de sodio al 1%(v/v) durante 20 minutos bajo agitación continua dentro de la cámara de flujo laminar. Seguidamente se realizaron 3 enjuagues consecutivos de agua estéril de 3 minutos cada uno, para luego proceder a la escisión del embrión con la ayuda de un escarpelo y posterior incubación.

III.3.6.3. Diseño experimental y análisis de datos.

Para el análisis de los datos se empleó un análisis de variancia (ANDEVA) verificando su homogeneidad en cada uno de los tratamientos con un nivel de significación de 0.05. Cada unidad experimental estuvo constituida por un embrión por contenedor. El número de repeticiones fue homogéneo en cada uno de los tratamientos.

III.3.6.4. Tratamientos y parámetros evaluados.

Se ensayaron cuatro tratamientos correspondientes a concentraciones de 0,1,2 y 3 mgL⁻¹ de glicina con 15 repeticiones (embriones) por tratamiento en contenedores de tubos de vidrio de 150x25 conteniendo 10 ml de medio cada uno y un embrión por contenedor como se aprecia en la tabla 13.

Tabla 13.- Descripción de tratamientos.

Tratamientos	Medio de cultivo	Dosis de glicina mgL ⁻¹
T1	MS 1/3	0
T2	MS 1/3	1
T3	MS 1/3	2
T4	MS 1/3	3

III.3.6.5. Toma de datos.

Cada 15 días se determinaron los diferentes estadios del proceso de desarrollo del embrión (apertura de cotiledones, longitud del embrión emisión de la radícula, porcentaje de germinación y porcentaje de contaminación). A los 30 días se midieron cuantitativamente los desarrollos de cada embrión en cada uno de los tratamientos obtenidos.

III.4. *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*

III.4.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Como material inicial se emplearon semillas maduras conservadas a 4°C durante 30 días previos a su uso en los diferentes tratamientos de estudio. Las semillas se recogieron el 3/10/2001 de la zona de El Canuto de en Medio dentro del Parque Natural Los Alcornocales.

III.4.1.2. Cultivo de semillas *in vitro*

Para el establecimiento *in vitro* de las semillas se realizó el siguiente procedimiento de esterilización: bajo cabina de flujo laminar, se depositaron las semillas en un cono de papel filtro estéril sobre un vaso de precipitado también estéril. Inmediatamente se iniciaron lavados consecutivos de etanol al 90% durante un minuto, seguidos de otro tratamiento con hipoclorito de sodio al 0.02% (v/v) durante otros 3 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua estéril por un período de tres minutos cada uno. Finalizadas estas operaciones con la ayuda de un escarpelo se procedió a su siembra en los medios de cultivo.

III.4.1.3. Medios de cultivo.

La base de los medios de cultivo empleados fueron: **a)** sales de VID (Troncoso 1991) con la adición de reguladores de crecimiento (0.072 mg/l de BAP (6-bencilaminopurina) y 0.024 mg /l de ANA (ácido naftalen-acético) y sacarosa al 2.5% (tratamiento T1). **b)** Sales de VID a ½ de concentración con la adición de sacarosa al 2.5% sin reguladores de crecimiento (tratamiento T2). Como gelificante se empleó agar a una concentración de 5grL⁻¹ Una vez preparado el substrato se procedió a ajustar el pH a 5.73-5.75 con soluciones diluidas de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico 1N. Para luego proceder a su esterilización

en autoclave a 121°C de temperatura durante 15 minutos y presión de 1 atmósfera. Se emplearon un total de 128 semillas para el primer tratamiento T1 y 140 semillas para el segundo tratamiento T2 las cuales fueron cultivados en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas a 25°C de temperatura con fotoperíodo de 16 horas de luz fría y una intensidad lumínica de 2000 lux.

Tabla 14. Descripción de los tratamientos: MS Murashige y Skoog; BAP 6-bencilaminopurina; ANA ácido &- naftalen-acético

TRATAMIENTOS	MEDIOS DE CULTIVO	REGULADORES DE CRECIMIENTO		Nº SEMILLAS
T1	Medio VID	BAP	ANA	128
		0.072	0.024	
T2	VID ½ concentración	Sin reguladores de crecimiento		140

III.4.1.4. Diseño experimental

Para la fase de establecimiento de las semillas cultivadas in vitro de *Rhododendron ponticum* se empleó un diseño completamente aleatorio, las unidades experimentales variaron en cuanto al número de semillas establecidas por contenedor evaluándose los resultados bajo los siguientes parámetros: a) porcentaje de germinación b) porcentaje de supervivencia y c) porcentaje de contaminación.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1 Buxus sempervirens

IV.1.1 Germinación en bandeja

En la tabla 15 se observan los resultados obtenidos para la germinación de semillas de *Buxus sempervirens* transcurridos 120 días desde su siembra en las condiciones descritas en la tabla 1. Se observa en dicha tabla un porcentaje de supervivencia del 0 % en los tratamientos T3 y T4, es decir, en aquéllos donde se procedió al golpeo del endocarpo fracturándolo para facilitar el desarrollo de la semilla desnuda. En el primer caso (T3) la muerte de todas las semillas es debida a una contaminación máxima, ya que no hubo tratamiento anticriptogámico (tabla 1) y en el segundo (T4), posiblemente a un efecto tóxico del benomilo sobre la semilla desprovista del endocarpo. En los tratamientos T1 y T2 a causa a de la protección que le confiere a la semilla la existencia de endocarpo, se mantienen sin ningún movimiento tras los citados 120 días desde la siembra.

Tabla 15. Resultados de la germinación en bandeja de semillas de *Buxus sempervirens* transcurridos 120 días desde su siembra.

Descripción	T1	T2	T3	T4
Cantidad de semillas	15	15	15	15
% de contaminación	0	0	100	0
% de supervivencia	-	-	0	0
% latencia	100	100	-	-

El retraso en la germinación estaría de acuerdo con las indicaciones de Arroyo (1994) que menciona que la semillas del *Buxus sempervirens* suelen germinar y desarrollar plántulas muy lentamente debido a la impermeabilidad de la cubierta seminal y las condiciones del embrión.

IV.1.2. Germinación de semillas con cubierta in vitro

Los resultados para este ensayo no fueron alentadores, ya que todas las semillas se contaminaron a pesar del tratamiento esterilizante, es decir, este tratamiento no resultó

suficiente para eliminar la contaminación que persistió sobre la superficie del endocarpo. Este resultado es frecuente en el cultivo de semillas completas *in vitro*, dado que como indica Pierik (1989), la contaminación interna se debe frecuentemente a la tolerancia de los agentes microbiológicos a periodos desfavorables (calor, frío, radiación UV, líquidos esterilizantes) que los hacen visibles al ponerse en contacto en el medio de cultivo rico en nutrientes.

IV.1.3. Cultivo de semillas sin cubierta *in vitro*

En la tabla 16 se indican los resultados obtenidos a los 130 días de cultivo *in vitro* de las semillas. Se observa que no existe síntoma alguno de germinación en ninguno de los tratamientos ensayados. El porcentaje de contaminación es del 33, 40 y 20% para los tratamientos T1, T2 y T3 respectivamente, permaneciendo, por tanto un 67, 60 y 68% de semillas en vías de germinación. Es decir, la eliminación del endocarpo como barrera mecánica para la germinación, no es suficiente para eliminar la dormancia, por lo que habría que atribuir al endospermo una parte importante de la responsabilidad de la latencia de la semilla. El porcentaje medio de contaminación de un 40%, se considera aún elevado, lo que indica que el tratamiento esterilizante es aún mejorable mediante la utilización de tiempos de esterilización más prolongados, aumento de temperatura o aumento en la concentración de cloro activo.

Tabla 16.- Resultados de la siembra de semillas desnudas *in vitro* de *Buxus sempervirens* a los 130 días de la siembra.

Tratamientos	% de germinación	% de latencia	% de contaminación
T1	0	67	33
T2	0	60	40
T3	0	80	20

En resumen, no se logró germinación alguna en los procedimientos para el establecimiento de semillas desnudas de *Buxus sempervirens* en condiciones de cultivo *in vitro*. Los resultados negativos encontrados mediante los métodos de germinación de semillas en bandeja y con testa *in vitro* confirman las dificultades de reproducción de la especie consideradas en este trabajo.

IV.2. Cotoneaster granatensis

IV.2.1. Germinación en bandeja

En la tabla 17 se indican los resultados obtenidos en la germinación en bandeja de semillas completas de *Cotoneaster granatensis*. Se observa en dicha tabla que tras 122 días de estancia en las bandejas, el porcentaje de supervivencia en las semillas vivas en los tratamientos T3 y T4 es 0 debido a razones similares a las descritas en el caso de las semillas en bandeja de *Buxus sempervirens*. Es decir, la eliminación de parte del endocarpo dejando al exterior la semilla desnuda produce una contaminación alta en el caso de no haber tratado con anticriptogámico y en el caso de hacerlo, bien la concentración o la estancia en el producto utilizado (Benlate) han sido excesivas, es decir, tóxicas. Por el contrario, cuando se mantuvieron las semillas con el endocarpo, éste produce una protección que mantiene a los huesos en el mismo estado que en la fecha de siembra.

Tabla 17. Germinación en bandeja de semillas completas de *Cotoneaster granatensis*.

Descripción	T1	T2	T3	T4
Cantidad de semillas	10	10	10	10
% de contaminación	0	0	100	0
% de supervivencia	100	100	-	0
% latencia	100	100	0	0

Al respecto Young & Young (1999), mencionan que la semilla del *Cotoneaster granatensis* tiene doble dormancia, debido a la dureza e impermeabilidad de la cubierta seminal y las condiciones del embrión, lo que puede explicar la tardanza en la germinación de las semillas en bandeja.

IV.2.2 Germinación de semillas con endocarpo *in vitro*

Los resultados encontrados en la germinación de semillas completas *in vitro* de *Cotoneaster granatensis* una vez transcurridos 136 días desde la siembra, son muy negativos, ya que la contaminación fue total en cualquiera de los tratamientos ensayados

IV.2.3. Cultivo de semillas desnudas *in vitro*.

En la tabla 18, se indican los resultados obtenidos al cultivar durante 90 días semillas desnudas de *Cotoneaster granatensis* en los medios que se describieron en la tabla 8. Se observa en la tabla que las contaminaciones no han sido muy elevadas ya que nunca han superado el 10%, incluso en las semillas sembradas en los tratamientos T2 y T4 no ha existido contaminación, esto indica la eficacia del tratamiento esterilizante utilizado. Teniendo en cuenta que el proceso de esterilización fue mucho más enérgico en el caso de la existencia de endocarpo leñoso (apartado III.1.3) que el utilizado en la semilla desnuda (apartado III.1.4), los resultados indican que la existencia del endocarpo leñoso dificulta claramente la eliminación de los agentes contaminantes de la superficie de la semilla.

En la tabla 18 se observa que solamente se produce germinación (60%) de semillas en el tratamiento T1, mientras que en el resto de tratamientos, T2, T3 y T4 no se produce resultado alguno.

Tabla 18. Evaluación de los diferentes tratamientos durante ocho semanas de cultivo *in vitro*

Tratamientos	% de germinación	% de latencia	% de contaminación
T1	60	34	6
T2	0	100	0
T3	0	90	10
T4	0	100	0

Dado que no se han encontrado trabajos previos sobre la germinación de semillas desnudas *in vitro* de *Cotoneaster granatensis*, con el presente experimento se ha intentado hacer un amplio barrido de posibilidades para obtener un medio de cultivo apropiado para este objetivo. Los resultados obtenidos indican un efecto positivo del suplemento de aminoácidos sobre la actividad reguladora de la auxina y citoquinina en medio de Murashige y Skoog (1962), permitiendo la germinación y la coloración verde de los cotiledones (figuras 15, 16, 17 y 18) a las doce semanas de iniciado el cultivo *in vitro*. En consecuencia, aunque ninguno de los resultados obtenidos con estos factores son concluyentes dada la amplia gama de situaciones ensayadas, en futuros trabajos sería de interés tomar como base alguno de los componentes del medio que han permitido obtener germinación de semillas desnudas *in vitro* de *Cotoneaster granatensis*.

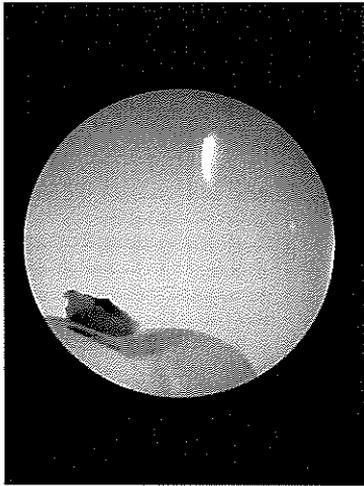


Figura 15

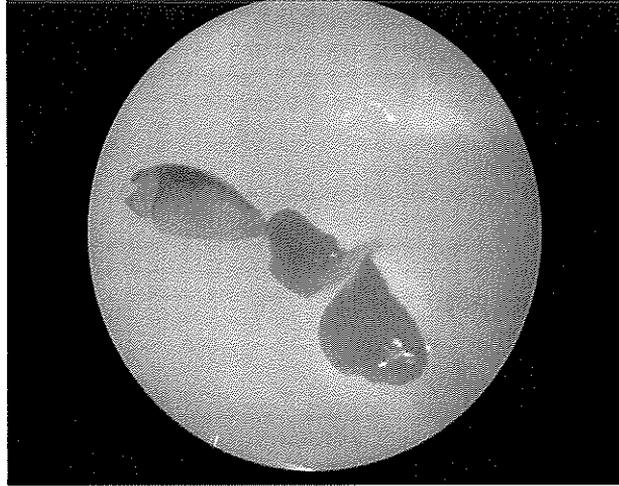


Figura 16

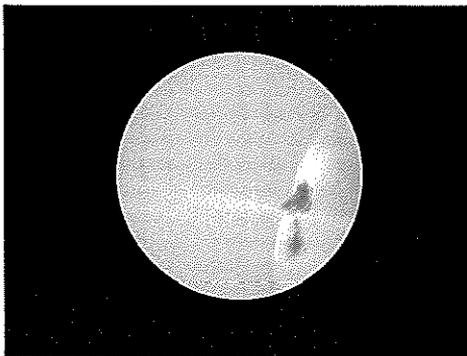


Figura 17



Figura 18

Figuras 15, 16, 17 y 18: Germinación de semillas desnudas *in vitro* de *Cotoneaster granatensis*.

Los resultados obtenidos pueden ser explicados de acuerdo con Tran Thanh Van (1980) quien menciona que varias partes de una planta pueden responder diferentemente a idénticas condiciones de cultivo y tales diferencias reflejan el estado fisiológico de la fuente del explanto. El estado fisiológico determinara además los factores exógenos que se deben añadir al medio de cultivo, o que deben sustraerse de él, para poder inducir la respuesta morfogenética requerida. Los factores endógenos podrán variar cuantitativamente de acuerdo con las condiciones ambientales, el genotipo, el tipo de célula, y otros aspectos.

Por su parte Pierik (1989) menciona que el empleo de estas mezclas complejas en los medios de cultivo tales como el hidrolizado de caseína leche de coco, peptona, triptona y otros, etc. pueden ser beneficiosos y estimuladores sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas cultivadas *in vitro*.

En general la respuesta de un tejido al cultivo *in vitro* depende, en mayor medida, de la interacción entre el nivel hormonal endógeno y el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento suplementados al medio de cultivo. De acuerdo a esto, cada explanto o un mismo explanto pero de diferente especie, pueden responder de manera distinta a una misma concentración de reguladores de crecimiento, a causa de diferencias en el contenido hormonal endógeno (Pérez Molphe Blanch et al, 1999).

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que las semillas sin endocarpo pero con testa de *Cotoneaster granatensis* pueden ser cultivadas *in vitro*. Siendo posible emplear el medio Murashige y Skoog que se puede suplementar a su vez con una mezcla de aminoácidos como el hidrolizado de caseína en una concentración de 200 mgL^{-1} . Para inducir la germinación un balance adecuado de auxina/citoquinina puede estar entre 1 mgL^{-1} de ANA (ácido α -naftalen-acético) y 0.5 mgL^{-1} de BAP (6-bencilaminopurina).

Por otro lado, la dureza e impermeabilidad de la cubierta seminal afectó notablemente al porcentaje de germinación en los diferentes tratamientos. Siendo de interés considerar esta observación en futuros ensayos.

La ausencia de germinación de semillas tanto en bandeja de turba en condiciones estándar, como con testa *in vitro*, confirman las dificultades de reproducción de la especie consideradas en este trabajo.

IV.3 *Euonymus latifolius*

IV.3.1 Germinación en bandeja

Al igual que en los casos de *Buxus* y *Cotoneaster*, transcurridos 120 días desde la siembra, no se observa ninguna germinación como se indica en la tabla 18, siendo los resultados idénticos a los obtenidos en los casos de las dos especies anteriores, por lo que las razones aducidas son las mismas, es decir, sin el endocarpo, el tratamiento con anticriptogámico ha sido tóxico y la ausencia de éste ha llevado a la semilla desnuda a una contaminación que ha imposibilitado su germinación produciendo la muerte de las mismas.

Por el contrario, cuando está presente el endocarpo (tratamientos 1 y 2), las semillas se mantienen en el mismo estado inicial, hayan sido tratadas o no.

Tabla 18. Resultados obtenidos en la germinación en bandejas de semillas de *Euonymus latifolius*

Descripción	T1	T2	T3	T4
Cantidad de semillas	10	10	10	10
% de contaminación	0	0	100	0
% de Mortandad	0	0	0	100
% latencia	100	100	0	0

Al respecto Herrera et al, (1999) menciona que las semillas de esta especie son viables aun perteneciendo a poblaciones de un solo individuo pero el porcentaje de germinación es muy bajo.

IV.3.2. Siembra de semillas *in vitro*

En la tabla 19 se expresan los resultados obtenidos en la germinación de semillas de *Euonymus latifolius in vitro* a los 136 días de la siembra. Se observa en la tabla que solamente se encuentra germinación en el tratamiento 1, es decir, cuando se usó medio con GA₃ y solidificado con agar. No obstante, el número de semillas germinadas fue muy bajo (5,26%).

Asimismo se observó que el tratamiento desinfectante fue muy eficaz al no aparecer ninguna contaminación.

Tabla 19. : Germinación se semillas completas de *Euonymus latifolius* a los 136 días de la siembra *in vitro*.

Tratamientos	Fecha de incubación	Total de semillas germinadas	% de germinación	% de Contaminación
T1	24/02/06	1	5,26	0
T2	24/02/06	0	0	0
T3	24/02/06	0	0	0
T4	24/02/06	0	0	0

IV.3.3 Cultivo de embriones *in vitro*

En la tabla 20 se indican los porcentajes de germinación de los embriones sembrados *in vitro* a los 30 días de cultivo.

Se observa en dicha tabla que existió una germinación similar en los tratamientos T2 y T4, es decir, aquéllos en los que no se adicionaron reguladores de crecimiento y los medios estaban diluidos. Esta germinación, que representa, en ambos casos, el 66.6% de los embriones sembrados, es muy superior a la obtenida en los medios con reguladores y la concentración completa de sales, donde ninguno de los embriones sembrados llegó a responder. Por otro lado, la contaminación resultó baja, no superando en ningún caso el 20%, lo que es normal en este tipo de material. De estos resultados se desprende que, como es conocido (García et al., 2002), los embriones germinan mejor en un medio diluido y sin reguladores, debido a que al ser un material lábil la adición de reguladores altera la morfogénesis y la adición de un medio completo resulta tóxico para este tipo material.

Tabla 20 Germinación de embriones *in vitro* según el medio de cultivo empleado a los 30 días de cultivo.

Descripción	% de germinación	% de embriones muertos	% de contaminación
T1	0	80	20
T2	66.67	23.33	10
T3	0	80	20
T4	66.67	23.33	10

En la tabla 20 se indica la longitud del tallo y la raíz de las plántulas obtenidas de los embriones germinados en los citados 30 días de cultivo *in vitro*. En dicha tabla se aprecia que el tratamiento T2 (sales de Murashige y Skoog) a 1/3 de concentración, es el que produce las plántulas con mayor longitud de tallo (10.33 mm) (figura 19) a las cuatro semanas de cultivo. Siendo la longitud del tallo en el tratamiento T4 (sales de VID a 1/2 de concentración) ligeramente inferior (6,22 mm) (figura 21) a la obtenida en el tratamiento anterior aunque sin significación estadística.

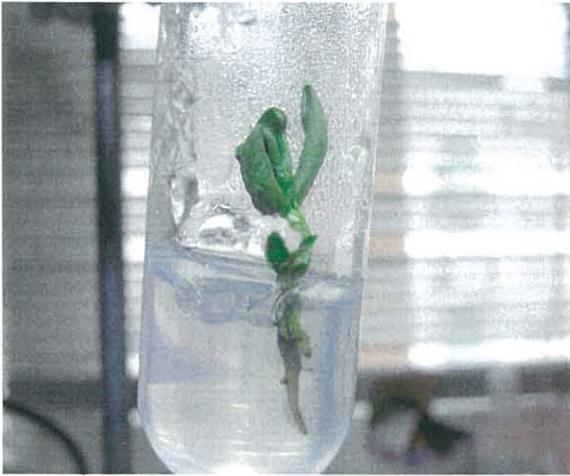


Figura 19

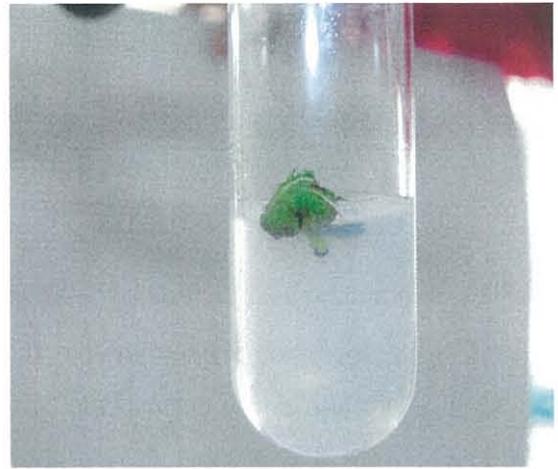


Figura 20

Figura 19-20: Desarrollo de embriones de *Euonymus latifolius* en el tratamiento T2

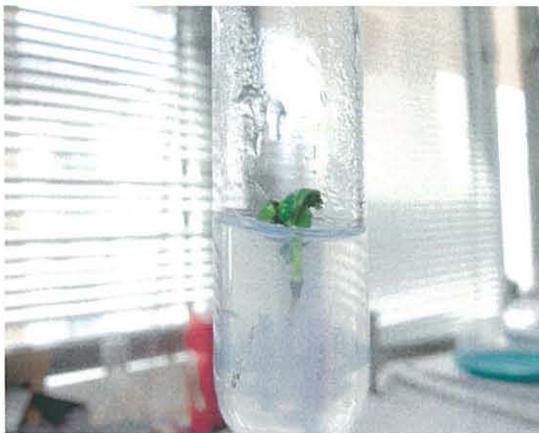


Figura 21



Figura 22

Figura 21-22: Desarrollo de embriones de *Euonymus latifolius* en el tratamiento T4

Respecto al desarrollo de la raíz de nuevo el medio T2, es decir, MS a 1/3 de concentración es el que desarrolla las raíces de mayor longitud media (3,05 mm), (figura 19) frente a las obtenidas en las plántulas de T4 (VID a 1/2 de concentración) (1,2 mm) (figura 21), aunque al igual que en el caso anterior, sin significación estadística.

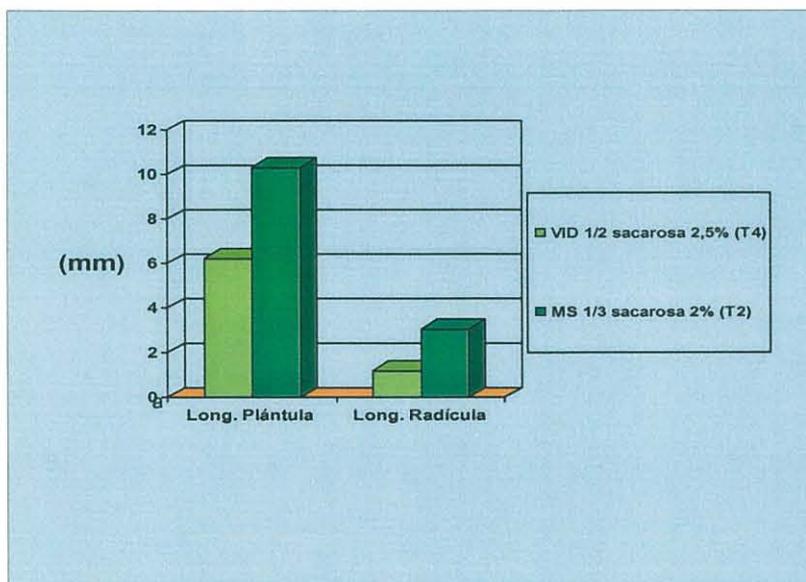


Figura 23: Efecto de la concentración de los medios de cultivo sobre el desarrollo de los embriones in vitro de *Euonymus latifolius*.

Es decir, a la germinación del embrión se le une un buen desarrollo del tallo y raíz en ambos medios de cultivo.

Con el objetivo de optimizar el proceso de germinación y a su vez observar el efecto de la sacarosa sobre el desarrollo y crecimiento de los embriones se realizó un segundo experimento descrito en el apartado de material y métodos (apartado III.4.3.2).

IV.3.4. Efecto de la concentración de sacarosa sobre el desarrollo y crecimiento embriones *in vitro* de *Euonymus latifolius*.

Como se indicó en el apartado de material y métodos y en función de los resultados obtenidos en el experimento anterior, el medio base empleado para este experimento fue: Sales de Murashige y Skoog 1/3 de concentración con tres variantes en la adición de sacarosa a) 1.5% (T1); b) 2% (T2) y c) 2,5% (T3).

Aplicando el mismo procedimiento de esterilización descrito en el apartado correspondiente, se trasladaron los embriones a la cámara de crecimiento bajo condiciones controladas a 25°C de temperatura con fotoperíodo de 16 horas de luz y una intensidad lumínica de 2000 lux.

En la tabla 21 se indican los porcentajes de germinación, de semillas muertas y contaminación obtenidos a los 30 días de la siembra.

Tabla 21 Efecto de la sacarosa sobre el porcentaje de germinación durante 30 días de cultivo in vitro.

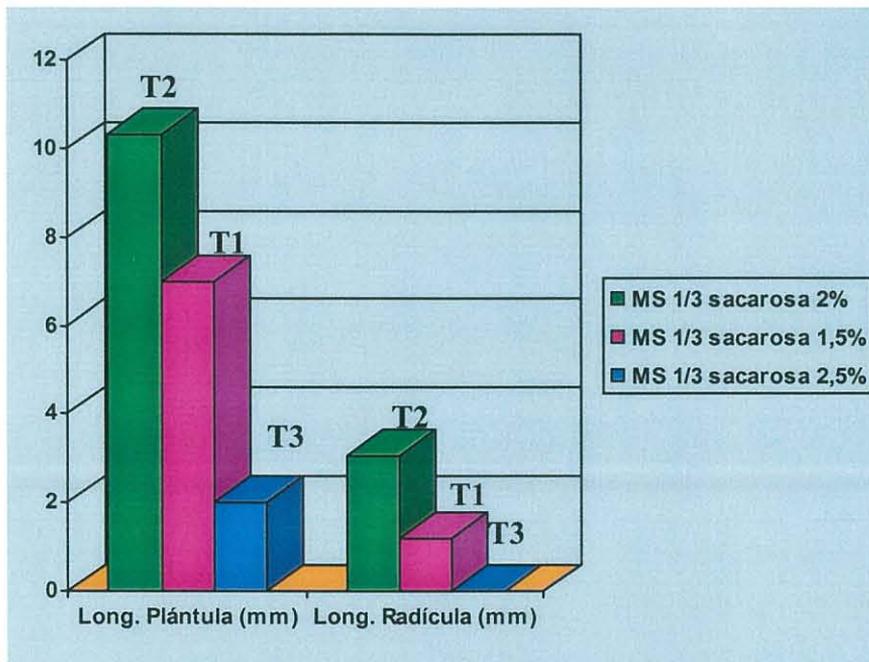
Descripción	% de Germinación	% de semillas muertas	% de contaminación
T1 sacarosa 1.5%	71	2	27
T2 sacarosa 2%	67	23	10
T3 sacarosa 2.5%	44	36	20

Se observa en dicha tabla que existe una ligera mejor germinación, aunque sin significación estadística, en el tratamiento de 1.5% de sacarosa, 71%, frente al tratamiento con 2.5% que fue del 44%. En consecuencia y teniendo en cuenta el porcentaje de contaminación, el porcentaje de semillas muertas es inferior en el tratamiento con la concentración mas baja de sacarosa, aunque tampoco sin significación estadística.

En la figura 24 se expresan los resultados obtenidos al cultivar durante 30 días embriones de *Euonymus latifolius* en medio MS (1/3) con diferentes concentraciones de sacarosa. Los resultados del experimento indican que los valores de longitud media del tallo obtenidos en las plántulas crecidas en los tratamientos T2, T1 y T3 son de 10,33; 7 y 2 mm. respectivamente. A pesar de ser superior la longitud del tratamiento T2 frente a T3, la diferencia no es estadísticamente significativa.

En el caso de las raíces, la longitud media de las mismas obtenida en las plántulas del tratamiento con 2 % de sacarosa es de 3.05 mm, mientras que en los tratamientos de 1,5 (figura 25) y 2,5%, las longitudes medias fueron 1,2 y 0 respectivamente. En este caso si resulta estadísticamente significativa la longitud alcanzada en las raíces de las plantas del tratamiento con un nivel intermedio de sacarosa.

Figura 24.- Efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento de embriones in vitro de plántulas de *Euonymus latifolius*.



Es decir, las plántulas se desarrollan mejor en la dosis del 2% de sacarosa (figura 26), siendo excesivamente elevada la de 2,5% (figura 27), aunque este resultado sólo es concluyente en el caso del desarrollo del sistema radicular.



Figura 25: Desarrollo del embrión de *Euonymus latifolius* en el tratamiento T1



Figura 26: Desarrollo del embrión de *Euonymus latifolius* en el tratamiento **T2**

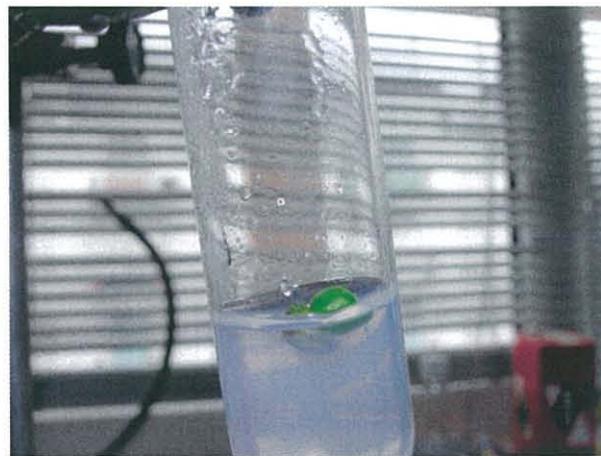


Figura 27: Desarrollo del embrión de *Euonymus latifolius* en el tratamiento **T3**

Los resultados obtenidos están de acuerdo con lo indicado por Monnier (1980) que indica que los embriones maduros se cultivan generalmente sobre un medio con sacarosa al 2-3% y que la demanda de sacarosa disminuye con el tamaño del embrión.

Por su parte Pierik (1989) menciona que la concentración de sacarosa al 2% tiene gran influencia sobre el crecimiento in vitro de plántulas de híbridos de *Phalaenopsis*. Además menciona que el azúcar se sintetiza y se transporta de forma natural por las plantas y su concentración depende mucho del tipo y edad del material vegetal.

IV.3.5. Efecto de la concentración de glicina sobre el desarrollo y crecimiento embriones *in vitro* de *Euonymus latifolius*.

En la tabla 22 se indican los porcentajes de desarrollo de cotiledones verdes, emisión de radícula y contaminación, en medio MS 1/3 con concentraciones crecientes de glicina

Tabla 22: Porcentajes de Germinación, Emisión de la Radícula y Contaminación de Embriones de *Euonymus latifolius*.

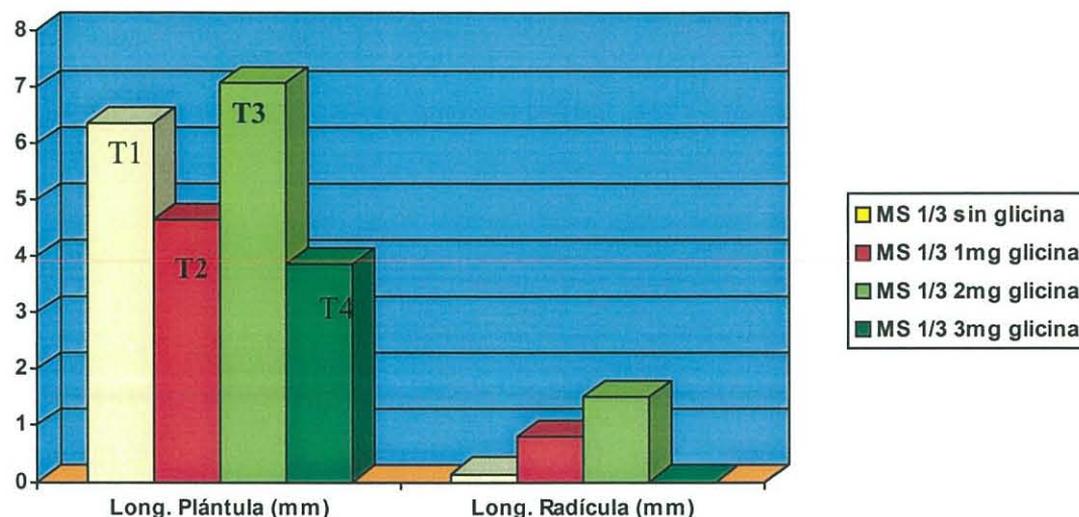
Nivel de glicina mg/l	% de embriones abiertos y verdes	% de emisión de la radícula	% de contaminación
0 (T1)	71.43 a	7.14 a	0 a
1 (T2)	35.71 a	14.28 a	6.7 a
2 (T3)	71.43 a	57.14 b	0 a
3 (T4)	57.14 a	0.00 a	6.7 a

Se observa en dicha tabla que el nivel de glicina no influyó en la apertura y adquisición de color verde por los embriones de *Euonymus latifolius* ensayados. No obstante, en el porcentaje de emisión radicular de los embriones sí se encontraron diferencias significativas en el tratamiento con 2 mgL⁻¹ de glicina, superior estadísticamente a los porcentajes encontrados en el resto de tratamientos con este aminoácido.

Por otro lado, se observa que los niveles de contaminación han sido reducidos, apareciendo sólo un embrión contaminado en cada uno de los tratamientos T2 y T3, lo que constata de nuevo la eficacia del sistema de esterilización utilizado.

En la figura 28 se muestra el efecto de las cuatro concentraciones de glicina ensayadas sobre el crecimiento de las plántulas originadas a partir de los embriones de *Euonymus latifolius* transcurridos 15 días desde su siembra *in vitro*.

Figura 28. Efecto de la glicina sobre el crecimiento de embriones a los 15 días de cultivo in vitro.



En esta figura se aprecia que el tratamiento T3 de 2 mgL^{-1} de glicina produce un desarrollo de la plántula de 7,02 mm, similar al obtenido en ausencia de glicina (6,35) y superior, aunque no de forma significativa a los tratamientos con 1 (4,64) y 4 mgL^{-1} (3,85).

En cuando a la emisión de la radícula, aunque también el tratamiento con 2 mgL^{-1} de glicina induce una raíz ligeramente más larga, no se encuentran diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, parece que el efecto de este aminoácido sobre la raíz es más consistente que sobre el tallo, ya que la longitud de la raíz crece de forma directamente proporcional ($r=0.9954$) a las concentraciones de glicina de 0, 1 y 2 mgL^{-1} adicionadas al medio, hasta el tratamiento con 3 mgL^{-1} en el que no hay desarrollo de la raíz, lo que parece indicar un efecto tóxico de este nivel de glicina en el medio.

En la figura 29, se indican los valores expresados en la figura 28, pero transcurridos 30 días desde la siembra. Respecto a la longitud de la parte aérea, se puede apreciar en dicha figura 29, salvando el mayor desarrollo global ocasionado 15 días más adelante, un comportamiento similar al obtenido en el control de los primeros 15 días, es decir, el tratamiento (T3) 2 mgL^{-1} de glicina es el que induce un mayor desarrollo de la parte aérea, 10,1 mm, frente al obtenido en ausencia de glicina, 9,7 mm y en los tratamientos con 1 y 3 mgL^{-1} (7,2 y 6,1 respectivamente), aunque de nuevo no hay diferencias estadísticas entre estos crecimientos.

En lo que respecta al desarrollo radicular, se repite la mayor longitud media con un 5,42 mm en el tratamiento con 2 mgL^{-1} de raíz frente a los tratamientos de carencia de glicina (2,1 mm) y 1 mgL^{-1} de este aminoácido con 2,2 mm de longitud radicular media. También en este caso, es decir, transcurrido un mes desde la siembra, la relación entre concentración de glicina y longitud media de la raíz es directa ($r=0.8789$) aunque algo menor que a los 15 días debido al fuerte desarrollo de la raíz en la concentración de 2 mgL^{-1} de glicina. De nuevo el nivel más elevado de glicina, inhibe de forma clara el desarrollo radicular con sólo una longitud media de raíz de 0,8 mm. Estos resultados avalan lo afirmado por Waris (1962) en el sentido de que la glicina tiene efectos profundos en la morfogénesis y por White, 1963; Sing. et al, 1981, donde recomiendan el extracto de levadura, mezcla de aminoácidos donde la glicina se encuentra presente, motivo por el uno de los autores (White, 1943), recomienda el uso de la glicina de manera individual para el cultivo de raíces de tomate, uso que han seguido otros autores como Rugini, 1982 para el olivo y White 1943 en tomate. Por otro lado, como se indicó en la introducción la glicina es el aminoácido de menor tamaño molecular, con un único átomo de hidrógeno como cadena lateral, por lo que esta circunstancia le permite su mejor absorción por la célula.

Figura 29 . Efecto de la glicina sobre el crecimiento de embriones a los 30 días de cultivo in vitro

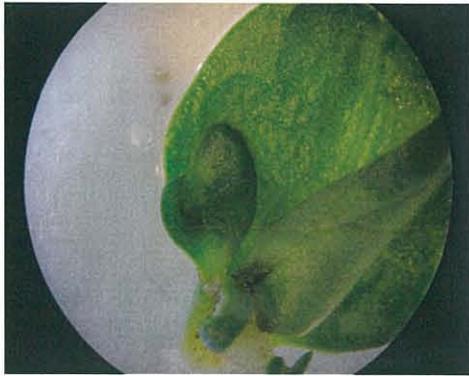
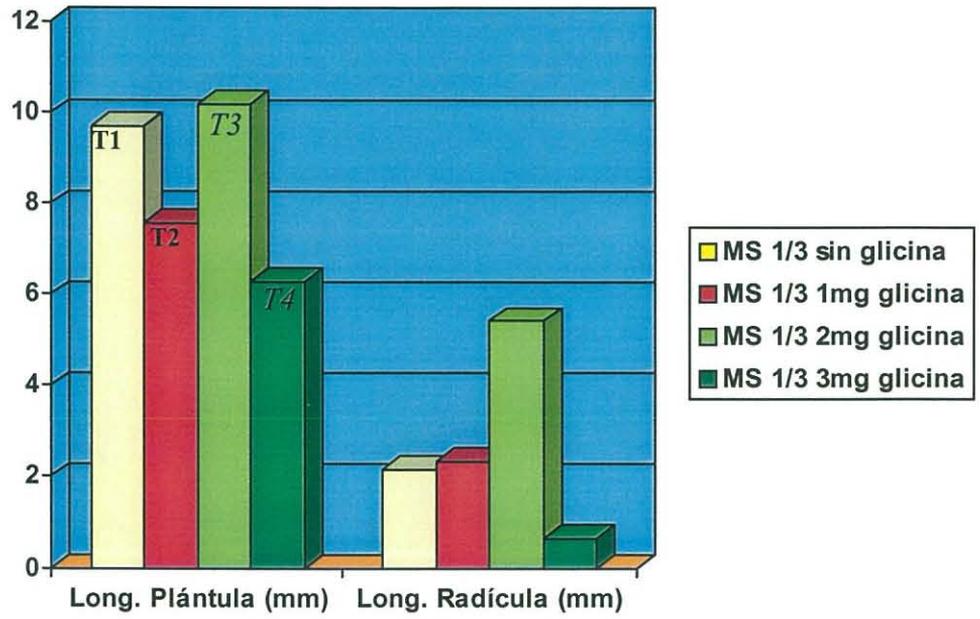


Fig.30 : Glicina 0 mgL⁻¹

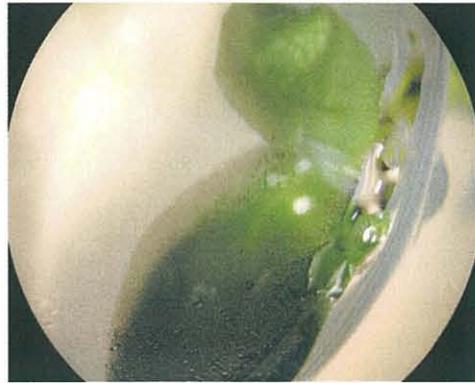


Fig.31.-: Glicina 0 mgL⁻¹



Fig.32: Glicina 0 mgL⁻¹



Fig.33.- Glicina 0 mgL⁻¹



Fig. 34: Glicina 2 mgL⁻¹

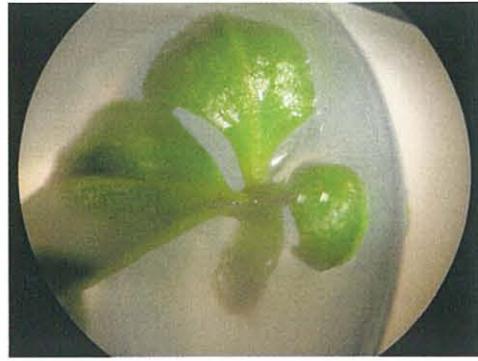


Fig.35: Glicina 2 mgL⁻¹



Fig. 36: Glicina 2 mgL⁻¹

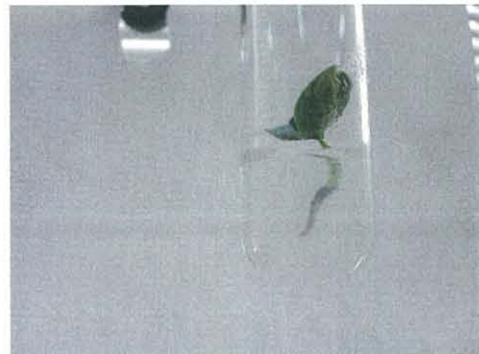


Fig.37: Glicina 2 mgL⁻¹



Fig. 38: Glicina 1 mgL⁻¹



Fig.39: Glicina 1 mgL⁻¹

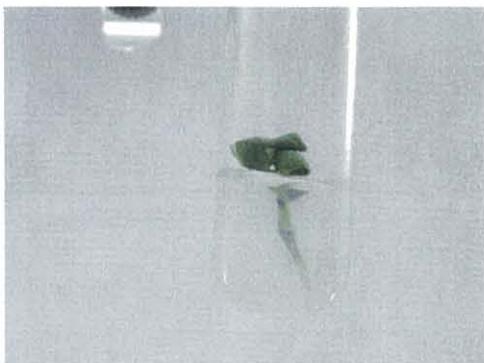


Fig.40: Glicina 1 mgL⁻¹



Fig.41:Glicina 1 mgL⁻¹



Fig.42: Glicina 3 mgL⁻¹



Fig.43: Glicina 3 mgL⁻¹

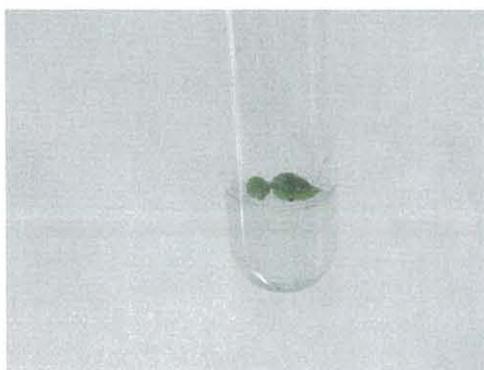


Fig.44: Glicina 3 mgL⁻¹



Fig.45: Glicina 3 mgL⁻¹

De los experimentos llevados a cabo con *Euonymus latifolius* se puede concluir que embriones de esta especie pueden ser cultivados con éxito *in vitro* en las condiciones ensayadas, es decir, usando el medio de Murashige y Skoog para el establecimiento de esos embriones a una concentración de 1/3 de sus macronutrientes y micronutrientes. Siendo recomendable una concentración de sacarosa en el medio entre el 1.5% y 2% y de glicina 2 mgL⁻¹. Por otro lado, la respuesta encontrada en cuanto a la germinación de semillas en bandeja y semillas cultivadas *in vitro* tanto completas como desnudas, muy baja lo que confirma las dificultades de germinación de semillas de la especie considerada en este trabajo.

IV.4. Rhododendron ponticum subsp. baeticum

IV.4.1 Cultivo de semillas *in vitro*

En la tabla 23 se indican los porcentajes de germinación obtenidos a los 60 días desde la siembra de semillas de rododendron en medio de VID con reguladores de crecimiento (0.072 mgL^{-1} de BAP (6-bencilaminopurina) y 0.024 mgL^{-1} de ANA (ácido naftalen-acético) y sacarosa al 2.5% (tratamiento T1).

Tabla 23. Evaluación de la germinación de semillas completas de Rododendron tras 60 días de cultivo *in vitro*

Tratamientos	% de germinación	% de semillas en vía de germinación	% de contaminación
T1	6.25 a	89.25	4.5
T2	21.43 b	78.57	0

Se observa en dicha tabla una germinación en el tratamiento T1) de un 6,25% y en el T2 de un 21.43%, muy superior ($t = 0.01$) al anterior, siendo el porcentaje de contaminación bajo, 4.5 % para el T1 mientras que en T2 no se observó ninguna contaminación, lo que indica que el proceso de esterilización (apartado III.4.1.2) fue adecuado. Por otra parte también se observó que en ambos tratamientos T1 y T2 no existían diferencias en cuanto a la estimulación de tejido de callo en relación a la presencia o ausencia de reguladores de crecimiento, lo que indica que el medio VID suplementado con reguladores no altera la diferenciación en las plántulas durante el proceso de germinación.

En la tabla 24 se indican los mismos resultados pero transcurridos 90 días desde la siembra.

Tabla 24 Evaluación de la germinación de semillas completas de Rododendron tras 60 días de cultivo *in vitro*

Tratamientos	% de germinación	% de semillas en vía de germinación
T1	6.25	89.25
T2	42.14	57.86

Se observa en la tabla 24 un aumento del porcentaje de germinación en el tratamiento T2 transcurridos 90 días de cultivo *in vitro* de las semillas con un 42,14 % de germinación para T2, también muy superior ($t < 0.01$) al obtenido para T1 (6,25%), estos resultados evidencian, por un lado, el buen estado de las semillas transcurridos 6 años desde su recogida y la mejor respuesta en el medio sin reguladores de crecimiento.

Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por Cantos et al., (2004) con una germinación superior 90%, pero similar en medio de cultivo con y sin reguladores de crecimiento.

De los experimentos realizados con rododendron se pueden obtener una serie de conclusiones como la confirmación de que las semillas de *Rhododendron ponticum* pueden ser germinadas en condiciones *in vitro* siendo su desarrollo adecuado (figuras :46-47-48-49-50-51-52). Además es posible emplear el medio de VID (Troncoso 1991) en una concentración normal y sus fuentes de reguladores de crecimiento así como una $\frac{1}{2}$ concentración de sales para el establecimiento de las semillas en condiciones de cultivo *in vitro*. Para aumentar el desarrollo y crecimiento de las plántulas de *Rhododendron ponticum* en condiciones *in vitro* la concentración óptima de sacarosa se encuentra entre el 2 y 2.5%. En cuanto al sistema de esterilización más óptima que se observó durante el ensayo por su singularidad sea el empleo de un cono estéril como base para el proceso de esterilización para el aislamiento aséptico de las semillas.

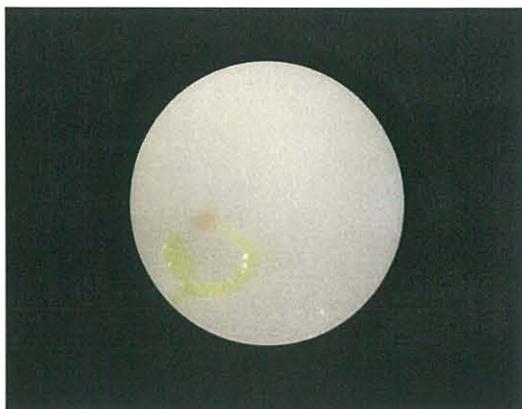


Figura :46

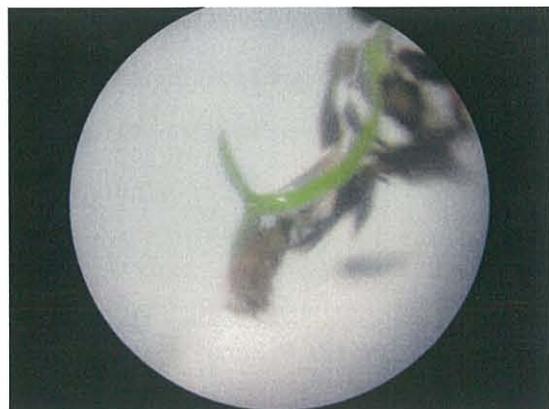


Figura : 47



Figura :48



Figura :49



Figura :50



Figura :51

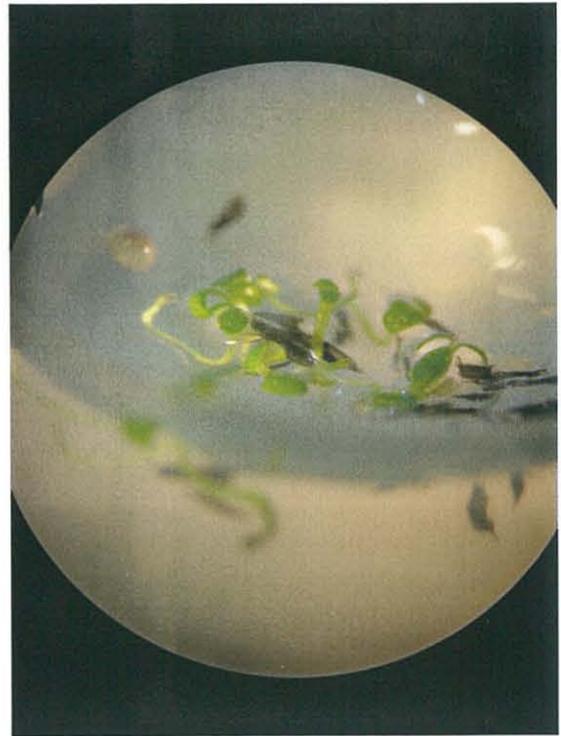


Figura :52

Figuras: 46-47-48-49-50-51-52 Germinación de Plántulas *in vitro* de Rhododendron ponticum

V. BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, W.C. (1975):** Propagation of Rhododendrons by tissue culture I. Development of culture media for multiplication of shoots, Proc. Int. Plant Propagators Soc., vol. 25 pp. 129-135.
- ANDERSON, W.C. (1978):** Rooting of tissue cultured Rhododendrons, Proc. Intl. Plant Prop. Soc. vol. 28 pp. 135-139.
- ANDERSON, W.C. (1984):** A Revised tissue Culture Medium for Shoot Multiplication of Rhododendron, J. Amer. Soc. Hort. Sci., vol. 109 (3), pp. 343-347.
- ARROYO, J. y MEJIAS, J. A (1997) :** Rhododendron ponticum subsp. baeticum (Boiss & Reuter). Had. Mazz, en VALDES CASTRILLON, B.; RODRIGUES HIRALDO, C.; LOPEZ ONTIVEROS, A. y MERINO ORTEGA, O.; Libro rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía, 1 Edición, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, pp. 231-235.
- ARDITTI, J.ERNST (1982):** In : Stewart and Merwe, van der. 263-277pp.
- CANTOS, M.; DOMÍNGUEZ, M.; LIÑÁN, J.; GARCÍA LIÑÁN, M.; TRONCOSO, J. y TRONCOSO, A. (2004).** Influencia de los reguladores de crecimiento en la propagación in vitro del RHODODENDRON PONTICUM subsp. BAETICUM (Boiss y Reuter). IX Simposio sobre metabolismo y modo de acción de fitohormonas. Salamanca. 7-9 de julio.
- CANTOS, M. ; LIÑAN, J.; PEREZ -CAMACHO, F. y TRONCOSO, A. (1993):** Obtención de plantas selectas de Vid, variedad Zalema, libres de la virosis entrenado corto, Actas de horticultura, Vol. II, pp. 705-709.
- CONSEJERIA DE MEDIO AMBIENTE (2003):** Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía. Tomo I. Especies en Peligro de Extinción pp. 135-137.
- CONSEJERIA DE MEDIO AMBIENTE (2003):** Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía. Tomo II. Especies Vulnerables pp. 70-73.
- CONSEJERIA DE MEDIO AMBIENTE (2003) :** Manual para la Identificación y Reproducción de Semillas de Especies Vegetales Autóctonas de Andalucía. Tomo I-II pp. 97-99, 135-137.
- FORDHAM, I.; STIMART, D.P. y ZIMMERMAN, R.H. (1982):** Axillary and adventitious Shoot proliferation of Exbury azaleas in vitro, HortSci, Vol. 17 (5), pp.738-739.
- FERNANDEZ M. NIETO A. (1982):** Plantas Medicinales. Pamplona: Ediciones Universidad de Navarra pp. 47-223.
- GAMBORG O.L., MILLER R. A. and OHYAMA, K. (1968):** Nutrient requirements of suspensión cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res. 50: 148-151.
- GIBSON (1967):** Austr. J. Biol. Sci. 20, 837-842.
- HELLER, R. (1953) :** Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Nat. Bot. Biol. Vég. 14:1-223.
- HERRERA. (1999):** Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España pp. 248-249.
- KNOP W. (1884):** Bereitung einer konzentrierten Nahrstofflösung für Pflanzen. *Landw Versuchs-Stat*, 30:292-294.
- LASTRA J.J. (1997) :** Plantas Medicinales en Asturias y la Cornisa Cantábrica. Gijón : Ediciones Trea, pp. 93-94.
- MURASHIGE T. y SKOOG F. (1962):** A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- MULET L. (1997) :** Flora tóxica de la Comunidad Valenciana. Castellón: Diputación Provincial pp. 103-104.
- MONIER, M. (1980):** Culture of Zygotic Embryos En: Thorp, T.A. (ed). Frontiers of plant tissue culture 1978. International Association for plant tissue culture, Calgary, Canadá pp. 277-295.

Pérez Molphe Blach, E. M., R. Ramírez Malagon , H.G. Nuñez Palenius & N. Ochoa. Alejo.(1999): Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad autónoma de Aguas Calientes 179pp

PIERIK, R. L.M., (1989):Cultivo in vitro de las Plantas Superiores Ediciones Mundi Prensa. Madrid – España 326p

RIVERA D. OBON C.(1991): La Guía Infaco de las Plantas Útiles y Venenosas de la Península Ibérica y baleares. Madrid pp. 657-659.

SAKHAROVA,S.G. (1993): Comportamiento en la germinación en laboratorio de distintos cultivares de *Rhododendron* spp. Byulleten-Glavnogo-Botanicheskogo-Sada, vol. 167, pp. 124-129.

STRODE, R. E. ; TRAVERS P. A. y OGLESVY. R.P. (1979): Commercial Micropropagation of rhododendrons, Proc. Inter. Plant. Prop. Soc., Vol. 29, pp. 439-443.

Tran Thanh Van, K. (1980): Control of morphogenesis by inherent and exogenously Applied factors in thin cell layers. En : Vasil, I.K (ed) Perspectives in plant cell and tissue culture. Academic Press, Nueva York. pp. 175 –194.

WARIS, H. (1962): Neomorphosis in seed plants induced by amino acids. *Physiol. Palnt.* pp. 736-752.

WHITE, P. R. (1939): Glycine in the nutrition of excised tomato roots. *Plant Physiol.* pp. 527-538.

WHITE, P. R. (1943): Further evidence on the significance of Glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. *Amer. J. Bot.* pp. 33-36.

WHITE, P. R. Grove, A. R.(1965): Proceedings of an international conference on plant tissue culture. McCutchan Publishing, Berkeley, California, E.U.