

Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Máster en Ingeniería de Montes

Cultivo in vitro de *Populus tremula* L.:
Influencia del medio de cultivo en la
conservación del material vegetal

Alumno: Raúl Calderón Mediavilla

Tutora: Rosario Sierra de Grado
Cotutor: Roberto San Martín Fernández

Julio de 2016

Copia para el tutor/a

AGRADECIMIENTOS.

Dedico el presente Trabajo Fin de Máster a todas las personas que han ayudado a su realización:

A Rosario Sierra de Grado, por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de investigación, y por sus siempre útiles explicaciones tanto al inicio como a lo largo del experimento.

A Arancha Otaño Llorente, por su ayuda prestada durante el trabajo de laboratorio, y mostrarme lo necesario para realizar de un modo correcto un cultivo *in vitro*.

A Roberto San Martín Fernández, por su esencial colaboración a la hora de analizar estadísticamente los resultados obtenidos en laboratorio.

A mis padres y a mi hermana por ser el apoyo y soporte durante todos los años de formación universitaria.

ÍNDICE

ÍNDICE.

1. Resumen	1
2. Antecedentes	2
2.1. Justificación del trabajo	2
2.2. Contexto del experimento	3
2.3. Estudios previos	4
3. Objetivos	8
4. Material y métodos	9
4.1. Material vegetal	9
4.2. Medio de cultivo	9
4.3. Equipamiento	12
4.4. Diseño experimental	13
4.5. Variables estudiadas	17
4.6. Plan de trabajo	18
4.6.1. Calendario de trabajo	18
4.6.2. Multiplicación previa de la planta	19
4.6.3. Elaboración de los medios	19
4.6.4. Cultivo de los explantos	20
4.6.5. Mediciones	21
4.7. Análisis estadístico	22
5. Resultados	24
5.1. Variables presencia/ausencia	24
5.1.1. Supervivencia	24
5.1.2. Presencia de callo	33
5.2. Variables cuantitativas	36
5.2.1. Crecimiento en altura	36
5.3. Variables categóricas	45
5.3.1. Número de tallos	45

5.3.2. Número de hojas	52
5.3.3. Tamaño de las raíces	58
6. Discusión	65
7. Conclusiones	69
8. Anejos	70
9. Bibliografía	80

RESUMEN

1. RESUMEN.

A pesar de ser la especie de álamo más extendida en el planeta, el álamo temblón (*Populus tremula* L.), afronta en la actualidad una serie de problemas para su conservación en España, debido a la reducción del área forestal a causa de factores como la desaparición de sus masas por cambios de uso del terreno, su escasa utilización en repoblaciones o su distribución en nichos ecológicos marginales que le imposibilitan colonizar nuevas áreas (Sierra de Grado, 2010), a lo que hay que añadir, la dificultad del álamo temblón para multiplicarse a partir de métodos convencionales que están generalizados para otras especies de chopos.

A partir de ahí, las técnicas de cultivo *in vitro* adquieren una gran importancia puesto que están demostrando ser una vía muy eficaz para la propagación de esta especie ya que permiten multiplicar clonalmente ejemplares adultos.

En la E.T.S.I.I.A.A. de Palencia se ha conseguido mantener una colección *in vitro* de *Populus tremula* L. empleando la técnica de micropropagación, donde el medio de cultivo utilizado es el Aspen Culture Medium (ACM) propuesto por Ahuja (1983). Lo que se pretende con el presente estudio es, partiendo del medio de cultivo ACM proliferación, encontrar el medio en el que la conservación del material vegetal sea lo más prolongado posible en el tiempo, de este modo retrasar el momento en que tenga que repicarse la planta para conservarla, y aligerar así la carga de trabajo.

Se estudió el desarrollo de tres clones, cada uno procedente de un rodal diferente de la provincia de Segovia, en ocho medios de cultivo donde se varió la cantidad de macronutrientes, micronutrientes, adenina y sacarosa, a tres temperaturas distintas (4°C, 15°C y 24°C). Las variables medidas en cada planta fueron: la presencia de raíz, el número de explantos con callo, el porcentaje de supervivencia, la presencia/ausencia de contaminación, el crecimiento en altura, el número de tallos por explanto y el número de hojas de cada explanto.

El medio que ha resultado más efectivo para la conservación del material vegetal ha sido el medio 6 a 15°C, el cual combina las menores concentraciones de nutrientes, adenina y sacarosa, y es por tanto el más económico. Los medios que han dado los peores resultados en cuanto a estado del material vegetal y supervivencia han sido los medios 5 y 7, que combinan los nutrientes al 50% con 20 g/L de sacarosa.

Las plantas que permanecieron durante 4 meses a 4°C no experimentaron desarrollo alguno, sin embargo, tras este período de tiempo se cambiaron a 15°C, y lograron desarrollarse con éxito, mostrando un óptimo estado. Ésta es una situación óptima si lo que se pretende es conservar el material vegetal durante largos períodos.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES.

2.1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.

El álamo temblón (*Populus tremula* L.) es la especie de álamo más extendida en el planeta, aun cuando en la Península Ibérica su área natural de localización está prácticamente limitada a la zona septentrional, fundamentalmente a los Pirineos, si bien también se localiza en la Cordillera Cantábrica, el Sistema Central y el Sistema Ibérico, mientras que en la mitad meridional se ha considerado que su presencia era meramente testimonial, sin llegar a formar nunca una formación boscosa pura, ni de entidad.

El *Populus tremula* L. presenta unas características muy importantes tanto desde el punto de vista de la conservación y restauración forestal, como productivo. Presenta además, un enorme potencial para la mejora genética, debido a su elevado crecimiento y adaptabilidad, consecuencia de su variabilidad genética, que le otorga además una notable plasticidad ecológica y variabilidad morfológica. A pesar de esto, el *Populus tremula* L. se encuentra con diversos problemas para su conservación en España: el álamo temblón es una especie colonizadora, con abundante producción de semilla, sin embargo, su reproducción sexual está limitada por diversos factores, como son la rápida pérdida de viabilidad de las semillas, sus estrictas exigencias para la germinación y la vulnerabilidad de los brinzales frente a diversos agentes bióticos y abióticos, a lo que hay que sumar la dificultad de su propagación vegetativa vía estaquillado. Además de esto, también se deben tener en cuenta factores externos que han provocado una desaparición de las masas de esta especie en España, tales como los cambios de uso del suelo, la sustitución de poblaciones autóctonas por otras especies más productoras como el *Populus x euroamericana*, las obras de ingeniería hidráulica o la reducción de las repoblaciones en áreas rurales debido a la pérdida de población. Ante estas dificultades, surgen como una alternativa interesante las técnicas de cultivo *in vitro*, puesto que, son técnicas que permiten multiplicar clonalmente ejemplares adultos de esta especie de una forma efectiva.

El cultivo *in vitro* o micropropagación es una técnica en la que una parte del material vegetal que se denomina explanto se cultiva en condiciones controladas (temperatura, iluminación y humedad) y asépticas (en ausencia de microorganismos) sobre un medio de cultivo nutritivo que en general contiene macro y micronutrientes (sales minerales en cantidades diferentes), una fuente de carbono y reguladores de crecimiento (la composición de los medios de cultivo elaborados en el presente estudio se muestra con detalle en las tablas nº 2 y nº 3). La micropropagación presenta una serie de ventajas como son la posibilidad de una rápida proliferación, la eliminación de los riesgos relacionados con los cambios ambientales o la aparición de microorganismos, la posibilidad de estudiar el comportamiento de los clones en diferentes composiciones del medio, o la capacidad de obtener gran cantidad de individuos en espacios reducidos.

Cuando el objetivo del cultivo *in vitro* es la propagación, se busca obtener la mayor cantidad de planta posible elaborando un medio de cultivo adecuado para ello:

después del crecimiento de los explantos y el desarrollo de los brotes, éstos se subcultivan periódicamente en un nuevo medio, de manera que en cada repicado aumenta en cascada la cantidad de plantas. Sin embargo, en proyectos de conservación *in vitro*, es importante elaborar un medio de cultivo en el que el material vegetal permanezca en buen estado retrasando lo máximo posible el momento de repicar.

2.2. CONTEXTO DEL EXPERIMENTO.

En la E.T.S.I.I.A.A. de Palencia se ha establecido una colección de recursos genéticos de *Populus tremula* L. tras haberse llevado a cabo una serie de muestreos en las poblaciones silvestres de Castilla y León, obteniéndose de ese modo un Banco de Conservación de Germoplasma *in vitro*. El muestreo se llevó a cabo en 10 zonas de las provincias de León, Palencia, Burgos, Soria, Segovia y Ávila, formándose una colección de 24 clones.

Por tanto, en este trabajo de investigación (donde se encuadra el presente estudio) se emplean técnicas de cultivo *in vitro* como medida de conservación *ex situ* de la especie en Castilla y León, lo que trae consigo la necesidad de preservar a largo plazo una gran cantidad de material vegetal y por tanto, un trabajo de laboratorio asociado: como es lógico, tras el establecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro*, llega un momento en que el medio de cultivo se agota y la planta ya no puede sobrevivir, por lo que es necesario un trabajo de repicado de las plantas, lo cual implica además, elaborar muchos medios de cultivo; en definitiva un trabajo muy laborioso que requiere de mucho material de laboratorio.

El trabajo y el coste implícitos en un proyecto de conservación de material vegetal pueden verse reducidos si se encuentran las condiciones para mantener la colección en óptimas condiciones por mucho tiempo con pocos repicados (minimizando el número de manipulaciones). Éste es, en esencia, el principal propósito de este experimento. Para ello, lo que se pretende lograr es que el material vegetal perdure en buen estado durante el máximo tiempo, que no se pierdan genotipos y que se agote el medio lo más tarde posible. Además, la presencia de callo no interesa puesto que induce mutaciones, por lo que una mayor inducción de callo será condición para que se descarte un medio.

Para alcanzar el objetivo propuesto se ha partido del medio ACM proliferación propuesto por Ahuja (1983), que es el medio estándar de cultivo para esta especie, y se han variado los factores temperatura, cantidad de macro y micronutrientes, adenina y sacarosa, con la previsión de observar diferencias significativas entre los diferentes medios. Las razones por las que se han considerado como relevantes estos factores en un proyecto de conservación de material vegetal son las siguientes:

1. Temperatura. Una manera de conseguir prolongar el mantenimiento del material vegetal en un medio es reduciendo la temperatura ambiente para, de ese modo, ralentizar el crecimiento de la planta y que el medio de cultivo tarde más tiempo en agotarse.
2. Sacarosa. El azúcar es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, Las plantas *in vitro* presentan una baja capacidad fotosintética, por lo que la fuente de carbono debe existir en el medio de cultivo de forma orgánica.

3. Macro y micronutrientes. Estos compuestos son la base de la nutrición de las plantas y aseguran el metabolismo, el crecimiento, las funciones fisiológicas, etc.
4. Adenina sulfato. La adenina sulfato fue utilizada por primera vez por Skoog & Tsui (1948) para el crecimiento de explantos de tallos de tabaco, donde estimuló la formación de vástagos adventicios. Posteriormente, Nisch et al. (1967) también utilizaron la adenina para estimular la formación de brotes. Naaz et al. (2007) también encontraron que la adenina sulfato mejoró la inducción de tallos en el desarrollo *in vitro* de *Syzygium cumini* L. Por todo esto, se puede concluir que, por lo general, la adenina sulfato en el cultivo *in vitro* induce a la formación de yemas axilares que darán lugar a nuevos brotes.
5. Por último, también se han estudiado las diferencias que pueden derivarse de la interacción entre diferentes concentraciones de nutrientes, sacarosa y adenina sulfato, empleando las concentraciones que se muestran en la tabla nº 4 (en Material y métodos).

2.3. ESTUDIOS PREVIOS.

La elección de los factores considerados relevantes para este estudio, viene justificada en parte por la revisión bibliográfica llevada a cabo.

En el estudio llevado a cabo por Martin et al (2007) se evaluó el comportamiento de 32 clones de *Populus tremula* L. en 15 medios de cultivo diferentes, evaluándose el número y tamaño de los tallos, el tamaño de las raíces, la presencia o ausencia de callo y la supervivencia, uno y tres meses después de cultivar las plantas. La supervivencia fue registrada cada mes durante ocho meses. En los medios de cultivo se varió la cantidad de los siguientes componentes: macronutrientes (100 mL, 50 mL, 25 mL y 12,5 mL), micronutrientes (1 mL, 0,5 mL, 0,25 mL y 0,125 mL), sacarosa (20 g, 13,3 g, 10 g, 6,7 g, 3,3 g y 1,6 g) y adenina sulfato (20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2,5 mg/L y 1,25 mg/L).

Se evaluó la respuesta de las plantas en las diferentes proporciones de sales, sacarosa y reguladores del crecimiento que contenía cada medio. La ausencia de benciladenina (BA) redujo el número de tallos por explanto. Comparando las parejas de medios que presentan los mismos componentes (al 100% y al 50%) resulta que los medios en los que las concentraciones son menores presentan un crecimiento medio de las plantas mayor.

Son et al (1991) cultivaron explantos de *Populus alba* x *Populus grandidentata* a 4°C en condiciones de oscuridad, en tres tipos de medio: MS (Murashige & Skoog 1962), SMM (medio de multiplicación de tallos), RIM (medio de inducción de tallos) y SEM (medio de elongación de tallos). Las plantas se cultivaron en tres periodos distintos: 0, 1 y 2 meses antes del almacenamiento en frío. Los resultados mostraron la importancia del tipo de medio que se usara, del período de tiempo que pasaba entre el cultivo y el almacenamiento y del estado de las plantas para la supervivencia a 4°C en oscuridad. Se observó el 70% de supervivencia (teniendo las plantas entre 4 y 6 ramificaciones de tallos) tras 2 años de almacenamiento de las plantas que fueron cultivadas en el SMM un mes antes del almacenamiento; tras 5 años la supervivencia fue del 25% y las plantas aún mantenían un potencial de multiplicación apto.

Philip et al (1992) investigaron el potencial morfogenético de explantos de pimienta común (*Piper nigrum*): éstos se instalaron sobre papel de filtro suspendido en

medio MS (Murashige & Skoog 1962) líquido con distinto contenido de IBA (ácido indolbutírico) (0-0,1 mg/L) y de BAP (0-10 mg/L), en solitario o en diferentes combinaciones, con o sin la inclusión de 160 mg/L de adenina sulfato. La adenina sulfato redujo el número de explantos que mostraban regeneración pero incrementó el número de vástagos adventicios por cada explanto regenerado, de modo que la adición de los 160 mg/L de adenina al medio mejoró la proliferación de tallos, produciéndose más de 14 por explanto, aunque sólo respondieron el 20% de los explantos.

Naaz et al (2013) estudiaron la interacción entre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de segmentos nodales maduros de *Syzygium cumini* L. y la inhibición de la necrosis apical, empleando la adenina sulfato como coadyuvante. Se probó la benciladenina (BA) como la citoquinina más influyente en la inducción de tallos y raíces, mostrando los tallos un crecimiento lento y tardío acompañado de abscisión de hojas y necrosis apical. Para tratar de eliminar estos problemas de abscisión y necrosis, se añadió adenina sulfato en concentraciones de 50 y 200 mg/L junto con la concentración óptima de BA. Con esto se mejoró la inducción de tallos junto con la presencia de hojas sanas. Además la necrosis apical y la clorosis fueron totalmente eliminadas en el 90% de los cultivos. Una concentración de 100 mg/L de adenina sulfato junto con 10 µM de BA se mostró como la composición más efectiva de las probadas.

Bertrand-Desbrunais et al (1992) estudiaron los efectos de concentraciones reducidas de sacarosa (5 g/L y 20 g/L) y bajas temperaturas (20°C y 27°C) en una colección de micro-esquejes de cafeto (*Coffea* spp). El medio base empleado fue la concentración de nutrientes del MS (Murashige & Skoog 1962) suplementado con las vitaminas del medio Morel & Wetmore (1951). Tras seis meses, en concentraciones de 5 g/L de sacarosa se observó una reducción en el crecimiento de los esquejes, la proliferación de raíces y la supervivencia. El enraizamiento (del 10%) sólo se incrementó con concentraciones de 20 g/L. La supervivencia descendió drásticamente en los medios sin sacarosa. A 20°C, el crecimiento de los esquejes también se redujo, pero se incrementó la tasa de defoliación y supervivencia.

En conclusión, estas especies se pueden almacenar durante 6 meses a 20°C en un medio que contenga al menos 20g/L de sacarosa.

Bonnier et al (1997) examinaron diferentes métodos para la conservación a largo plazo de 10 especies de lirio (*Lilium* L.), almacenándolos durante 28 meses a -2°C y 25°C en cuatro diferentes medios: la concentración estándar o ¼ de la concentración de nutrientes del medio propuesto por Murashige & Skoog (1962) con 9% o 6% de sacarosa. Se examinó el crecimiento de los bulbos, el de los brotes y la viabilidad de las plantas. El crecimiento de los brotes a 25°C se redujo significativamente usando ¼ de la concentración del medio MS. También, un incremento en la concentración de sacarosa del 6 al 9% redujo el crecimiento de los brotes, pero el efecto fue menor y no significativo respecto a la reducción de nutrientes. Por tanto, la combinación de ¼ de la concentración de nutrientes y 9% de sacarosa dio la mayor reducción de crecimiento de bulbos y brotes, y la mayor viabilidad.

A -2°C el crecimiento de los bulbos fue muy pequeño y no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Sota et al (2014) estudiaron el efecto del medio nutritivo en la micropropagación y la conservación *in vitro* del cerezo de Santa Lucía (*Prunus mahaleb* L.). Para encontrar un protocolo de conservación *in vitro* a medio plazo, se evaluó el efecto de la reducción de la concentración de sacarosa y sales del medio Murashige & Skoog

(1962). Los tratamientos fueron dos: en uno se redujo a la mitad la concentración del medio MS, sin sacarosa y suplementado con reguladores de crecimiento y agar; en el otro, se utilizó el medio MS con su concentración estándar, sin reguladores de crecimiento y suplementado con 3% de sacarosa y 0,55% de agar. Los explantos se mantuvieron en estas condiciones durante tres períodos (3, 4, y 5 meses) para cada método. Como resultado se obtuvo que el mayor porcentaje de supervivencia se logró en los explantos conservados en el medio $\frac{1}{2}$ MS sin sacarosa (un 96,36%) para el período de 3 meses. A partir de los 3 meses, el porcentaje de supervivencia fue decreciendo, de manera que, el medio en el que más plantas sobrevivieron a los 5 meses fue también el medio $\frac{1}{2}$ MS sin sacarosa (29,6% de supervivencia), mientras que con el otro tratamiento no sobrevivió ninguna planta.

Sota et al (2014) evaluaron la conservación por crecimiento lento *in vitro* de *Zizyphus jujuba* a través de tres métodos: 1. La reducción a la mitad de la concentración de sales del medio Murashige & Skoog (1962), sin sacarosa y suplementado con fitohormonas y agar (0,57%); 2. La combinación de baja temperatura (4°C) y condiciones de oscuridad en el medio MS estándar; 3. Ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo MS estándar suplementado con sacarosa (3%) y agar (0,57%). La colección se conservó en estas condiciones durante tres períodos (3, 6 y 10 meses) para cada método. Tras 10 meses, los porcentajes de supervivencia fueron significativamente distintos entre los tres tratamientos: el medio MS estándar sin reguladores de crecimiento tuvo una supervivencia del 12,6%, en el medio $\frac{1}{2}$ MS sin sacarosa sobrevivieron un 63% de las plantas y en el medio MS estándar a 4°C un 78,6% de las plantas.

Tokoporo et al (2013) evaluaron el efecto de la concentración de nutrientes en el medio y la temperatura en la conservación *in vitro* de explantos de banano (*Musa* spp. L.). Se intentó alcanzar un mínimo crecimiento para conservar el material vegetal mediante diferentes condiciones: se emplearon 2 regímenes de temperaturas (22°C y 15°C) y tres niveles de concentración del medio Murashige & Skoog (estándar, $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{4}$ MS) enriquecido con 4% de sacarosa, bencilaminopurina (BAP), vitaminas, ácido ascórbico y 8 g/L de agar. El fotoperiodo fue de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. La máxima supervivencia a los 8 meses se dio a 15°C en los medios MS estándar y $\frac{1}{2}$ MS. La temperatura, la concentración de los componentes del medio y la interacción entre el tiempo de conservación y la concentración del medio no tuvieron efectos significativos en el número de tallos y raíces. La interacción entre la temperatura y la concentración del medio sí influyó significativamente el número de raíces.

Ahmed et al (2010) mantuvieron 9 genotipos de perales en el medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa + 7 g/L de agar + 1 mg/L de bencilaminopurina (BAP), para posteriormente evaluar la conservación *in vitro* de este material vegetal transfiriendo explantos a diferentes medios: el medio MS estándar, el medio MS a $\frac{1}{2}$ de su concentración, el medio MS a $\frac{1}{4}$ de su concentración y el medio MS estándar enriquecido con 2,5% o 3,5% de manitol. La supervivencia en cada medio de cultivo se evaluó tras unos períodos de conservación de 3, 6, 9 y 12 meses. La mayor tasa de supervivencia se observó a los 3 meses en el medio MS estándar suplementado con 2,5% de manitol y en el MS a $\frac{1}{2}$ de su concentración estándar, (supervivencia del 68,30% y 68,22% respectivamente), si bien, el único medio significativamente peor que éstos fue el MS a $\frac{1}{4}$ de su concentración. A los 12 meses, la supervivencia en el medio MS estándar suplementado con 2,5% de manitol fue significativamente mejor que la del resto de medios (43,52%).

Por tanto, el medio óptimo de este estudio para la conservación de los genotipos evaluados fue el medio MS estándar suplementado con 2,5% de manitol tanto a corto como a medio plazo.

Ahmed et al (2010) realizaron otro experimento con los mismos genotipos de peral establecidos también en el medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa + 7 g/L de agar + 1 mg/L de BAP. En este caso, los explantos se trasplantaron a un medio de cultivo igual que en el que estaban, y se evaluó la supervivencia en distintos regímenes de temperaturas: 25, 15, 10 y 5°C, durante 3, 6, 9 y 12 meses, bajo un fotoperiodo de 16 h. Todas las temperaturas con las que se ensayó resultaron diferir significativamente unas de otras, de manera que el porcentaje de supervivencia se iba reduciendo al aumentar la temperatura, resultando las siguientes medias: 79,21% de supervivencia a 5°C, 71,61% de supervivencia a 10°C, 53,98% de supervivencia a 15°C y 42,69% de supervivencia a 25°C. La máxima supervivencia se observó a 5°C a los 3 meses (84,15% de plantas vivas). De igual modo, a los 12 meses la máxima supervivencia se dio a 5°C (77,44% de plantas vivas) y la supervivencia mínima a 25°C (32,37% de plantas vivas).

Tras esta revisión bibliográfica, se puede concluir que, los factores que más influyen en la conservación *in vitro*, especialmente en plantas leñosas, son la temperatura, la concentración de nutrientes y la concentración de sacarosa. En todos los casos, una conservación más prolongada del material vegetal viene ligada a una menor temperatura; en cuanto a la concentración de nutrientes y de sacarosa no se puede extraer una conclusión tan concisa puesto que, la conservación de las plantas depende de cómo se combinen las diferentes concentraciones que se empleen de cada factor.

Aunque son bien conocidas las técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación clonal del género *Populus*, hasta la fecha son pocos los estudios realizados sobre la conservación *in vitro* a largo plazo de este material vegetal. En este estudio en concreto se va a estudiar la incidencia de la temperatura, de la sacarosa, de la adenina sulfato y la reducción de nutrientes, en la conservación de *Populus tremula* L. durante 6 meses. Se ensayará con 3 clones distintos para introducir variabilidad en el experimento y así obtener unos resultados más confiables.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS.

El objetivo general que se busca con el presente trabajo es, partiendo del medio de cultivo ACM de proliferación (Ahuja, 1983) empleado en la micropropagación de plantas, encontrar un medio de cultivo *in vitro* en el que el material vegetal de *Populus tremula* L., además de desarrollarse adecuadamente, se mantenga en buen estado de conservación durante el mayor período de tiempo posible.

Lo que se busca, por tanto, es obtener un medio de conservación de las plantas para alargar al máximo su estancia en un mismo medio de cultivo, y así, retrasar todo lo posible la realización de un nuevo cultivo de material.

En particular se analizará la influencia de la temperatura, la concentración de nutrientes, de sacarosa y de adenina sulfato sobre la conservación de tres clones de *Populus tremula* durante un período de seis meses.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL.

El material empleado en el presente estudio ha sido tomado de la colección de *Populus tremula* del Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias.

Fueron tres clones los escogidos de entre todo el material disponible en la cámara de cultivo, una vez estudiadas variables como el vigor o la tasa de proliferación, y comprobando que se disponía de suficiente material de cada clon seleccionado.

En la tabla 1 se muestran los clones utilizados en el experimento.

Tabla nº 1. Procedencia del material utilizado.

Número de clon	Código	Provincia	Rodal
1	PAJ	Segovia	Pajares de Fresno
10	RIA	Segovia	Riaza
19	GOM	Segovia	Gomeznarro

4.2. MEDIOS DE CULTIVO.

Como ya se ha mencionado previamente, el objeto de este estudio es analizar el comportamiento y duración del material vegetal (los tres clones) en ocho medios de cultivo, generados a partir del medio control ACM (Aspen Culture Medium) desarrollado por Ahuja (Ahuja, 1983) cuya composición se muestra en la tabla nº 2. El medio 1 es el medio control, y el resto de medios se han elaborado a partir del mismo medio ACM variando la cantidad de algunos de sus componentes, tal y como se muestra en la tabla nº 3. Por último, en la tabla nº 4, se señala de una manera concisa y resumida el modo en que se ha evaluado la interacción entre las diferentes concentraciones de nutrientes, adenina sulfato y sacarosa.

Los factores que se han considerado relevantes han sido modificados del siguiente modo:

1. Temperatura. En el presente estudio, se han ensayado tres temperaturas distintas en diferentes cámaras: en la cámara de cultivo visitable (24°C), en la cámara tipo armario (15°C) y en la cámara refrigeradora (4°C).
2. Sacarosa. Puesto que lo que se pretende encontrar es un medio de conservación prolongada del material vegetal, resultaría interesante encontrar una proliferación de tallos lenta. Es por esto que se ha variado la concentración de sacarosa, empleando 20g/L (cantidad del medio estándar) en unos medios y 7g/L en otros, puesto que, *a priori*, el crecimiento y desarrollo de la planta aumentan con la concentración de azúcar, algo que se pretende ralentizar.

3. Macro y micronutrientes. Como nuestro objetivo es la conservación, es decir, detener y ralentizar la proliferación, se ha ensayado con la cantidad del medio estándar (100 mL de macronutrientes y 10 mL de micronutrientes) y esa cantidad reducida a la mitad (50 mL de macro y 5 mL de micronutrientes) en combinación con las distintas cantidades de sacarosa y adenina sulfato.
4. Adenina sulfato. Este factor se ha ensayado con la cantidad del medio estándar, 20 mg/L, y ésta incrementada al doble (40 mg/L). Se llevó a cabo este incremento en la concentración de adenina puesto que consideramos interesante obtener una buena roseta de cada planta, lo más consistente posible pero, a la vez, con el menor crecimiento.

Tabla nº 2. Composición de un litro de medio de cultivo ACM proliferación.

ACM Proliferación Medio		Medio mg/L	Solución Stock		Cantidad a tomar
			g – mg	mL	
Macronutrientes "A"	NH ₄ NO ₃	400	4 g	1000	100 mL
	K ₂ SO ₄	990	9,9 g		
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	3,7 g		
	KH ₂ PO ₄	170	1,7 g		
Macronutrientes "B"	CaNO ₃ · 4H ₂ O	556	5,56 g	1000	100 mL
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	96	0,96 g		
Micronutrientes	MnSO ₄ H ₂ O	16,9	1,69 g	1000	10 mL
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	0,86 g		
	H ₃ BO ₃	6,2	0,62 g		
	KI	0,83	0,083 g		
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,025 g		
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,0025 g		
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,0025 g		
Hierro	Sequestrem 0,02M	80			0,08 g
Vitaminas	Thiamina	0,1	10 mg	100	1 mL
	Ac. Nicotínico	0,5	50 mg		
	Piridoxina	0,5	50 mg		
	Lisina	100	1000 mg	100	10 mL
	Mio-inositol	100	1000 mg	100	10 mL
Hormonas	BAP (CIH calentar)	0,5	50 mg	100	1 mL
	ANA (KOH)	0,02	2 mg	100	1 mL
	Adenina Sulfato (Q)	20	500 mg	100	4 mL
Sacarosa					20 g
Agar					8 g
pH = 5,8					

Tabla nº 3. Composición de cada medio de cultivo elaborado.

Medios		Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4	Medio 5	Medio 6	Medio 7	Medio 8
Macronutrientes A		100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Macronutrientes B		100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Micronutrientes		10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Hierro		0,08 g	0,08 g	0,08 g	0,08 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g
Vitaminas	Th+Ac.Nic+Pir.	1 mL							
	Lisina	10 mL							
	Mio-inositol	10 mL							
Reguladores	BA	1 mL							
	ANA	1 mL							
	Adenina	4 mL	4 mL	8 mL	8 mL	4 mL	4 mL	8 mL	8 mL
Sacarosa		20 g	7 g						
Agar		8 g							
pH		5,6-5,8							

Tabla nº 4. Resumen de las distintas mezclas de los componentes de los medios de cultivo relevantes para el ensayo.

Componente	Cantidad o porcentaje							
	100%				50%			
Nutrientes	100%				50%			
Adenina	20 mg/L	40 mg/L	20 mg/L	40 mg/L	20 mg/L	40 mg/L	20 mg/L	40 mg/L
Sacarosa	20 g/L	7 g/L	20 g/L	7 g/L	20 g/L	7 g/L	20 g/L	7 g/L
Medio	1	2	3	4	5	6	7	8

4.3. EQUIPAMIENTO.

Se muestra a continuación el instrumental y equipo utilizado para la realización del experimento, diferenciando cada una de las fases del cultivo in vitro, que han sido las siguientes:

- Elaboración de los medios de cultivo.
 - ✓ Probetas.
 - ✓ Matraz aforado de 1L.
 - ✓ Papel de plata.
 - ✓ Pipetas.
 - ✓ Destilador de agua.
 - ✓ Agua destilada.
 - ✓ Erlenmeyer.
 - ✓ Vasos de precipitado.
 - ✓ Vidrio reloj.
 - ✓ Balanza de precisión.
 - ✓ Compuestos para elaborar los medios de cultivo (macro y micronutrientes, sacarosa, vitaminas, agar, etc.).
 - ✓ Calentador/agitador.
 - ✓ Imanes.
 - ✓ pH-metro.
 - ✓ Reguladores del pH (HCl y NaOH).
 - ✓ Tarros con tapa.
 - ✓ Guantes.
 - ✓ Autoclave.

- Fase de repicado de los explantos.
 - ✓ Cámara de flujo laminar.
 - ✓ Alcohol 70%.
 - ✓ Tarro con alcohol, pinzas y bisturí.
 - ✓ Tijeras.
 - ✓ Parafilm.
 - ✓ Mechero de alcohol.
 - ✓ Placas Petri.
 - ✓ Rotulador permanente.
 - ✓ Cámara de cultivo (24°C).
 - ✓ Cámara a 15°C.
 - ✓ Cámara a 4°C.

- Mediciones.
 - ✓ Regla milimetrada.
 - ✓ Tijeras.

✓ Parafilm.

4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Los medios de cultivo se repartieron en 162 botes y cada bote contenía 3 explantos de un mismo clon. Estos botes fueron repartidos en tres cámaras, del siguiente modo:

- 72 botes en la cámara a 24°C.
- 72 botes en la cámara a 15°C.
- 18 botes en la cámara a 4°C.

La primera cámara de cultivo presenta un fotoperiodo que abarca 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, siendo la temperatura con luz y con oscuridad de 24°C. La cámara a 15°C presenta un fotoperiodo de 10,5 horas de luz y 13,5 horas de oscuridad, y la cámara a 4°C tiene una puerta de cristal transparente y no tiene iluminación interna sino que recibe luz natural a través de las ventanas del laboratorio, de las que se encuentra a unos 3 m de distancia.

Se llevó a cabo un diseño experimental para minimizar las posibles desviaciones que los parámetros ambientales podrían provocar en el ensayo, como la diferencia de luz que le llegase a cada planta en función de su posición y de la balda en la que se encontrara. De este modo, en cada cámara se utilizó un diseño experimental en tres bloques aleatorios completos: en la cámara a 24°C y en la cámara a 15°C cada bloque contaba con todos los clones en todos los medios, y en la cámara a 4°C se evaluó únicamente el medio control.

En la cámara a 24°C, el croquis del diseño experimental empleado fue el que se muestra en la siguiente tabla:

Tabla nº 5. Esquema del diseño experimental en la cámara a 24°C.

Bloque 1				Bloque 2			
Medio 7	Medio 6	Medio 1	Medio 5	Medio 4	Medio 6	Medio 7	Medio 3
19	19	19	19	19	19	19	19
10	10	10	10	10	10	10	10
1	1	1	1	1	1	1	1
Medio 3	Medio 2	Medio 4	Medio 8	Medio 1	Medio 2	Medio 5	Medio 8
19	19	19	19	19	19	19	19
10	10	10	10	10	10	10	10
1	1	1	1	1	1	1	1

Bloque 3			
Medio 1	Medio 3	Medio 7	Medio 6
19	19	19	19
10	10	10	10
1	1	1	1
Medio 4	Medio 8	Medio 2	Medio 5
19	19	19	19
10	10	10	10
1	1	1	1

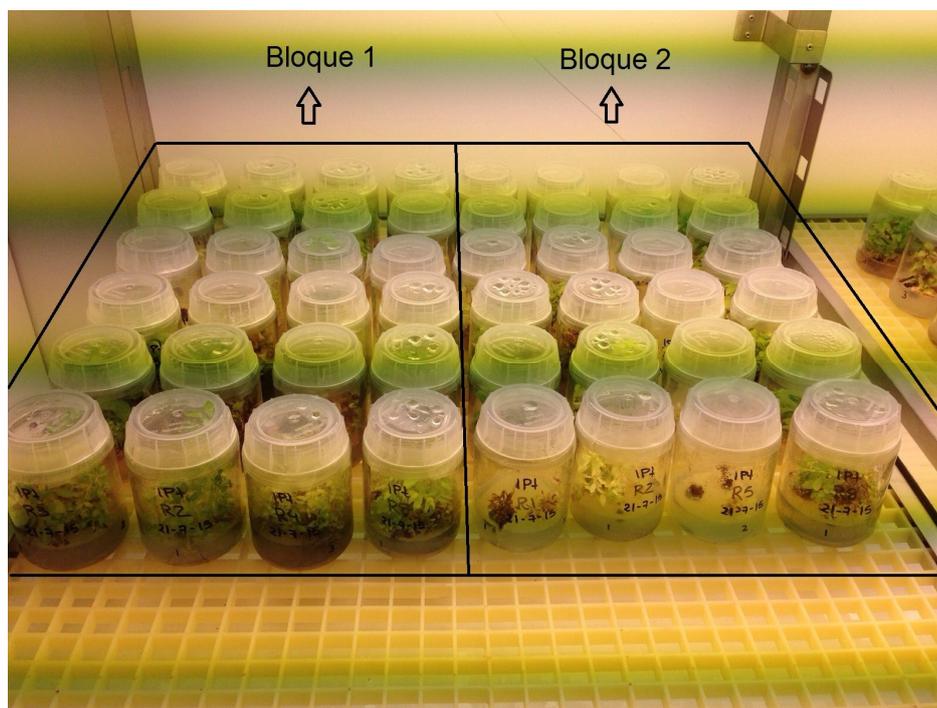


Fig. nº 1. Disposición de los botes en los bloques 1 y 2 de la cámara de cultivo.

En la cámara a 15°C, se estableció el diseño experimental de acuerdo con el esquema de la tabla nº 6:

Tabla nº 6. Esquema del diseño experimental de la cámara a 15°C.

	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3
1ª balda	Medio 3	Medio 4	Medio 7
	19	19	19
	10	10	10
	1	1	1
	Medio 7	Medio 3	Medio 3
	19	19	19
2ª balda	10	10	10
	1	1	1
	Medio 2	Medio 7	Medio 1
	19	19	19
	10	10	10
	1	1	1
3ª balda	Medio 1	Medio 1	Medio 4
	19	19	19
	10	10	10
	1	1	1
	Medio 4	Medio 8	Medio 5
	19	19	19
4ª balda	10	10	10
	1	1	1
	Medio 5	Medio 2	Medio 2
	19	19	19
	10	10	10
	1	1	1
4ª balda	Medio 6	Medio 5	Medio 6
	19	19	19
	10	10	10
	1	1	1
	Medio 8	Medio 6	Medio 8
	19	19	19
4ª balda	10	10	10
	1	1	1
	1	1	1

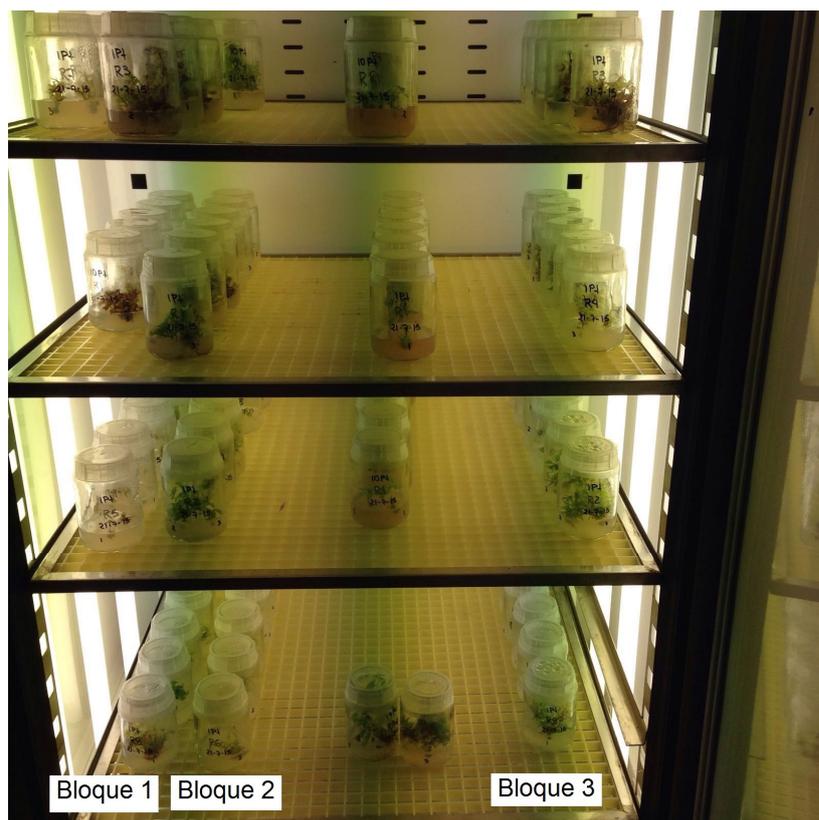


Fig. nº 2. Distribución de los botes en los 3 bloques de la cámara a 15°C (los botes de la parte central de la cámara no forman parte del experimento).

Por último, en la tabla nº 7 se esquematiza el diseño experimental establecido en la cámara refrigerada a 4°C.

Tabla nº 7. Esquema del diseño experimental de la cámara a 4°C.

	Medio 1					
Bloque 1 (1ª balda)	10	1	19	1	10	19
Bloque 2 (2ª balda)	1	10	10	19	1	19
Bloque 3 (3ª balda)	10	19	1	1	10	19

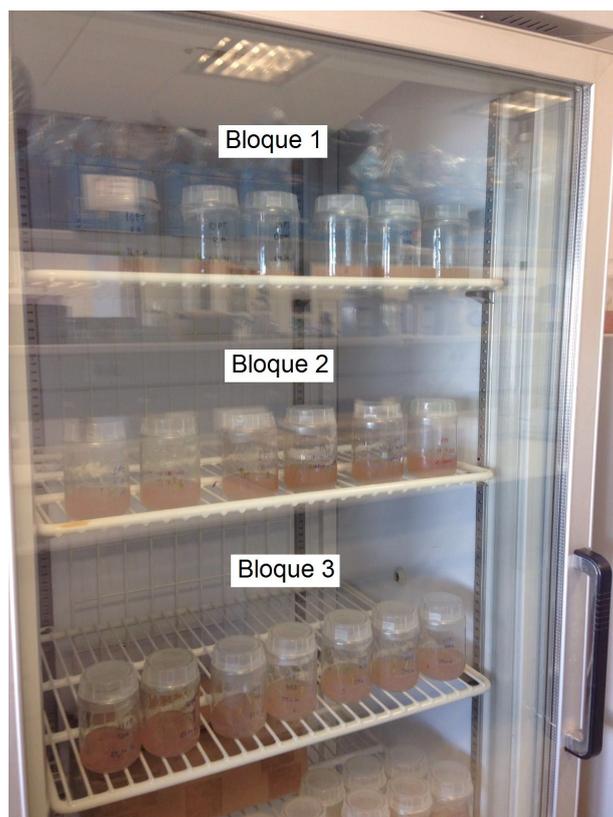


Fig. nº 3. Distribución de los botes en los 3 bloques de la cámara a 4°C.

4.5. VARIABLES ESTUDIADAS.

Tras llevar a cabo la siembra de los explantos en la cámara de flujo laminar, los botes fueron repartidos en las tres cámaras. Esta tarea se llevó a cabo entre los días 20 y 22 de julio de 2015. La primera medición se llevó a cabo el día 4 de septiembre de 2015 y a partir de ésta se ejecutó una cada mes. Las variables medidas en cada bote fueron las siguientes:

- Variables categóricas.
 - Presencia de raíz. La ausencia de raíz sería la categoría O. A partir de ahí, las raíces pequeñas (hasta 1 cm) son la categoría A, las medianas (entre 1 y 5 cm) toman la categoría B y las grandes (más de 5 cm) son la categoría C.
 - Número de tallos por explanto. La presencia de entre 1 y 5 tallos toma la categoría A, la presencia de entre 5 y 10 es la categoría B y la presencia de más de 10 tallos la categoría C.
 - Número de hojas de cada explanto. La ausencia de hojas representa la categoría O. La presencia de entre 1 y 5 hojas es la categoría A, la presencia

de entre 5 y 10 hojas es la categoría B y la presencia de más de 10 hojas la categoría C.

- Variables cuantitativas.
 - Crecimiento en altura. En este caso, se mide el crecimiento en altura de cada explanto en cm.
- Presencia/ausencia.
 - Número de explantos con callo. La presencia de callo toma valor 1 y la ausencia toma valor 0.
 - Supervivencia. Los explantos vivos toman valor 1 y las muertas toman valor 0.
 - Presencia/ausencia de contaminación. La ausencia de contaminación toma valor 0 y la presencia toma valor 1.

4.6. PLAN DE TRABAJO.

4.6.1. Calendario de trabajo.

La elaboración del experimento se desarrolló a lo largo de las siguientes fases:

- Fase de preparación del material vegetal.

 Multiplicación de los clones para el experimento.

La primera fase del experimento consistió en multiplicar el material de la cámara del Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales hasta obtener suficientes explantos para el ensayo. Esta labor se llevó a cabo durante los días 20 y 27 de marzo.

 Elaboración de los medios de cultivo.

El 13 de marzo, se elaboró el medio necesario para cultivar los explantos en la fase de multiplicación expuesta anteriormente, elaborándose en este caso el medio control ACM.

Los 8 medios de cultivo fueron elaborados durante los días 16 y 17 de julio, en un total de 180 botes que fueron conservados en papel de periódico hasta que se realizó el cultivo de los explantos en los mismos.

- Fase de instalación del experimento.

 Cultivo de los explantos.

Esta es la fase en la que se instalan los clones en los botes del experimento. Se llevó a cabo durante los días 20, 21 y 22 de julio. Los botes se repartieron en las tres cámaras de acuerdo con el diseño experimental elaborado en gabinete. Desde la

instalación de los explantos en los botes, hasta que se llevó a cabo la primera medición transcurrió un período de tiempo de 43 días.

- **Fase de toma de datos.**

■ Mediciones.

La medición y toma de datos comenzó el día 4 de septiembre de 2015 y se repitió posteriormente una vez al mes.

MARZO 2015						
L	M	X	J	V	S	D
						1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28	29
30	31					

JULIO 2015						
L	M	X	J	V	S	D
		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31		

4.6.2. Multiplicación previa de la planta.

La ejecución de esta labor se desarrolló como sigue:

En primer lugar se preparó el medio de cultivo en el que se iban a cultivar los tres clones: se elaboraron en total 2 L del medio control ACM que se repartió en 40 botes que, tras ser cerrados con tapa, se envolvieron en grupos de cuatro en papel periódico para posteriormente ser introducidos en el autoclave, donde fueron esterilizados.

Una vez se dispuso del medio de cultivo, se pudo comenzar a repicar la planta de la cámara de cultivo: esto se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar, donde es fundamental trabajar con unas medidas higiénicas adecuadas, comenzando por limpiar la cámara con alcohol al 70%, emplear un tarro con alcohol y un mechero de alcohol para evitar la contaminación de las pinzas y el bisturí, pulverizar con alcohol al 70% todo el material que utilizemos dentro de la cámara de flujo laminar (material vegetal, medios de cultivo, placas Petri, pinzas, agua destilada, bisturí).

Finalizado el trabajo en la cámara de flujo laminar, se llevaron los tarros correctamente etiquetados con rotulador a la cámara de cultivo.

4.6.3. Elaboración de los medios.

El proceso de elaboración de los medios de cultivo se llevó a cabo en dos días; el primero de ellos se prepararon 5 L de medio y el segundo los 4 L restantes. Se explica a continuación, de forma detallada, el procedimiento:

En primer lugar se pone en funcionamiento el destilador de agua y se comprueba que el autoclave tenga suficiente agua destilada para realizar una correcta esterilización del material. Tras ello, se cogen los Erlenmeyer de 1 L necesarios (4 ó 5 según el caso) para realizar la mezcla de los ingredientes, la cual se ejecuta en dos pasos:

1. En primer lugar, se introducen 0,5 L de agua destilada en cada Erlenmeyer con 8 gramos de agar, se cierra con papel de plata y se introduce en el autoclave a 121°C durante 1 minuto.
2. Mientras se están autoclavando los Erlenmeyer, se elaboran los 0,5 L restantes de cada uno. Para ello se pesa la cantidad necesaria de hierro y sacarosa en la balanza de precisión y se introduce en cada una de las probetas de 0,5 L que se enrasarán con la cantidad adecuada de macronutrientes "A", macronutrientes "B", micronutrientes, vitaminas, reguladores y agua destilada. Para conseguir disolver bien la sacarosa y el hierro y obtener una mezcla uniforme, se introduce un imán en la probeta que remueve el medio gracias a la acción del agitador. A la vez que se agita, es necesario regular el pH con HCl (para bajarlo) y NaOH (para subirlo), puesto que debe alcanzar un valor entre 5,6 y 5,8.

Una vez calibrado el pH de la solución, se extraen los Erlenmeyer del autoclave y se introduce en cada uno de ellos los 0,5 L de las probetas (teniendo 1 L en cada Erlenmeyer), se agita, y se reparte cada litro en 20 tarros, obteniendo por tanto un total de 100 tarros. Tras ello, se cierran con tapa y se envuelven en grupos de 4 con papel de periódico, para finalmente, ser introducidos en el autoclave, donde serán esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Al día siguiente se extraen los botes y se dejan envueltos en el papel en la zona del material esterilizado hasta que se realice el cultivo.

4.6.4. Cultivo de los explantos.

Antes de comenzar con el cultivo de los explantos, hay que comprobar que todo el material que vamos a emplear dentro de la cámara de flujo laminar (placas Petri, pinzas, bisturí, botes vacíos y agua destilada) esté correctamente esterilizado; en caso contrario deberá ser introducido en el autoclave, envuelto en papel de periódico, durante 30 minutos a 121°C.

Una vez está el material esterilizado, el primer paso es limpiar la cámara de flujo laminar con alcohol al 70% y encender la luz y el ventilador. Después se introduce todo el material que vamos a usar, pulverizado previamente con alcohol al 70%, siendo éste: mechero de alcohol, agua destilada, placas Petri, el bote con la planta de donde se extraen los explantos, bisturí y pinzas dentro de un tarro con alcohol y los tarros con el medio en el que se cultivarán los explantos.

El proceso de trabajo es el siguiente: se disponen dos placas Petri y se les echa una capa de agua destilada, se sacan del tarro las pinzas y el bisturí y se hacen pasar por el fuego para quemar el alcohol que contienen y limpiarlos, se extrae del bote donde está la planta una roseta y se cierra; se deposita la roseta en una de las placas y se obtienen los explantos, que son pasados a la otra placa Petri. Después de esto se vuelve a dejar el bisturí en el tarro con alcohol y se cultivan los explantos en el medio

con ayuda de las pinzas. Por último se sellan los tarros con parafilm para evitar la pérdida de humedad, se etiquetan con rotulador permanente y se llevan a la cámara correspondiente. Finalizado el proceso, se limpia la cámara de flujo laminar con alcohol al 70%.

4.6.5. Mediciones.

El día 22 de julio finalizó la fase de preparación del material vegetal. La fase de toma de datos comenzó el día 4 de septiembre: a partir de esta fecha fueron medidos mensualmente los explantos presentes en la cámara a 24°C y en la cámara a 15°C. En la cámara a 4°C no se observó ningún crecimiento en los explantos por lo que se decidió pasar los 18 botes de dicha cámara a la cámara a 15°C el día 1 de diciembre, de modo que la distribución de los botes fuese la misma (se mantuvo el mismo diseño experimental). El día 11 de diciembre ya se observaba cierto desarrollo en los explantos por lo que fue el día elegido para llevar a cabo la primera medición de los mismos. Además de en esta ocasión, también se midieron en enero. En la figura nº 4 se puede ver el crecimiento de los explantos en esta segunda medición.

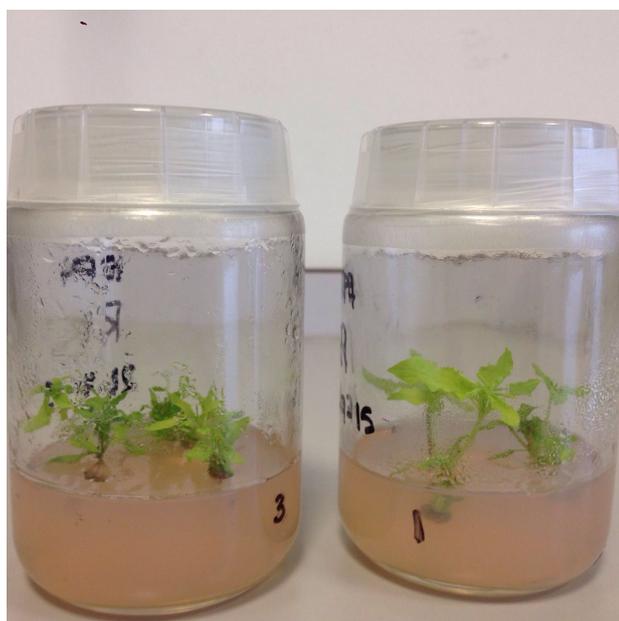


Fig. nº 4. Crecimiento de los explantos de la cámara refrigerada a 4°C tras llevar 1 mes en la cámara a 15°C.

Las últimas mediciones se llevaron a cabo en el mes de enero, donde ya se observaba un número considerable de plantas secas en la cámara a 24°C.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se ha llevado a cabo con el paquete estadístico SAS 9.4 for Windows. Cada variable respuesta se ha analizado como sigue.

Análisis de la Supervivencia:

En cada fecha de medición, para cada cámara y para cada medio de cultivo se obtuvo el porcentaje (P) de explantos que sobrevivieron en cada bloque (9 explantos por combinación de fecha, cámara, medio y bloque). Es decir, el porcentaje de supervivencia se obtuvo sobre un total de 9 explantos.

Para analizar el porcentaje de explantos vivos y ver el efecto de los distintos factores (MES, Cámara, Medio de Cultivo) se ajustó el modelo lineal Mixto de medidas repetidas de ecuación:

$$P_{ijkl} = \mu + C_i + B_j(C_i) + M_k + F_l + C_i \times M_k + C_i \times F_l + M_k \times F_l + C_i \times M_k \times F_l + \xi_{ijkl}$$

Donde μ representa el efecto de media general, C_i es el factor Cámara ($i=1$ 15°C, $i=2$ 24°C), B_j es el factor Bloque ($j=1,2,3$), M_k es el factor Medio de Cultivo ($k=1,2,\dots,8$), F_l es el factor de medidas repetidas que representa el efecto del tiempo ($l=1$ Septiembre, $l=2$ Octubre, ..., $l=5$ Enero) y ξ_{ijkl} representa el término de error aleatorio del modelo. Los errores son normales e independientes en cada fecha de medición, con correlaciones no nulas entre las diferentes fechas de medición y con varianzas diferentes para cada fecha de medición y cada cámara de cultivo, que fueron estimadas mediante máxima verosimilitud restringida (REML).

Posteriormente, para observar el efecto en la supervivencia de los componentes del medio de cultivo (Nutrientes, Adenina, Sacarosa) se plantearon, para cada cámara de cultivo, el modelo lineal mixto de medidas repetidas:

$$\begin{aligned} P_{ijkl} = & \mu + B_i + N_j + A_k + S_l + F_m + N_j \times A_k + N_j \times S_l + A_k \times S_l + N_j \times A_k \times S_l \\ & + N_j \times F_m + A_k \times F_m + S_l \times F_m + N_j \times A_k \times F_m + N_j \times S_l \times F_m + A_k \times S_l \times F_m \\ & + N_j \times A_k \times S_l \times F_m + \xi_{ijkl} \end{aligned}$$

Donde los nuevos factores son: N_j que representa el efecto de los nutrientes, A_k que representa el efecto de la Adenina y S_l que representa el efecto de la Sacarosa. Todos ellos a dos niveles, alto y bajo. Los errores son normales independientes en cada fecha, con correlaciones no nulas entre fechas diferentes y con varianzas diferentes por fechas, estimadas mediante REML.

Análisis de la presencia de Callos en los explantos.

Se actuó de la misma manera que en el caso anterior pero calculando el porcentaje de explantos con callos, de entre los supervivientes.

Análisis de la presencia de Tallos, Hojas y Raíces.

Se actuó de la misma manera que en el caso anterior pero calculando el porcentaje de explantos presentes en cada categoría de hojas, tallos y raíz, de entre los supervivientes.

Análisis del Crecimiento.

Para estudiar el crecimiento de los explantos y analizar el efecto de los distintos factores (MES, Cámara, Medio de Cultivo) en la altura de las mismas se ajustó el modelo lineal Mixto de medidas repetidas de ecuación:

$$H_{ijklm} = \mu + C_i + B_j(C_i) + M_k + F_l + C_i \times M_k + C_i \times F_l + M_k \times F_l + C_i \times M_k \times F_l + \xi_{n(ijkl)}$$

Donde la variables respuesta, H_{ijklm} , representa la Altura de la planta n (n=1,2,...,9) en cada una de las combinaciones de los factores anteriormente señalados, Cámara Bloque, Medio de Cultivo y Fecha de medición. Los errores son normales e independientes en cada fecha de medición, con correlaciones no nulas entre las diferentes fechas de medición y con varianzas diferentes para cada fecha de medición y cada cámara de cultivo, que fueron estimadas mediante máxima verosimilitud restringida (REML).

Posteriormente, para observar el efecto en el crecimiento de los componentes del medio de cultivo (Nutrientes, Adenina, Sacarosa) se plantearon, para cada cámara de cultivo, el modelo lineal mixto de medidas repetidas:

$$\begin{aligned} P_{ijkl} = & \mu + B_i + N_j + A_k + S_l + F_m + N_j \times A_k + N_j \times S_l + A_k \times S_l + N_j \times A_k \times S_l \\ & + N_j \times F_m + A_k \times F_m + S_l \times F_m + N_j \times A_k \times F_m + N_j \times S_l \times F_m + A_k \times S_l \times F_m \\ & + N_j \times A_k \times S_l \times F_m + \xi_{ijkl} \end{aligned}$$

Donde los nuevos factores son: N_j que representa el efecto de los nutrientes, A_k que representa el efecto de la Adenina y S_l que representa el efecto de la Sacarosa. Todos ellos a dos niveles, alto y bajo. Los errores son normales independientes en cada fecha, con correlaciones no nulas entre fechas diferentes y con varianzas diferentes por fechas, estimadas mediante REML.

RESULTADOS

5. RESULTADOS.

El estudio de todas las variables respuesta se ha llevado a cabo en las dos temperaturas, 15°C y 24°C, por separado ya que las diferencias entre ellas eran siempre significativas; de este modo podemos comparar el comportamiento de las plantas en una y otra cámara.

5.1. VARIABLES PRESENCIA/AUSENCIA.

5.1.1. Supervivencia.

Como lo que se busca en este estudio es analizar la conservación del material vegetal en los diferentes medios de cultivo, se evaluó la supervivencia en el mes de Enero, el último mes en que se llevaron a cabo mediciones, además de reflejar la evolución de la supervivencia en cada medio durante los cinco meses que duró el ensayo. Esta evolución se muestra en las figuras nº 5 y 6.

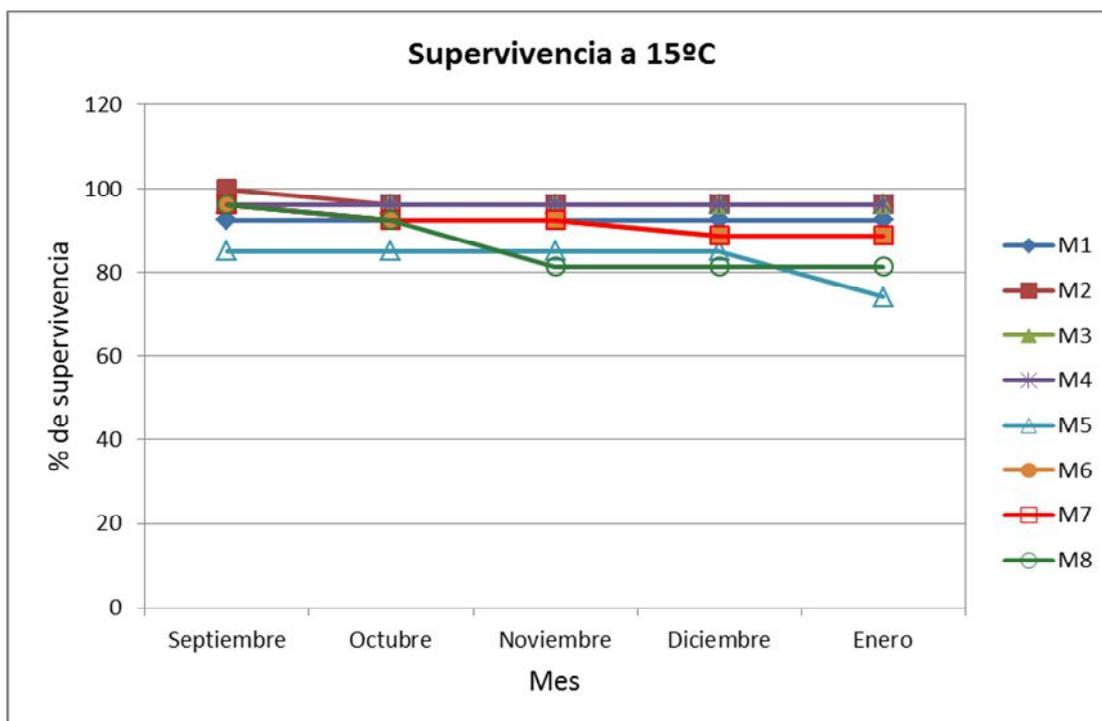


Fig. nº 5. Evolución de la supervivencia en cada medio de cultivo de la cámara a 15°C.

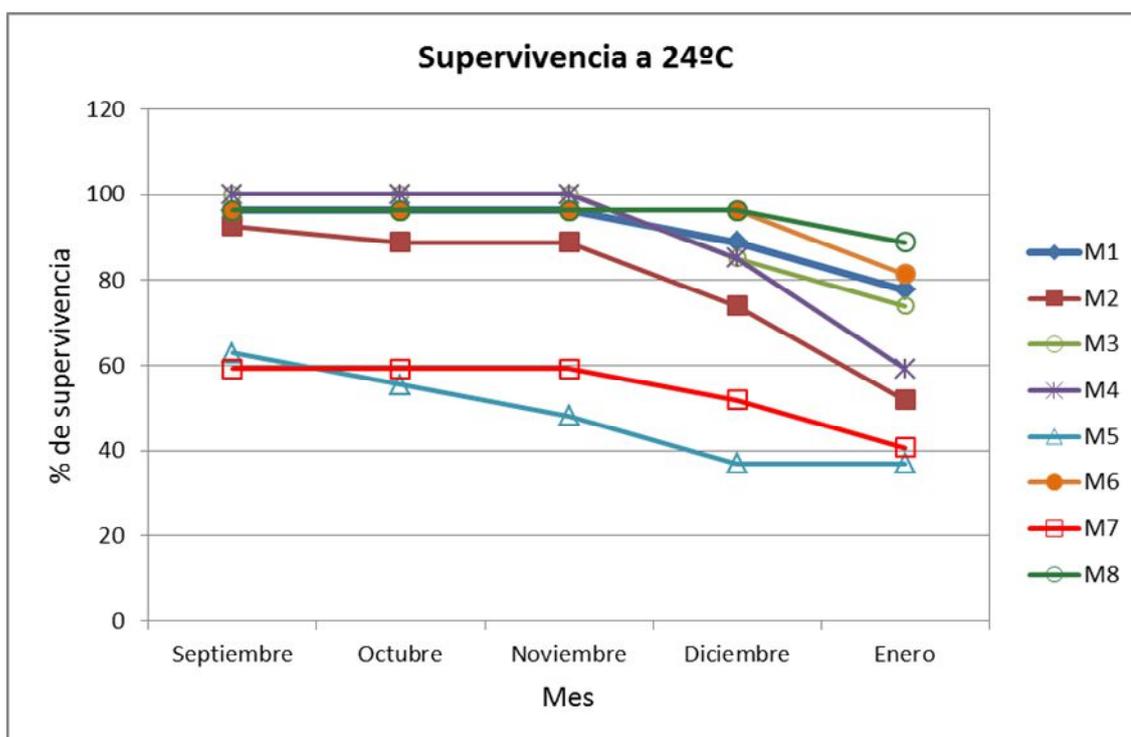


Fig. nº 6. Evolución de la supervivencia en cada medio de cultivo de la cámara a 24°C.

Como puede verse en la figura nº 5, a 15°C la supervivencia de las plantas permanece más estable en el tiempo. En este caso, es en los medios 5 y 8 donde se da una mortandad más acusada, si bien no es abundante. En el medio 5, mueren tres plantas en el último mes, que previamente ya mostraban decaimiento y escaso desarrollo. Las muertes del medio 8 en el mes de noviembre se deben a la contaminación de un bote, que provocó la pérdida de 3 explantos.

En la figura nº 6, correspondiente a la supervivencia a 24°C se evidencia un incremento de la mortandad a partir del mes de noviembre, siendo más drástico en los medios 2 y 4: éstos tienen en común el 100% de sales y la cantidad de sacarosa (7 g/L). La elevada tasa de mortalidad al inicio del experimento en los medios 5 y 7 se debe a que en estos medios, un alto porcentaje de las plantas muertas formaban un callo bastante grande al inicio de su desarrollo y se secaban: estos medios presentan las sales al 50% y 20 g/L de sacarosa. Los medios que mantienen un mayor porcentaje de plantas vivas al final del experimento son el 6 y el 8, que presentan las sales al 50% y 7 g/L de sacarosa.

Tabla nº 8. Tabla Anova de interacción bloque(temperatura) y temperatura*medio.

Efecto	Num DF	Den DF	F-valor	Pr>F
Temperatura	1	28	48.12	<.0001
Bloque(Temperatura)	4	28	4.24	0.0083
Medio	7	28	4.69	0.0014
Temperatura*Medio	7	28	3.54	0.0075

En la tabla Anova se puede observar que los factores temperatura y medio son significativos, al igual que las interacciones bloque(temperatura) y temperatura*medio.

En el siguiente gráfico (Figura nº 7) se representa la supervivencia media de plantas en cada medio de cultivo en el mes de Enero, juntando los datos de las dos cámaras.

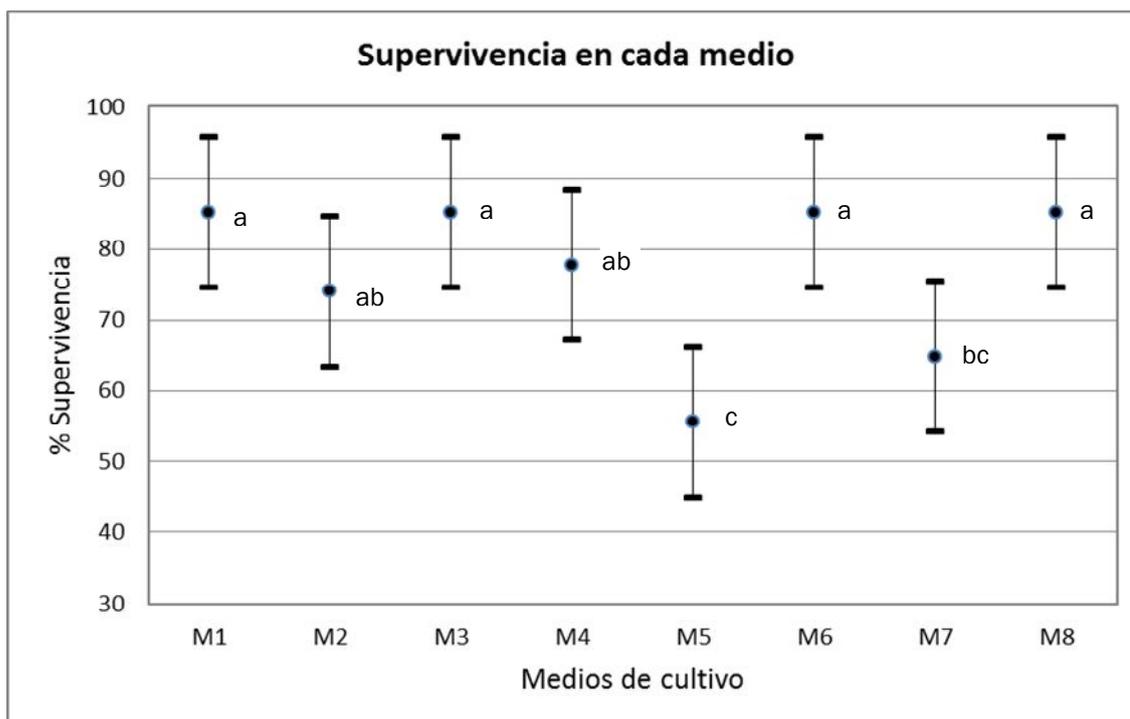


Fig. nº 7. Supervivencia en enero en cada medio de cultivo, contabilizando las dos cámaras juntas.

De este gráfico se desprende que no hay ningún medio que mejore al medio control (el medio 1) en cuanto a supervivencia al final del experimento. Los medios 3, 6 y 8 resultan ser igual de buenos que el 1, e incluso con el 2 y el 4 no existen diferencias significativas. El medio en el que menos plantas sobreviven al final del ensayo es el 5, seguido del medio 7, son por tanto los que presentan unos resultados más desfavorables; en estos dos medios, que tienen las sales al 50% y 20g/L de sacarosa, se produjo una mortalidad más alta desde el inicio del experimento, donde se encontró que las plantas desarrollaban un callo muy grande y morían antes de presentar desarrollo alguno.

Para conocer el estado de las plantas al final del experimento en función de que estén a 15°C o a 24°C se ha elaborado el gráfico siguiente (Figura nº 8). De este modo se puede ser más preciso en el análisis y concretar en que medida influye la temperatura en los resultados observados en un mismo medio.

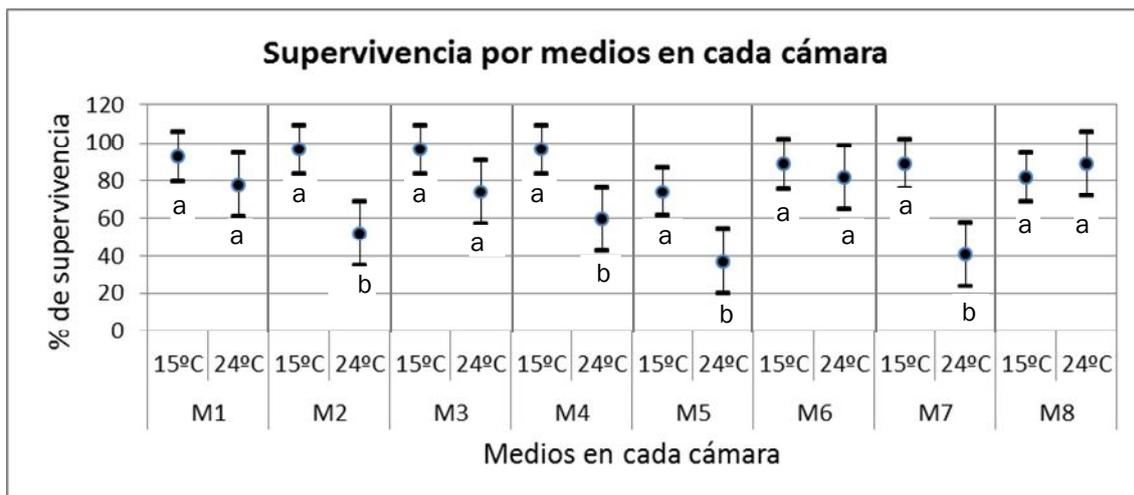


Fig. nº 8. Supervivencia en enero en cada medio de cultivo. Se compara cada medio en las dos temperaturas.

Los medios 1, 3 (sales al 100% y 20 g/L de sacarosa), 6 y 8 (sales al 50% y 7 g/L de sacarosa) presentan una buena tasa de supervivencia tanto a 15°C como a 24°C. En otros medios si que existen diferencias significativas, en función de a qué temperatura los utilizemos: esto sucede con los medios 2, 4 (sales al 100% y 7 g/L de sacarosa), 5 y 7 (sales al 50% y 20 g/L de sacarosa); éstos presentan buenos resultados a 15°C pero la mortalidad aumenta en gran medida si se emplean a 24°C.

En la gráfica nº 9 se compara la supervivencia media al final del experimento en todos los medios de las dos cámaras, para determinar qué combinación temperatura*medio puede ser la que conserve un mayor porcentaje de plantas vivas.

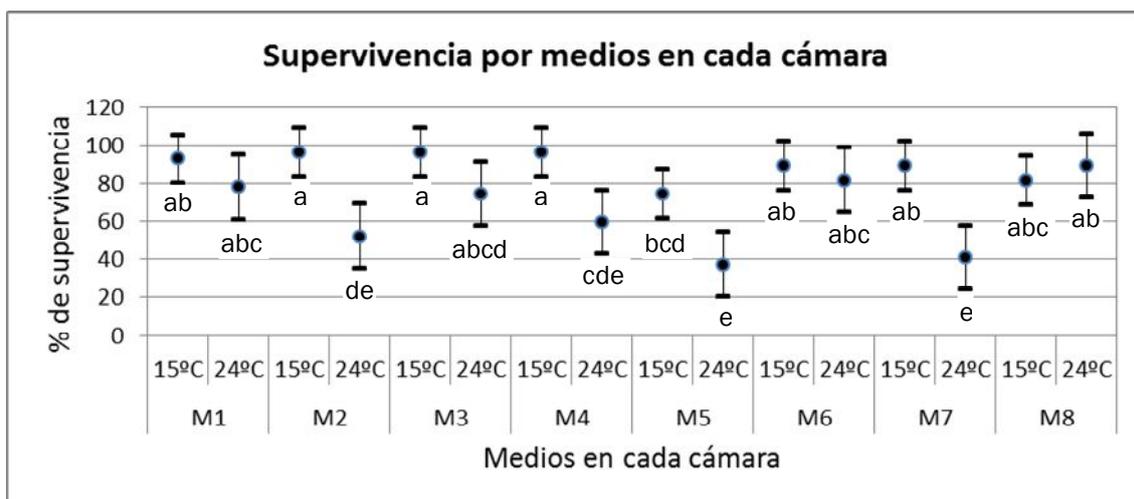


Fig. nº 9. Supervivencia en enero en todos los medios de las cámaras a 15°C y 24°C.

Se observa en casi todos los medios una mayor supervivencia a 15°C, salvo en el medio nº 8, donde sobreviven más plantas a 24°C, si bien la diferencia con respecto a 15°C no es significativa.

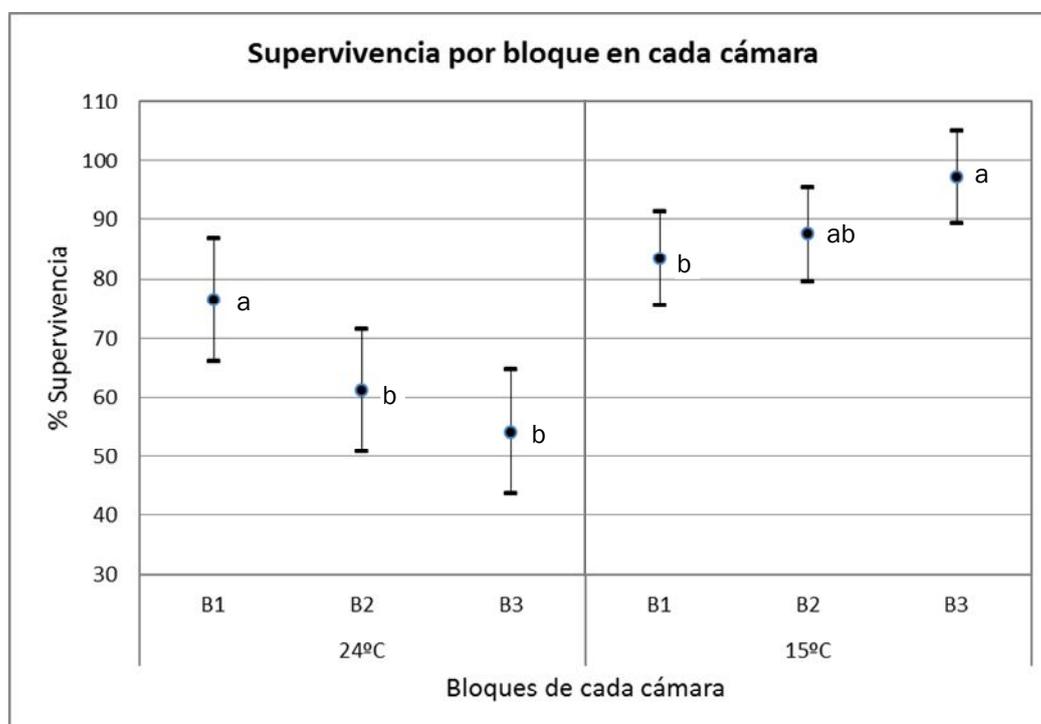


Fig. nº 10. Supervivencia media en enero en cada bloque de cada cámara.

En la cámara a 24°C, la supervivencia media de las plantas en enero es significativamente mayor en el bloque 1 que en los bloques 2 y 3: esto puede deberse a la distribución de los bloques en la cámara, ya que el bloque 1 estaba pegando a la pared y debido a ello, los clones se estarían desarrollando a una temperatura ligeramente inferior y recibirían menor intensidad de luz. En el caso de la menor supervivencia en el bloque 1 a 15°C, no se ha encontrado una causa referente a la cámara, puesto que todas las bombillas lucían y tenían la misma intensidad, y la ventilación se supone homogénea para todos los bloques (hay dos ventiladores en la parte superior).

- Evaluación de los factores significativos en cada cámara.

Según las tablas Anova expuestas en los Anejos (tabla nº 9 y tabla nº 10), los factores que suponen diferencias significativas en la supervivencia en cada cámara son:

A 15°C: la interacción nutrientes*mes.

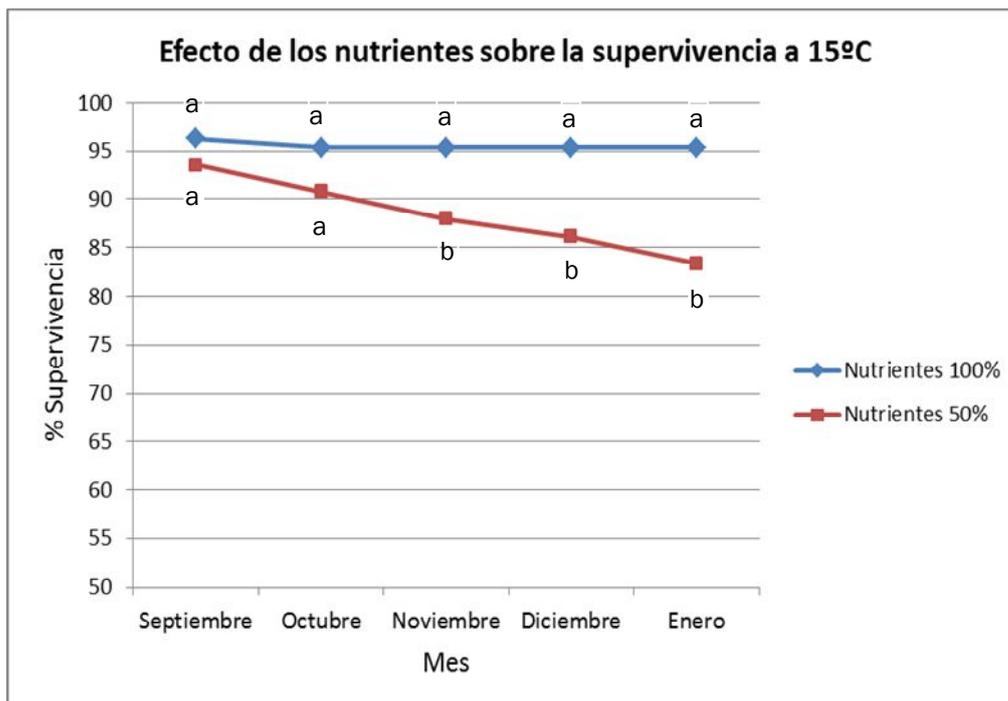


Fig. nº 11. Evolución de la supervivencia en función de la concentración de nutrientes a 15°C. Se comparan las dos series (nutrientes 100% respecto a nutrientes 50%).

Como puede verse en esta figura 11, en los dos primeros meses no existen diferencias significativas entre emplear una concentración de nutrientes u otra, sin embargo, a medida que pasan los meses esas diferencias se hacen mayores, de manera que, a partir de noviembre, la concentración de nutrientes al 100% mejora significativamente la supervivencia.

A 24°C: la concentración de nutrientes, la sacarosa, y las interacciones nutrientes*sacarosa, nutrientes*sacarosa*mes y nutrientes*mes. . Las dos primeras no se muestran porque son valores medios de todo el experimento y no aportan información relevante.

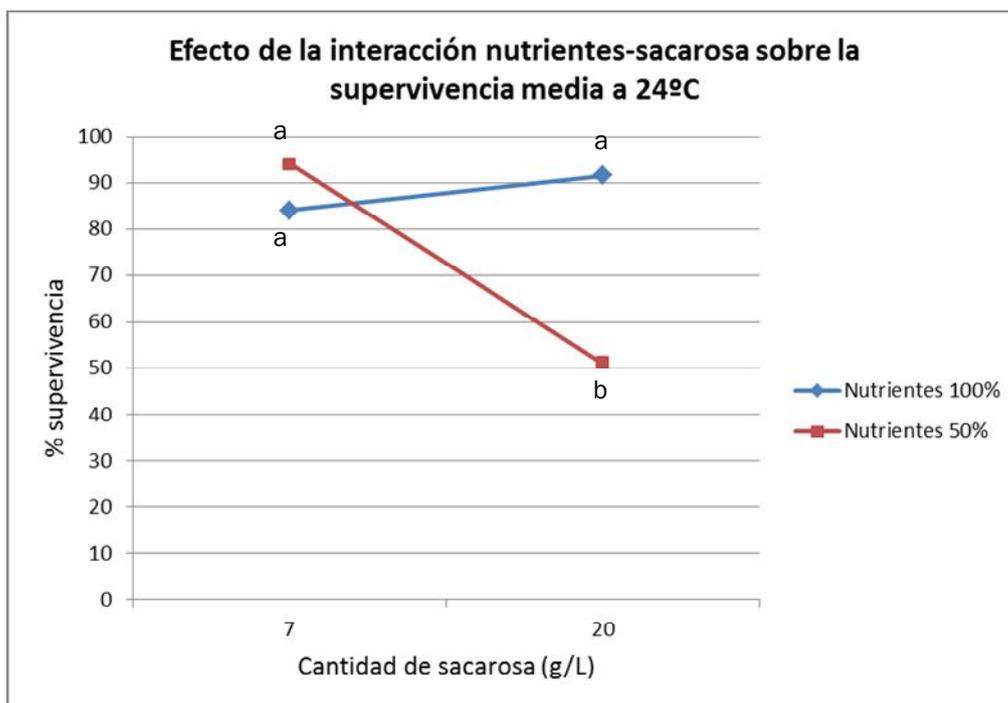


Fig. nº 12. Supervivencia media de cada combinación de nutrientes y sacarosa a 24°C. Se compara el primer valor de cada serie con el segundo.

En esta figura se observa que empleando una concentración de nutrientes al 100% la supervivencia no cambia significativamente al cambiar la cantidad de sacarosa; sin embargo, si el medio contiene los nutrientes al 50%, la supervivencia es mucho mayor empleando 7 g/L de sacarosa que 20 g/L: esto se ve claramente reflejado en los medios 5 y 7, donde la supervivencia es significativamente inferior.

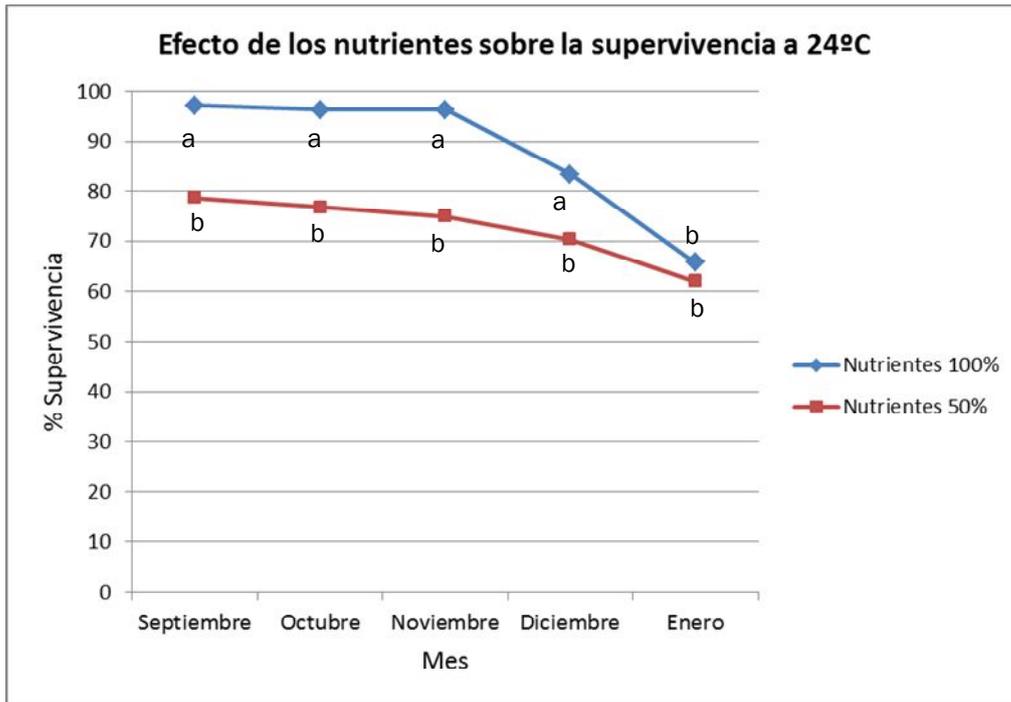


Fig. nº 13. Evolución de la supervivencia en función de la concentración de nutrientes a 24°C. Se comparan las dos series entre sí.

Como puede verse, la supervivencia en los medios con los nutrientes al 100% es significativamente superior que la de los medios al 50% de nutrientes; sin embargo, a partir de noviembre, la supervivencia de las plantas en los medios con los nutrientes al 100% sufre una repentina caída, de modo que con el paso del tiempo la diferencia de supervivencia entre los medios con una y otra concentración de nutrientes se va haciendo cada vez menor, hasta hacerse nula en el mes de enero.

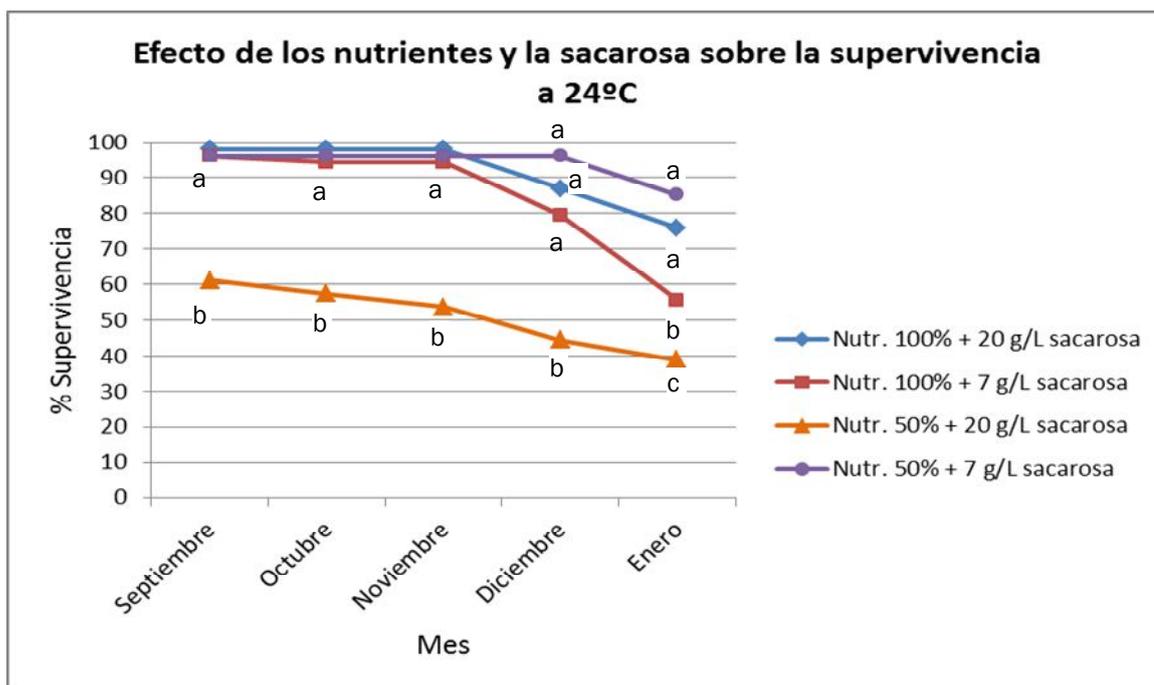


Fig nº 14. Evolución de la supervivencia según la cantidad de nutrientes y sacarosa a 24°C. Se comparan las 4 series unas con otras.

Como se refleja en esta figura, la concentración de nutrientes al 50% + 20 g/L de sacarosa es la combinación donde la supervivencia es significativamente menor. Entre el resto de mezclas no hay diferencias significativas hasta enero, donde el empleo de 7 g/L de sacarosa más nutrientes al 100% ofrece menor supervivencia. Por tanto, la mejor respuesta en enero se obtiene con las combinaciones: nutrientes al 50% + 7 g/L de sacarosa (medios 6 y 8) y nutrientes al 100% + 20 g/L de sacarosa (medios 1 y 3), lo cual se ve también en la Fig. nº 6.

5.1.2. Presencia de callo.

La presencia de callo en el material vegetal del presente experimento fue muy superior a la esperada, por anteriores experiencias en el laboratorio con esta especie. Como puede verse en la gráfica siguiente, los valores de porcentaje de plantas con callo rondan el 90%, siendo el medio nº 2 el único que baja del 80% de media, que es significativamente mejor que el resto. Se ha incluido este gráfico sobre la presencia media de callo a lo largo de todo el ensayo ya que es una variable que varió muy poco a lo largo del tiempo.

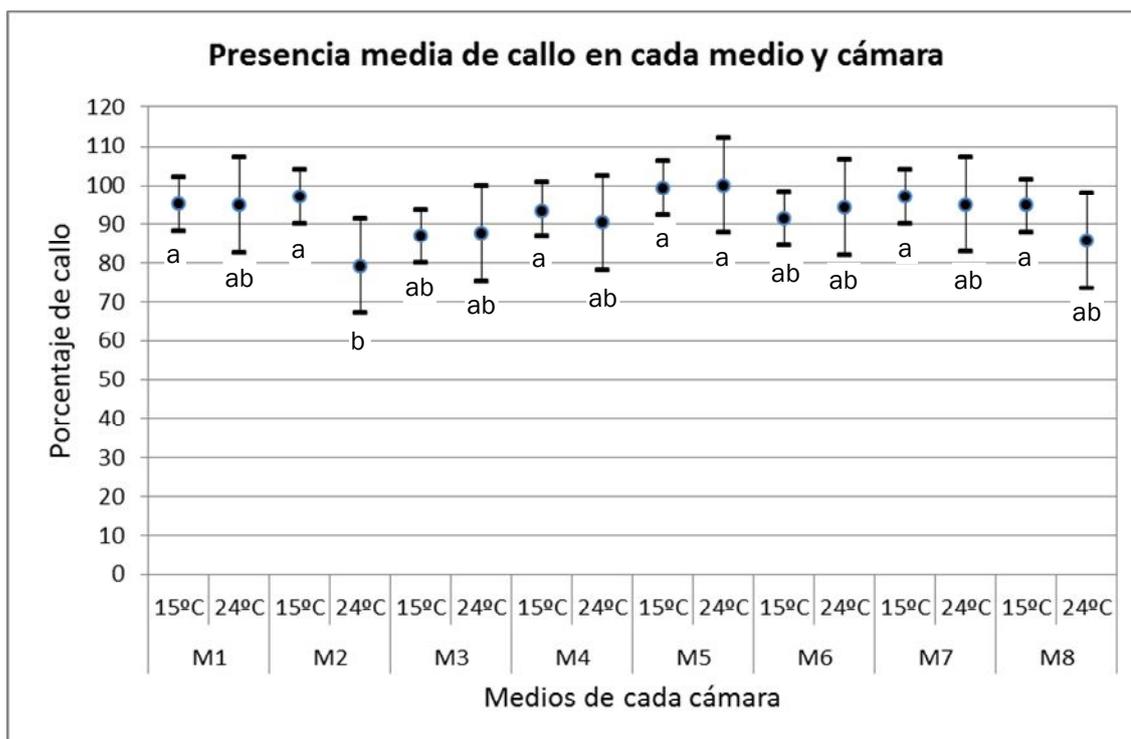


Fig. nº 15. Porcentaje medio de plantas con callo en cada medio de cada cámara a lo largo del experimento. Se comparan todos los valores entre sí.

- **Evaluación de los factores significativos en cada cámara.**

Observando las tablas Anova para esta variable (tabla nº 11 y tabla nº 12 de los Anejos), se extraen los siguientes factores significativos:

A 15°C: las interacciones nutrientes*mes, adenina*mes y sacarosa*mes. La interacción sacarosa*mes no se expone porque las diferencias sólo eran significativas en el mes de octubre.

A 24°C: el único factor significativo es el tiempo. Sin embargo, las diferencias que genera el paso de los meses se deben a las plantas que mueren.

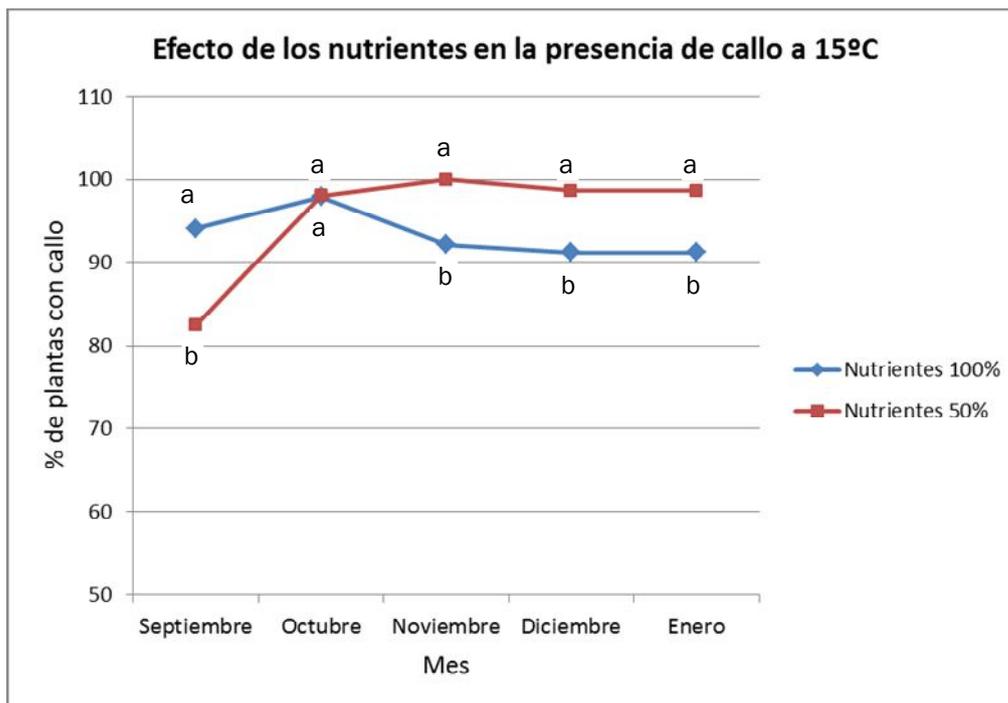


Fig. nº 16. Evolución del porcentaje de callo en función de la concentración de nutrientes. Se comparan las dos series entre si.

En esta figura se observa que, las plantas presentes en los medios en los que la concentración de nutrientes está al 50% tardan más tiempo en desarrollar el callo, pero a partir del mes de octubre presentan un porcentaje de callo significativamente mayor que las plantas que crecen con los nutrientes al 100%.

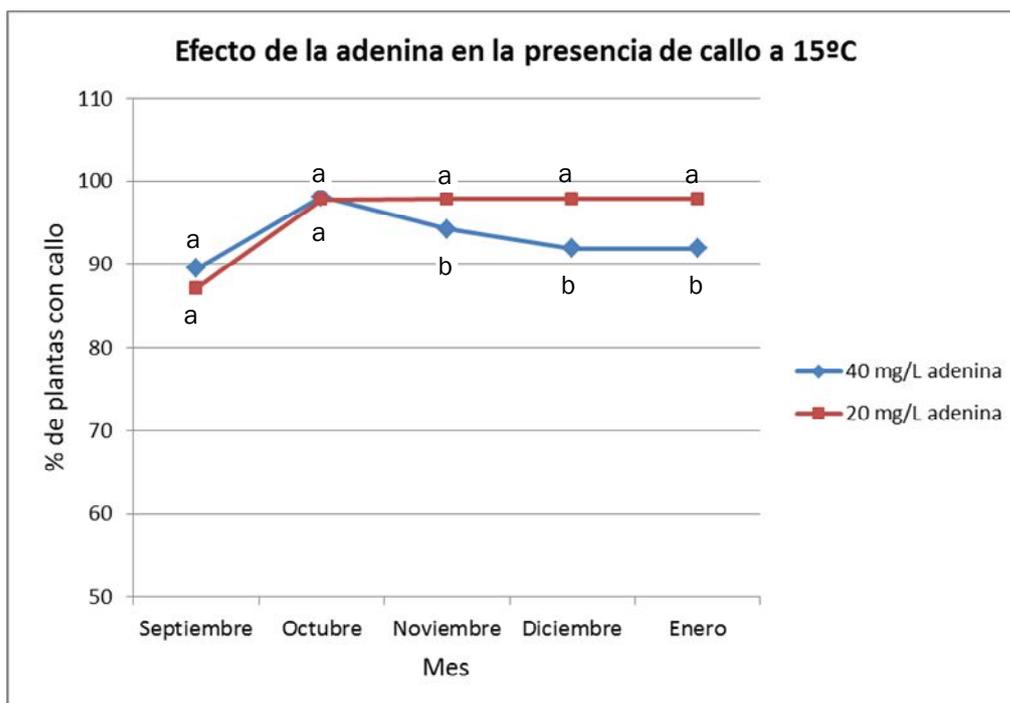


Fig. nº 17. Evolución del porcentaje de callo en función de la concentración de adenina. Se comparan las dos series entre si.

Lo que sucede en esta figura es similar a lo que se observaba en la figura anterior, si bien en este caso el desarrollo de callo al inicio es el mismo independientemente de la concentración de adenina sulfato, es a partir de octubre cuando se pone de manifiesto un mayor porcentaje de callo en las plantas que crecen con una menor concentración de adenina.

5.2. VARIABLES CUANTITATIVAS.

5.2.1. Crecimiento en altura.

Para analizar esta variable se registró el crecimiento del tallo más alto de cada explanto. Analizando el crecimiento a lo largo de los 6 meses que duró el ensayo, se puede observar un crecimiento más rápido al inicio, que se va ralentizando con el tiempo. Tanto a 24°C como a 15°C, el crecimiento más lento se da en aquellos medios en los que la concentración de nutrientes se ha reducido a la mitad.

A través de las tablas Anova (tabla nº 13 y tabla nº 14 de los Anejos) se pueden determinar los factores que son significativos a 15°C y a 24°C:

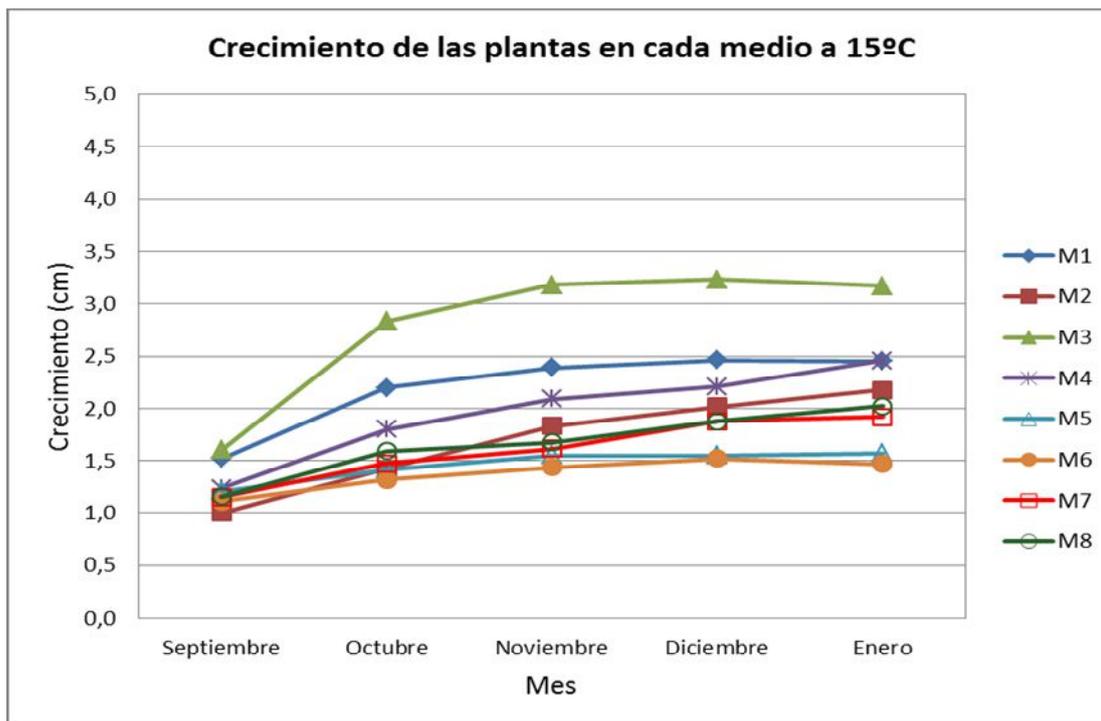


Fig nº 18. Crecimiento medio de las plantas a 15°C durante los 5 meses de estudio, en cada medio de cultivo.

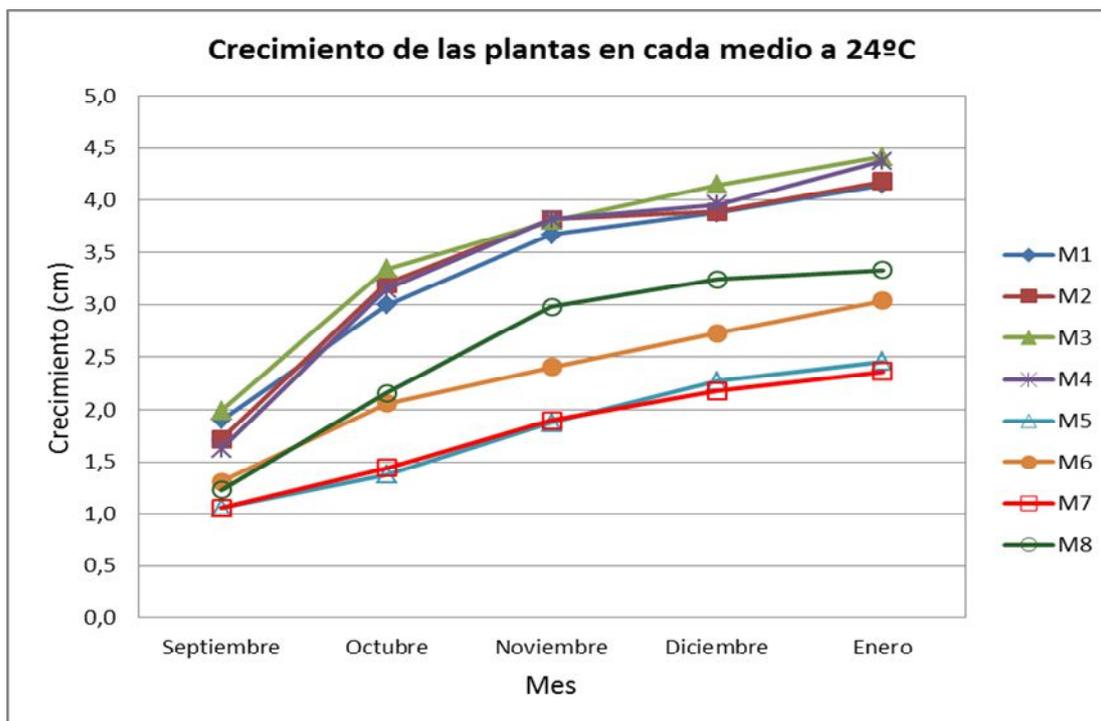


Fig. nº 19. Crecimiento medio de las plantas a 24°C durante los 5 meses de estudio, en cada medio de cultivo.

Como puede verse, el descenso de la temperatura provoca la ralentización del crecimiento de las plantas. Es, por tanto, a 15°C y en los medios donde la concentración de nutrientes se reduce a la mitad donde el crecimiento es menor.

La diferencia en el desarrollo del material vegetal en función de la temperatura y el medio en el que se encuentre, puede verse claramente también a través de observar la altura media al principio y al final del experimento:

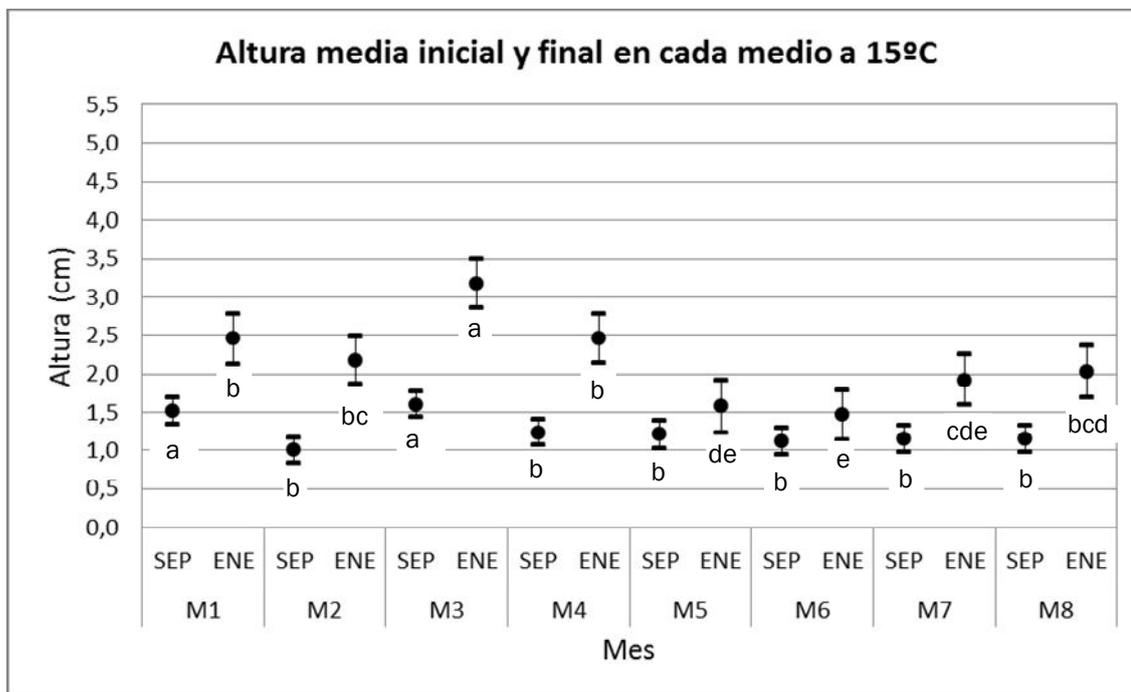


Fig. nº 20. Altura media en la primera y última medición en cada medio de cultivo a 15°C. Se comparan por un lado las alturas de septiembre y por otro las de enero.

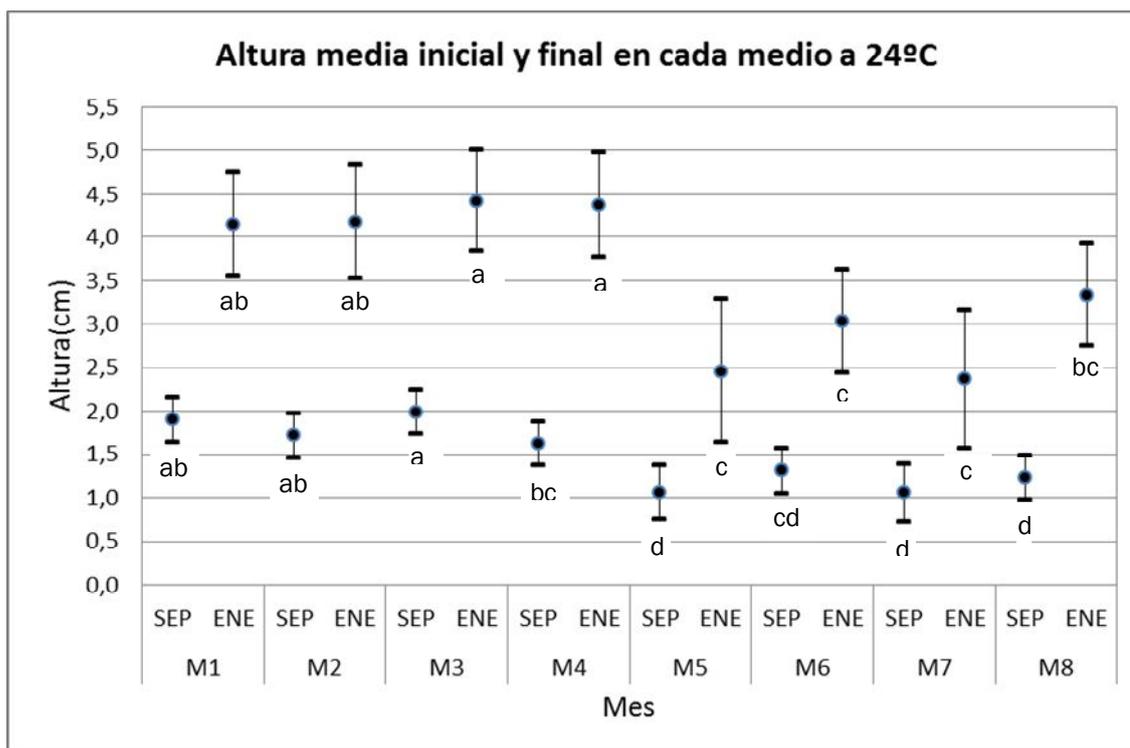


Fig. nº 21. Altura media en la primera y última medición en cada medio de cultivo a 24°C. Se comparan por un lado las alturas de septiembre y por otro las de enero.

A 24°C las diferencias se hacen muy evidentes, observándose dos grupos claramente diferenciados, dentro de los cuales no existen diferencias significativas. Sí que hay diferencias significativas entre ellos: las plantas alcanzan una altura media mucho mayor en enero en los medios de cultivo 1, 2, 3 y 4 (que tienen la concentración de nutrientes al 100%) que en los medios 5, 6 y 7 (cuya concentración de nutrientes está al 50%), siendo el medio 8 un medio intermedio entre estos dos grupos puesto que no es significativamente diferente a los medios 1 y 2.

A 15°C no se observa esta diferenciación entre dos grupos significativamente distintos uno de otro: la altura media en el medio 3 (que tiene la máxima concentración de nutrientes, adenina y sacarosa) es superior a la del resto de medios. Además, no existen diferencias significativas entre el medio 8 y los medios 1, 2 y 4, ni entre el medio 7 y el medio 2.

- Evaluación de los factores significativos en cada cámara.

Siguiendo la información extraída de las tablas Anova de cada cámara (tablas nº 13 y nº 14 de los Anejos), los factores que causan diferencias significativas en el crecimiento son:

A 15°C: las interacciones nutrientes*mes, adenina*mes, sacarosa*mes y nutrientes*sacarosa*mes.

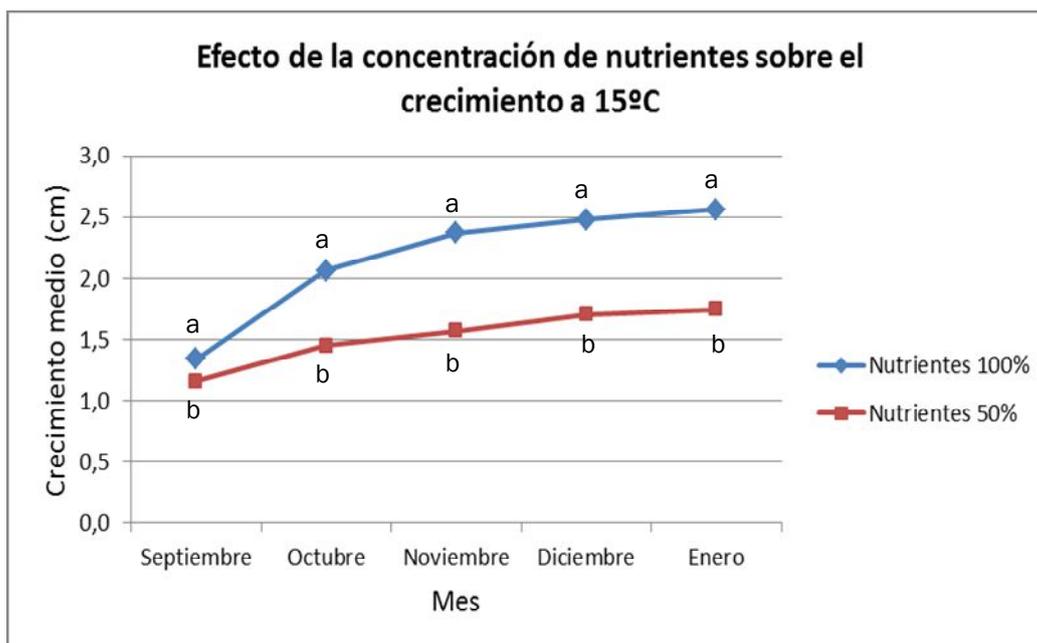


Fig. nº 22. Crecimiento medio en función de la concentración de nutrientes a 15°C. Se comparan las dos series entre si.

El crecimiento medio de las plantas a 15°C es significativamente superior en aquellos medios que contienen los nutrientes al 100%, y esta diferencia respecto a los que la concentración de nutrientes esta al 50% se incrementa a medida que avanzan los meses.

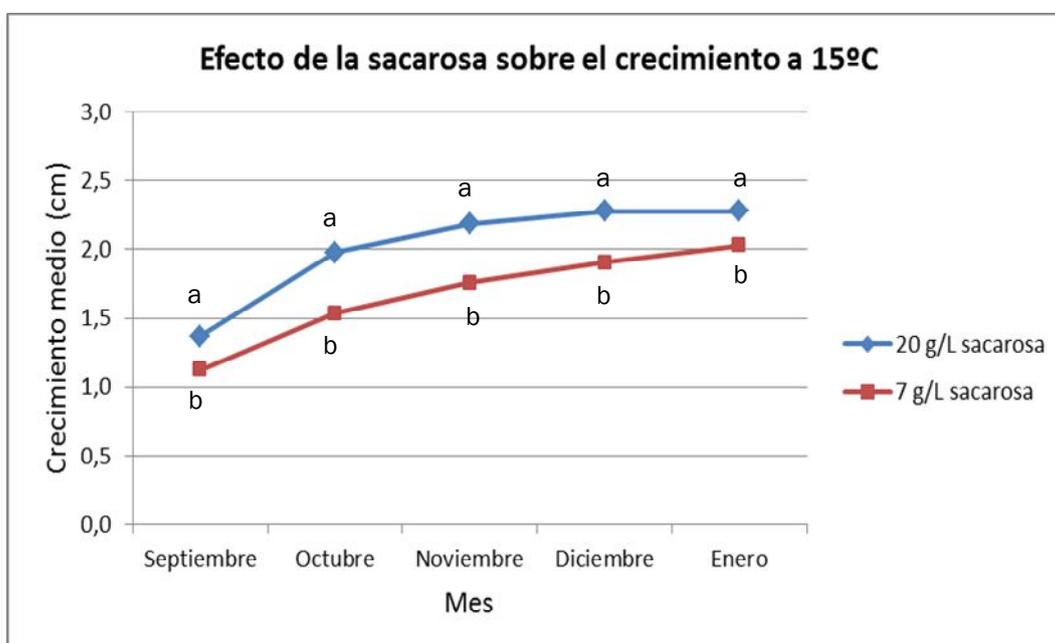


Fig. nº 23. Crecimiento medio en función de la cantidad de sacarosa a 15°C. Se comparan las dos series entre si.

Evaluando el crecimiento medio a 15°C en función de la cantidad de sacarosa, vemos que las diferencias entre los medios con 20 g/L y los medios con 7 g/L son sólo significativas en octubre y noviembre.

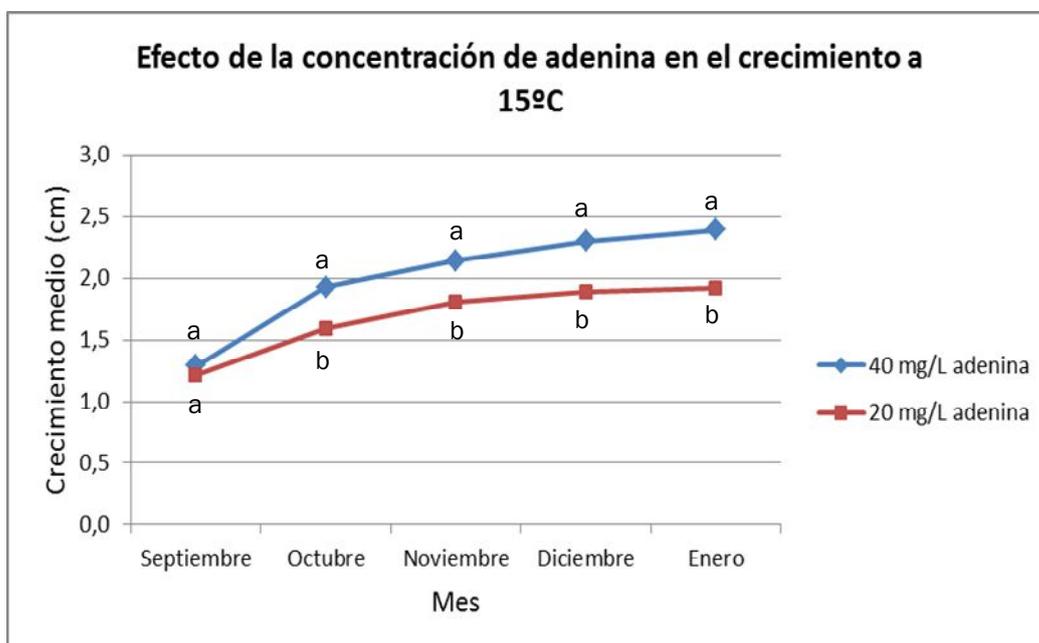


Fig. nº 24. Crecimiento medio en función de la concentración de adenina a 15°C. Se comparan las dos series entre si.

En esta gráfica se puede ver cómo en el primer mes no existen diferencias significativas entre los medios que contienen una u otra concentración de sacarosa, sin embargo, a partir del segundo mes las diferencias van haciéndose cada vez mayores, de manera que se logra un crecimiento significativamente superior en los medios que contienen 40 mg/L de adenina.

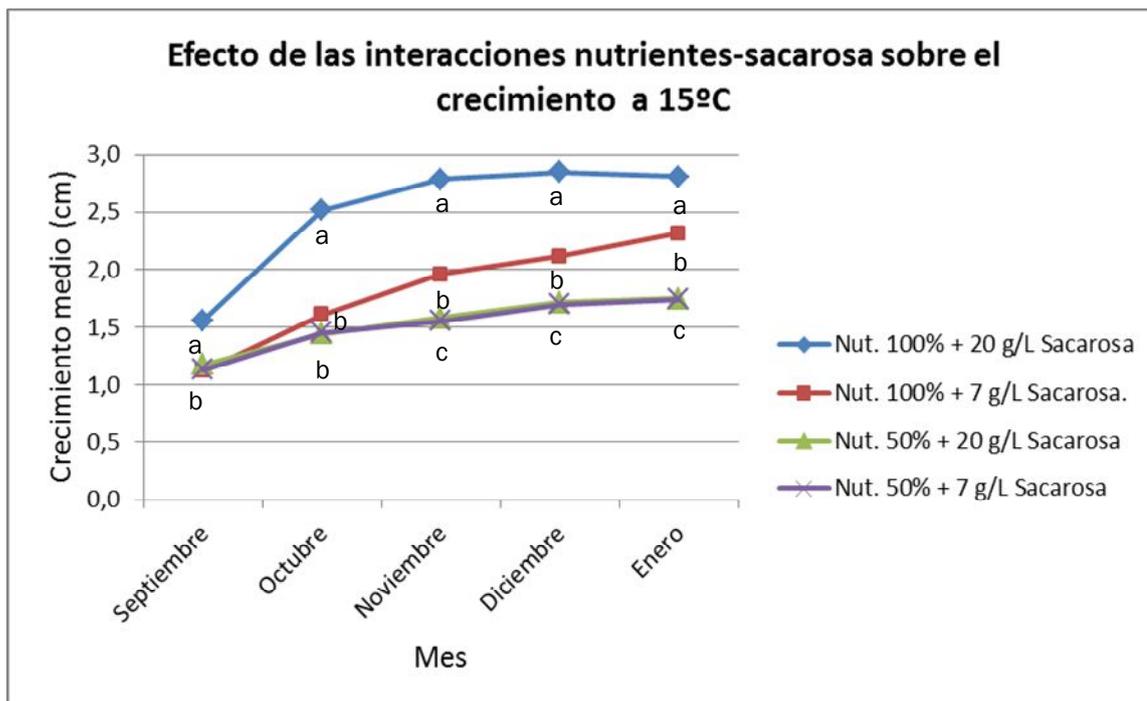


Fig. nº 25. Crecimiento medio en función de las combinaciones de nutrientes y sacarosa. Se comparan las series unas con otras.

Como se ve en la figura nº 25, el crecimiento medio en los medios con una concentración de nutrientes al 50% es el mismo independientemente de la cantidad de sacarosa. Sin embargo, en los medios en los que la concentración de nutrientes está al 100%, el crecimiento es significativamente mayor si empleamos 20 g/L de sacarosa a si usamos 7 g/L.

A 24°C: las interacciones nutrientes*mes, sacarosa*mes y nutrientes*sacarosa.

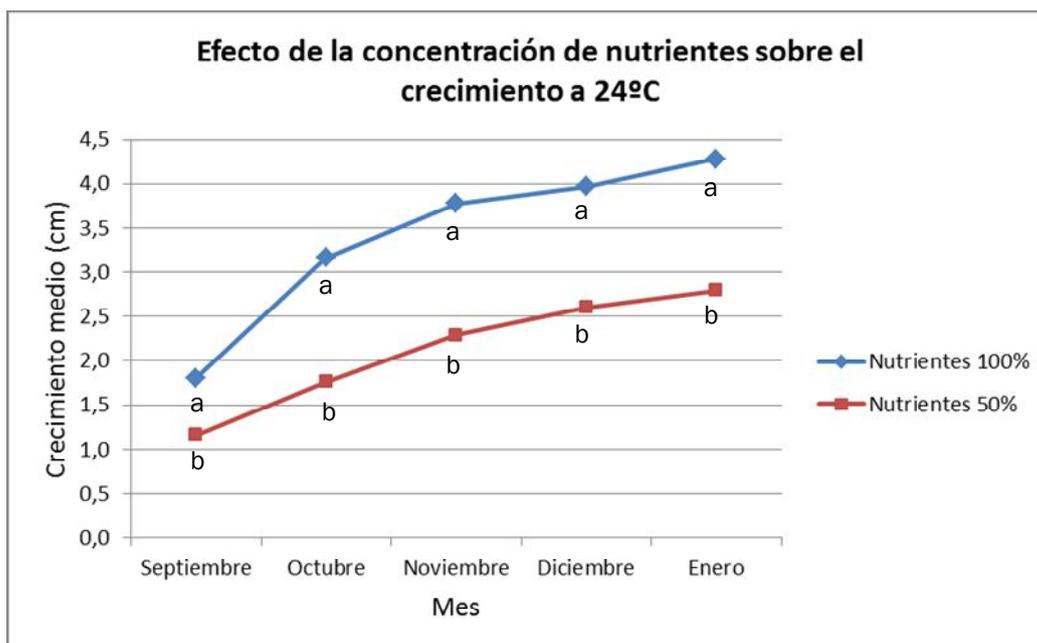


Fig. nº 26. Crecimiento medio en función de la concentración de nutrientes a 24°C. Se comparan las dos series entre si.

En la figura nº 26 se puede ver como el crecimiento de los explantos es significativamente mayor en los medios con la concentración de nutrientes al 100%, y esta diferencia respecto a los medios que contienen los nutrientes al 50% se mantiene constante a lo largo de todo el ensayo.

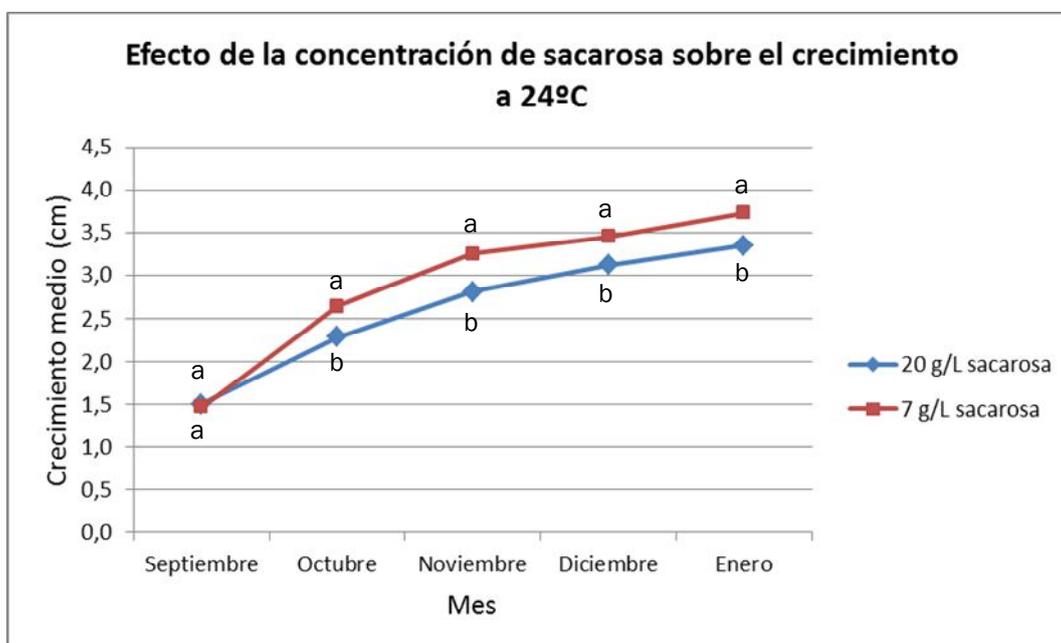


Fig. nº 27. Crecimiento medio en función de la de la concentración de sacarosa a 24°C. Se comparan las dos series entre si.

En la Fig. nº 27 se aprecia un menor crecimiento de las plantas en aquellos medios que contienen 20 g/L de sacarosa a partir de octubre. La diferencia entre las dos series se mantiene constante a lo largo del tiempo.

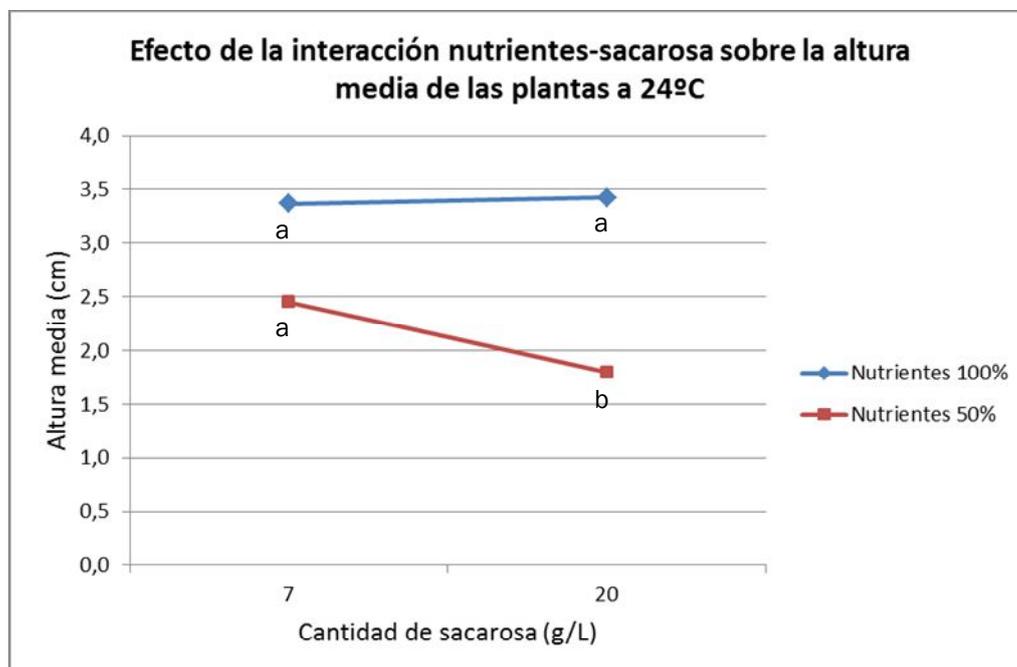


Fig. nº 28. Altura media de las plantas en función de la combinación de nutrientes y sacarosa a 24°C. Se compara el primer valor de cada serie con el segundo.

Como puede verse, en los medios con una concentración de nutrientes al 100%, la cantidad de sacarosa no influye en el crecimiento medio. Sin embargo, en los medios en los que los nutrientes están al 50%, el crecimiento medio es significativamente superior empleando 7 g/L de sacarosa en lugar de 20 g/L.

- Crecimiento de las plantas de la cámara a 4°C.

Estas plantas se mantuvieron a 4°C hasta el mes de diciembre. Hasta esa fecha no se produjo desarrollo alguno en dichas plantas, por lo que se cambiaron a la cámara a 15°C el día 1 de diciembre. Los resultados del cambio fueron positivos ya que las plantas comenzaron a desarrollarse, y se tomaron datos de su crecimiento en el mes de diciembre (el día 11) y en enero (el día 12). El estado de las plantas en cuanto a proliferación de tallos y de hojas puede verse en las siguientes gráficas (en estas dos primeras mediciones no se observó ninguna raíz).

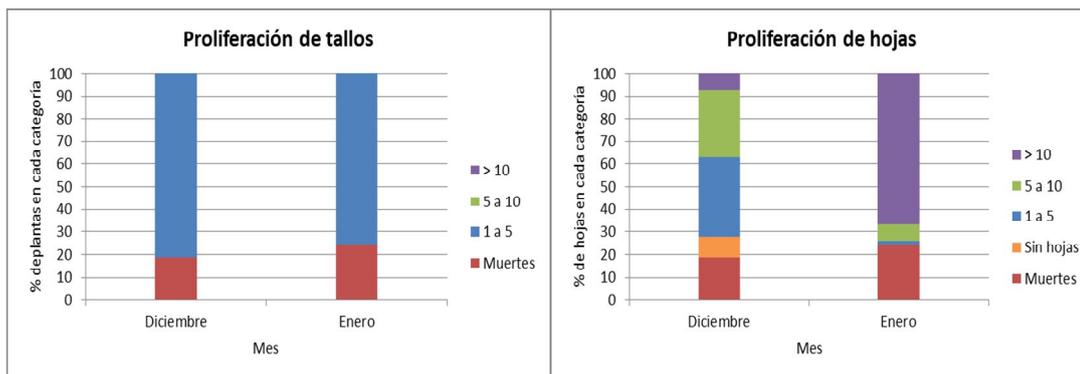


Fig. nº 29. Porcentaje de proliferación de tallos y hojas tras un mes de haber cambiado los botes de 4°C a 15°C.

Éste es uno de los aspectos más interesantes del presente estudio, puesto que lo que se busca es la conservación del material vegetal durante el mayor tiempo posible, para lo cual resulta muy útil conocer que tras 4 meses y 10 días de estancia de las plantas a 4°C sin observarse ningún desarrollo, una vez fueron cambiadas a 15°C, respondieron a la perfección, y con una proliferación de hojas más veloz que el de las plantas que se instalaron desde el inicio a 15°C.

5.3. VARIABLES CATEGÓRICAS.

Los resultados de las variables categóricas se han expuesto y evaluado a través de histogramas en los que se muestra la evolución de la proliferación de tallos, hojas y raíces, y mediante gráficas que reflejan la probabilidad de que las plantas estén en cada categoría de las contempladas para cada variable.

5.3.1. Número de tallos.

En los histogramas siguientes se muestra la proliferación media mensual de tallos en cada cámara.

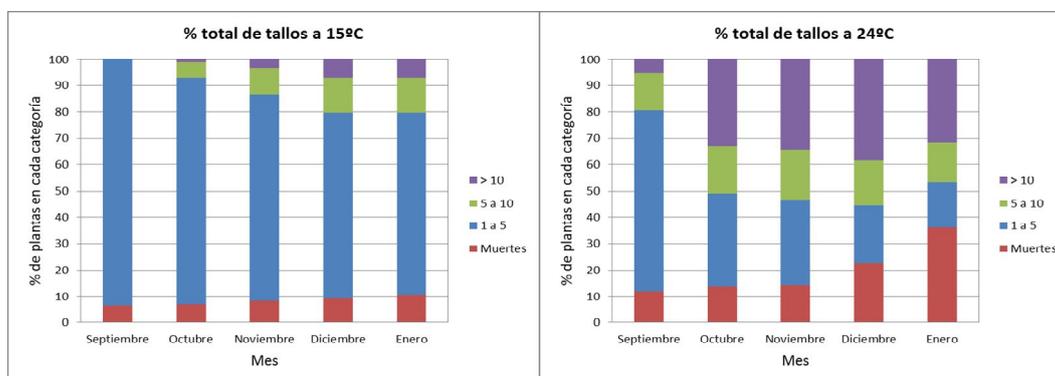


Fig. nº 30. Proliferación media de tallos en cada cámara a lo largo del ensayo.

Como puede apreciarse, las diferencias entre las dos cámaras son evidentes: a 15°C, hasta el mes de octubre no comienzan a aparecer plantas con más de 5 tallos, y sólo un 20,37% de las plantas superan los 5 tallos al final del experimento y un 6,94% los 10 tallos. A 24°C, en septiembre ya hay plantas con más de 5 y de 10 tallos, alcanzándose un máximo de las mismas en diciembre, con un 55,56% de plantas con más de 5 tallos y un 38,43% con más de 10.

En las Figuras nº 31 y nº 32, se muestra qué porcentaje de plantas se encuentran en cada rango de número de tallos que se ha establecido. Como era de esperar, la proliferación es mucho menor a 15°C que a 24°C.

A 15°C, los medios que presentan una mayor proliferación de tallos son el 1 y el 3, que tienen las sales al 100% y 20 g/L de sacarosa. A éstos les sigue el 2 (100% de sales + 20 mg/L de adenina + 7 g/L de sacarosa) con un 33% de plantas con más de 5 tallos. Tras estos tres medios, los siguientes con más número de tallos serían el 4 y el 8, que comparten los 7 g/L de sacarosa y los 40 mg/L de adenina. Finalmente los que menos tallos desarrollan son los medios 5, 6 y 7.

A 24°C los medios que presentan una menor proliferación son el 5 y el 7, sin embargo la mortalidad es muy elevada (desde el 40% al inicio del ensayo hasta el 60% al final), el desarrollo de las plantas es muy pobre y en general no presentaban un buen estado. En el resto de medios, la mortalidad comenzaba a incrementarse en el mes de diciembre y se hacía más acusada en enero. Hacia el final del experimento los medios podrían dividirse en tres grupos: los medios 2 y 4 (sales al 100% y 7 g/L de azúcar) tienen abundante proliferación pero la mortalidad en el último mes es elevada. En los medios 8 y 3 (40 mg/L de adenina) la mitad de las plantas tienen entre 5 y 10 tallos y la otra mitad más de 10 tallos, por lo que la proliferación es considerable y la mortalidad se reduce respecto a los dos anteriores. Por último, los medios 1 y 6 (20 mg/L de adenina) tienen un mayor porcentaje de plantas que presentan entre 1 y 5 tallos, por tanto la proliferación en estos es inferior a los medios 3 y 8, y la mortalidad es similar.

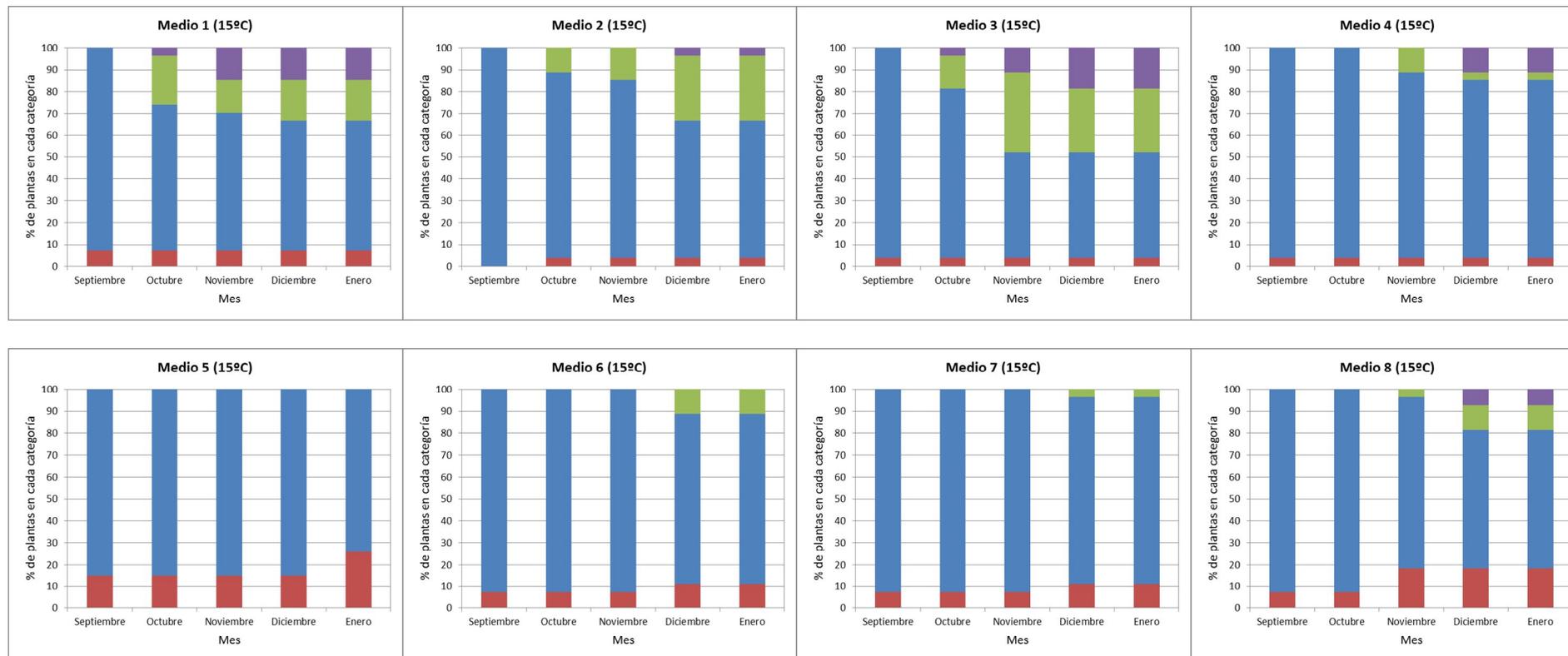
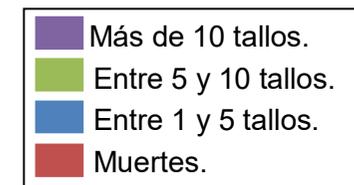


Fig. nº 31. Porcentaje de proliferación de tallos en cada medio de cultivo en cada mes a 15°C.



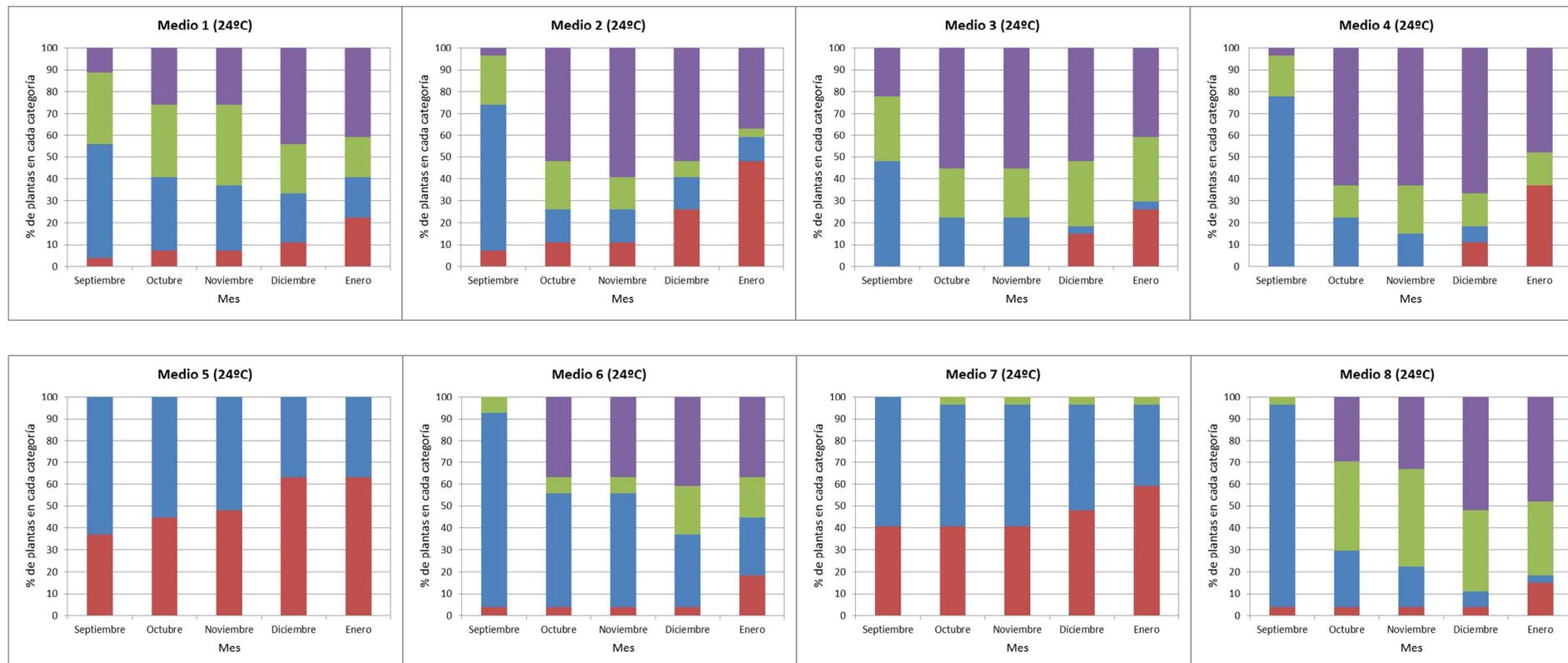


Fig. nº 32. Porcentaje de proliferación de tallos en cada medio de cultivo en cada mes a 24°C.



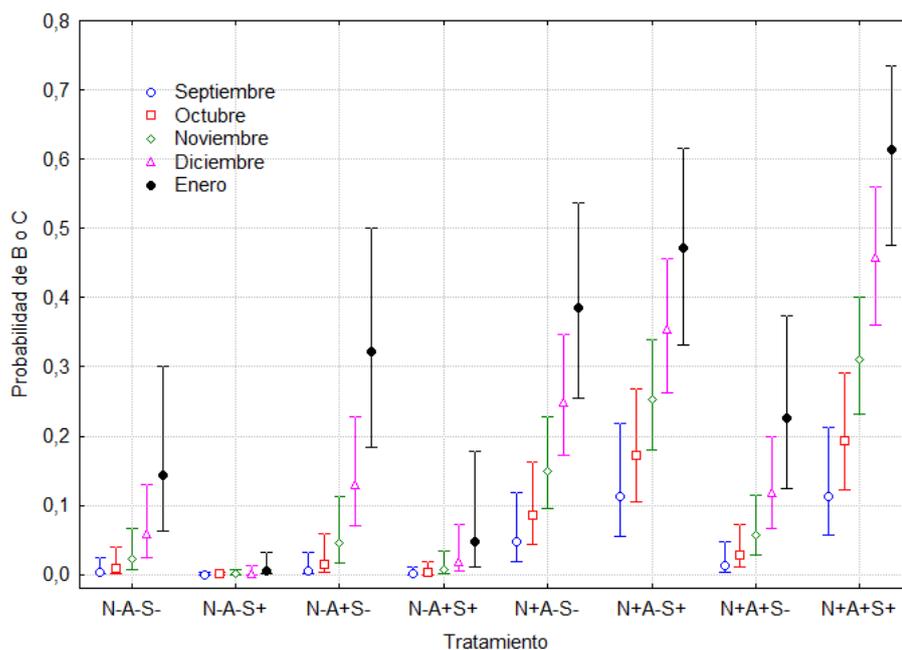


Fig. nº 33. Probabilidad de que las plantas tengan más de 5 tallos a 15°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S- = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

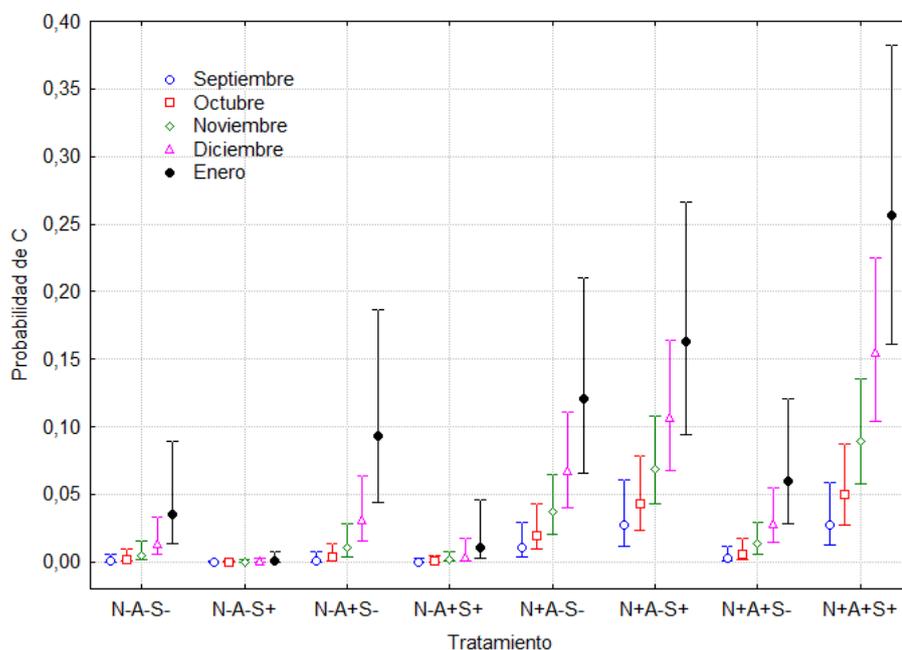


Fig. nº 34. Probabilidad de que las plantas tengan más de 10 tallos a 15°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S- = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

Se aprecia una correspondencia entre la Fig. nº 33 y los histogramas anteriores: Los medios donde la proliferación de tallos es más precoz son el 3, el 2 y el 1, y es en éstos donde se alcanza el mayor número de tallos al final del experimento. Los medios en los que encontramos una menor probabilidad de encontrar muchos tallos al final del experimento son el 5, el 7, el 6 y el 4.

Los resultados mostrados en la Fig. nº 34 son similares a los de la Fig. nº 33, por lo que la probabilidad de encontrar más de 10 tallos se corresponde bastante con la de encontrar más de 5 tallos aunque reducida a la mitad: por tanto, los medios en los que la proliferación de tallos es más precoz son el medio 3 y el 1, y es donde más probabilidad hay de encontrar más de 10 tallos en enero. Por el contrario, los medios en los que encontrar más de 10 tallos es menos probable serían el 4, el 6, el 7 y el 5.

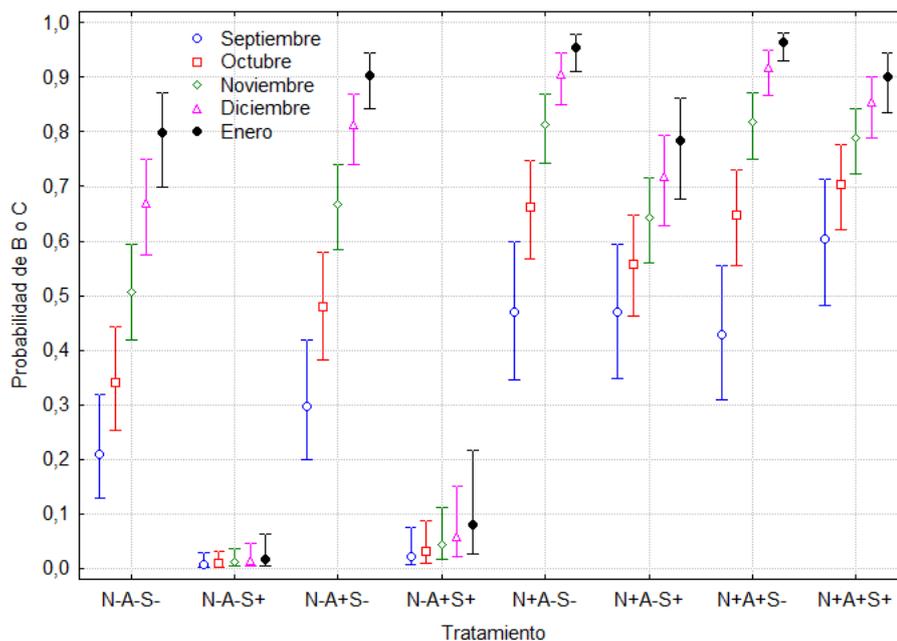


Fig. nº 35. Probabilidad de que las plantas tengan más de 5 tallos a 24°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S- = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

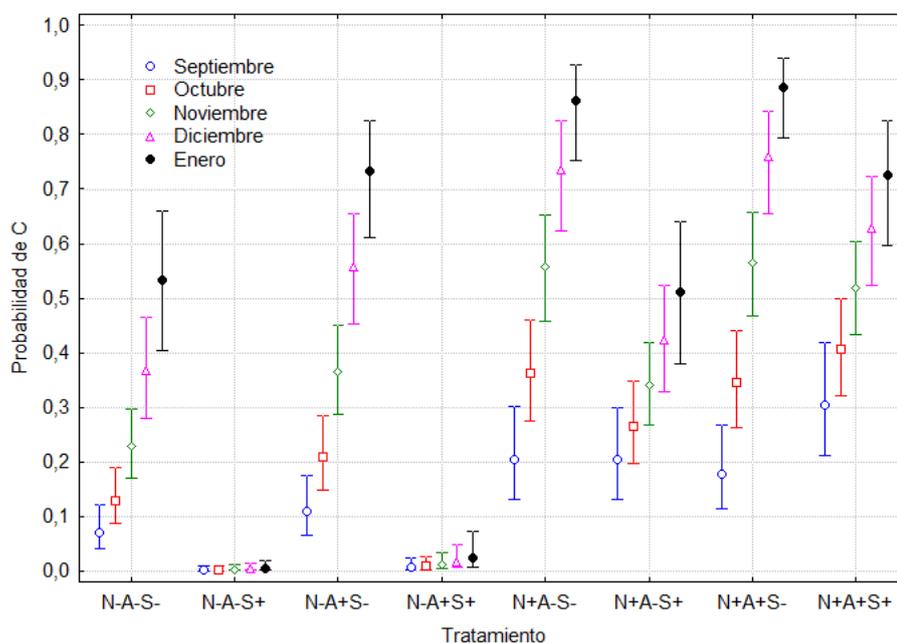


Fig. nº 36. Probabilidad de que las plantas tengan más de 5 tallos a 24°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S- = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

Al igual que en los histogramas, en la Fig. nº 35 se observa que, a 24°C los medios en los que la proliferación de tallos es más tardía son el 6 y el 8, y al final del experimento, la proliferación se iguala bastante, siendo ligeramente inferior en los medios 1 y 6.

Si se observa la probabilidad de encontrar más de 10 tallos, en esta ocasión también se corresponde con la probabilidad de encontrar más de 5: los medios en los que la proliferación es ligeramente más tardía son el 6 y el 8, y al final del experimento, los medios en los que la proliferación de tallos es menor son el 6 y el 1, y aquellos en los que la probabilidad de encontrar más de 10 tallos es mayor son los medios 2 y 4. Esto se corresponde con los resultados expuestos en los histogramas.

5.3.2. Número de hojas.

La siguiente figura muestra la proliferación mensual de hojas en cada temperatura.

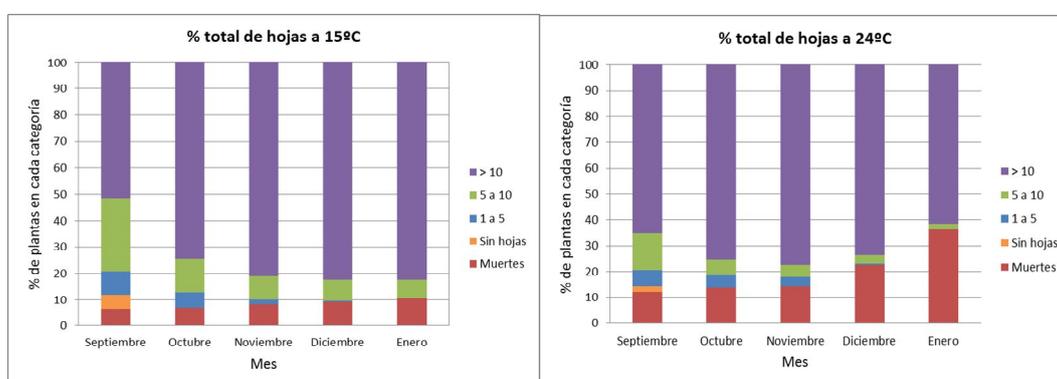


Fig. nº 37. Proliferación media de hojas en cada cámara a lo largo del ensayo.

En este caso, la diferencia entre las dos cámaras no es tan grande en cuanto a la proliferación de hojas, si bien, por lo general las hojas alcanzaron un tamaño mayor más rápidamente a 24°C que a 15°C.

A 15°C, los medios 2, 4 (sales al 100% y 7 g/L de sacarosa) y 6 y 8 (sales al 50% y 7 g/L de sacarosa) son los que menor proliferación de hojas presentan en el primer mes y alcanzan el máximo de hojas en noviembre, para mantenerse constante a partir de ahí, manteniendo un porcentaje de plantas con un número de hojas entre 5 y 10, es decir, sin alcanzar el rango superior de número de hojas. En cambio en los medios 1, 3 y 7, que tienen en común la cantidad de sacarosa (20 g/L), todas las plantas terminan por tener más de 10 hojas, si bien, en los medios 1 y 3, esto se consigue en el mes de octubre, y en el medio 7 no se logra hasta el mes de diciembre (los medios 1 y 3 tienen las sales al 100% y el 7 al 50%).

A 24°C, en los medios 3, 4 y 8 casi todas las plantas presentan más de 10 hojas desde el primer mes de mediciones. En los medios 1, 2 y 6 la cantidad de hojas en el primer mes es ligeramente inferior (desde el 14% de plantas con menos de 10 hojas del medio 1 hasta el 33% del medio 6), sin embargo, a partir del segundo mes casi todas las plantas pasan a tener más de 10 hojas.

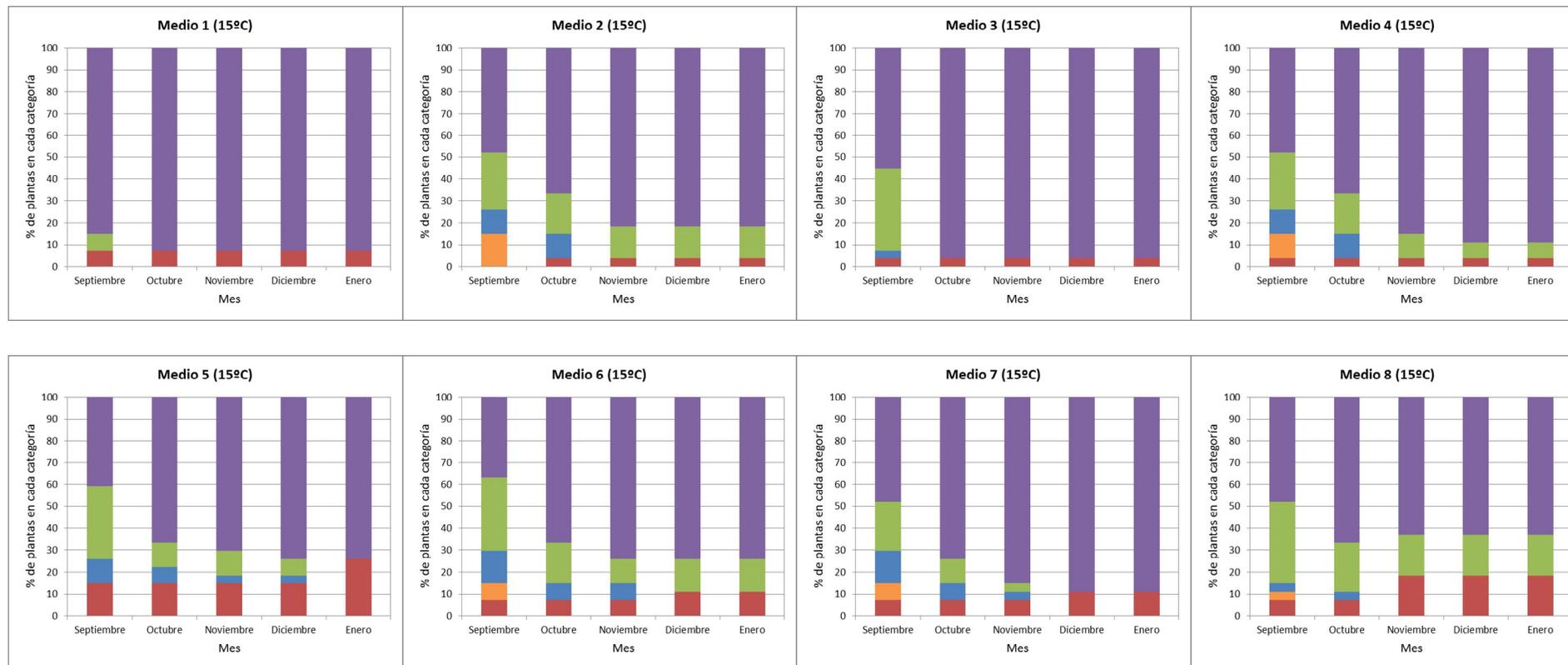


Fig. nº 38. Porcentaje de proliferación de hojas en cada medio de cultivo en cada mes a 15°C.



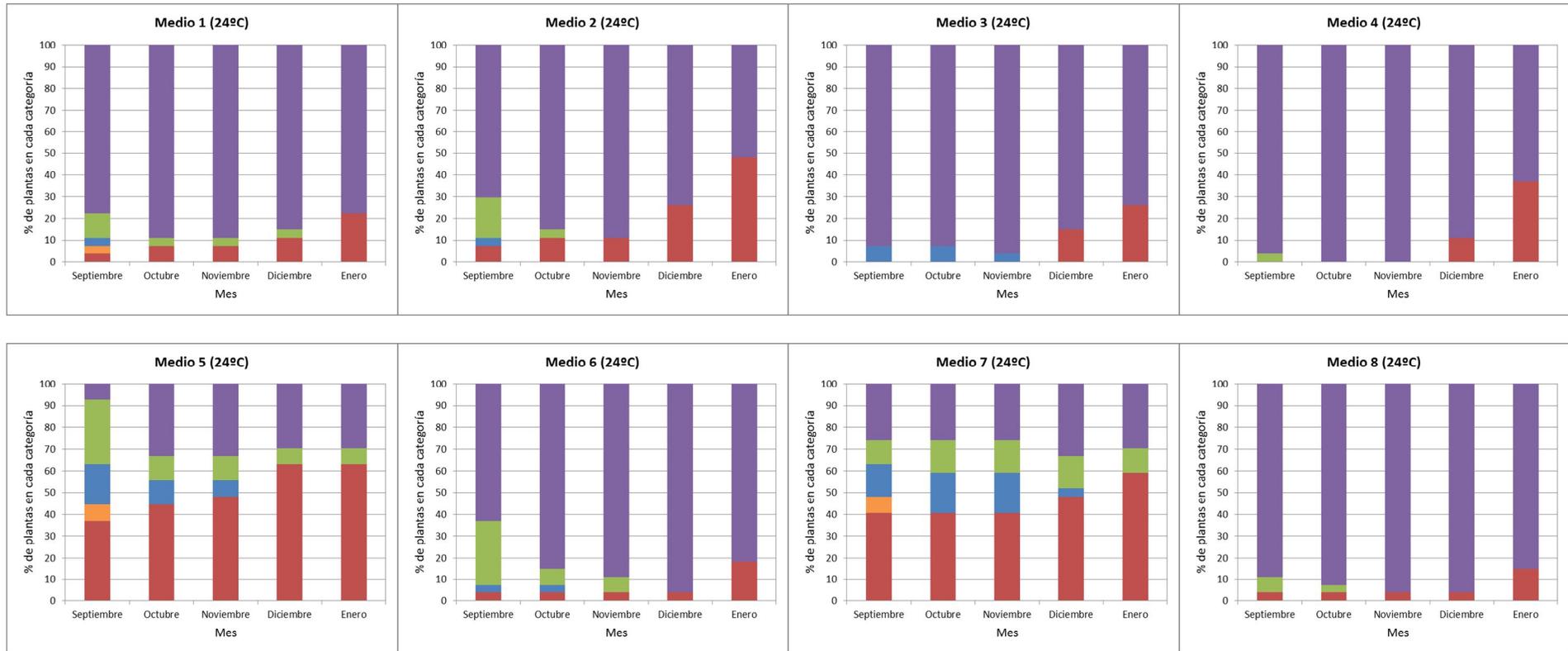


Fig. nº 39. Porcentaje de proliferación de hojas en cada medio de cultivo en cada mes a 24°C.



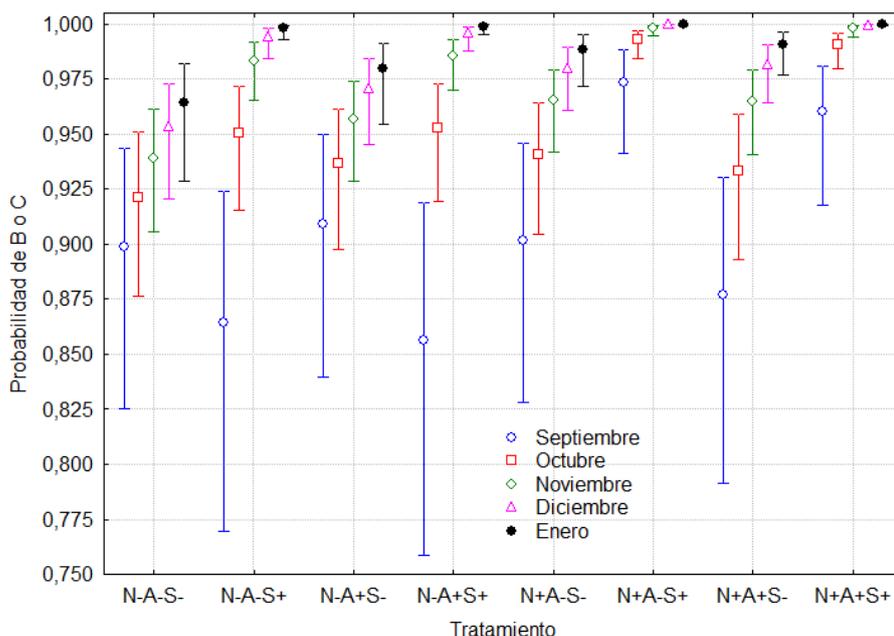


Fig. nº 40. Probabilidad de que las plantas tengan más de 5 hojas a 15°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S+ = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

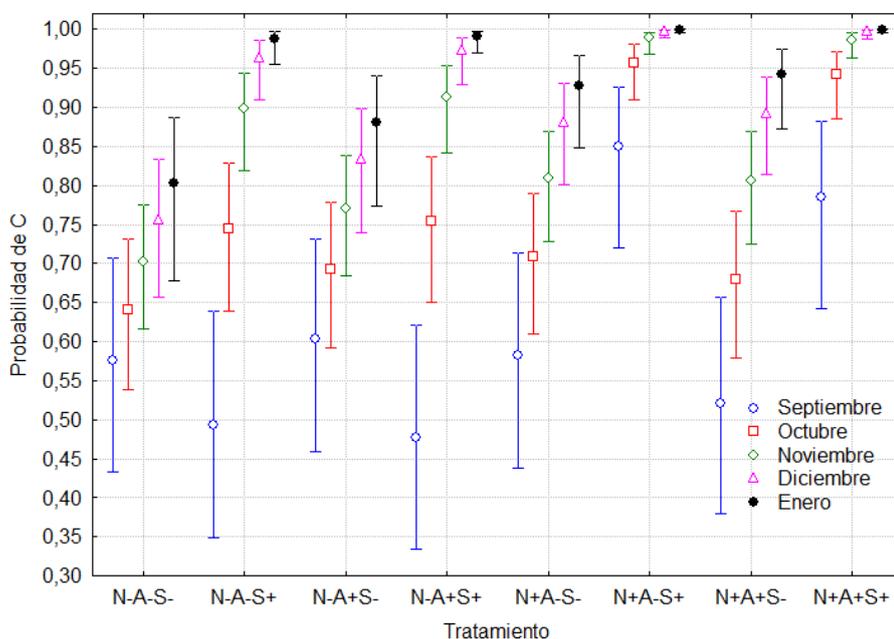


Fig. nº 41. Probabilidad de que las plantas tengan más de 10 hojas a 15°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S+ = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

En las figuras nº 40 y 41, se observa que los medios en los que la proliferación de hojas es más precoz son el 1 y el 3, y es más tardía en los medios 6 y 8 (sales al 50% y 7 g/L de sacarosa), y 2 y 4 (sales al 100% y 7 g/L de sacarosa), que son además, los medios en los que permanece un porcentaje de plantas con menos de 10 hojas al final del ensayo (entre un 7% y un 18%). Hacia el final del experimento, la probabilidad de encontrar más de 5 hojas o más de 10 es prácticamente el 100% en los medios 1, 3, 5 y 7 (20 g/L de sacarosa), se reduce un poco en los medios 2 y 4 (nutrientes al 100% + 7 g de sacarosa), y la reducción es un poco mayor en los medios 6 y 8 (nutrientes al 50% + 7 g de sacarosa). Estos resultados se corresponden con los observados en los histogramas anteriores.

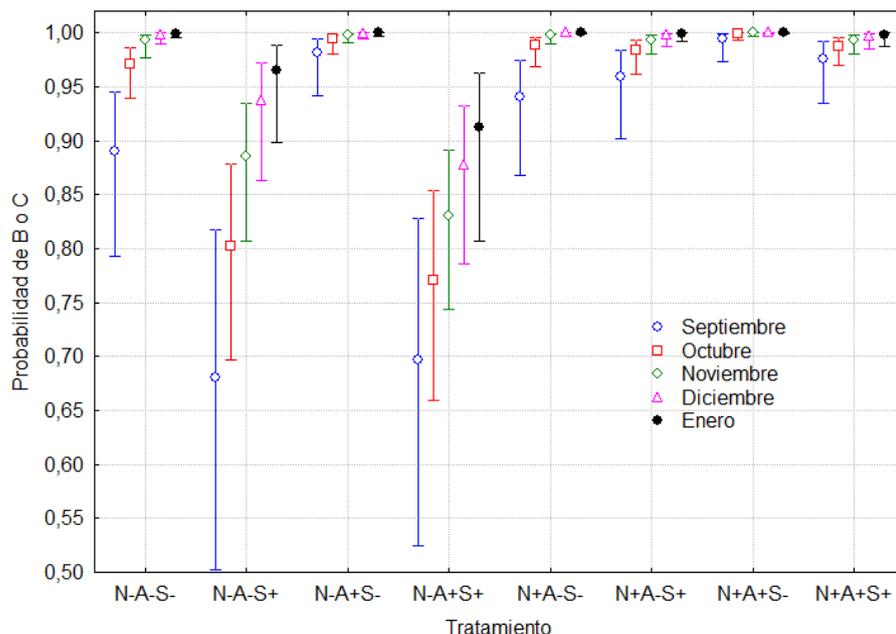


Fig. nº 42. Probabilidad de que las plantas tengan más de 5 hojas a 24°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S+ = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

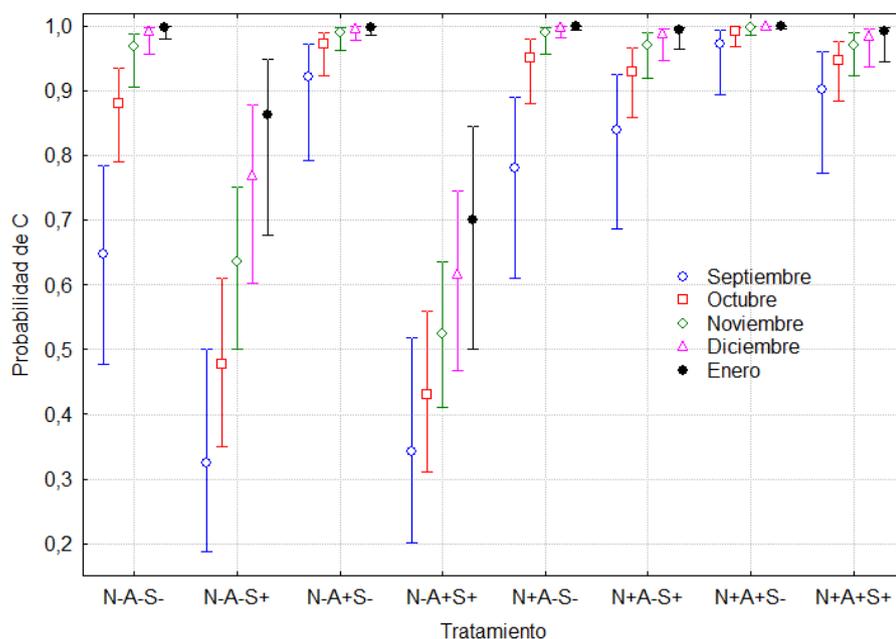


Fig. nº 43. Probabilidad de que las plantas tengan más de 10 hojas a 24°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S+ = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

Como puede verse, a 24°C apenas existen diferencias al final del experimento, salvo en los medios 5 y 7, pero como ya se ha comentado previamente, la mortalidad en estos dos medios es muy elevada. En cuanto a la precocidad de proliferación de hojas, el medio más tardío sería el medio 6, seguido por los medios 1 y 2. Al igual que en los casos anteriores, se intuye una correspondencia entre la información de estas gráficas y los histogramas que las preceden.

5.3.3. Tamaño de las raíces.

En la figura nº 44, se muestra el porcentaje de proliferación de raíces en las dos cámaras.

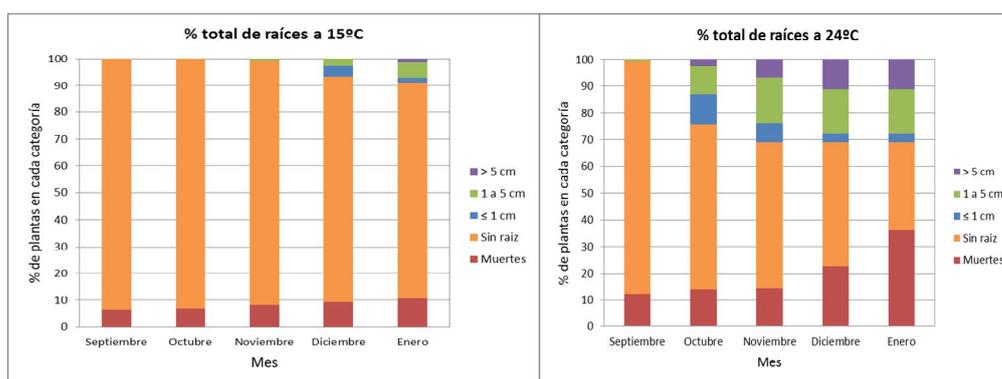


Fig nº 44. Proliferación media de raíces en cada cámara a lo largo del ensayo.

La diferencia entre las dos temperaturas es evidente: a 15°C, comienzan a surgir raíces en el mes de diciembre, mientras que a 24°C lo hacen ya en el mes de octubre. Es por esta razón por la que el análisis de la varianza se ha llevado a cabo por separado: a partir de diciembre a 15°C, y a partir de octubre a 24°C.

Al igual que con las dos variables anteriores, los resultados obtenidos de esta variable en cada medio se han reflejado también a través de histogramas, que son una forma muy intuitiva de apreciar la evolución de la proliferación de las raíces en cada medio en una cámara y en otra:

A 15°C la proliferación de raíces es prácticamente nula durante todo el experimento. En los medios 1 y 4 comienzan a surgir pequeñas raíces a partir del mes de noviembre y se mantienen en porcentajes muy bajos. Los medios 2, 5 y 7 comienzan a desarrollar raíces en diciembre, si bien son muy pocas las plantas que las presentan. El medio que presenta mayor número de plantas con raíz es el número 3 (medio con la máxima concentración de nutrientes, adenina y sacarosa), si bien solo son un 22% de las plantas. Por último, en el medio 6 (medio con la mínima concentración de nutrientes, adenina y sacarosa) no aparecen raíces durante todo el experimento.

A 24°C las raíces comienzan a surgir a partir del segundo mes en todos los medios. Los medios 2 y 8 presentan unos resultados similares en cuanto a la proliferación y desarrollo de las raíces, aunque en el medio 8, permanecen más plantas vivas durante más tiempo. La cantidad de plantas que desarrollan raíz en los medios 1, 3, 4 y 6 se

sitúa entre un 30% y 44%, la diferencia está en que el medio 1 alcanza el máximo de plantas con raíces > 5 cm en noviembre y los medios 3, 4 y 6 lo alcanzan en diciembre.

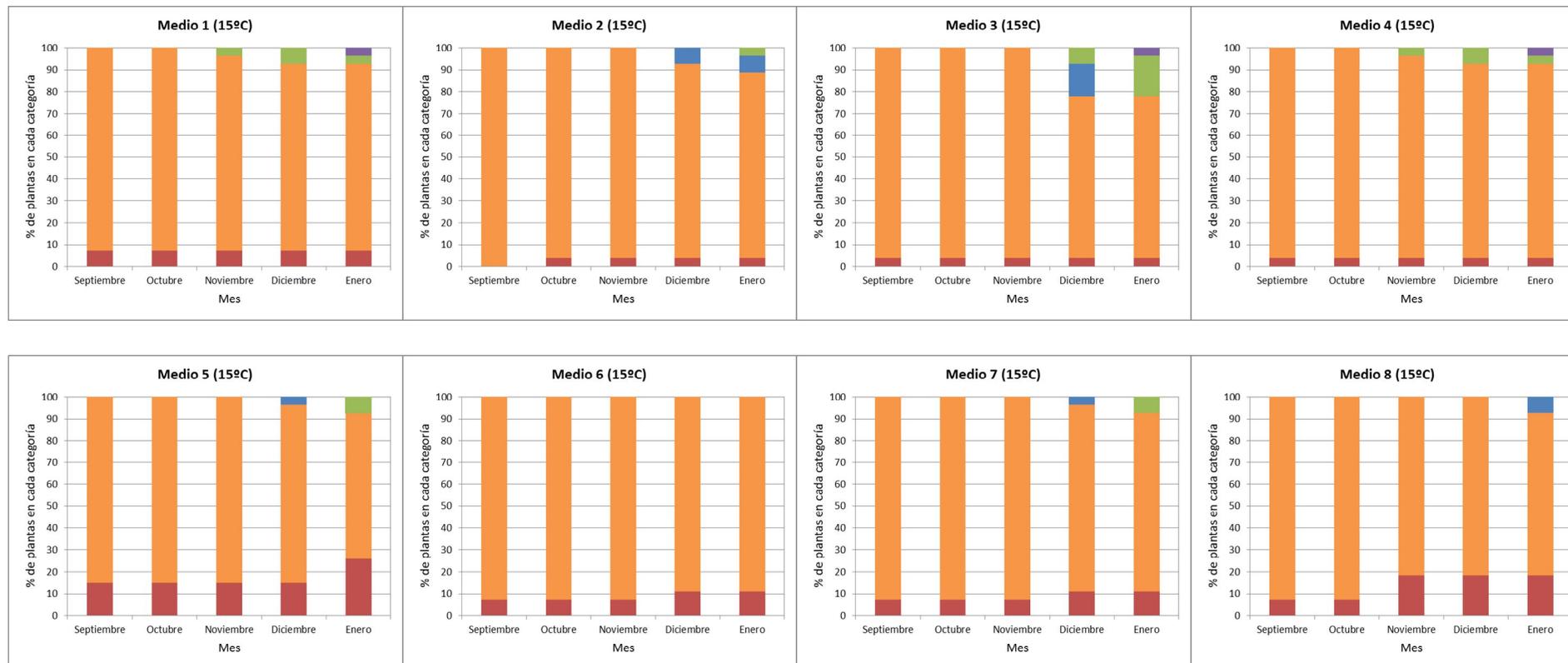


Fig. nº 45. Porcentaje de proliferación de raíces en cada medio de cultivo en cada mes a 15°C.



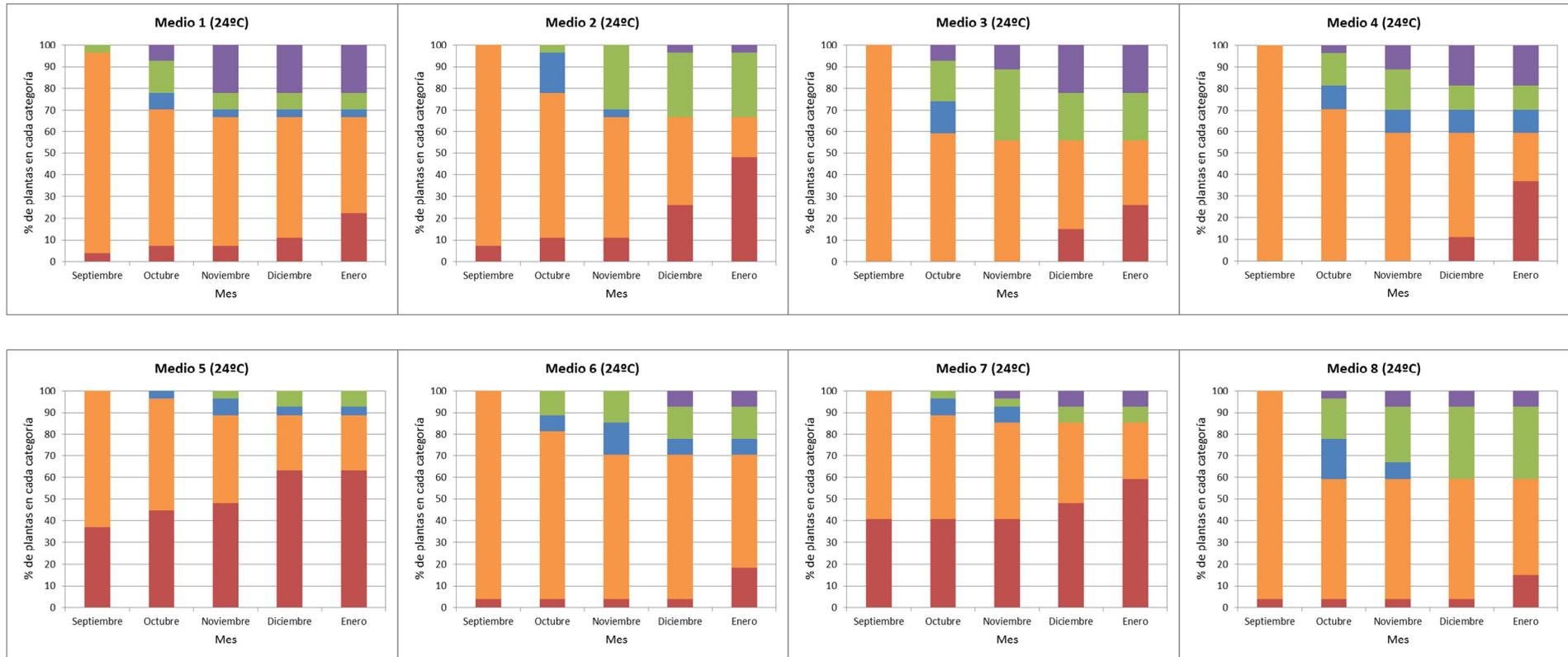


Fig. nº 46. Porcentaje de proliferación de raíces en cada medio de cultivo en cada mes a 24°C.



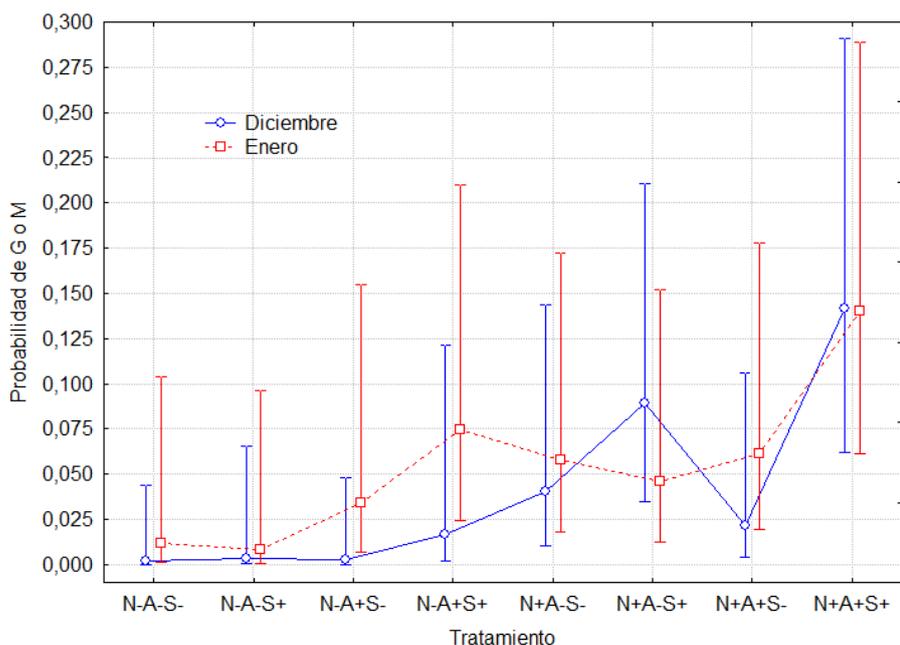


Fig. nº 47. Probabilidad de que las plantas tengan raíces de > 1 cm a 15°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S+ = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

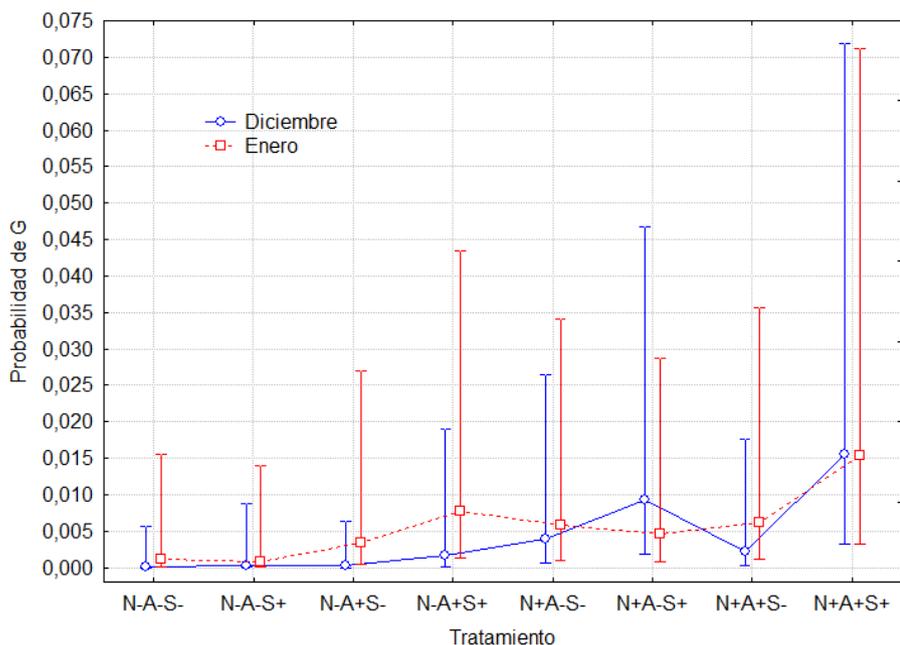


Fig. nº 48. Probabilidad de que las plantas tengan raíces de > 5 cm a 15°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S+ = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

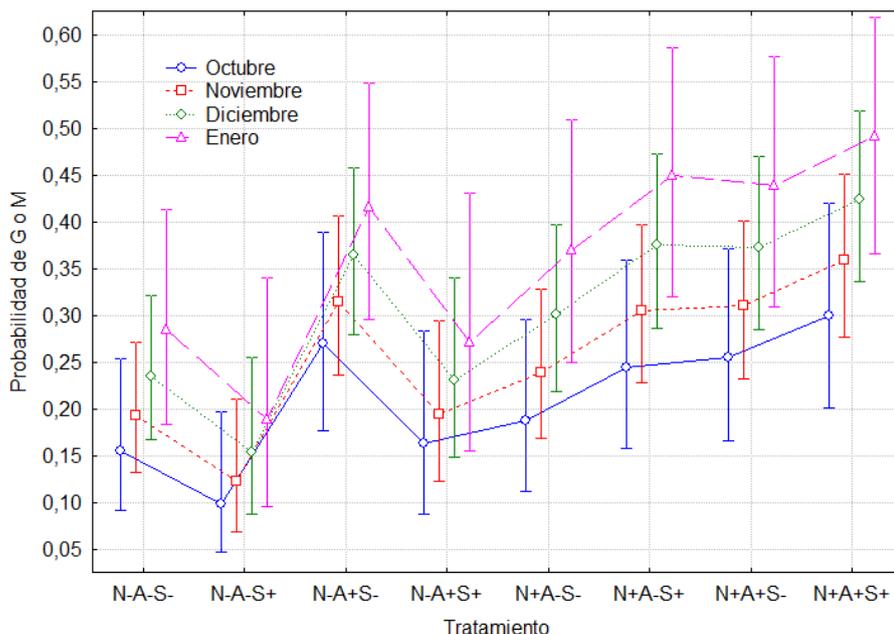


Fig. nº 49. Probabilidad de que las plantas tengan raíces de > 1 cm a 24°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S- = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

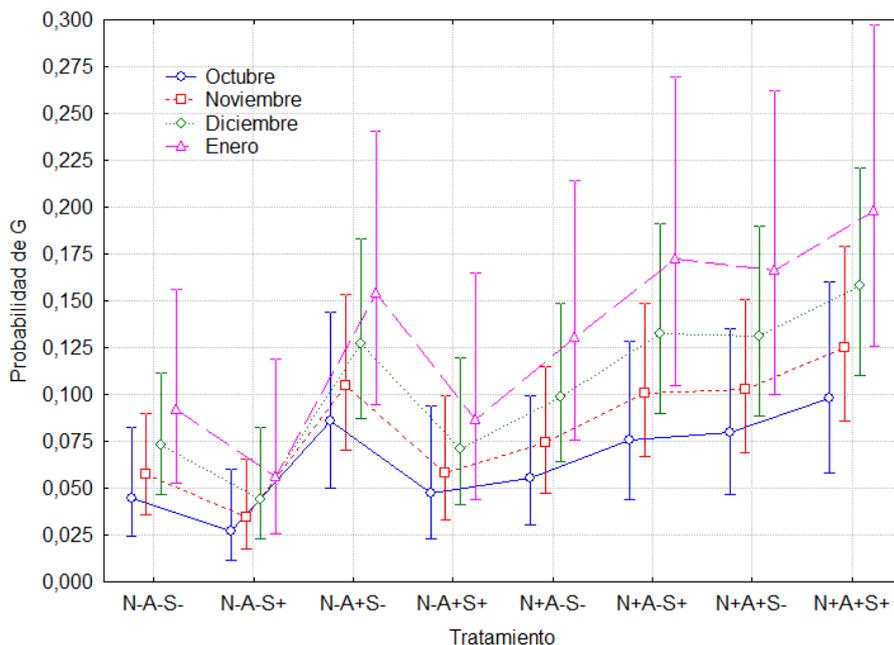


Fig. nº 50. Probabilidad de que las plantas tengan raíces de > 5 cm a 24°C en cada medio a lo largo del ensayo, donde los medios son: N-A-S- = medio 6; N-A-S+ = medio 5; N-A+S- = medio 8; N-A+S+ = medio 7; N+A-S+ = medio 2; N+A-S- = medio 1; N+A+S- = medio 4; N+A+S+ = medio 3.

A 15°C sólo aparecen raíces en los dos últimos meses del experimento, lo que se puede concluir es que los únicos medios en los que es probable encontrar raíces de > de 5 cm son el 3 y el 1.

En la figura nº 49 se observa que, los medios en los que existe una mayor probabilidad de encontrar raíces de más de 5 cm y donde además el enraizamiento es más temprano son el 3 por encima del resto, y a continuación de éste, el 1, el 4 y el 8. Y los mismos resultados se observan en la figura nº 50. De nuevo, estos resultados son los que se ven reflejados también en los histogramas precedentes.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN.

A continuación se evalúan los resultados obtenidos comparándolos con estudios precedentes.

- Supervivencia.

Si se analiza la supervivencia en función del medio sin separar las temperaturas, se puede ver que los medios en los que la supervivencia es significativamente inferior son el 5 y el 7, que tienen las sales al 50% y 20 g/L de sacarosa. A partir de ahí, lo más interesante sería ver lo que sucede en enero en cada cámara.

A 15°C la supervivencia es significativamente superior que a 24°C en los medios 2, 4, 5 y 7. El medio 5 es en el que menor número de plantas sobreviven, entre el resto de medios no existen diferencias significativas. Los medios que contienen los nutrientes al 100% (95% de plantas vivas en enero) conservan mejor el material vegetal que aquellos medios con los nutrientes al 50% (84% de plantas vivas en enero).

A 24°C, los medios que presentan una menor supervivencia al final del ensayo son el 2, el 4, el 5 y el 7; la supervivencia media en los medios 1, 3, 6 y 8 se sitúa entre un 74% y un 88%, de manera que no hay diferencias significativas entre ellos. En el inicio, la supervivencia en los medios con los nutrientes al 100% es significativamente superior respecto a los medios con los nutrientes al 50%, sin embargo, a partir de noviembre estas diferencias se reducen, hasta igualarse en enero. Se observa que, la combinación de los nutrientes al 50% junto con 20 g/L de sacarosa es la que peor conserva el material vegetal en el tiempo; en este caso, las combinaciones que mejores resultados dan son: nutrientes al 50% + 7 g/L de sacarosa (medios 6 y 8) y nutrientes al 100% + 20 g/L de sacarosa (medios 1 y 3). Por otro lado, la menor supervivencia en el bloque 1, respecto al 2 y al 3, induce a concluir que el incremento de la temperatura provoca un descenso de la supervivencia al final del ensayo, puesto que, como ya se ha explicado anteriormente, este bloque estaba junto a la pared y es posible que sus botes estuviesen a una temperatura ligeramente inferior.

Tokoporo et al (2013) mostraron que conservando las plantas de banano (*Musa spp*), aún siendo especie tropical, a 15°C mejoraba significativamente la supervivencia respecto a 22°C. Sin embargo, la reducción a la mitad de la concentración de los nutrientes del medio MS (Murashige & Skoog 1962) no ofreció resultados significativos; sí que se observó una marcada reducción en la supervivencia si la concentración de nutrientes se reducía a la cuarta parte.

El incremento de la supervivencia con la reducción de la temperatura también lo mostraron los resultados de Ahmed et al (2010), donde la mayor supervivencia de los 9 genotipos de peral en el medio MS suplementado con sacarosa y agar se dio a 5°C, y se fue reduciendo a medida que se incrementó la temperatura (supervivencia a 5°C > a 10°C > a 15°C > a 25°C). Además de este estudio, Ahmed et al (2010) evaluaron la conservación de los 9 genotipos de peral en función de la concentración de nutrientes y manitol (medio MS estándar, ½ MS, ¼ MS, MS estándar + 2,5% de manitol y medio MS

estándar + 3,5% de manitol), obteniendo la supervivencia máxima tras 12 meses en el medio MS estándar + 2,5% de manitol.

Sota et al (2014) mostraron que la conservación óptima de *Zizyphus jujuba* se dio en el medio MS estándar a 4°C (78,6%) seguido por el medio ½ MS con reguladores y sin sacarosa (63%) y del medio MS estándar sin reguladores y con 3% de sacarosa (12,6%). Además, Sota et al (2014) obtuvieron una mayor supervivencia de las plantas de *Prunus mahaleb* tras un período de conservación de 5 meses en el medio ½ MS sin sacarosa, con reguladores y agar (29,6% de plantas vivas) respecto al medio MS estándar con 3% de sacarosa y sin reguladores (0% de plantas vivas).

Bonnier et al (1997) resolvieron que la mayor supervivencia de plantas de 10 especies de *Lilium* L. tras 28 meses de conservación, se obtuvo en el medio ¼ MS con 9% de sacarosa, siendo el resto de medios: MS estándar + 6% de sacarosa, MS estándar + 9% de sacarosa y ¼ MS + 6% de sacarosa.

Bertrand-Desbrunais et al (1992) evaluaron la conservación de cafeto (*Coffea spp.*) en 4 condiciones: medio MS + 5 g/L de sacarosa (a 20°C ó 27°C) y medio MS + 20 g/L de sacarosa (a 20°C ó 27°C). Tras 6 meses, la máxima supervivencia se obtuvo en el medio MS + 20 g/L de sacarosa a 20°C.

✓ El efecto de la temperatura en los trabajos revisados, es que temperaturas más bajas prolongan la conservación del material vegetal, que es lo mismo que sucede en el presente estudio. En nuestro caso, las combinaciones nutrientes-sacarosa que conservan peor el material vegetal son, en este orden: nutrientes al 50% + 20 g/L de sacarosa y nutrientes al 100% + 7 g/L de sacarosa; al contrario sucede con las especies del género *Lilium* L., donde la mayor supervivencia a 25°C se dio en los medios que combinaban la menor concentración de nutrientes con la mayor concentración de sacarosa. En el caso de las especies *Zizyphus jujuba* y *Prunus mahaleb* la adición de sacarosa redujo la supervivencia, y lo contrario sucedió con los genotipos de *Coffea spp.* y *Pyrus spp.* donde los medios con mayor concentración de sacarosa o manitol conservaron mejor las plantas.

- Presencia de callo.

Respecto a la presencia de callo en las plantas, los únicos factores que provocan diferencias significativas son la concentración de nutrientes y de adenina sulfato a 15°C.

- Crecimiento.

En cuanto al crecimiento, por lo general se ve ralentizado al disminuir la temperatura y en aquellos medios en los que la concentración de nutrientes se reduce a la mitad.

A 15°C el medio 3 es en el que el crecimiento es significativamente superior al resto; los medios 5, 6 y 7 presentan un crecimiento medio menor que los medios 1, 2 y 4, y en el medio 8 el crecimiento es intermedio entre estos dos grupos. Si analizamos los ingredientes de los medios que se han variado por separado resulta que el menor crecimiento se obtiene con: los nutrientes al 50%; 7 g/L de sacarosa; 20 mg/L de adenina. Analizando la combinación nutrientes-sacarosa en el tiempo, el menor crecimiento se da con los nutrientes al 50%, siendo igual con 7 g/L o con 20 g/L de sacarosa; por el contrario, introduciendo los nutrientes al 100%, el crecimiento es significativamente superior con 20 g/L de sacarosa que con 7 g/L.

A 24°C se hace mucho más evidente la diferencia de crecimiento entre los medios en los que la concentración de sales está al 100% y en los que está al 50%, de manera que los medios 1, 2, 3 y 4 provocan un crecimiento significativamente mayor de las plantas con respecto a los medios 5, 6 y 7. Analizando la combinación nutrientes-sacarosa, con los nutrientes al 100% el crecimiento es igual combinándolo con 7 g/L o con 20 g/L de sacarosa; por el contrario, si los nutrientes están al 50%, el crecimiento es significativamente inferior con 20 g/L de sacarosa que con 7 g/L.

Al contrario que en el presente estudio, Martin et al (2007) encontraron que, los medios en los que los componentes (nutrientes, sacarosa y adenina) estaban concentrados a la mitad, las plantas crecían más.

Bertrand-Desbrunais et al (1992) evaluaron la conservación de cafeto (*Coffea spp.*) en 4 condiciones: medio MS + 5 g/L de sacarosa (a 20°C ó 27°C) y medio MS + 20 g/L de sacarosa (a 20°C ó 27°C). Tras 6 meses, el medio en el que el crecimiento se ralentizó más fue el medio MS + 5 g/L de sacarosa a 20°C.

Bonnier et al (1997) concluyeron que el menor crecimiento a 25°C de los genotipos de *Lilium* L. se obtuvo en el medio $\frac{1}{4}$ MS con 9% de sacarosa, siendo el resto de medios: MS estándar + 6% de sacarosa, MS estándar + 9% de sacarosa y $\frac{1}{4}$ MS + 6% de sacarosa.

✓ Por norma general, tanto en el presente estudio como en los trabajos revisados (salvo Martin et al, 2007) los resultados muestran una ralentización del crecimiento a temperaturas más bajas y con concentraciones menores de nutrientes y sacarosa. Otra similitud es que en este trabajo se observa un comportamiento similar al de las plantas de *Lilium* L.: a 24°C, el menor crecimiento se da empleando la menor concentración de nutrientes junto con la mayor de sacarosa.

- Número de tallos.

Al analizar la proliferación de tallos, lo primero que se observa es que al reducirse la temperatura, la proliferación de tallos es mucho menor.

A 15°C, los medios en los que la proliferación es más precoz y mayor al final del experimento son el 1 y el 3 (nutrientes al 100% + 20 g/L de sacarosa), seguidos por el medio 2 (nutrientes al 100% + 7 g/L de sacarosa). Los que menos proliferación presentan son los medios 5, 6 y 7 (nutrientes al 50%).

A 24°C los medios en los que la proliferación es menor son el 5 y el 7, sin embargo la mortalidad es muy elevada en ambos. La menor proliferación de tallos se da en el medio 6 (26% de plantas con menos de 5 tallos en enero) seguido del medio 1 (19% de plantas con menos de 5 tallos en enero). Los medios con mayor proliferación de tallos son el 2 y el 4 (nutrientes al 100% + 7 g/L de sacarosa).

- Número de hojas.

Si analizamos el número de hojas no existen grandes diferencias entre las dos temperaturas, ya que la mayoría de las plantas alcanzan rápidamente un número de hojas superior a 10.

La proliferación más rápida de hojas a 15°C se da en el medio 1, seguido por el medio 3 (ambos tiene 20 g/L de sacarosa y nutrientes al 100%); en ambos, todas las

plantas alcanzan un número de hojas superior a 10 en octubre. Los medios en los que la proliferación de hojas es más tardía son el 6 y el 8 (nutrientes al 50% + 7 g/L de sacarosa), y es además donde permanece un mayor porcentaje de plantas con menos de 10 hojas al final del experimento, seguidos por los medios 2 y 4 (nutrientes al 100% + 7 g/L de sacarosa).

A 24°C apenas existen diferencias entre los medios, ya que todos alcanzan rápidamente el número máximo de hojas. Los únicos en los que la proliferación de hojas se ralentiza son los medios 5 y 7, pero, como ya se ha dicho antes, tienen el inconveniente de que presentan una mortalidad elevada desde el inicio del experimento. La aparición de un número elevado de hojas es un poco más tardía en el medio 6.

- Número de raíces.

Respecto a la aparición de raíces, sí que existen diferencias entre las dos cámaras. A 15°C la cantidad de raíces es prácticamente nula hasta el mes de noviembre, y a partir de aquí se contabilizaron muy pocas raíces. A 24°C sin embargo, las raíces comienzan a surgir en octubre, llegándose a contabilizar un 30% de las plantas con raíz.

A 15°C, el medio donde aparece mayor cantidad de raíces es el medio 3 (máxima concentración de nutrientes, sacarosa y adenina), si bien sólo son un 18% de las plantas. Le sigue el medio 2 con un 11% de plantas con raíz en enero y los medios 4 y 8 con un 7,4%. El medio 6 es el único en el que no aparece ninguna raíz en todo el ensayo.

A 24°C los medios que alcanzan un tamaño de las raíces mayor son el 1, el 3 y el 4, donde el 20% de las plantas presentan raíces de más de 5 cm. En todos los medios comienzan a aparecer raíces en el mes de octubre, y el porcentaje máximo de plantas con raíces se sitúa entre un 30% y un 40% en todos los medios, salvo en los ya mencionados 5 y 7. Los medios en los que la proliferación es más temprana son el 1, 3, 4 y 8, y en el medio 6 es ligeramente más tardía.

Bertrand-Desbrunais et al. (1992), resolvieron que, los medios en los que la concentración de sacarosa era superior, el enraizamiento se incrementaba.

✓ Los resultados de estas tres últimas variables (número de tallos, hojas y raíces) presentan cierta correlación. La reducción de la temperatura provoca una proliferación de tallos, hojas y raíces más tardía. La concentración de nutrientes al 100% trae consigo una mayor proliferación, que en general se incrementa al combinarlos con 20 g/L de sacarosa. La combinación de las menores concentraciones de nutrientes, sacarosa y adenina es la que otorga una menor proliferación de las tres variables.

➤ Por último, cabe destacar que, en aquellos trabajos en los que el objetivo sea, no la conservación, sino la proliferación, el medio 3 puede ser una alternativa más interesante respecto al medio control ACM, puesto que a 24°C provoca un mayor crecimiento en las plantas y una proliferación de tallos más precoz.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES.

- ✓ Existen diferencias significativas entre el efecto de las dos temperaturas, 15°C y 24°C, para todas las variables respuesta analizadas. El material vegetal se conserva mejor a 15°C.
- ✓ Los medios 5 y 7 quedarían descartados como medios de conservación debido a la gran mortalidad que se observa en ellos desde el inicio del experimento a 24°C, y por el escaso vigor que mostraban gran número de plantas en estos medios a 15°C.
- ✓ Los medios 2 y 4 también quedarían descartados a 24°C debido al significativo descenso de la supervivencia en enero.
- ✓ El crecimiento tanto a 15°C como a 24°C es significativamente inferior en los medios 5, 6 y 7.
- ✓ El medio 3 no sería una buena opción para conservación debido a que es el medio que maximiza el crecimiento y la proliferación de tallos. Por otro lado, teniendo esto en cuenta, se puede proponer este medio como una mejor opción al medio control ACM, en el caso de que el objetivo sea la proliferación.
- ✓ El medio en el que la proliferación de tallos y hojas es más tardía, y en el que además las plantas presentan un menor número de tallos y hojas en enero es el medio 6. Es también, el único medio en el que a 15°C no aparecen raíces durante todo el experimento.
- ✓ La mejor opción, teniendo en cuenta los objetivos del presente trabajo, sería usar el medio 6 a 15°C. Tras él, las mejores opciones que se podrían elegir serían, por este orden, el medio 8, el 4 y el 2 a 15°C. El medio 6 es, además, el más económico.
- La opción más interesante que se ha puesto de manifiesto en este experimento para conservar el material vegetal, sería mantener las plantas a 4°C, temperatura a la que no experimentan ningún desarrollo, y posteriormente cambiarlas a 15°C. Determinar el medio de cultivo óptimo a esta temperatura y el máximo período en que podrían conservarse los explantos a esa temperatura requiere mayor investigación.

ANEJOS

8. ANEJOS.

8.1. TABLAS ANOVA.

A continuación se muestran las Tablas Anova que se han utilizado para interpretar los resultados del experimento.

8.1.1. Supervivencia.

Tabla nº 9. Tabla Anova para la supervivencia a 15°C.

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
BLOQUE	2	14	1.56	0.2444
Nutrientes	1	14	4.22	0.0591
Adenina	1	14	0.22	0.6427
Sacarosa	1	14	0.34	0.5715
MES	4	64	3.58	0.0107
Nutrientes*Adenina	1	14	0.00	0.9587
Nutrientes*Sacarosa	1	14	0.00	0.9587
Adenina*Sacarosa	1	14	1.73	0.2090
Nutrie*Adenin*Sacaro	1	14	0.47	0.5047
Nutrientes*MES	4	64	2.53	0.0487
Adenina*MES	4	64	0.53	0.7158
Sacarosa*MES	4	64	0.96	0.4349
Nutrient*Adenina*MES	4	64	0.96	0.4349
Nutrien*Sacarosa*MES	4	64	0.53	0.7158
Adenina*Sacarosa*MES	4	64	0.43	0.7847
Nutr*Adeni*Sacar*MES	4	64	0.56	0.6937

Tabla nº 10. Tabla Anova para la supervivencia a 24°C.

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
BLOQUE	2	14	7.62	0.0058
Nutrientes	1	14	15.04	0.0017
Adenina	1	14	1.29	0.2754
Sacarosa	1	14	20.62	0.0005
MES	4	64	23.64	<.0001
Nutrientes*Adenina	1	14	0.04	0.8526
Nutrientes*Sacarosa	1	14	41.38	<.0001
Adenina*Sacarosa	1	14	0.08	0.7807
Nutrie*Adenin*Sacaro	1	14	0.72	0.4089
Nutrientes*MES	4	64	3.00	0.0246

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Adenina*MES	4	64	1.04	0.3933
Sacarosa*MES	4	64	1.09	0.3670
Nutrient*Adenina*MES	4	64	0.67	0.6140
Nutrien*Sacarosa*MES	4	64	2.84	0.0312
Adenina*Sacarosa*MES	4	64	0.52	0.7179
Nutr*Adeni*Sacar*MES	4	64	1.32	0.2738

8.1.2. Presencia de callo.

Tabla nº 11. Tabla Anova para la presencia de callo a 15°C.

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
BLOQUE	2	14	3.47	0.0598
Nutrientes	1	14	0.92	0.3532
Adenina	1	14	1.18	0.2948
Sacarosa	1	14	0.02	0.8966
MES	4	64	6.43	0.0002
Nutrientes*Adenina	1	14	1.75	0.2072
Nutrientes*Sacarosa	1	14	4.06	0.0636
Adenina*Sacarosa	1	14	1.36	0.2629
Nutrie*Adenin*Sacaro	1	14	0.00	0.9661
Nutrientes*MES	4	64	11.50	<.0001
Adenina*MES	4	64	4.17	0.0046
Sacarosa*MES	4	64	4.31	0.0038
Nutrient*Adenina*MES	4	64	1.53	0.2046
Nutrien*Sacarosa*MES	4	64	0.77	0.5461
Adenina*Sacarosa*MES	4	64	3.83	0.0075
Nutr*Adeni*Sacar*MES	4	64	7.05	<.0001

Tabla nº 12. Tabla Anova para la presencia de callo a 24°C.

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
BLOQUE	2	14	8.84	0.0033
Nutrientes	1	14	1.85	0.1948
Adenina	1	14	0.33	0.5726
Sacarosa	1	14	2.75	0.1194
MES	4	64	4.44	0.0032
Nutrientes*Adenina	1	14	1.05	0.3237
Nutrientes*Sacarosa	1	14	0.02	0.8906
Adenina*Sacarosa	1	14	0.77	0.3937
Nutrie*Adenin*Sacaro	1	14	1.67	0.2169
Nutrientes*MES	4	64	0.81	0.5208
Adenina*MES	4	64	0.08	0.9889
Sacarosa*MES	4	64	0.71	0.5907

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Nutrient*Adenina*MES	4	64	0.39	0.8163
Nutrien*Sacarosa*MES	4	64	0.36	0.8349
Adenina*Sacarosa*MES	4	64	0.89	0.4741
Nutr*Adeni*Sacar*MES	4	64	0.23	0.9209

8.1.3. Crecimiento.

Tabla nº 13. Tabla Anova para el crecimiento a 15°C.

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
BLOQUE	2	192	0.09	0.9095
Nutrientes	1	192	72.22	<.0001
Adenina	1	192	18.99	<.0001
Sacarosa	1	192	21.47	<.0001
MES	4	756	175.59	<.0001
Nutrientes*Adenina	1	192	2.06	0.1531
Nutrientes*Sacarosa	1	192	19.61	<.0001
Adenina*Sacarosa	1	192	0.38	0.5376
Nutrie*Adenin*Sacaro	1	192	2.54	0.1123
Nutrientes*MES	4	756	26.18	<.0001
Adenina*MES	4	756	7.58	<.0001
Sacarosa*MES	4	756	3.48	0.0079
Nutrient*Adenina*MES	4	756	1.38	0.2393
Nutrien*Sacarosa*MES	4	756	4.78	0.0008
Adenina*Sacarosa*MES	4	756	1.92	0.1058
Nutr*Adeni*Sacar*MES	4	756	2.26	0.0613

Tabla nº 14. Tabla Anova para el crecimiento a 24°C.

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
BLOQUE	2	181	3.54	0.0311
Nutrientes	1	181	70.04	<.0001
Adenina	1	181	0.67	0.4145
Sacarosa	1	181	3.78	0.0535
MES	4	654	189.75	<.0001
Nutrientes*Adenina	1	181	0.00	0.9799
Nutrientes*Sacarosa	1	181	5.34	0.0220
Adenina*Sacarosa	1	181	0.03	0.8644
Nutrie*Adenin*Sacaro	1	181	0.67	0.4148
Nutrientes*MES	4	654	14.02	<.0001
Adenina*MES	4	654	0.67	0.6130
Sacarosa*MES	4	654	3.88	0.0040
Nutrient*Adenina*MES	4	654	0.34	0.8500
Nutrien*Sacarosa*MES	4	654	0.37	0.8333

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Adenina*Sacarosa*MES	4	654	0.64	0.6316
Nutr*Adeni*Sacar*MES	4	654	0.38	0.8239

8.2. TABLAS LOGISTIC.

A continuación se muestran las Tablas derivadas del análisis Logistic que se han utilizado para interpretar los resultados del nº de tallos, hojas y raíces.

8.2.1. Número de tallos.

- Análisis estadístico del nº de tallos a 15°C.

Tabla nº 15. Tabla Anova para el nº de tallos a 15°C.

Tipo 3 Análisis de efectos			
Efecto	DF	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Nutrientes	1	9.0776	0.0026
Adenina	1	0.0138	0.9066
Nutrientes*Adenina	1	7.3307	0.0068
Sacarosa	1	0.0535	0.8171
Nutrientes*Sacarosa	1	21.0267	<.0001
Adenina*Sacarosa	1	7.5328	0.0061
nmes	1	31.7575	<.0001
nmes*Nutrientes	1	1.4130	0.2346
nmes*Adenina	1	0.6786	0.4101
nmes*Sacarosa	1	0.6145	0.4331

Tabla nº 16. Tabla de estimación de máxima verosimilitud para el nº de tallos a 15°C.

Análisis del estimador de máxima verosimilitud							
Parámetro			DF	Estimador	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Intercept	C		1	-8.3425	1.3649	37.3604	<.0001
Intercept	B		1	-6.8178	1.3560	25.2807	<.0001
Nutrientes	Alto		1	3.1698	1.4127	5.0343	0.0248
Adenina	Alto		1	0.3163	0.9339	0.1147	0.7348

Nutrientes*Adenina	Alto	Alto	1	-1.8027	0.6658	7.3307	0.0068
Sacarosa	Alto		1	-2.8503	1.1940	5.6989	0.0170
Nutrientes*Sacarosa	Alto	Alto	1	3.9498	0.8614	21.0267	<.0001
Adenina*Sacarosa	Alto	Alto	1	1.3451	0.4901	7.5328	0.0061
nmes			1	1.0076	0.2950	11.6662	0.0006
nmes*Nutrientes	Alto		1	-0.3707	0.3118	1.4130	0.2346
nmes*Adenina	Alto		1	0.1435	0.1742	0.6786	0.4101
nmes*Sacarosa	Alto		1	-0.1501	0.1915	0.6145	0.4331

- **Análisis estadístico del nº de tallos a 24°C.**

Tabla nº 17. Tabla Anova para el nº de tallos a 24°C.

Tipo 3 Análisis de efectos			
Efecto	DF	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Nutrientes	1	25.5454	<.0001
Adenina	1	1.2295	0.2675
Nutrientes*Adenina	1	3.1096	0.0778
Sacarosa	1	4.1718	0.0411
Nutrientes*Sacarosa	1	38.0820	<.0001
Adenina*Sacarosa	1	3.9837	0.0459
nmes	1	79.5308	<.0001
nmes*Nutrientes	1	0.7450	0.3881
nmes*Adenina	1	0.7725	0.3794
nmes*Sacarosa	1	10.8401	0.0010

Tabla nº 18. Tabla de estimación de máxima verosimilitud para el nº de tallos a 24°C.

Análisis del estimador de máxima verosimilitud							
Parámetro			DF	Estimador	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Intercept	C		1	-3.2579	0.4003	66.2316	<.0001
Intercept	B		1	-2.0135	0.3886	26.8433	<.0001
Nutrientes	Alto		1	1.0921	0.4666	5.4791	0.0192
Adenina	Alto		1	0.3753	0.4214	0.7929	0.3732
Nutrientes*Adenina	Alto	Alto	1	-0.6389	0.3623	3.1096	0.0778

Sacarosa	Alto		1	-3.1745	0.7591	17.4875	<.0001
Nutrientes*Sacarosa	Alto	Alto	1	3.6203	0.5867	38.0820	<.0001
Adenina*Sacarosa	Alto	Alto	1	0.7054	0.3534	3.9837	0.0459
nmes			1	0.6789	0.1107	37.6304	<.0001
nmes*Nutrientes	Alto		1	0.1194	0.1383	0.7450	0.3881
nmes*Adenina	Alto		1	0.0984	0.1119	0.7725	0.3794
nmes*Sacarosa	Alto		1	-0.4458	0.1354	10.8401	0.0010

8.2.2. Número de hojas.

- Análisis estadístico del nº de hojas a 15°C.

Tabla nº 19. Tabla Anova para el nº de hojas a 15°C.

Tipo 3 Análisis de efectos			
Efecto	DF	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Nutrientes	1	1.2986	0.2545
Adenina	1	0.5696	0.4504
Nutrientes*Adenina	1	0.9584	0.3276
Sacarosa	1	0.8432	0.3585
Nutrientes*Sacarosa	1	14.2679	0.0002
Adenina*Sacarosa	1	0.1914	0.6618
nmes	1	72.6707	<.0001
nmes*Nutrientes	1	3.1555	0.0757
nmes*Adenina	1	0.6427	0.4227
nmes*Sacarosa	1	16.7295	<.0001

Tabla nº 20. Tabla de estimación de máxima verosimilitud para el nº de hojas a 15°C.

Análisis del estimador de máxima verosimilitud							
Parámetro			DF	Estimador	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Intercept	C		1	0.0287	0.3955	0.0053	0.9421
Intercept	B		1	1.9107	0.4163	21.0632	<.0001
Nutrientes	Alto		1	-0.2505	0.4910	0.2602	0.6100
Adenina	Alto		1	-0.00557	0.4858	0.0001	0.9908
Nutrientes*Adenina	Alto	Alto	1	-0.3665	0.3744	0.9584	0.3276

Sacarosa	Alto		1	-1.1569	0.5260	4.8371	0.0279
Nutrientes*Sacarosa	Alto	Alto	1	1.7303	0.4581	14.2679	0.0002
Adenina*Sacarosa	Alto	Alto	1	-0.1818	0.4156	0.1914	0.6618
nmes			1	0.2757	0.1242	4.9245	0.0265
nmes*Nutrientes	Alto		1	0.2788	0.1569	3.1555	0.0757
nmes*Adenina	Alto		1	0.1200	0.1497	0.6427	0.4227
nmes*Sacarosa	Alto		1	0.8245	0.2016	16.7295	<.0001

- **Análisis estadístico del nº de hojas a 24°C.**

Tabla nº 21. Tabla Anova para el nº de hojas a 24°C.

Tipo 3 Análisis de efectos			
Efecto	DF	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Nutrientes	1	6.1333	0.0133
Adenina	1	7.3592	0.0067
Nutrientes*Adenina	1	0.5722	0.4494
Sacarosa	1	0.9049	0.3415
Nutrientes*Sacarosa	1	6.8867	0.0087
Adenina*Sacarosa	1	6.8160	0.0090
nmes	1	28.0862	<.0001
nmes*Nutrientes	1	0.9214	0.3371
nmes*Adenina	1	1.3014	0.2540
nmes*Sacarosa	1	4.7213	0.0298

Tabla nº 22. Tabla de estimación de máxima verosimilitud para el nº de hojas a 24°C.

Análisis del estimador de máxima verosimilitud							
Parámetro			DF	Estimador	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Intercept	C		1	-0.7982	0.5882	1.8415	0.1748
Intercept	B		1	0.6908	0.6033	1.3109	0.2522
Nutrientes	Alto		1	0.3761	0.6375	0.3480	0.5552
Adenina	Alto		1	2.1342	0.7092	9.0565	0.0026
Nutrientes*Adenina	Alto	Alto	1	0.4800	0.6345	0.5722	0.4494
Sacarosa	Alto		1	-0.5770	0.7291	0.6263	0.4287

Nutrientes*Sacarosa	Alto	Alto	1	1.7286	0.6587	6.8867	0.0087
Adenina*Sacarosa	Alto	Alto	1	-1.7897	0.6855	6.8160	0.0090
nmes			1	1.4049	0.3298	18.1494	<.0001
nmes*Nutrientes	Alto		1	0.2890	0.3011	0.9214	0.3371
nmes*Adenina	Alto		1	-0.2672	0.2342	1.3014	0.2540
nmes*Sacarosa	Alto		1	-0.7613	0.3504	4.7213	0.0298

8.2.3. Número de raíces.

- Análisis estadístico del nº de raíces a 15°C.

Tabla nº 23. Tabla Anova para el nº de raíces a 15°C.

Tipo 3 Análisis de efectos			
Efecto	DF	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Nutrientes	1	2.3382	0.1262
Adenina	1	0.3640	0.5463
Nutrientes*Adenina	1	0.6437	0.4224
Sacarosa	1	1.7953	0.1803
Nutrientes*Sacarosa	1	0.0064	0.9361
Adenina*Sacarosa	1	1.6690	0.1964
nmes	1	2.2003	0.1380
nmes*Nutrientes	1	1.6517	0.1987
nmes*Adenina	1	0.7086	0.3999
nmes*Sacarosa	1	1.4559	0.2276

Tabla nº 24. Tabla de estimación de máxima verosimilitud para el nº de raíces a 15°C.

Análisis del estimador de máxima verosimilitud							
Parámetro			DF	Estimador	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Intercept	G		1	-16.5893	7.1710	5.3518	0.0207
Intercept	M		1	-14.2412	7.1383	3.9802	0.0460
Intercept	P		1	-13.6873	7.1357	3.6792	0.0551
Nutrientes	Alto		1	9.5742	6.1073	2.4576	0.1170
Adenina	Alto		1	-2.4711	4.3241	0.3266	0.5677
Nutrientes*Adenina	Alto	Alto	1	-1.0076	1.2558	0.6437	0.4224

Sacarosa	Alto		1	5.1461	4.4636	1.3292	0.2490
Nutrientes*Sacarosa	Alto	Alto	1	0.0886	1.1048	0.0064	0.9361
Adenina*Sacarosa	Alto	Alto	1	1.1608	0.8985	1.6690	0.1964
nmes			1	1.9651	1.4508	1.8346	0.1756
nmes*Nutrientes	Alto		1	-1.5907	1.2377	1.6517	0.1987
nmes*Adenina	Alto		1	0.7087	0.8419	0.7086	0.3999
nmes*Sacarosa	Alto		1	-1.0963	0.9085	1.4559	0.2276

- **Análisis estadístico del nº de raíces a 24°C.**

Tabla nº 25. Tabla Anova para el nº de raíces a 24°C.

Tipo 3 Análisis de efectos			
Efecto	DF	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Nutrientes	1	0.5125	0.4741
Adenina	1	1.1376	0.2862
Nutrientes*Adenina	1	0.8206	0.3650
Sacarosa	1	0.0728	0.7873
Nutrientes*Sacarosa	1	6.5415	0.0105
Adenina*Sacarosa	1	0.1268	0.7218
nmes	1	13.0661	0.0003
nmes*Nutrientes	1	0.1401	0.7082
nmes*Adenina	1	0.0673	0.7953
nmes*Sacarosa	1	0.0004	0.9847

Tabla nº 26. Tabla de estimación de máxima verosimilitud para el nº de raíces a 24°C.

Análisis del estimador de máxima verosimilitud							
Parámetro			DF	Estimador	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Intercept	G		1	-3.5711	0.5706	39.1627	<.0001
Intercept	M		1	-2.2049	0.5603	15.4880	<.0001
Intercept	P		1	-1.8397	0.5585	10.8517	0.0010
Nutrientes	Alto		1	0.1114	0.5969	0.0348	0.8519
Adenina	Alto		1	0.7671	0.5690	1.8176	0.1776
Nutrientes*Adenina	Alto	Alto	1	-0.2988	0.3299	0.8206	0.3650

Sacarosa	Alto		1	-0.5205	0.6176	0.7105	0.3993
Nutrientes*Sacarosa	Alto	Alto	1	0.8644	0.3380	6.5415	0.0105
Adenina*Sacarosa	Alto	Alto	1	-0.1157	0.3249	0.1268	0.7218
nmes			1	0.2565	0.1440	3.1728	0.0749
nmes*Nutrientes	Alto		1	0.0555	0.1482	0.1401	0.7082
nmes*Adenina	Alto		1	-0.0366	0.1411	0.0673	0.7953
nmes*Sacarosa	Alto		1	-0.00279	0.1459	0.0004	0.9847

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

- AHMED, M; ANJUM, M.A; (2010). **In vitro storage of some pear genotypes with the minimal growth technique.** Turk J. Agric For 34; pp. 25-32.
- AHMED, M; ANJUM, M.A; SHAH, A.H; HAMID, A; (2010). **In vitro preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes.** Pak. J. Bot., 42(3): pp. 1639-1650.
- AHUJA, M.R; (1992). **Micropropagation of woody plants.** Kluwer Academic Publishers.
- AZURMENDI, P; (2009). **Cultivo in vitro de *Populus tremula* L. (Álamo temblón). Influencia de BAP y adenina en la fase de proliferación.** Proyecto fin de carrera de la ETSIA de Palencia, Ingeniería de Montes.
- BERTRAND-DESBRUNAIS, A; NOIROT, M; CHARRIER, A; (1992). **Slow growth in vitro conservation of coffee (*Coffea* spp.).** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: pp. 105-110. Kluwer Academic Publishers.
- BONNIER, F.J.M; VAN TUYL, J.M; (1997). **Long term in vitro storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49: pp. 81–87. Kluwer Academic Publishers.
- ESCUDERO, C.E; SIERRA DE GRADO, R; (2010). **Conservación de recursos genéticos de *Populus tremula* L. en Castilla y León.** TRIM, 1 (2010), pp. 7-15.
- GISBERT, C; FITA, A.M.; DÍEZ, M.J; (2008). **Prácticas de cultivo "in vitro" y transformación genética de plantas.** Universidad Politécnica de Valencia.
- GÓMEZ, A; PINTOS, B; GRAU, J.M; BUENO, M.A; (2014). **Micropropagación de *Populus tremula* L.** Reduca (Biología). Serie Botánica. 7 (2): pp. 1-11, 2014.
- HERMOSO, J; (2012). **Estudio de la influencia de IBA (Ácido Indolbutírico) en la fase de enraizamiento en el cultivo in vitro de *Populus tremula* L.** Trabajo fin de máster de la ETSIA de Palencia, Máster en Ingeniería de Montes.
- MARTIN, M.T; PEDRANZANI, H.E; SIERRA DE GRADO, R; (2007). **Behavior and preservation of an in vitro collection of European aspen in Spain.** Biocell, 31(1), pp. 41-49.
- MARGARA, J; (1988). **Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro: los meristemos y la organogénesis.** Ediciones Mundi-Prensa.

- MÍNGUEZ, A; (2007). **Recuperación de una colección de recursos genéticos de *Populus tremula* L. mediante técnicas de cultivo in vitro.** Proyecto fin de carrera de la ETSIA de Palencia, Ingeniería de Montes.
- NAAZ, A; SHAHZAD, A; ANIS, M; (2014). **Effect of Adenine Sulphate Interaction on Growth and Development of Shoot Regeneration and Inhibition of Shoot Tip Necrosis Under In Vitro Condition in Adult *Syzygium cumini* L. - a Multipurpose Tree.** Appl Biochem Biotechnol, 173: pp. 90–102.
- PÉREZ, E; (2002). **Establecimiento en cultivo in vitro de *Populus x canescens*.** Proyecto fin de carrera de la ETSIA de Palencia, Ingeniería Técnica Forestal.
- PIERIK, R.L.M; (1990). **Cultivo in vitro de las plantas superiores.** Ediciones Mundi-Prensa.
- PARDOS, J.A; TORIBIO, M; (1984). **El cultivo in vitro aplicado a la mejora forestal.** Comunicaciones I.N.I.A. Serie: Recursos naturales, Nº 28.
- PHILIP, V.J; JOSEPH, D; TRIGGS, G.S; (1992). **Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures.** Plant Cell Reports 12: pp. 41-44.
- SIERRA DE GRADO, R; (2003). **El álamo temblón (*Populus tremula* L.). Bases para su cultivo, gestión y conservación.** Ediciones Mundi-Prensa.
- SON, S.H; CHUN, Y.W; HALL, R; (1991). **Cold storage of in vitro cultures of hybrid poplar shoots (*Populus alba* L. x *P. grandidentata* Michx.).** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: pp. 161-168. Kluwer Academic Publishers.
- SOTA, V; KONGJIKA, E; (2014). **The effect of nutrient media in micropropagation and in vitro conservation of wild population of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb*).** Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 3 (6); pp. 453-456. Faculty of Biotechnology and Food Sciences.
- SOTA, V; KONGJIKA, E; (2014). **Slow growth in vitro conservation of *Zizyphus jujuba* Mill.** Agriculture & Forestry, Vol. 60. Issue 1: pp. 27-37, Podgorica.
- TOKOPORO, G.L; ELHASSAN, A.A; ALI, M.A; (2013). **Effect of nutrient medium concentration and temperature on short-term in vitro conservation of shoot-tip explants of banana.** JONARES, Vol. 1, pp. 37-40.
- VIETEZ, E; VIETEZ, A.M; BALLESTER, A; VIETEZ, M.L; SAN JOSE, M.C; VIETEZ, F.J; (1987). **Propagación de plantas leñosas por cultivo “in vitro”.** Excma. Diputación de Pontevedra.