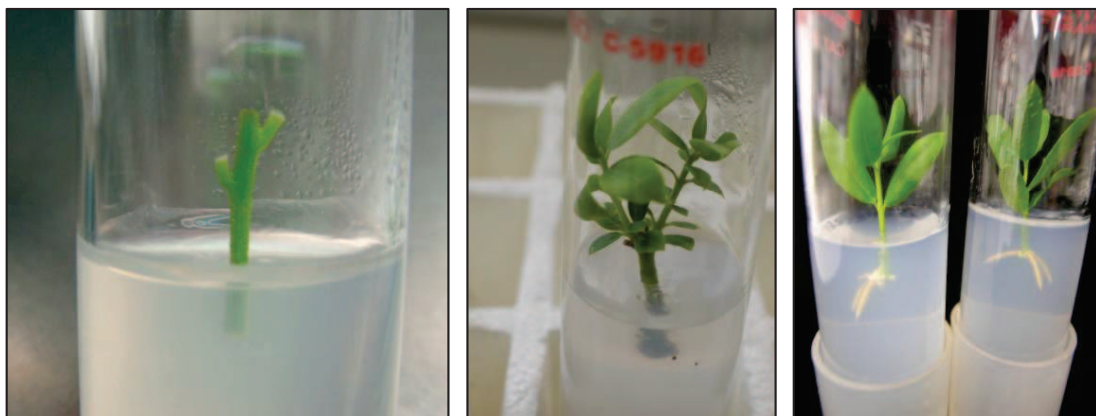




FACULTAD DE CIENCIAS



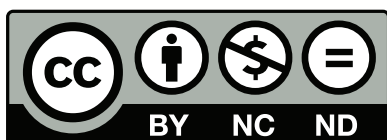
TESIS DOCTORAL

**REJUVENECIMIENTO Y MICROPROPAGACIÓN
DE OLIVO
(*Olea europaea* L.)**

**Isabel Vidoy Mercado
2014**

AUTOR: Isabel Vidoy Mercado

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



Instituto de Investigación y Formación
Agraria y Pesquera (IFAPA)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento de Biología Vegetal
Área de Fisiología Vegetal

REJUVENECIMIENTO Y MICROPROPAGACIÓN DE OLIVO (*Olea europaea* L.)

TESIS DOCTORAL

Isabel Vidoy Mercado

2014



Instituto de Investigación y Formación
Agraria y Pesquera (IFAPA)



Departamento de Biología Vegetal
Área de Fisiología Vegetal

ARACELI BARCELÓ MUÑOZ, INVESTIGADORA DEL INSTITUTO
DE INVESTIGACIÓN Y FORMACIÓN AGRARIA Y PESQUERA (IFAPA) Y
FERNANDO PLIEGO ALFARO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE
BIOLOGIA VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD DE MALAGA,

INFORMAN:

Que la memoria de Tesis, titulada “**Rejuvenecimiento y Micropropagación de Olivo (*Olea europaea* L.)**”, presentada por la Licenciada Isabel Vidoy Mercado, para optar al grado de Doctora en Ciencias, ha sido realizada bajo su dirección y supervisión, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Biotecnología del Centro IFAPA-Churriana, y autorizan su presentación para su defensa.

Para que así conste, firman la presente en Málaga, 2 de Diciembre de 2014.

Araceli Barceló Muñoz

Fernando Pliego Alfaro



**Departamento de Biología Vegetal
Área de Fisiología Vegetal**

**MIGUEL ANGEL QUESADA FELICE, DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA,**

ACREDITA:

Que la tesis doctoral titulada **“Rejuvenecimiento y Micropropagación de Olivo (*Olea europaea* L.)”**, presentada por la Licenciada Isabel Vidoy Mercado, para optar al grado de Doctora en Ciencias, ha sido realizada bajo la dirección y supervisión, de los doctores Araceli Barceló Muñoz, investigadora del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, y Fernando Pliego Alfaro, catedrático del departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Biotecnología del Centro IFAPA-Churriana, y autoriza su presentación para su defensa.

Para que así conste, firman la presente en Málaga, 2 de Diciembre de 2014.

Miguel Ángel Quesada Felice

Agradecimientos

Alguien dijo que “La felicidad no es una estación de llegada, sino un modo de viajar” y ahora que ha llegado el momento de que este trabajo vea la luz, quisiera agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado en este largo viaje.

En primer lugar, a mis directores de tesis, los doctores Araceli Barceló y Fernando Pliego, sin cuya experiencia, ayuda y apoyo este trabajo nunca se hubiera concluido. Gracias por compartir conmigo vuestra enorme experiencia y sabiduría.

Vaya también mi agradecimiento para mi familia, que aunque no siempre han comprendido la finalidad y objetivo de mi dedicación a este proyecto siempre me han apoyado de forma incondicional.

A mi compañera de trabajo y amiga, Eli, ella ha sido el verdadero motor que me ha conducido en este periplo, siempre ha estado ahí: por su ayuda en el trabajo, por su apoyo emocional, por escucharme cuando las cosas no salían bien y no dejarme caer en el desánimo.

A todas las compañeras que pasaron por el laboratorio (Isa Clavero, Rosa, Belén, Tere, David, Eva...) y a las que aún están allí (Isa Padilla, Pepa, Yanette, Borja, Marta, Amalia, Clara, Adela, Mayte, Josefa), por compartir sus conocimientos e inquietudes conmigo. A todo el personal administrativo del IFAPA, en especial a Julia y Nani, quienes no han dudado en levantar el teléfono para ayudarme con las tareas burocráticas; Carmen Villalobos, por ayudarme a buscar bibliografía; Nieves, la directora, que en este último periodo me ha permitido seguir compartiendo el trabajo con mis compañeros. A mis compañeros de desayuno, Elsa, Leonardo, Jose Miguel, Juan Ramón, Ignacio, Carmen....A Pepa y Conchi que con su sentido del humor y sus cafés, hacen más llevaderas las mañanas. Al personal del campo, Pepillo, Antonio, Baltasar, Mohamed... en especial a Dani y Antonio, que me han ayudado y prestado su experiencia en el trabajo de invernadero.

Finalmente quiero agradecer al personal de la Estación Experimental la Mayora, el apoyo y la ayuda que me brindaron el tiempo que estuve con ellos (Iñaki, Marian, Carlos, Francisco, Yolanda, Estrella) y muy especialmente a Encarnita por sus sabios y acertados consejos.

A Carmen de Río *in memoriam*...

Ha sido un placer trabajar con todos ustedes.

A mi Chico y a Marina

*“No todo lo que cuenta puede ser contado
y no todo lo que puede ser contado cuenta”*

Albert Einstein

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. EL OLIVO	3
I.1.1. Origen, distribución geográfica y características botánicas	3
I.1.2. Estado actual del cultivo en España	5
I.1.3. Propagación	8
I.1.3.1. Enraizamiento de grandes propágulos	8
I.1.3.2. Enraizamiento de estaquillas leñosas bajo nebulización	9
I.1.3.3. Injerto	10
I.1.3.4. Propagación por semilla	10
I.1.3.5. Propagación <i>in vitro</i>	11
I.1.3.5.1. Micropropagación por organogénesis axilar	12
I.1.3.5.2. Micropropagación por organogénesis adventicia	22
I.1.3.5.3. Micropropagación por embriogénesis somática	23
I.1.3.5.4. Características de las plantas micropropagadas	25
I.1.3.6. Estado actual de la propagación del olivo	28
I.2. CRECIMIENTO Y DESARROLLO: DEFINICIÓN Y CONCEPTOS	43
I.2.1. Fases de crecimiento y su caracterización	43
I.2.2. Características diferenciales de las fases juvenil y adulta	46
I.2.2.1. Características morfológicas	46
I.2.2.2. Características citológicas e histológicas	47
I.2.2.3. Características fisiológicas	47
I.2.2.3.1. Contenido endógeno de reguladores de crecimiento	47
I.2.2.3.2. Capacidad de enraizamiento	48
I.2.2.4. Características bioquímicas y moleculares	51
I.2.3. Cambio de fase	57
I.2.3.1. Descripción y bases de su desarrollo	57

I.2.3.2. Factores que controlan el cambio de fase	62
I.2.3.2.1. Tamaño de la planta	62
I.2.3.2.2. Reguladores de crecimiento	64
I.2.3.2.3. Disponibilidad de nutrientes	65
I.2.3.2.4. Regulación génica	65
I.2.4. Estabilidad de los meristemos	68
I.2.5. Manipulación del cambio de fase como herramienta para la mejora y propagación	72
I.2.5.1. Acortamiento del periodo juvenil para acelerar el proceso de mejora	72
I.2.5.1.1. Elección de genitores	72
I.2.5.1.2. Técnicas de cultivo	73
I.2.5.1.3. Transformación con genes que controlan el cambio de fase	73
I.2.5.2. Rejuvenecimiento para mejorar la propagación vegetativa	74
I.2.5.2.1. Cono de juvenilidad	74
I.2.5.2.2. Inducción de rejuvenecimiento	76
I.2.5.2.2.1. Bases del rejuvenecimiento	78
I.2.5.2.2.2. Técnicas de rejuvenecimiento	80
I.2.5.2.2.2.1. Técnicas de rejuvenecimiento <i>in vivo</i>	80
I.2.5.2.2.2.2. Técnicas de rejuvenecimiento <i>in vitro</i>	83
II. OBJETIVOS	101
III. MATERIAL Y MÉTODOS	105
III.1. MATERIAL VEGETAL	107
III.1.1. Procedencia del material	107
III.1.2. Desinfección superficial de los explantos y establecimiento de los cultivos asépticos	108
III.2. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	121

III.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES	121
III.3.1. Material juvenil	122
III.3.1.1. Establecimiento de cultivos asépticos	122
III.3.1.1.1. Experimento 1.- Efecto de los medios IM y RV sobre el desarrollo de material juvenil en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	122
III.3.1.2. Fase de multiplicación	122
III.3.1.2.1. Experimento 1.- Efecto de los medios OM y RV sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil	122
III.3.1.2.2. Experimento 2.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de bencilaminopurina y medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil	122
III.3.1.2.3. Experimento 3.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de bencilaminopurina y medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes apicales de material juvenil	123
III.3.1.3. Fase de enraizamiento	124
III.3.1.3.1. Experimento 1.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes apicales de material juvenil	124
III.3.1.3.2. Experimento 2.- Efecto del tipo de explanto sobre el enraizamiento <i>in vitro</i> de material juvenil	124
III.3.1.3.3. Experimento 3.- Enraizamiento <i>ex vitro</i> de las microestaquillas procedentes de los cultivos mantenidos en el medio de proliferación	125
III.3.2. Material adulto	127
III.3.2.1. Micropropagación de cv. Arbequina	127
III.3.2.1.1. Establecimiento de cultivos asépticos	127
III.3.2.1.1.1. Experimento 1.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre sobre el establecimiento <i>in vitro</i> de secciones nodales de material adulto	127

III.3.2.1.2. Fase de multiplicación	128
III.3.2.1.2.1. Experimento 1.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación <i>in vitro</i> de material adulto	128
III.3.2.1.2.2. Experimento 2.- Efecto del cultivo alternado en presencia de ribósido de zeatina o tidiazurón y de la combinación de ribósido de zeatina y ácido giberélico (GA ₃) en la tasa de multiplicación de material adulto	129
III.3.2.1.2.3. Experimento 3.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y GA ₃ , sobre la tasa de multiplicación de material adulto	129
III.3.2.1.2.4. Experimento 4.- Efecto de distintas concentraciones de bencilaminopurina ó tidiazurón junto con ribósido de zeatina sobre la tasa de multiplicación de material adulto	129
III.3.2.1.2.5. Experimento 5.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y 24- epibrasinólido sobre la tasa de multiplicación de material adulto	130
III.3.2.1.3. Fase de enraizamiento	130
III.3.2.1.3.1. Experimento 1.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento <i>in vitro</i> de material adulto	130
III.3.2.1.3.2. Experimento 2.- Efecto de la adición de GA ₃ al medio de proliferación sobre el posterior enraizamiento <i>in vitro</i> de material adulto	130
III.3.2.1.3.3. Experimento 3.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de ácido indolbutírico en el enraizamiento <i>ex vitro</i> de microestaquillas de material adulto	131
III.3.2.2. Micropropagación del cv. Picual	131
III.3.2.2.1. Establecimiento de cultivos asépticos	131
III.3.2.2.1.1. Experimento 1.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento <i>in vitro</i> de secciones nodales de material adulto	131
III.3.2.2.2. Fase de multiplicación	132
III.3.2.2.2.1. Experimento 1.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación <i>in vitro</i> de material adulto	132

III.3.2.2.2. Experimento 2.- Efecto de las combinaciones entre formulaciones basales y suplementos hormonales de los medios RP y ZAD sobre la tasa de multiplicación <i>in vitro</i> de material adulto	132
III. 3.2.2.3. Experimento 3.- Efecto de ribósido de zeatina con GA ₃ sobre la tasa de multiplicación de material adulto	133
III.3.2.2.4. Experimento 4.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina, en medio de doble fase, sobre la tasa de multiplicación de material adulto	133
III.3.2.3. Fase de enraizamiento	133
III.3.2.3.1. Experimento 1.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento <i>in vitro</i> de material adulto	133
III.3.2.3.2. Experimento 2.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de ácido indolbutírico en el enraizamiento <i>ex vitro</i> de microestaquillas de material adulto	133
III.3.3. Material microinjertado	134
III.3.3.1. Efecto de los microinjertos sucesivos en la estabilidad genética	134
III.3.3.1.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la estabilidad genética de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero	134
III.3.3.2. Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad morfogénica	137
III.3.3.2.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de enraizamiento <i>in vitro</i> de los brotes obtenidos	137
III.3.3.2.2. Experimento 2.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de enraizamiento mediante estaquillado semileñoso de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero	138
III.3.3.2.3. Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de micropropagación de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero	138

III.3.3.2.3.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	138
III.3.3.2.3.2. Experimento 2.- Efecto de los microinjertos sucesivos sobre la tasa de multiplicación <i>in vitro</i>	139
III.3.3.2.3.3. Experimento 3.- Efecto de los microinjertos sucesivos en la capacidad de enraizamiento <i>in vitro</i>	139
III.3.3.3. Efecto de los microinjertos sucesivos sobre la entrada en producción	139
III.3.3.3.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la precocidad de entrada en producción de las plantas obtenidas y transplantadas a campo	139
III.4. TOMA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	142
IV. RESULTADOS	145
IV.1. MATERIAL JUVENIL	147
IV.1.1. Establecimiento de cultivos asépticos	147
IV.1.1.1. Experimento 1.- Efecto de los medios IM y RV sobre el desarrollo de material juvenil en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	147
IV.1.2. Fase de multiplicación	149
IV.1.2.1. Experimento 1.- Efecto de los medios OM y RV sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil	149
IV.1.2.2. Experimento 2.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de bencilaminopurina y medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil	151
IV.1.2.3. Experimento 3.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de bencilaminopurina y medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes apicales de material juvenil	155
IV.1.3. Fase de enraizamiento	158

IV.1.3.1. Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes apicales de material juvenil	158
IV.1.3.2. Experimento 2.- Efecto del tipo de explanto sobre el enraizamiento <i>in vitro</i> de material juvenil	158
IV.1.3.3. Experimento 3.- Enraizamiento <i>ex vitro</i> de las microestaquillas procedentes de los cultivos mantenidos en el medio de proliferación	159
IV.2. MATERIAL ADULTO	161
IV.2.1. Micropropagación del cv. Arbequina	161
IV.2.1.1. Establecimiento de cultivos asépticos	161
IV.2.1.1.1. Experimento 1.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre sobre el establecimiento <i>in vitro</i> de secciones nodales de material adulto	161
IV.2.1.2. Fase de multiplicación	165
IV.2.1.2.1. Experimento 1.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación <i>in vitro</i> de material adulto	165
IV.2.1.2.2. Experimento 2.- Efecto del cultivo alternado en presencia de ribósido de zeatina o tidiazurón y de la combinación de ribósido de zeatina y ácido giberélico (GA ₃) en la tasa de multiplicación de material adulto	169
IV.2.1.2.3. Experimento 3.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y GA ₃ , sobre la tasa de multiplicación de material adulto	171
IV.2.1.2.4. Experimento 4.- Efecto de distintas concentraciones de bencilaminopurina ó tidiazurón junto con ribósido de zeatina sobre la tasa de multiplicación de material adulto	174
IV.2.1.2.5. Experimento 5.- Efecto de distintas concentraciones ribósido de zeatina y 24-epibrasinólido sobre la tasa de multiplicación de material adulto	176
IV.2.1.3. Fase de enraizamiento	178
IV.2.1.3.1. Experimento 1.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento <i>in vitro</i> de material adulto	178
IV.2.1.3.2. Experimento 2.- Efecto de la adición de GA ₃ al medio de proliferación sobre el posterior enraizamiento <i>in vitro</i> de material adulto	180

IV.2.1.3.3. Experimento 3.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de ácido indolbutírico en el enraizamiento <i>ex vitro</i> de microestaquillas de material adulto	182
IV.2.2. Micropropagación del cv. Picual	184
IV.2.2.1. Establecimiento de cultivos asépticos	184
IV.2.2.1.1. Experimento 1.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento <i>in vitro</i> de secciones nodales de material adulto	184
IV.2.2.2. Fase de multiplicación	187
IV.2.2.2.1. Experimento 1.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación <i>in vitro</i> de material adulto	187
IV.2.2.2.2. Experimento 2.- Efecto de las combinaciones entre formulaciones basales y suplementos hormonales de los medios RP y ZAD sobre la tasa de multiplicación <i>in vitro</i> de material adulto	191
IV.2.2.2.3. Experimento 3.- Efecto de ribósido de zeatina con GA ₃ sobre la tasa de multiplicación de material adulto	194
IV.2.2.2.4. Experimento 4.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina, en medio de doble fase, sobre la tasa de multiplicación de material adulto	195
IV.2.2.3. Fase de enraizamiento	198
IV.2.2.3.1. Experimento 1.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento <i>in vitro</i> de material adulto	198
IV.2.2.3.2. Experimento 2.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de ácido indobutírico en el enraizamiento <i>ex vitro</i> de microestaquillas de material adulto	200
IV.3. MATERIAL MICROINJERTADO	202
IV.3.1. Efecto de los microinjertos sucesivos en la estabilidad genética	202
IV.3.1.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la estabilidad genética de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero	202

IV.3.2. Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad morfogénica	204
IV.3.2.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de enraizamiento <i>in vitro</i> de los brotes obtenidos	204
IV.3.2.2. Experimento 2.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de enraizamiento mediante estaquillado semileñoso de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero	205
IV.3.2.3. Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de micropropagación de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero	206
IV.3.2.3.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	206
IV.3.2.3.2. Experimento 2.- Efecto de los microinjertos sucesivos sobre la tasa de multiplicación <i>in vitro</i>	209
V.3.2.3.3. Experimento 3.- Efecto de los microinjertos sucesivos en la capacidad de enraizamiento <i>in vitro</i>	209
IV.3.3. Efecto de los microinjertos sucesivos en la entrada en producción	212
IV.3.3.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la precocidad de entrada en producción de las plantas obtenidas y transplantadas a campo	212
V. DISCUSION	217
V.1. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS ASÉPTICOS	219
V.2. FASE DE MULTIPLICACIÓN	223
V.2.1. Influencia del estado ontogenético	224
V.2.2. Influencia de las sales minerales	225
V.2.3. Influencia de los reguladores de crecimiento	227
V.2.4. Influencia de la fuente de hidratos de carbono	233

V.2.5. Efecto de la textura del medio	234
V.3. FASE DE ENRAIZAMIENTO	237
V.3.1. Enraizamiento <i>in vitro</i>	237
V.3.2. Enraizamiento <i>ex vitro</i>	241
V.4. ESTABILIDAD GENÉTICA Y PRECOCIDAD DE ENTRADA EN PRODUCCIÓN DEL MATERIAL PROCEDENTE DE LOS MICROINJERTOS SERIADOS	243
V.4.1. Efecto de los microinjertos sucesivos en la estabilidad genética	243
V.4.2. Efecto de los microinjertos sucesivos en la entrada en producción	246
VI. CONCLUSIONES	249
VII. BIBLIOGRAFIA	255
ABREVIATURAS	
INDICE DE TABLAS	
INDICE DE FIGURAS	

I. INTRODUCCIÓN

I.1. EL OLIVO

El olivo (*Olea europaea* L.), pertenece a la familia *Oleaceae*, que comprende especies de plantas distribuidas por las regiones tropicales y templadas del mundo. Hay alrededor de 35 especies del género *Olea*, siendo *O. europaea*, la única que posee fruto comestible y que se destina tanto a la producción de aceite como a la de aceituna de mesa.

Atendiendo a criterios morfológicos y de distribución geográfica, Green y Wickens (1989), distinguieron cuatro subespecies: i) *O. europaea* spp. *europaea*, en la zona mediterránea; dentro de este grupo se encuentran los olivos cultivados (var. *sativa*) y los acebuches u olivos silvestres (var. *sylvestris*); ii) *O. europaea* spp. *laperrinei* (Batt. y Trab.) Ciferri, en los macizos del Sahara; iii) *O. europaea* spp. *cerasiformis* (Webb. y Berth), en las Islas Canarias y Madeira y iv) *O. europaea* spp. *cuspidata* (Well. Ciferri) en Asia y el este de África. Sin embargo, Civantos (2004) distingue una sola especie, *O. europaea*, con las subespecies *sativa* y *sylvestris* que agrupan a los cultivares y a las formas silvestres, respectivamente.

I.1.1. Origen, distribución geográfica y características botánicas

El olivo tiene su origen en una región geográfica que ocupa el sur del Cáucaso, Palestina, zona costera de Siria y altiplanicies de Irán, desde donde se extendió por todos los países de la cuenca mediterránea. A partir del siglo XV, con el descubrimiento de América se expandió por América Latina y en la actualidad se cultiva también en China, Sudáfrica, Japón y Australia. Es una especie diploide ($2n= 46$) que, pese a su rusticidad, presenta una serie de requisitos que limitan su área de distribución a zonas de clima mediterráneo, esto es, latitudes de 30°- 40°, tanto del Hemisferio Norte como en el Sur; en este último, está presente en latitudes más tropicales con clima modificado por la altitud (Civantos, 2004).

Rapoport (2004) señala que el olivo cultivado es un árbol de tamaño mediano, de alrededor de 4-8 metros de altura, según la variedad. Presenta un tronco grueso y la corteza de color gris a verde grisáceo. Su copa es redondeada aunque puede estar modificada por las labores de poda, necesarias en el mantenimiento de este cultivo, y también por las condiciones agronómicas y ambientales de su crecimiento. Presenta hojas simples, de forma lanceolada con bordes enteros, que persisten 2 ó 3 años en el árbol. Las estructuras reproductoras son inflorescencias paniculadas que se desarrollan en las axilas de las hojas, en nudos del crecimiento vegetativo del año previo a la floración. El fruto, la aceituna, es una drupa de forma elipsoidal a globosa y su tamaño depende del cultivar; presenta color verde durante su desarrollo y negro cuando madura.

El olivo es un árbol que, en condiciones normales de crecimiento, presenta una fase juvenil que puede durar más de 10 años (Rugini y Fedeli, 1990), aunque puede ser acortado a 3-4 años con la aplicación de determinadas técnicas, como el crecimiento forzado mediante luz continua en invernadero climatizado (Clavero-Ramírez y Pliego-Alfaro, 1993) y sistemas de riego, fertilización y poda en campo (Lavee *y col.*, 1996; Moreno-Alías *y col.*, 2010).

Además de la capacidad de fructificación, existen una serie de características morfológicas que diferencian claramente la fase juvenil de la adulta, esto es, las hojas de los individuos juveniles tienen forma redondeada-oval, los tallos presentan entrenudos cortos con gran densidad de hojas, son poco leñosos, con alto contenido en agua; por el contrario, las hojas de los individuos adultos son más alargadas, delgadas y duras, con una gruesa cutícula en su cara superior; las ramas están más lignificadas y presentan entrenudos más largos, con lo cual la densidad foliar es menor; en esta fase, el grado de ramificación de los árboles disminuye pues muchas de las yemas laterales se diferencian para formar yemas florales (García *y col.*, 2000b).

I.1.2. Estado actual del cultivo en España

España es el primer país oleícola del mundo con una superficie cultivada de 2.500.000 Ha (FAOSTAT, 2013); la producción media de aceite de oliva ha experimentado en los últimos años un gran aumento (Figura 1); de la misma manera, es el primer exportador de aceituna de mesa con cifras superiores a 400.000 Tm/ año; un informe del COI (Consejo Oleícola Internacional, 2012a) señala que, además de la importancia socioeconómica de los productos oleícolas, los esfuerzos realizados en las últimas décadas, sitúan a España en los primeros puestos en cuanto a investigación y desarrollo tecnológico en este sector.

Las labores del cultivo generan al año alrededor de 46 millones de jornadas de trabajo, siendo una fuente de empleo de gran importancia, sobre todo en aquellas regiones donde constituye un auténtico monocultivo; se estima que la producción oleícola ha contribuido con una media de 2,700 millones de euros (ventas de productos oleícolas más ayudas de la Unión Europea) al PIB agrícola durante el periodo 1996/99 (informe COI, 2012a).

El cultivo del olivo en España destaca por su antigüedad y su carácter tradicional, se extiende por todo el territorio nacional salvo en las comunidades de Galicia, Asturias y Cantabria (Civantos, 2004). Predomina el cultivo extensivo y de secano, aunque entre los años 1989 y 1999 pasó de representar el 5 % al 22 % de la superficie de regadío, debido a la implantación de explotaciones intensivas.

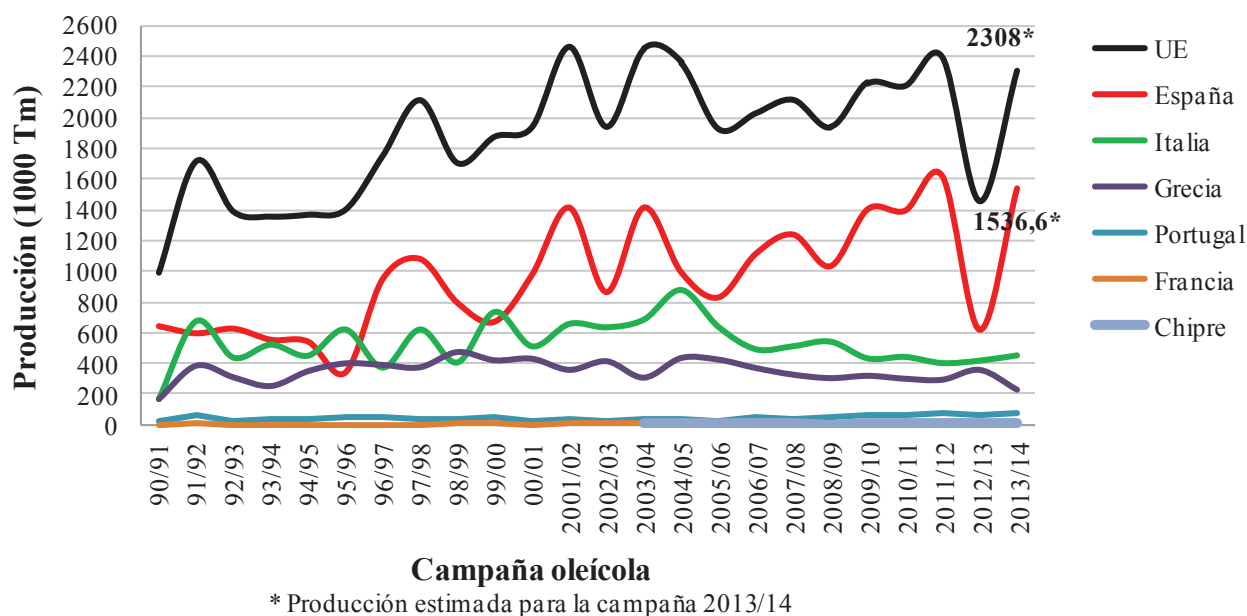


Figura 1.- Evolución de la producción de aceite de oliva en la Unión Europea y los principales países productores de Europa en el periodo 1990-2013. (Fuente COI, informe: Noviembre 2013. http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figureslang=es_ES (consultado el 26/11/2014))

El material vegetal cultivado en España incluye un gran número de variedades, todas ellas muy antiguas y que presentan zonas de difusión restringidas a sus posibles lugares de origen; en relación con sus características productivas, el Ministerio de Agricultura ((1972), citado por Civantos (2004)) dividió el territorio español en diez zonas olivareras que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1.- Zonas olivareras del territorio español ((Ministerio de Agricultura (1972), en Civantos (2004)).

Zona	Variedades	Localización	Denominaciones de Origen
Picual	Picual	Jaén, Norte de Granada, Comarca de Bujalance (Córdoba)	Sierra de Segura, Sierra Mágina, Sierra de Cazorla, Montes de Granada
Hojiblanco	Hojiblanco, Picual, Carrasqueña de Córdoba, Picudo, Chorrúo	Córdoba (excepto Comarca de Bujalance y La Carlota), Estepa (Sevilla), Comarca de Loja (Granada), Comarca de Antequera (Málaga)	Baena, Priego de Córdoba
Andalucía Occidental	Lechín de Sevilla, Hojiblanco, Verdial de Huévar, Manzanilla Serrana, Manzanillo, Gordal Sevillana	Cádiz, Huelva, Sevilla (excepto Estepa), Comarca La Carlota (Córdoba)	Sierra de Cádiz
Andalucía Oriental	Lechín de Granada, Verdial de Vélez-Málaga, Aloreña, Picual de Almería	Almería, Granada (excepto comarca Iznalloz), Málaga (excepto Antequera)	Poniente de Granada
Oeste	Manzanilla Cacereña, Carrasqueña de Badajoz, Morisca, Verdial de Badajoz, Cornicabra	Cáceres, Badajoz, Ávila, Salamanca, Zamora	Sierra de Gata-Las Hurdes, Aceite de Monterrubio
Centro	Cornicabra, Castellana, Alfarara, Gordal de Hellín	Castilla-La Mancha, Madrid	Montes de Toledo
Levante	Blanqueta, Villalonga, Changlot Real, Lechín de Granada, Cornicabra	Murcia, Alicante, Valencia	
Valle del Ebro	Empeltre, Verdeña, Farga, Royal de Calatayud	Aragón, La Rioja, Navarra, Álava	Bajo Aragón
Tortosa-Castellón	Farga, Morrut, Sevilleana, Empeltre	Bajo Ebro-Montsiá de Tarragona, Castellón	Baix Ebre-Montsia
Arbequina	Arbequina, Verdiell, Empeltre, Argudell	Cataluña (excepto bajo Ebro-Montsiá), Baleares	Les Garrigues, Siurana y Terra Alta, Aceite de Mallorca

I.1.3. Propagación

El olivo ha sido propagado desde tiempos remotos de forma vegetativa; ésto explicaría la antigüedad de las variedades actuales (Oliveros y Jordana, 1968), su localización, restringida a sus lugares de origen, y la homogeneidad genética existente dentro de los diferentes cultivares (Barranco, 2004). La propagación por medio de semillas ha quedado restringida a la obtención de plantas para reforestación, injerto de variedades difíciles de enraizar y evaluación de progenies en los programas de mejora genética clásica por cruzamientos.

I.1.3.1. Enraizamiento de grandes propágulos

El enraizamiento de grandes propágulos, ya sean zuecas o estacas leñosas, ha sido un sistema de propagación clásico (Caballero y del Río, 2004). Las zuecas se toman de la parte basal de troncos viejos, pueden tener o no brotes y tienen el inconveniente de que, además del gran tamaño del propágulo, producen daños graves al árbol del que se toman; este sistema de propagación aún se utiliza en algunas zonas olivareras del Norte de África y Oriente Próximo.

Las estacas, provienen de restos de poda de plantaciones establecidas, tienen alrededor de 20 cm de grosor y se colocan casi verticalmente en hoyos realizados directamente en la plantación, en el suelo del vivero o, más recientemente, en bolsas de plástico.

Los principales inconvenientes que plantea el enraizamiento de estacas son:

1. El uso de madera de poda como fuente de propágulo, limita la época de propagación e implica el riesgo de multiplicar variedades no deseadas.
2. La necesidad de una gran cantidad de material vegetal, lo que repercute negativamente en la calidad del mismo.

3. El arranque de las plantas de vivero, a raíz desnuda, deja en el suelo parte de las raíces formadas, lo que implica un desequilibrio entre el sistema radicular y el aéreo con el consiguiente retraso en el crecimiento posterior.
4. El cultivo de la estaca en bolsa, limita el crecimiento de la raíz, de manera que cuando se realiza su trasplante a suelo, debe seguir formando su sistema radicular y ello limita su crecimiento durante el primer año.
5. Se acentúa la tendencia natural del olivo a crecer en forma arbustiva, lo que obliga a una costosa poda de formación.

I.1.3.2. Enraizamiento de estaquillas leñosas bajo nebulización

Este sistema se basa en la utilización de reguladores de crecimiento favorecedores de la rizogénesis, que se aplican en la base de la estaquilla. El proceso ha sido descrito y revisado por diversos autores (Caballero, 1981; Cimato y Fiorino, 1980; Caballero y del Río, 1994) y consta de tres fases:

1. Enraizamiento de estaquillas (15 cm) con dos o tres pares de hojas, obtenidas a partir de árboles cultivados para este fin. La base de la estaquilla se sumerge durante cinco segundos en una solución de AIB (2-4 g/l) y se plantan en mesas de propagación, con perlita como sustrato. Para el éxito de esta fase es necesaria la aplicación de calor basal (20-25 °C) y el mantenimiento de una alta humedad relativa (nebulización intermitente).
2. Endurecimiento del material enraizado sometiéndolo a situaciones de estrés hídrico creciente, limitando o acortando los periodos de nebulización.
3. Crianza de los plantones en maceta, a un solo tronco.

Las principales ventajas de este sistema de propagación son:

1. Obtención de gran cantidad de material a partir de una planta madre.

2. El proceso puede ser realizado en cualquier época del año.
3. Las plantas desarrollan un buen sistema radicular antes de su trasplante a campo.
4. El cultivo a un solo tronco reduce los gastos de la poda de formación.

Aunque esta técnica permite la multiplicación comercial de una gran cantidad de cultivares de olivo, Caballero y del Río (2004) señalan que los resultados obtenidos varían de un año a otro, aún para el mismo cultivar e idéntica época y condiciones ambientales.

I.1.3.3. Injerto

Este sistema de propagación sólo se ha usado en el caso de variedades de olivo que, por su baja capacidad de enraizamiento, son difíciles de propagar por estaquillado. Cuando se realiza en vivero requiere de cuatro a cinco años para la obtención de una buena planta, lo que incrementa su coste; además, se sigue dejando una buena parte del sistema radicular en el suelo del vivero y si se realiza en bolsa se produce un crecimiento limitado de las raíces. Una técnica alternativa es el injerto de taller (Fontanazza y Jacobini, 1976); en este caso, se utiliza como púa una sola yema y como patrones, estaquillas semileñosas enraizadas o plántulas de semilla de corta edad. No obstante, el uso de portainjertos de semilla es, en general, poco recomendable, por el aumento de la heterogeneidad que se produce, sobre todo en lo relativo al vigor (Hartmann *y col.*, 2011).

I.1.3.4. Propagación por semilla

Las semillas de olivo presentan dos tipos de latencia, una mecánica debida al endocarpo (Crisosto y Sutter, 1985), que puede ser eliminada por escarificación química o mecánica (Sotomayor-León y Caballero, 1990; Abu-Qaoud, 2005) y otra fisiológica debida al endospermo, que puede ser superada mediante estratificación húmeda durante 30 días a 15 °C (Lagarda *y col.*, 1983).

Existe una gran variabilidad en cuanto a porcentajes de germinación, alcanzándose los valores máximos cuando las semillas están maduras, fecha que varía según las variedades. En cualquier caso, Sotomayor-León y Caballero (1990) señalan que la maduración de la semilla se produce cuando el embrión ha alcanzado su longitud y peso seco máximos, su endospermo representa menos del 20 % del peso seco de la semilla y ésta ha perdido agua con respecto a estadíos anteriores de desarrollo.

Una vez eliminadas las latencias, se consigue una germinación media del 90 %, si el proceso se realiza a 25°C con fotoperiodo de 16 horas durante un mes. El crecimiento posterior en invernadero permite obtener una planta de 12 cm de altura, cinco o seis meses después de la germinación, periodo que puede ser reducido mediante la aplicación de condiciones de crecimiento forzado (Clavero-Ramírez y Pliego-Alfaro, 1993; Clavero-Ramírez, 1994; Lavee *y col.*, 1996; Moreno-Alías *y col.*, 2010).

La propagación a partir de semillas puede resultar recomendable tanto para la producción de patrones (Vidoy-Mercado *y col.*, 2012b) como para la evaluación de progenies en programas de mejora genética (Acebedo *y col.*, 1997).

I.1.3.5. Propagación *in vitro*

La micropropagación es una gran herramienta para la producción de plantas genéticamente homogéneas que, presenta una serie de ventajas, sobre los métodos de propagación vegetativa tradicionales, como son: la utilización de propágulos de pequeño tamaño, la independencia de la estacionalidad, la calidad sanitaria del material obtenido y la manipulación de grandes cantidades de material en un reducido espacio.

Los métodos disponibles para la propagación de plantas *in vitro* son (George, 2008):

1. Multiplicación de brotes a partir de yemas axilares.

2. Formación de brotes adventicios o embriones somáticos, bien a) directamente a partir de porciones de tejido (explantos) de la planta madre o b) indirectamente a través de tejido desorganizado (callo) originado a partir de células del explanto.

I.1.3.5.1. Micropropagación por organogénesis axilar

La multiplicación de plantas mediante la producción de brotes axilares es el método que mejor asegura la estabilidad genética de las plantas micropropagadas (George, 1993). Los cultivos se inician a partir de explantos que poseen meristemos intactos y los brotes que se forman son usados como propágulos. En las especies leñosas, la capacidad morfogénica es generalmente más elevada en el material juvenil que en el adulto (Favre y Juncker, 1987; Arrillaga *y col.*, 1991).

Material juvenil

El material juvenil muestra generalmente una elevada capacidad morfogénica y se suele utilizar como sistema modelo para el establecimiento de las condiciones de cultivo idóneas para la variedad en cuestión, así como para la obtención de explantos con los que iniciar procesos de organogénesis adventicia (Cañas y Benbadis, 1988) o embriogénesis somática (Pritsa y Voyiatzis, 1999).

El establecimiento *in vitro* de material juvenil puede realizarse a partir de embriones o de cualquier otro explanto derivado de plantas juveniles (Tabla 2A).

El cultivo *in vitro* de embriones aislados, a partir de frutos maduros de olivo, produce tasas de germinación más elevadas y la obtención de plántulas en un periodo de tiempo menor, que cuando se cultiva la semilla entera (Cañas *y col.*, 1987). Estos autores también señalaron que las tasas de germinación son dependientes del cultivar y que se obtenían mejores resultados cuando se utilizaron frutos procedentes del mismo año de su

recolección, aunque las semillas pueden ser almacenadas a 4 ° C durante varios meses sin perder su capacidad germinativa.

Kiani *y col.*, (2006) estudiaron las tasas de germinación *in vitro* de embriones aislados a partir de semillas de tres cultivares, recolectadas en tres épocas diferentes (mediados de Agosto, Septiembre y Octubre); los porcentajes de germinación obtenidos fueron superiores para las semillas recolectadas durante el primer periodo, oscilando entre el 85 % y 90 % y observándose en todos los casos una reducción de estos valores en los periodos de recolección posteriores. Clavero-Ramírez (1994) señala que, los embriones aislados germinaban en medio sin reguladores de crecimiento y que la incubación de los cultivos en oscuridad y a 13°C durante dos semanas favorecía la germinación de los mismos.

Las formulaciones minerales usadas en las fases de establecimiento y proliferación (Tabla 2), han sido: 1) la OM (olive medium), formulada por Rugini (1984) tras analizar la composición mineral de los ápices de brotes vigorosos de árboles de campo y de embriones cigóticos maduros; este medio, rico en Ca, Mg, S, P, B, Cu y Zn, tiene una relación Ca/N (1:11) y añade glutamina como fuente de nitrógeno reducido; y 2) la MS (Murashige y Skoog, 1962), con un alto contenido en nitrógeno libre y una relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (1,9:1). La primera de ellas se ha utilizado en los cvs. Bical (Cañas *y col.*, 1987) y “Arbequina” (González-Padilla *y col.*, 2009) entre otros; mientras que la formulación MS se ha usado en los cvs. Arbequina y “Chetoui” (Acebedo *y col.*, 1997) y “Dezful” (Kiani *y col.*, 2006).

En cuanto a los hidratos de carbono, se han utilizado tanto la sacarosa (Acebedo *y col.*, 1997; González-Padilla *y col.*, 2009) como el manitol (Chaari-Rkhis *y col.*, 1999), aunque éste último producía un mayor crecimiento de las plántulas (aumento de la longitud de los brotes, número de hojas formadas y ruptura de la dominancia apical) cuando se utiliza en el cultivo de embriones cigóticos del cv. Manzanillo (García *y col.*, 2002c).

La zeatina, en concentraciones que oscilan entre 1- 4 mg/l (González-Padilla *y col.*, 2009) es la citoquinina más usada; en menor medida se ha utilizado BAP combinada con ANA (Cañas *y col.*, 1987) o con KIN (Chaaris-Rkhis *y col.*, 1999) y 2iP (Cañas y Benbadis, 1988). El agente gelificante usado mayoritariamente es el agar a una concentración 0,6-0,8 %.

La fase de inducción de los primordios radiculares puede ser realizada mediante el cultivo de los brotes durante 7-14 días en un medio mínimo ($\frac{1}{2}$ OM) con auxina y posterior transferencia a medio sin reguladores de crecimiento. El AIB es la auxina más utilizada y a una concentración de 1 mg/l induce altos porcentaje de enraizamiento (alrededor del 90 %) en material juvenil de diferentes cultivares (Cañas *y col.*, 1987) (Tabla 2A).

La aplicación de un pulso eléctrico (250-2500 V) en la base de la microestaquilla en una solución de AIB (González-Padilla *y col.*, 2009) y el cultivo posterior de los brotes en medios sin reguladores de crecimiento, produjo un aumento de los porcentajes de enraizamiento en material juvenil de los cultivares Arbequina, Gordal y Manzanillo.

Material adulto

Preparación de la planta madre y establecimiento de los cultivos.

Mientras que el establecimiento *in vitro* de explantos a partir de plantas juveniles no ofrece demasiadas dificultades, cuando se parte de árboles adultos se presentan problemas de oxidación, contaminación, necrosis y falta de reactividad (Rugini y Baldoni, 2005); en este último caso, es una práctica común la aplicación de diferentes técnicas de rejuvenecimiento, tanto *ex vitro* como *in vitro*, para restaurar la competencia; así, se ha utilizado: i) el crecimiento forzado a partir de segmentos de tallo plantados en vermiculita (Rama y Pontikis, 1990), ii) injerto sobre plántulas juveniles (García-Férriz *y col.*, 2001), iii) enraizamiento de estaquillas procedentes del árbol madre (Grigoriadou *y col.*, 2002), iv) podas severas

(Roussos y Pontikis, 2002; Peixe *y col.*, 2007) y v) microinjerto *in vitro* (Revilla *y col.*, 1996), entre otros.

Para eliminar los problemas de oxidación de los explantos y el efecto de la acumulación de compuestos fenólicos en los medios de cultivo, se han propuesto diversas estrategias como mantener los explantos sumergidos en agua destilada durante tres horas antes de su establecimiento *in vitro* e incubarlos posteriormente en oscuridad durante 7 días (Seyhan y Özzambak, 1994) ó la adición de 0,2 g/l de polivinilpirrolidona a los medios de cultivo (Ramzan-Kan *y col.*, 2002).

Como podemos apreciar en la Tabla 2B, el explanto generalmente utilizado para el establecimiento *in vitro* del material adulto es la sección nodal, procedente de brotes en crecimiento activo recolectados de los árboles madre inmediatamente después de su brotación (Rugini, 1984); previamente a su recolección es recomendable fumigar con una solución fungicida (Varlaro *y col.*, 2009).

Cañas *y col.*, (1992) señalaron que el cultivo de ápices caulinares no era viable debido a la rápida oxidación que experimentaban tras su recolección, incluso con el empleo de sustancias antioxidantes, aunque éstos problemas desaparecían cuando los explantos provenían de brotes previamente establecidos *in vitro*. Las posibles causas de esta diferencia de comportamiento, fueron señaladas por Roussos y Pontikis (2001) tras un estudio en el que analizaron el contenido de diversos compuestos fenólicos en ápices y secciones nodales recolectados a partir de árboles del cv. Koroneiki, mantenidos en campo e invernadero, y relacionaron estos valores con su potencial de oxidación cuando se establecían *in vitro*. Los ápices de ambos tipos de materiales mostraron mayores cantidades de fenoles y mayores porcentajes de oxidación que las secciones nodales; por otra parte, al evaluar el efecto de los árboles madre, encontraron que los explantos procedentes de plantas de invernadero mostraban mayores porcentajes de supervivencia y menores concentraciones de compuestos

fenólicos que los procedentes de árboles de campo. También determinaron que mientras que las concentraciones de luteolina-7-glucósido, luteolina y quercitina tienen una relación positiva con la oxidación, el contenido en oleuropeína, ácido clorogénico y rutina no tiene ninguna relevancia en este proceso.

Proliferación del material vegetal

El cultivo *in vitro* del olivo es muy dependiente de la composición del medio nutritivo (Cozza *y col.*, 1997), lo que implica que, para cada cultivar, tengan que ser ajustadas tanto las concentraciones como el tipo de sales minerales y reguladores de crecimiento (Tabla 2B). Las formulaciones minerales utilizadas mayoritariamente en la fase de inicio y proliferación han sido OM (Rugini, 1984), seguida por MS (Murashige y Skoog, 1962) y en menor medida DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) y WPM (Lloyd y McCow, 1980). Así, Grigoriadou *y col.* (2002) observaron que, para el cv. Chondrolia Chalkidikis, el medio WPM era más adecuado que los medios OM y QL (Quoirin y Lepoivre, 1977) dando como resultado un mejor aspecto de los brotes obtenidos. En el cv. Picholine Marocaine, Brhadda *y col.* (2003) llegaron a la conclusión de que en la fase de establecimiento, los medios $\frac{1}{2}$ MS y OM eran igual de efectivos, con unas tasas de brotación del 91,6 y 90,9 %, pero el medio OM se distinguió posteriormente por permitir un mayor crecimiento de los brotes, sin síntomas de hiperhidricidad. Por su parte, Roussos y Pontikis (2002) señalaron que la formulación mineral DWK modificada era la más adecuada para la propagación del cv. Koroneiki.

En cuanto a la fuente de hidratos de carbono, se ha utilizado tanto la sacarosa como el manitol aunque sus efectos dependen del cultivar; así, Leva *y col.* (1994; 2012) comprobaron que el crecimiento *in vitro* de los explantos del cv. Maurino, era dependiente de la concentración de sacarosa, determinando el óptimo en 34 g/l (longitud de los brotes 3,9 cm), sin embargo, su sustitución por manitol a la misma concentración, produjo una mayor elongación (4,6 cm); además, al estudiar la evolución de los explantos durante cuatro

subcultivos sucesivos, observaron que la exposición a elevadas concentraciones de sacarosa durante periodos prolongados reducía el metabolismo de los tejidos, mientras que el empleo de manitol, a largo plazo, incrementaba las tasas de proliferación así como la calidad y uniformidad de los explantos. Sin embargo, en el cv. Meski, Chaari *y col.* (2002) obtuvieron 9,08 brotes/explanto con una longitud media de 11,97 cm cuando utilizaban un medio con la formulación mineral OM suplementado con 30 g/l de glucosa; estos valores disminuían si el mismo medio era suplementado con otros carbohidratos (30 g/l manitol; 30 g/l sacarosa ó 14 g/l manitol + 8 g/l sacarosa + 8 g/l glucosa).

En relación a los reguladores de crecimiento, la zeatina (Z) y el ribósido de zeatina (RZ), son las citoquininas que mejores resultados han dado en el cultivo *in vitro* de esta especie (Rugini, 1984); las concentraciones utilizadas oscilan entre 2-10 mg/l (Rugini y Fontanazza, 1981; Bartolini *y col.*, 1990; Rama y Pontikis, 1990; Rugini, 1992; Leva *y col.*, 1994; Carter, 1997; Cozza *y col.*, 1997; Briccoli-Bati *y col.*, 1999, 2002; Chaari *y col.*, 2002; Grigoriadou *y col.*, 2002; Lambardi *y col.*, 2002; Leva *y col.*, 2002; Roussos y Pontikis, 2002; Brhadda *y col.*, 2003; Grigoriadou *y col.*, 2003; Leva *y col.*, 2003; Sghir *y col.*, 2005; Briccoli-Bati *y col.*, 2006; Binet *y col.*, 2007; Grigoriadou *y col.*, 2007; Donini *y col.*, 2008 a; Brito *y col.*, 2009; Leva 2009; Chaari-Rkhis *y col.*, 2011). El empleo de esta citoquinina natural, encarece en gran medida el proceso de micropropagación, por lo que la tendencia ha sido, bien disminuir su concentración y complementar con otros reguladores de crecimiento o intentar su sustitución, con resultados variables dependiendo de cada cultivar. Así, la presencia de dikegulac (2,3:4,6-Bis-*O*-(methylethylidene)- α -L-xylo-2-hexulofuranosonic acid) - un regulador de crecimiento que rompe la dominancia apical de los brotes - incorporado al medio de cultivo junto con 1 mg/l de zeatina, produjo un aumento en la producción de brotes *in vitro* en los cvs. Canino, Frantoio y Moraiolo (1,4 – 2,5; 1,3-2,7 y 1,7-3,1 brotes/explanto cuando el medio lleva solo Z frente a Z+ dikegulac, respectivamente),

pero no en los cvs. Rosciola y Piantone di Moiano (Mendoza-de Gyves *y col.*, 2008). Por otra parte, Ansar *y col.* (2009a) observaron que las tasas de proliferación *in vitro* del cv. Moraiolo aumentaban cuando se añadía BAP (0.5 mg/l) al medio con Z (3mg/l), obteniéndose 2,05 y 0,69 brotes/cultivo de una longitud de 4,7 y 2,82 cm, respectivamente.

La zeatina, suplementada sólo con ácido giberélico, ha dado resultados contradictorios, así en el cv. Chondrolia Chalkidikis (Grigoriadou *y col.*, 2002) se observó un aumento de 4,2 a 7 en la tasa de proliferación cuando se utilizaban conjuntamente Z (4mg/l) y GA₃ (3 mg/l); por el contrario en el cv. Koroneiki, Donini *y col.* (2008) observaron que la adición de GA₃ al medio de cultivo, producía un descenso de la tasa de supervivencia obtenida con solo Z (1-4 mg/l), 53,5 % - 82,57 %, respectivamente.

La sustitución de Z por otras citoquininas, con suplemento de auxinas o ácido giberélico, se realizó en el cv. Kalamón, así la combinación de BAP (1mg/l) + AIB (1 mg/l) + GA₃ (0,1 mg/l) produjo tasas de brotación del 93 % con 4,1 brotes/ explanto de 10,4 mm de longitud media; tras dos subcultivos, el número de nuevos brotes/explanto aumentó hasta 9,6 (Dimassi-Theriou, 1994). Por su parte, Seyhan y Özzambak (1994) obtuvieron 6 brotes/explanto con una longitud media de 1,35 cm y 7 brotes/explanto de 1,41 cm en los cvs. Domat y Memecik, respectivamente, cuando se utilizaba BAP (0,5 mg/l) suplementada con ANA (0,05 mg/l). Concentraciones superiores de BAP producían mayor número de brotes axilares pero se apreciaba una disminución considerable de la longitud de los mismos.

Peixe *y col.* (2007) propusieron la sustitución de zeatina por leche de coco (50 ml /l) y BAP (2 mg/l) para la multiplicación del cv. Galega Vulgar, obteniendo una media de 3,4 explantos/cultivo; sin embargo, el uso de este mismo medio en los cvs. Arbequina y Picual (Vidoy-Mercado *y col.*, 2012a) no dio buenos resultados, observándose, tras cuatro subcultivos sucesivos, una alta incidencia de necrosis (45 % - 44 %) y aparición de contaminación endógena (55 %- 50 %).

En el cv. Rowghani, las mayores tasas de proliferación (1,8 brotes/explanto) se alcanzaron cuando se utilizaba 2iP (4mg/l); la combinación de 2iP (1 mg/l) con BAP (1 mg/l) disminuyó significativamente la tasa de proliferación (0,95 brotes/explanto), pero también se observó un marcado efecto de la combinación sales minerales-reguladores de crecimiento porque estas diferencias fueron apreciadas cuando se utilizaban las sales DKW, pero no con las OM (Peyvandi *y col.*, 2009). En el cv. Nebbiara, Zacchini y de Agazio (2004) observaron que, en las mismas condiciones de cultivo, la eliminación de la yema apical de los explantos antes de cada subcultivo, producía un aumento significativo de las tasas de proliferación y de la longitud de los brotes desarrollados.

Enraizamiento de los brotes

Rugini y Fedeli (1990) señalaron que se podían obtener elevados porcentajes de enraizamiento tras mantener los cultivos proliferando *in vitro* durante cierto tiempo, aunque el olivo presenta resultados variables incluso con el empleo de la misma técnica. Durante la fase de enraizamiento, los medios de cultivo utilizados, suelen contener bajas concentraciones de sales minerales; así las formulaciones más utilizadas han sido ½ macros Knop + micros Heller (Rugini y Fontanazza, 1981; Rugini, 1984); ½ DKW (Revilla *y col.*, 1996); ½ SH (Briccoli-Bati *y col.*, 1999); ½ OM (Chaari *y col.*, 2002); WPM (Roussos y Pontikis, 2002); ½ MS (Zucherelli y Zucherelli, 2002) y ½ BN (Mendoza-de Gyves *y col.*, 2008).

El hidrato de carbono más ampliamente utilizado es la sacarosa, con concentraciones que oscilan entre 15 g/l (Ansar *y col.*, 2009), 20 g/l (Grigoriadou *y col.*, 2002; Sghir *y col.*, 2005) y 30 g/l (Rugini *y col.*, 1984; Revilla *y col.*, 1996; Ozkaya *y col.*, 2003); también se ha utilizado el manitol a concentraciones de 18 g/l (Farahani *y col.*, 2008), 20 g/l (Roussos y Pontikis, 2002; Vidoy *y col.*, 2012b), 30 g/l (Chaari-Rkhis *y col.*, 1999) y 36 g/l (Zacchini y de Agazio, 2004) (Tabla 2B).

La fase de inducción de los primordios radicales puede ser realizada mediante el cultivo durante un periodo de tiempo determinado- 5 días (Sghir *y col.*, 2005) ó 4 semanas (Zachini y de Agazio, 2004) - en un medio con auxinas o por inmersión de la base de la microestaquilla, durante 8-10 segundos, en una solución estéril de AIB (1-3 g/l) (Chaari *y col.*, 2002; Peixe *y col.*, 2007); posteriormente, los explantos son cultivados en medios sin reguladores.

En todos los casos estudiados (Tabla 2B) se han utilizado medios de cultivo sólidos con agar (0,6 % - 0,8 %).

Para mejorar las tasas de enraizamiento del material adulto se han propuesto varias estrategias:

1. Etiolación de los cultivos. Rugini *y col.*, (1987) proponen la etiolación basal de los brotes, mediante la adición al medio de cultivo de tintas, gránulos negros de policarbonato o carbón activado; estos autores señalan, que si bien este método no incrementa la tasa de enraizamiento, si previene la senescencia que aparece en estas condiciones y que podría afectar posteriormente al trasplante de la plántula a las condiciones *ex vitro*. Mencuccini (2003) observó, en los cvs. Frantoio, Dolce Agogia y Moraiolo, que la capacidad de enraizamiento *in vitro* de estos cultivares presentaba variaciones estacionales, semejantes a las observadas cuando se enraizaban estaquillas *ex vitro*, obteniéndose porcentajes del 12-28 % y del 56-96 % en Enero y en el periodo de Mayo-Septiembre, respectivamente; sin embargo tras el oscurecimiento total de los medios de cultivo, mediante la adición de tinta negra (100-200 mg/l), se evitaba este efecto y los cultivos podían ser enraizados en cualquier época del año. En los cvs. Arbequina (Revilla *y col.*, 1996), Koroneiki (Roussos y Pontikis, 2002), Nebbiara (Zacchini y de Agazio, 2004), Luzques y Hazouia (Sghir *y col.*, 2005), se

propone la incubación en oscuridad de los cultivos durante los 5-7 primeros días de la fase de enraizamiento

2. Adición de diferentes sustancias. En presencia de auxinas, la adición de poliaminas a los medios de cultivo, en particular putrescina, favorece el proceso de enraizamiento aumentando el número y la longitud de las raíces (Rugini y Fedeli, 1990). Así, en el cv. Chondrolia Chalkidikis, se obtuvieron porcentajes de enraizamiento del 70 % y 2,3 raíces/explanto cuando se usaba una combinación de AIB (2,5 mg/l) y ANA (0,5 mg/l), aunque se observaron problemas de abscisión de ápices y hojas de los brotes enraizados; con la adición de putrescina (2,65 mg/l) al medio de enraizamiento, Grigoriadou y col. (2002; 2003) evitaron estos problemas y además los porcentajes de enraizamiento se elevaron hasta el 93 %. El empleo de extracto crudo de olivo obtenido a partir de esferoblastos, junto con auxinas, permitió elevar el porcentaje de enraizamiento del cv. Kalamón hasta el 82,5 % frente al 65 % que se obtenía con la utilización exclusivamente de ANA (2 mg/l) (Rama y Pontikis, 1990); en el cv. Koroneiki los porcentajes de enraizamiento alcanzados fueron del 76 % cuando se utilizaron AIB + ANA (1:1 mg/l) y del 87 % cuando se añadieron 50 mg/l de este extracto crudo (Roussos y Pontikis, 2002).
3. Infección artificial con bacterias (*Agrobacterium*, *Pseudomonas*). Explantos del cv. Moraiolo, infectados o no infectados con *A. rhizogenes*, fueron enraizados en un mismo medio basal, suplementado con 2,65 mg/l de putrescina; los resultados obtenidos mostraron que la infección aumentó el porcentaje de enraizamiento hasta el 70 % frente al 40 % obtenido cuando se utilizaba sólo putrescina (Rugini, 1992). En el cv. Rogwani, los cultivos inoculados con *P. fluorescens* duplicaban el número y la longitud de las raíces desarrolladas con respecto a los obtenidos sólo con AIB (0,1-0,3 mg/l) (Peyvandi y col., 2010). Por contrario en el el cv. Koroneiki, la infección in

vitro de los explantos con *P. savastanoi* pv. *savastanoi* inhibió el proceso de rizogénesis, tanto en presencia como en ausencia de auxinas (Roussos y Pontikis, 2002).

I.1.3.5.2. Micropropagación por organogénesis adventicia

Material juvenil.

Cañas y Benbadis (1988) indujeron callo a partir de fragmentos de cotiledón de semillas de los cvs. Tanche y Cupressino, en un medio OM modificado suplementado con 2 mg/l de AIB y 0,2-0,5 mg/l de RZ o 2-iP; la mayor frecuencia de regeneración de brotes se observó con el empleo de 2-iP, en ausencia o con muy baja concentración de auxina, mejorando la respuesta a medida que los explantos se encontraban más próximos al eje embrionario. Los brotes regenerados fueron enraizados tras un tratamiento con AIB (1mg/l) y aclimatados en invernadero. Estos autores observaron la aparición de cierta variabilidad morfológica, relacionada con la filotaxia, entre las plantas regeneradas al compararlas con las plantas provenientes de semilla.

Material adulto.

Raman y col. (2002) indujeron callo a partir de ápices del cv. Pantaloon, en medio OM suplementado con 2-iP (0,5 mg/l) y cefotaxima (150 mg/l) consiguiendo, tras dos subcultivos sucesivos, la formación de hojas expandidas, aunque no lograron la regeneración de plantas completas.

Rugini y Caricato (1995) obtuvieron brotes adventicios a partir de peciolo de brotes establecidos *in vitro* de los cultivares italianos Canino y Moraiolo. El medio utilizado incluía las sales MS (0,5x), TDZ (30µM) y ANA (0,54 µM). La alta capacidad organogénica de los peciolo ha sido confirmada por Mazri y col. (2013) en el cv. marroquí Dahbia.

I.1.3.5.3. Micropropagación por embriogénesis somática

Material juvenil

La embriogénesis somática (ES), es la regeneración de una estructura bipolar (embrión) a partir de una célula somática.

Este proceso se ha observado en algunos cultivares de olivo utilizando explantos juveniles; así, Rugini (1988) obtuvo callo embriogénico a partir de embriones inmaduros de 75 días. La mayoría de los explantos utilizados (70 %) regeneraban embriones somáticos sin fase intermedia de callo y el resto lo hacía tras la formación de callo embriogénico. Por su parte, Leva y Petruccelli (1995) y Leitao y Fevereiro (1998) utilizaron embriones maduros. Otros tipos de explanto utilizados han sido cotiledones (Pritsa y Voyiatzis, 1999; Trabelsi y col., 2003; Leva y Petruccelli, 2007); discos de hoja, peciolo e hipocótilo, de semillas germinadas *in vitro* (Mencuccini y Rugini, 1993; Shibli y col., 2001). Orinos y Mitrakos (1991) y Mitrakos y col., (1992) recomiendan la utilización de radículas aisladas de embriones maduros, en lugar de segmentos de cotiledón, tanto en olivos silvestres como cultivados. Márquez y col., (1999) y Cerezo y col., (2011) han corroborado estas observaciones en los cvs. Picual, Manzanillo y Arbequina. Recientemente, Mazri y col. (2011) señalaron que, en las mismas condiciones de cultivo y para el mismo cultivar, la capacidad embriogénica depende del tipo de explanto utilizado; así, para el cv. Dabhia, el callo inducido a partir de ovarios y estambres de flores no polinizadas, hojas y peciolo de plantas micropropagadas, o radículas y cotiledones de embriones cigóticos, presentaba células con características embriogénicas, mientras que la conversión de éstas en embriones somáticos, sólo se producía cuando se utilizaban explantos provenientes directamente del embrión.

La regeneración exclusivamente por vía indirecta ha sido observada por Rugini (1995) a partir de callo derivado de la raíz principal de semillas germinadas *in vitro*. Para

obtenerlo, cuando las plantas tenían 2-3 nudos, se hacían heridas superficiales en la raíz principal y se colocaban las plantas en posición horizontal hasta que se formaba callo. Por su parte, Shibli *y col.*, (2001) también han obtenido mejores resultados en la formación de callo embriogénico al utilizar segmentos de raíces en lugar de otros explantos como secciones de hoja, peciolo o segmentos de hipocótilo.

En cuanto a la composición de los medios de cultivo, la utilización de auxinas y citoquininas en la inducción de embriogénesis somática depende del tipo de explanto utilizado. Orinos y Mitrakos (1991) y Mitrakos *y col.*, (1992) utilizaron el medio OMc (Cañas y Benbadis, 1988), modificado con un suplemento de AIB (5 mg/l) y 2iP (0,6 mg/l) para la inducción de callo embriogénico que posteriormente se cultivó en el mismo medio pero con baja o nula concentración de auxina, para la diferenciación de los embriones. Estas condiciones también fueron adecuadas para los cultivares cvs. Picual, Manzanillo y Arbequina (Márquez *y col.*, 1999; Cerezo *y col.*, 2011).

La sacarosa es usada normalmente a 2-3 % en el cultivo de los callos embriogénicos (Orinos y Mitrakos, 1991; Mitrakos *y col.*, 1992). Shibli *y col.*, (2001) estudiaron el efecto de los azúcares sobre la inducción llegando a la conclusión que los mejores resultados se obtenían con la incorporación de 36 g/l de sacarosa.

La maduración de embriones somáticos se ha visto favorecida por el cultivo en medio ECO (olive cyclic embryogenesis medium) sin hormonas y por el uso de membranas semipermeables de acetato de celulosa, que producen una desecación controlada del embrión (Cerezo *y col.*, 2011).

Material adulto

Rugini y Caricato (1995) describieron, en los cultivares Canino y Moraiolo, un sistema cíclico de embriogénesis somática a partir de tejidos maduros, en el que los embriones primarios se originaban a partir de estructuras morfogénicas derivadas de los

peciolos de los brotes adventicios obtenidos en medio con TDZ (30 μ M) y ANA (0,5 μ M); el rejuvenecimiento adquirido por los brotes regenerados, directamente de los tejidos del peciolo o indirectamente a través del callo del peciolo era determinante para el proceso de embriogénesis; las plántulas regeneradas de esta manera, eran morfológicamente similares a las obtenidas a partir de yemas axilares. El medio utilizado fue OMe suplementado con 0,5 μ M 2iP, 0,44 μ M BAP, 0,25 μ M AIB y 0,42 μ M cefotaxima, y el proceso cíclico pudo ser mantenido durante dos años incubando los cultivos en oscuridad.

Trabelsi y col. (2011) obtuvieron embriones globulares a partir de cultivos en suspensión derivados de callo obtenido de hojas maduras del cv. Chetoui. Así mismo, en el cv. Dahbia, Mazri y col. (2013) obtuvieron embriones bien diferenciados a partir de explantos de peciolo; estos embriones mostraban una alta tasa de proliferación en medio ECO suplementado con reguladores de crecimiento (Cerezo y col., 2011), aunque no se ha testado la capacidad de germinación de los mismos.

En *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *maderensis* (Lopes y col., 2009) y para *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*, (Capelo y col., 2010), obtuvieron embriones somáticos a partir de peciolos y discos de hoja, sin que fuese necesario un proceso de rejuvenecimiento previo *in vitro*, aunque estos autores no han conseguido aún la conversión de los embriones en plántulas.

I.1.3.5.4. Características de las plantas micropropagadas

Las plántulas obtenidas tras el proceso de micropropagación poseen una cutícula muy fina, baja densidad estomática y una sola capa de parénquima en empalizada (Cozza y col., 1997), por lo que es necesario llevar a cabo una etapa de adaptación, bajo condiciones de alta humedad relativa, para lograr plantas con un buen sistema radicular y aéreo antes ser trasplantadas a campo.

La inoculación con micorrizas arbusculares del género *Glomus*, durante el periodo de aclimatación, de plántulas del ecotipo 05300 (Binet *y col.*, 2007) [una selección que se ha originado en Laragne (France) a partir de una plantación que ha sobrevivido a la congelación en varios momentos del siglo XX y que se localiza en una zona geográfica situada al límite climático del cultivo del olivo: 44.32 °N/5.82°E] y del cv. Aglandau (Meddad-Hamza *y col.*, 2010), incrementó de forma significativa los porcentajes de supervivencia y el posterior desarrollo y crecimiento de las plantas, debido al mayor desarrollo del sistema radicular de las plantas micorrizadas con respecto a las que no lo estaban.

Además de estas alteraciones morfológicas, el cultivo *in vitro* puede generar variabilidad genética en las plantas micropropagadas; estos cambios se han englobado en la denominación genérica de variaciones somaclonales (Larkin y Scowcroft, 1981) y son fenómenos de naturaleza no predecible, que pueden ser genéticos o epigenéticos (Jain, 2001). Entre las posibles causas de las variaciones observadas podemos citar tanto factores intrínsecos, genotipo, edad de la planta madre, tipo de explanto, grado de organización meristemática del explanto original y nivel de ploidía inicial (Henry *y col.*, 1998), como factores de estrés (Joyce *y col.*, 2003), que se producen en el explanto como consecuencia de la composición del medio y el ambiente de cultivo: desequilibrios nutricionales y hormonales; acumulación de etileno y calentamiento, si el cultivo se realiza en recipientes herméticos, o estrés hídrico por desecación y estrés salino por concentración de sales, cuando el cultivo se realiza en recipientes ventilados.

En los cultivares Zard y Rowghani (Yari *y col.*, 2011a; Farahani *y col.*, 2011b) y Dezful (Peyvandi *y col.*, 2009; Yari *y col.*, 2011b; Farahani *y col.*, 2011c) se han detectado diferencias morfológicas entre las plantas micropropagadas por organogénesis axilar, tras permanecer durante varios meses en condiciones *in vitro*; estas diferencias estaban relacionadas con el número y forma de las hojas, longitud de los entrenudos, número y

longitud de los brotes axilares y capacidad de enraizamiento; dichas diferencias fueron detectadas también a nivel genético, de manera que ninguna de las plantas analizadas fue exactamente igual, en relación al patrón de bandas obtenido mediante RAPDs, a la planta madre original y estas diferencias eran mayores a medida que se incrementaba el número de subcultivos; por otra parte, el análisis de valor “C-value” demostró que las diferencias observadas eran debidas a cambios en la secuencia de nucleótidos y no a la variación en la cantidad de ADN de las células. Por el contrario, en los cultivares Arbequina, Picual y Empeltre (García-Férriz *y col.*, 2001); Maurino (Leva *y col.*, 2003; Leva y Petrucchelli, 2012) y Arbequina (Vidoy-Mercado *y col.*, 2012b) no se han detectado variaciones morfológicas ni genéticas entre el árbol madre y las plantas micropropagadas. Igualmente, en *O. maderensis* y *O. europaea* ssp. *Europaea* var. *Sylvestris* no se encontraron diferencias en los niveles de ploidía ni en las secuencias génicas analizadas mediante SSR entre la planta madre y las plantas micropropagadas de estos genotipos (Brito *y col.*, 2010). Asimismo, diversos autores han señalado que las plantas micropropagadas no muestran caracteres de juvenilidad y comienzan a florecer al mismo tiempo que las plantas obtenidas por estaquillado (Briccoli-Bati *y col.*, 1999, 2002 y 2006; Leva *y col.*, 2002; García-Férriz *y col.*, 2003; Brito *y col.*, 2009; Leva, 2009). Por su parte, Cañas y Benbadis (1988), describieron la aparición de cierta variabilidad morfológica, relacionada con la filotaxia, entre las plantas regeneradas por organogénesis adventicia, cuando se comparan con las plantas provenientes de semilla.

En embriones somáticos de olivo, Bradai (2009) observó una disminución de la capacidad de germinación asociada con la edad del cultivo. Asimismo, este autor ha observado una clara influencia del genotipo en la aparición de variación somaclonal.

I.1.3.6. Estado actual de la propagación del olivo

Según datos proporcionados por el COI (2012b), la producción anual de olivos es de, aproximadamente, 40 millones de árboles, con 32 millones en el área mediterránea y 8 millones en el resto del mundo. En cuanto a la técnica empleada, Fabbri *y col.* (2004) ofrecían los siguientes datos: unos 28 millones de árboles se obtienen por estaquillado semileñoso bajo nebulización; 7 millones por injerto y 5 millones a partir de grandes propágulos.

La micropropagación comercial del olivo no está muy extendida, debido a que determinados cultivares, de gran importancia económica i.e. 'Frantoio', 'Kalamata', 'Leccino', 'Picholine', 'Pendolino', 'Gordal Sevillana' o 'Picual', son difíciles de establecer *in vitro* (Zuccherelli y Zuccherelli, 2002), así como a la dependencia del uso de zeatina para la inducción y elongación de los brotes axilares, lo que encarece de manera excesiva los costes de producción (Rugini y Baldoni, 2005). No obstante, la homogeneidad del material obtenido, las elevadas tasas de multiplicación, la obtención de plantas en buen estado sanitario y la posibilidad de controlar el proceso de micorrización hacen que este sistema de propagación esté resultando competitivo para algunos cultivares (García-Férriz e Ibarra-Huesa, 2005).

Tabla 2.- Micropropagación de material juvenil (A) y adulto (B) de olivo, mediante brotación de yemas axilares.

A) Material juvenil								
Cultivar	Fuente de explantos	Explanto inicial	Medios de cultivo				Respuesta Morfogenética	Autores
			Formulación Mineral	Hidratos Carbono	Reguladores de crecimiento	Agente gelificante		
Arbequina	Semilla	Embriones	MS mod	Sac	No	*	Plántulas	Acebedo y col., 1997
	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	OM	Sac	Z	Agar	Brotes	González-Padilla y col., 2009
			OM mod	Sac	AIB	Agar	Raíces	
Bical	Semilla	Embriones	OM mod	*	BAP +ANA	*	Plántulas	Cañas y col., 1987
Cañivano	Semilla	Embriones	MS mod	Sac	No	*	Plántulas	Acebedo y col., 1997
Chetoui	Semilla	Embriones	MS mod	Sac	No	*	Plántulas	Acebedo y col., 1997
Chemlali de Sfax	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	MS mod	Man	Z + Kin	Agar	Brotes	Chaari-Rkhis y col., 1999
Cornezuelo	Semilla	Embriones	OM mod	*	BAP +ANA	*	Plántulas	Cañas y col., 1987
Cornezuelo de Jaén	Semilla	Embriones	MS mod	Sac	No	*	Plántulas	Acebedo y col., 1997
Dezful	Semillas	Embriones	MS mod	*	No	Agar	Plántulas	Kiani y col., 2006
Galego	Semilla	Embriones	MS mod	Sac	No	*	Plántulas	Acebedo y col., 1997

INTRODUCCIÓN

Gordal Sevillana	Semilla	Embriones	OM mod	*	BAP +ANA	*	Plántulas	Cañas y <i>col.</i> , 1987
	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	OM	Sac	Z	Agar	Brotes	González-Padilla y <i>col.</i> , 2009
			OM mod	Sac	AIB	Agar	Raíces	
Jabaluna	Semilla	Embriones	MS mod	Sac	No	*	Plántulas	Acebedo y <i>col.</i> , 1997
Lechín	Semilla	Embriones	OM mod	*	BAP +ANA	*	Plántulas	Cañas y <i>col.</i> , 1987
Lechín de Granada	Semilla	Embriones	MS mod	Sac	No	*	Plántulas	Acebedo y <i>col.</i> , 1997
Lechín de Sevilla	Semilla	Embriones	MS mod	Sac	No	*	Plántulas	Acebedo y <i>col.</i> , 1997
Manzanillo	Semilla	Embriones	OM mod	*	BAP +ANA	*	Plántulas	Cañas y <i>col.</i> , 1987
	Semilla	Embriones	OM mod	Man	No	*	Plántulas	García y <i>col.</i> , 2002c
	Semilla	Embriones	MS mod	*	No	Agar	Plántulas	Kiani y <i>col.</i> , 2006
Manzanillo de Jaén	Semilla	Embriones	MS mod	Sac	No	*	Plántulas	Acebedo y <i>col.</i> , 1997
Manzanilla de Sevilla	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	OM	Sac	Z	Agar	Brotes	González-Padilla y <i>col.</i> , 2009
			OM mod	Sac	AIB	Agar	Raíces	
Marteño	Semilla	Embriones	OM mod	*	BAP +ANA	*	Plántulas	Cañas y <i>col.</i> , 1987

Picual	Semilla	Embriones	OM mod	*	BAP +ANA	*	Plántulas	Cañas y <i>col.</i> , 1987
	Semilla	Fragmentos de cotiledón	OM mod	*	2iP	Agar	Brotes	Cañas y Benbadis., 1988
			OM mod	*	AIB	Agar	Raíces	
	Semilla	Embriones	MS mod	Sac	No	*	Plántulas	Acebedo y <i>col.</i> , 1997
Rowghani	Semillas	Embriones	OM	*	2iP	Agar	Plántulas	Farahani y <i>col.</i> , 2008
Tanche	Semilla	Fragmentos de cotiledón	OM mod	*	2iP	Agar	Brotes	Cañas y Benbadis., 1988
			OM mod	*	AIB	Agar	Raíces	
Zard	Semillas	Embriones	MS mod	*	No	Agar	Plántulas	Kiani y <i>col.</i> , 2006

^{1.-} Material proveniente de stocks en proliferación de material juvenil, previamente establecido *in vitro*.

SN.- sección nodal.

*- No especificado.

B) Material adulto								
Cultivar	Fuente de explantos	Explanto inicial	Medios de cultivo				Respuesta	Autores
			Formulación mineral	Hidratos Carbono	Reguladores de crecimiento	Agente gelificante	Morfogenética	
Aglandau	Estaquillas enraizadas	SN	OM mod	Sac	Z	*	Brotes	Binet <i>y col.</i> , 2007
			OM	*	AIB	*	Raíces	
Amellau	Estaquillas enraizadas	SN	OM	Sac	RZ	*	Brotes	Sghir <i>y col.</i> , 2005
			OM	*	ANA/AIB	*	Raíces	
Arbequina	Estaquillas enraizadas	SN	DKW	Sac	BAP + AIB	Agar	Brotes	Revilla <i>y col.</i> , 1996
			DKW mod	Sac	AIB	Agar	Raíces	
	Yemas adultas injertadas en acebuche	SN	OM	*	BAP+TDZ	*	Brotes	García-Férriz <i>y col.</i> , 2001; 2002; 2003
	Arboles invernadero	SN	MS	*	Z	Agar	Brotes	Donini <i>y col.</i> , 2008a
	Árbol adulto severamente podado	SN	DKW mod	Man	RZ	Agar	Brotes	Vidoy-Mercado <i>y col.</i> , 2012a
Ascolano	Arboles de invernadero	SN	OM	*	Z	*	Brotes	Carter, 1997
Ascolana Dura	Arboles de invernadero	SN	MS mod	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlaro <i>y col.</i> , 2009

Canino	Ramas fructíferas	SN	OM	*	*	*	Brotes	Zucherelli y Zucherelli, 2002
			MS mod	Sac+Man	ANA + putrescina	Agar	Raíces	
	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	OM	Man	Z+ Dikegulac	Agar	Brotes	Mendoza-de Gyves y col., 2008
			BN mod	Sac	AIB+ putrescina	Agar	Raíces	
Capolga	Arboles de invernadero	SN	MS mod	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlaro y col., 2009
Carboncella	Arboles de invernadero	SN	MS mod	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlaro y col., 2009
Carolea	Brotes <i>in vitro</i> ¹		SH mod	Man	ANA/AIB	Phytigel	Raíces	Briccoli-Bati y col., 1999; 2002
	Arboles campo	SN	OM mod	Man	Z	*	Brotes	
			OM mod	*	AIB + putrescina	*	Raíces	Briccoli-Bati y col., 2006
	Arboles de invernadero	SN	OM	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlaro y col., 2009
Cassanese	Arboles de invernadero	SN	MS mod	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlaro y col., 2009
Chemlali de Sfax	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	MS	Man	Z+ Kin	Agar	Brotes	Chaari-Rkhis y col., 1999
Chetoui	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	MS	Man	Z+ Kin	Agar	Brotes	Chaari-Rkhis y col., 1999

Chondrolia Chalkidikis	Estaquillas enraizadas	SN	WPM	Sac	Z	Agar	Brotes	Grigoriadou y <i>col.</i> , 2002; 2003; 2007
			WPM	*	AIB + ANA	*	Raíces	
Coratina	Brotes <i>in vitro</i>	*	MSmod	Man	Z	Gelrite	Brotes	Leva, 2011
Empeltre	Arboles de invernadero	SN	OM	*	Z	*	Brotes	Carter, 1997
	Yemas adultas injertadas	SN	OM	*	BAP+TDZ	*	Brotes	García-Férriz y <i>col.</i> , 2001; 2002; 2003
Dahbia	Estaquillas enraizadas	SN	OM	Sac	RZ	*	Brotes	Sghir y <i>col.</i> , 2005
			OM	*	ANA/AIB	*	Raíces	
Dolce Agogia	Brotes basales	SN	MS mod	Sac	RZ + AIB+ GA ₃	*	Brotes	Rugini y Fontanazza, 1981 Rugini, 1984; 1992
			Knop&Heller	Sac	ANA	Agar	Raíces	
	Brotes <i>in vitro</i> ^I	Secciones subapicales (3-4 cm)	MS	Sac	ANA	Agar	Raíces	Mencuccini, 2003
	Brotes <i>in vitro</i> ^I	Secciones apicales (4nudos)	OM mod	*	AIB	*	Raíces	
Domat	Árboles (5-10 años)	SN	OM	*	BAP	*	Brotes	Seyhan y Özzambak, 1994

Frantoio	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	OM	Sac	Z	Agar	Brotes	Rugini, 1984
	Brotes <i>in vitro</i> ¹	*	OM mod	*	Z	*	Brotes	Lambardi <i>y col.</i> , 2002
	Brotes <i>in vitro</i> ¹	Microestaquillas apicales (2/3 nudos)	OM mod	Man	ANA	Agar	Raíces	Lucchesini y Vitagilano, 2002
	Ramas fructíferas	SN	OM	*	*	*	Brotes	Zucherelli y Zucherelli, 2002
			MS mod	Sac+Man	ANA + putrescina	Agar	Raíces	
	Brotes <i>in vitro</i> ¹	Secciones subapicales (3-4 cm)	MS	Sac	ANA	Agar	Raíces	Mencuccini, 2003
	Arboles de invernadero	SN	MS	*	BAP+ GA ₃ + AIB	*	Brotes	Donini <i>y col.</i> , 2008b
Haouzia	Estaquillas enraizadas	SN	OM	Man	Z+ Dikegulac	Agar	Brotes	Mendoza-de Gyves <i>y col.</i> , 2008
			BN mod	Sac	AIB+ putrescina	Agar	Raíces	
			OM	*	ANA/AIB	*	Raíces	
Haouzia	Estaquillas enraizadas	SN	OM	Sac	RZ	*	Brotes	Sghir <i>y col.</i> , 2005
			OM	*	ANA/AIB	*	Raíces	

Kalamon	Brotos procedentes de esferoblastos	SN	OM mod	*	RZ	Agar	Brotos	Rama y Pontikis, 1990
			OM mod	*	ANA	*	Raíces	
	Árboles en invernadero	SN	WPM	Sac	BAP+ GA ₃ + AIB	Agar	Brotos	Dimassi-Theriou, 1994; 1999
			WPM	*	AIB	*	Raíces	
	Árboles de 18 años	SN	MS mod	Sac	BAP + AIB	Agar	Brotos	Ozkaya y col., 2003
			Knop&Heller	Sac	AIB	Agar	Raíces	
Koronieki	Árboles severamente podados	SN	DKW mod	Man	RZ/TDZ	Agar	Brotos	Roussos y Pontikis, 2002
			WPM	*	AIB + ANA	*	Raíces	
	Árboles de 18 años	SN	MS mod	Sac	BAP + AIB	Agar	Brotos	Ozkaya y col., 2003
			Knop&Heller	Sac	AIB	Agar	Raíces	
	Árboles de invernadero	SN	MS	*	BAP+ GA ₃ + AIB	*	Brotos	Donini y col., 2008b
Leccino	Brotos <i>in vitro</i> ¹	*	OM mod	*	Z	*	Brotos	Lambardi y col., 2002
	Árboles de 10- 15 años	SN	MS	*	GA ₃	Gelrite	Brotos	Ramzan-Kan y col., 2002
Lucques	Estaquillas enraizadas	SN	OM	Sac	RZ	*	Brotos	Sghir y col., 2005
			OM	*	ANA/AIB	*	Raíces	
Maremmano	Brotos <i>in vitro</i>	*	MSm	Man	Z	Gelrite	Brotos	Leva, 2011

Maurino	Árbol adulto	SN	MS mod	*	Z	*	Brotes	Bartolini y <i>col.</i> , 1990
			MS mod	Man	Z	Agar	Brotes	Leva y <i>col.</i> , 1994; 2002; 2003, 2012; Leva, 2009
	Brotes <i>in vitro</i>	*	MSmod	Man	Z	Gelrite	Brotes	Leva, 2011
Memecik	Árboles (5-10 años)	SN	OM	*	BAP	*	Brotes	Seyhan y Özzambak, 1994
Meski	Brotes <i>in vitro</i> ^I	SN	MS mod	Man	Z+ Kin	Agar	Brotes	Chaari-Rkhis y <i>col.</i> , 1999
	Brotes <i>in vitro</i> ^I	SN	OM	*	Z	Agar	Brotes	Chaari-Rkhis y <i>col.</i> , 2002
			OM mod	*	AIB	*	Raíces	
Mission	Árboles (9años)	SN	½ MS	Sac	BAP+ GA ₃	Agar	Brotes	Rostami y Shahsavar, 2012
			½ MS	Sac	AIB	Agar	Raíces	

Moraiolo	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	OM	Sac	Z	Agar	Brotes	Rugini, 1984;1992
			BN	Sac	ANA	Agar	Raíces	
	Brotes <i>in vitro</i> ¹	Peciolos de hoja	MS	*	TDZ/TDZ+ANA	*	Brotes	Mencuccini y Rugini, 1993
	Ramas fructíferas	SN	OM	*	*	*	Brotes	Zucherelli y Zucherelli, 2002
			MS mod	Sac+Man	ANA + putrescina	Agar	Raíces	
	Brotes <i>in vitro</i> ¹	Secciones subapicales (3-4 cm)	MS	Sac	ANA	Agar	Raíces	Mencuccini, 2003
	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	OM	Man	Z+ Dikegulac	Agar	Brotes	Mendoza-de Gyves y <i>col.</i> , 2008
			BN mod	Sac	AIB+ putrescina	Agar	Raíces	
Nebbiara	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	OM	Sac	Z+ BAP	Agar	Brotes	Ansar y <i>col.</i> , 2009a; 2009b
			OM mod	Sac	AIB	Agar	Raíces	
	Árbol de campo	SN	OM	Man	Z + GA ₃ + AIB	Agar	Brotes	Zacchini y de Agazio, 2004
			OM mod	Sac	ANA	Agar	Raíces	

Nocellara etnea	Árboles campo	SN	OM	Man	Z	*	Brotes	Cozza y <i>col.</i> , 1997
			OM mod	*	ANA	*	Raíces	
	Brotes <i>in vitro</i> ¹	*	SH mod	Man	ANA/AIB	Phytigel	Raíces	Briccoli-Bati y <i>col.</i> , 1999; 2002
	Árboles campo	SN	OM mod	Man	Z	*	Brotes	Briccoli-Bati y <i>col.</i> , 2006
			OM mod	*	AIB + putrescina	*	Raíces	
Nocellara del Belice	Árboles campo	SN	OM	Man	Z	*	Brotes	Cozza y <i>col.</i> , 1997
			MS mod	*	ANA	*	Raíces	
Nocellara Messinese	Árboles de invernadero	SN	MS mod	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlaro y <i>col.</i> , 2009
Oueslati	Árboles campo (50 años)	SN	OM mod	Man	Z	Agar	Brotes	Chaari-Rkhis y <i>col.</i> , 2011
			MS mod	Man	AIB	Agar	Raíces	
Galega vulgar	Árboles de campo de 8 años	SN	OM	Sac	BAP+ Leche de coco	Agar	Brotes	Peixe y <i>col.</i> , 2007
			OM	*	AIB	*	Raíces	
Orbetana	Árboles de invernadero	SN	MS mod	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlaro y <i>col.</i> , 2009
Piantone di Falerone	Árboles de invernadero	SN	MS mod	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlaro y <i>col.</i> , 2009
Picholine du Languedoc	Estaquillas enraizadas	SN	OM	Sac	RZ	*	Brotes	Sghir y <i>col.</i> , 2005
			OM	*	ANA/AIB	*	Raíces	

Picholine Marocaine	Estaquillas enraizadas	SN	OM	Sac	RZ	*	Brotes	Sghir y col., 2005
			OM	*	ANA/AIB	*	Raíces	
	Árboles de campo (30 años)	SN	OM	*	Z	Agar	Brotes	Brhadda y col., 2003
Piantone di Mogliano	Arboles de invernadero	SN	MS mod	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlaro y col., 2009
Piantone di moiano	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	OM	Man	Z+ Dikegulac	Agar	Brotes	Mendoza-de Gyves y col., 2008
			BN mod	Sac	AIB+ putrescina	Agar	Raíces	
Picual	Yemas adultas injertadas en acebuche	SN	OM	*	BAP+TDZ	*	Brotes	García-Férriz y col., 2001; 2002; 2003
	Arboles de invernadero	SN	MS	*	BAP+ GA + AIB	*	Brotes	Donini y col., 2008b
	Árbol adulto severamente podado	SN	OM	Man	Z +GA ₃ + AIB	Agar	Brotes	Vidoy-Mercado y col., 2012a
Raggia	Árboles de invernadero	SN	MS mod	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlaro y col., 2009
Rosciola	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	OM	Man	Z+ Dikegulac	Agar	Brotes	Mendoza-de Gyves y col., 2008
			BN mod	Sac	AIB+ putrescina	Agar	Raíces	
Rowghani	Árboles de invernadero (4 años)	SN	DKW	Man	2iP	*	Brotes	Peyvandi y col., 2009

Salonemque	Estaquillas enraizadas	SN	OM	Sac	RZ	*	Brotes	Sghir y col., 2005
			OM	*	ANA/AIB	*	Raíces	
San Francesco	Brotes <i>in vitro</i>	*	MSmod	Man	Z	Gelrite	Brotes	Leva, 2011
Sargano	Árboles de invernadero	SN	MS mod	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlano y col., 2009
Sevillano	Árboles de invernadero	SN	OM	*	Z	*	Brotes	Carter, 1997
Sig de Sfax	Brotes <i>in vitro</i> ¹	SN	MS mod	Man	Z+ Kin	Agar	Brotes	Chaari-Rkhis y col., 1999
Tanche	Estaquillas enraizadas	SN	OM mod	Sac	Z	*	Brotes	Binet y col., 2007
			OM	*	AIB	*	Raíces	
Tondina	Árboles de invernadero	SN	OM mod	Man	Z	Phytigel	Brotes	Varlano y col., 2009
ZDH4	Estaquillas enraizadas	SN	OM	Sac	RZ	*	Brotes	Sghir y col., 2005
			OM	*	ANA/AIB	*	Raíces	

Otras especies del género <i>Olea</i>	<i>Olea europaea</i> L. Ecotipo 05300	Estaquillas enraizadas	SN	OM mod	Sac	Z	*	Brotes	Binet y col., 2007
				OM	*	AIB	*	Raíces	
	<i>Olea europaea</i> L. spp.maderensis Lowe	Arboles campo	SN	DKW	*	BAP + AIB	*	Brotes	Santos y col., 2003
				DKW mod	Sac	AIB	*	Raíces	
		Arboles campo	SN	OM mod	*	Z	*	Brotes	Brito y col., 2009
				OM mod	*	ANA	*	Raíces	

Se especifica la edad de la planta madre cuando ésta aparece en el trabajo correspondiente.

¹Material proveniente de cultivos previamente establecidos *in vitro*.

SN.- sección nodal.

* Componente del medio no especificado.

BN (Bourgin y Nitsch, 1967).

DKW (Driver y Kuniyuki, 1984).

MS (Murasige y Skoog, 1962).

OM (Rugini, 1984).

SH (Schenk y Hildebrant, 1972).

WPM (Lloyd y McCow, 1980).

I.2. CRECIMIENTO Y DESARROLLO: DEFINICIÓN Y CONCEPTOS

Todos los organismos multicelulares pasan por una serie de etapas de desarrollo, más o menos definidas, en las cuales aparecen una serie de características diferenciales. En las plantas, estos cambios ocurren en una región dinámica de su estructura, el meristemo apical del tallo (Robinson y Wareing, 1969; Kester 1976; Poethig, 1990); esta renovación de tipo meristemático origina que su evolución ontogenética no afecte a las células consideradas individualmente como sucede en el reino animal. De hecho, la viabilidad de las semillas no presenta relación alguna con la edad del árbol madre; semillas de plantas de 170 años mostraron la misma capacidad germinativa y vigor que otras provenientes de madres más jóvenes (Sax, 1962).

I.2.1. Fases de crecimiento y su caracterización

En el ciclo de vida de una planta, que se inicia a partir de la germinación de una semilla, podemos diferenciar tres fases de desarrollo (Greenwood, 1987):

- 1.- Fase embrionaria, o de crecimiento, que sigue a la germinación de la semilla.
- 2.- Fase juvenil de crecimiento vegetativo, en la que la planta aumenta de tamaño y volumen.
- 3.- Fase adulta, en la que la planta cambia su forma de crecimiento de indeterminado a determinado con la producción de los primordios florales. Poethig (1990, 2003) diferencia en esta fase dos etapas:
 - La primera, de crecimiento vegetativo, caracterizada por una pérdida gradual de capacidad morfogenética.
 - La segunda, de crecimiento reproductivo, en la que la planta adquiere la capacidad de formar estructuras reproductoras (flores en Angiospermas y conos en Gimnospermas).

La transición de la fase juvenil a la adulta se denomina Cambio de Fase (CF) (Brink, 1962; Hackett, 1976). Por su parte, Meier-Dinkel y Kleinschmit (1990) distinguieron los siguientes conceptos: i) edad cronológica (edad de la planta desde el momento de la germinación de la semilla hasta el momento actual), ii) edad fisiológica o somática (referida a la pérdida de vitalidad durante su ciclo de vida, que termina con la muerte, y que está causada principalmente por el incremento en la complejidad de la planta) y iii) edad ontogenética (se refiere a la fase de desarrollo en la que se encuentra la planta).

Fase juvenil

La duración del periodo juvenil está influenciada tanto por factores genéticos como ambientales (Hackett, 1985) y en plantas leñosas es muy variable, como puede apreciarse en la Tabla 3.

Tabla 3.- Duración del periodo juvenil en algunas especies leñosas (Clark, 1983)

Especie	Periodo juvenil
<i>Rosa hybrid tea</i>	20-30 días
<i>Vitis spp.</i>	1 año
<i>Malus spp.</i>	4-8 años
<i>Citrus spp.</i>	5-8 años
<i>Hedera helix</i>	5-10 años
<i>Sequoia sempervirens</i>	5-15 años
<i>Acer pseudoplatanus</i>	15-20 años
<i>Quercus robur</i>	25-30 años
<i>Fagus sylvatica</i>	30-40 años

Fase adulta

La adquisición de la capacidad para florecer implica un cambio drástico en los patrones de diferenciación celular y de morfogénesis del meristemo apical del tallo, que se reflejan en una variación gradual de las características morfológicas y del desarrollo: cutícula de la hoja, grosor, textura y color de la corteza, forma y disposición de las hojas, índice de plastocrono, presencia de espinas, orientación del tallo, número de ramas y distribución, anchura y longitud de las traqueidas, vigor, retención de hojas en invierno, pigmentación del tallo, capacidad para formar raíces y yemas adventicias, distribución de fotosintatos en el tallo principal o en las ramas, así como resistencia a enfermedades y al frío (Hackett, 1987); en este sentido, es necesario señalar que aunque estos cambios son más evidentes en las plantas leñosas, también ocurren en las herbáceas.

El único criterio consistente para asegurar la terminación del periodo juvenil es la capacidad de una planta para florecer (Zimmerman, 1972) y que ésta se mantenga, siempre y cuando se den las condiciones necesarias para ello; así, es necesario tener en cuenta que la floración depende, tanto de la fase de desarrollo en la que se encuentre la planta como de ciertas condiciones ambientales (fotoperiodo, temperatura... etc.), por lo que la ausencia de floración no debe ser considerada, de forma aislada, como un indicador de juvenilidad (Hackett, 1987).

En las plantas de ciclo anual o bienal, la floración es un proceso irreversible que permite a la planta fructificar y que conduce a su muerte; por el contrario, en las plantas perennes, la floración ocurre solamente en zonas localizadas, lo que permite a la planta continuar creciendo cuando ha alcanzado la madurez porque sólo algunos de sus ápices producen yemas florales, mientras otros permanecen en estado vegetativo, aunque no necesariamente juvenil, a lo largo de su ciclo de vida (Poethig, 1990; Tooke *y col.*, 2005).

A medida que la planta progresa en su desarrollo, se produce una reducción en las tasas de crecimiento, hay pérdida de la dominancia apical y también se reduce la capacidad de producción de flores. Esta pérdida de vigor, o envejecimiento, puede ser revertida mediante el injerto del tallo sobre un patrón juvenil o por una mejora en las condiciones nutritivas (Poethig, 1990).

I.2.2. Características diferenciales de las fases juvenil y adulta

Las características de las diferentes etapas de desarrollo en el ciclo de vida de una planta son (Haffner y col., 1991): morfológicas, citológicas e histológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares, y aunque algunas pueden ser consideradas como marcadores del CF, hay que tener en cuenta que no se ha demostrado su relación directa con la madurez sexual (Hackett, 1985; 1987) y que no son homogéneas, sino que suelen ser específicas para cada especie (Von Aderkas y Bonga, 2000).

I.2.2.1. Características morfológicas.

En algunas especies es posible distinguir, por criterios exclusivamente morfológicos, cuándo se trata de un individuo juvenil o adulto. De manera general, Bonga (1982) y Franclet (1983) consideran juveniles aquellas partes de la planta en las cuales predominan las características juveniles (ramas en ángulo obtuso, gruesas y largas; tronco no bifurcado; retención de hojas en invierno y corteza lisa); por el contrario, serían adultas las zonas de la planta con ramas finas, en ángulo agudo; tronco bifurcado; hojas gruesas, densamente nervadas y corteza gruesa.

Además de estas consideraciones generales, existen especies con características morfológicas claramente diferentes en las distintas etapas del desarrollo; así, *Ficus pumila* (Doorenbos, 1965; Hackett y col., 1987) y *Hedera helix* (Hackett y col., 1987) presenta

hábitos de crecimiento ortotrópico en la fase juvenil y plagiotrópico en la fase adulta; las hojas juveniles de *Eucaliptus spp.* no presentan peciolo, son opuestas y de forma ovalada, mientras las adultas son pecioladas, alternas y lanceoladas (Doorenbos, 1965); o *Sequoiadendron giganteum*, que presenta hojas juveniles con forma de escama mientras las hojas adultas son aciculares (Monteuuis y Bon, 1990). Éstas y otras diferencias se encuentran recogidas en la Tabla 4A.

I.2.2.2. Características citológicas e histológicas

Células con núcleos de pequeño tamaño y cromatina no condensada, domo apical pequeño y hojas con grandes células epidérmicas son características de tejidos juveniles; mientras que en los adultos suelen observarse células con un núcleo reticulado y elongado, rodeado por membranas del retículo endoplasmático, cromatina condensada, ADN metilado y domo apical de gran tamaño (Bonga, 1982; Franclet, 1983).

En la Tabla 4B, podemos ver las diferencias citológicas e histológicas que aparecen en diferentes especies como *Sequoiadendron giganteum*, en la que se observa un alargamiento de la forma del ápice con la maduración (Monteuuis, 1987a); *Olea europaea* con un aumento en el número de cromocentros y del ADN nuclear en los ápices adultos (Mazzuca y col., 1995); *Larix laricina* que presenta una reducción del número de nucleólos/célula en el cambium adulto (Mellerowicz y col., 1995); o *Tectona grandis* con un aumento en el número de vasos conductores en el tallo a lo largo del desarrollo (Husen y Pal., 2006).

I.2.2.3. Características fisiológicas

I.2.2.3.1. Contenido endógeno de reguladores de crecimiento

Se ha establecido una relación entre el contenido hormonal y los procesos de desarrollo implicados en el CF; en general, giberelinas y auxinas se asocian con el

crecimiento juvenil (Rogler y Hackett, 1975a; Zimmerman *y col.*, 1985; Meier-Dinkel y Kleinschmit, 1990), mientras que las sustancias inhibidoras del crecimiento, como el ABA, se asocian con la fase adulta (Rogler y Hackett, 1975b).

Las diferencias fisiológicas entre las fases juvenil y adulta afectan también a parámetros como la capacidad fotosintética (Bauer y Bauer, 1980); la presencia de determinados enzimas y formas isoenzimáticas en una determinada fase del desarrollo (Murray y Hackett, 1991; Sánchez-Romero *y col.*, 1993; Murray *y col.*, 1994; Valdés *y col.*, 2007); los niveles de poliaminas (Königshofer, 1989; 1990) o la alteración de la relación putrescina/espermidina (Schwartz *y col.*, 1986). Estas diferencias se recogen en la tabla 4C.

I.2.2.3.2. Capacidad de enraizamiento

La característica fisiológica más determinante, por su influencia en la capacidad de propagación de las especies, es la capacidad de enraizamiento, que es elevada en los individuos juveniles y disminuye progresivamente a lo largo del desarrollo de la planta (Bonga, 1982; Franclet, 1983). De hecho, son numerosos los ejemplos en los que se ha constatado la mayor capacidad de enraizamiento, y por lo tanto de propagación, de los individuos juveniles frente a los adultos; así, en *Tectona grandis* (Husen y Pal, 2006), se obtuvieron unos porcentajes de enraizamiento del 77,33 %, 53,33 % y 37,99 % en estaquillas procedentes de individuos de 2 meses, 15 años y 30 años, respectivamente; también se observó una mayor producción de callo basal en las estaquillas de mayor edad. En esta misma especie, estaquillas procedentes de árboles adultos de 95 años sólo pudieron ser inducidas a enraizar tras la combinación de diferentes tratamientos, entre ellos los injertos sucesivos, la etiolación de las plantas injertadas y aplicaciones basales de AIB (Husen y Pal, 2003). En *Backhousia citriodora* F. Muel. (Kibbler *y col.*, 2004) las estaquillas juveniles, además de tener mayor porcentaje de enraizamiento (100 %), enraizaban antes que las adultas (40 %).

Otro factor crítico en el enraizamiento es el grado de lignificación de las estaquillas, ya que la formación de raíces adventicias es un proceso organizado que requiere la sincronización de varios procesos químicos y cambios estructurales y cuando una planta se va haciendo adulta necesita más tejido leñoso para mantener su estructura, siendo las esclereidas una barrera física en los procesos de enraizamiento (Davies, 1983).

La posición de la estaquilla en el árbol madre también condiciona su capacidad de enraizamiento al estar relacionada con la edad ontogenética; así en *Coffea arabica*, los porcentajes de enraizamiento alcanzados fueron del 96 %, 77 % y 55 % según se tomaran las estaquillas a 0-15, 16-45 y 45-75 cm del suelo, respectivamente (Puroshotham y Sulladmath, 1985). *Magnolia kobus*, *Magnolia soulangeana* (Bajarczuk, 1983) y *Sequoiadendron giganteum* (Monteuuis, 1985) son otras especies en las que también se ha descrito este comportamiento. En brotes micropropagados de individuos adultos de *Castanea* spp, Sánchez y Vieitez (1991) observaron que la capacidad de enraizamiento estaba estrechamente relacionada con la posición original del explanto en la planta madre, disminuyendo los porcentajes de enraizamiento desde 40-90 %, cuando los brotes procedían de la parte basal, al 0 % -11 %, cuando procedían de la copa del mismo árbol.

Vidal y col. (2003) realizaron estudios histológicos de la parte basal de estaquillas, procedentes de zonas basales y apicales de *Quercus robur* L., que fueron sometidas a un tratamiento con AIB, observando que cuatro días después del tratamiento, las células de las estaquillas basales comenzaban a dividirse dando lugar a meristemoides y primordios radiculares, mientras que no se observó diferenciación en las células de los estaquillas apicales. Esta respuesta diferencial a auxina también se ha observado en otras especies, así, en *Ficus pumila*, la cantidad óptima de AIB para estimular el enraizamiento de estaquillas era dos veces superior para las estaquillas procedentes de material adulto que para las estaquillas procedentes de material juvenil; este hecho ha sido interpretado de distintas

maneras, bien que las estaquillas adultas poseían menor cantidad de auxina endógena (Davies y Joiner, 1980) o que los niveles de auxinas decrecen en las partes maduras de los árboles, lo que puede ser debido a que el abastecimiento del meristemo adulto decrece o bien a que el transporte de auxinas se vea limitado por el aumento en tamaño de la planta (Davies, 1984). Estas consideraciones parecen estar avaladas por el hecho de que la decapitación de las estaquillas reduce la capacidad de enraizamiento en guisante (Koukourikoupetridou y Bangerth, 1997) y *Rhododendron* (Chen y col., 1997), por interrupción del transporte polar de auxinas (TPA); también se ha observado este efecto con el uso de sustancias inhibitoras del TPA, tales como el ácido 1,3,5-triiodobenzoico (Liu y Reid, 1992a; Marks, 1996) y el ácido naftiltalámico (Visser y col., 1995); en estos casos, la capacidad de enraizamiento puede ser restablecida mediante la aplicación de auxina en el hipocótilo decapitado (Liu y Reid, 1992a). Sin embargo, en material micropropagado de *Quercus robur*, procedente de las partes basal y apical del árbol, Vidal y col. (2003) concluyen que la concentración endógena de AIA no es un factor limitante en su capacidad de enraizamiento.

La aplicación de determinadas sustancias de naturaleza fenólica, conjuntamente con auxina, aumenta la capacidad de enraizamiento tal y como se ha observado en *Ceratonia siliqua* tras la adición de pirogalol (Pontikis y Xiroychakis, 1985); sin embargo, en el patrón de vid “140-Rugeri” el porcentaje de estaquillas enraizadas, cuando se tratan con fenoles, aumenta en Abril-Septiembre (cuando existe una buena capacidad de enraizamiento de forma natural) pero no en Noviembre (cuando la capacidad de enraizamiento es baja) (Bartolini y col., 1988). Németh (1986), sugirió que el papel de los fenoles sería formar complejos con las auxinas y evitar su oxidación, de manera que mantendrían los tejidos con una bajo potencial redox, condición ésta que se relaciona con la juvenilidad. Claudot (1989; citado por Haffner y col., 1991) afirmó que la diferente capacidad organogénica de los tejidos durante los procesos de maduración, puede estar relacionada con variaciones en los

niveles de diferentes compuestos fenólicos implicados en diferentes procesos biológicos, aunque no existe una tendencia clara; así, mientras en *Castanea sativa*, se detectó un aumento en el contenido en fenoles durante su desarrollo ontogenético (García y col., 1980), en *Sequoiadendron giganteum* se ha observado una gran variación clonal y no se ha podido asociar este parámetro con una determinada fase del desarrollo (Monteuuis, 1988, citado por Haffner y col., 1991).

También es necesario tener en cuenta el estado fisiológico del material de partida, así, Pontikis y Xiroychakis (1985) comprobaron en *Ceratonia siliqua* L., que las estaquillas juveniles no mostraban cambios estacionales significativos en la capacidad de enraizamiento, mientras que las adultas solo enraizaban en primavera, coincidiendo con el inicio de la actividad del cambium.

Finalmente, las condiciones luz/oscuridad, son otro de los factores determinantes en el enraizamiento, así, en *Acacia mangium*, Monteuuis y Bon (2000) observaron que a las mismas concentraciones y tipos de auxina utilizados, el material adulto enraíza en mayor porcentaje y produce mayor número de raíces cuando se incubaba en oscuridad frente a la incubación en condiciones de luz; sin embargo, en las estaquillas juveniles solo se detectó la influencia en el número de raíces, que fue mayor en condiciones de oscuridad.

I.2.2.4. Características bioquímicas y moleculares

Las diferencias observadas se refieren a la presencia de diferentes perfiles proteicos e incluso proteínas específicas que aparecen en determinadas fases del desarrollo; así en *Sequoiadendrom giganteum* se detectó un proteína de membrana (J16) que sólo aparece en los individuos juveniles (Bon, 1988); también se han detectado diferencias en los niveles de transcripción génica (Monteuuis y Gendraud, 1987; Gil y col., 2003); aumento en los niveles (Fraga y col., 2002b; 2002c) y patrones (Baurens y col., 2004) de metilación del ADN a

medida que las plantas se acercan a la fase adulta y al diferente equilibrio entre los procesos catabólicos y anabólicos (Monteuuis y Gendraud, 1987; Monteuuis y Bon, 1990). Estas diferencias se encuentran recogidas en la Tabla 4D.

Tabla 4.- Características diferenciales de las fases juvenil y adulta en distintas especies: A) Morfológicas; B) Citológicas e histológicas; C) Fisiológicas y D) Bioquímicas y moleculares.

A) MORFOLÓGICAS				
Característica diferencial	Juvenil	Adulto	Especie	Referencia
Hábito de crecimiento	Ortotrópico	Plagiotrópico	<i>Ficus pumila</i> <i>Hedera helix</i> <i>Marcgravia rectifolia</i> <i>Quercus petrea</i> <i>Larix laricina</i>	Doorenbos, 1965 Hackett y col., 1987 Doorenbos, 1965 McGowran y col., 1998 Greenwood y col., 1989
Tallo	Plano	Cilíndrico	<i>Marcgravia rectifolia</i>	Dobbins y col., 1983
	Presencia de espinas	Sin espinas	<i>Malus spp</i> ; <i>Pyrus spp</i> y <i>Citrus spp.</i>	Doorenbos, 1965
	Raíces aéreas	Sin raíces aéreas	<i>Marcgravia rectifolia</i> <i>Hedera helix</i> <i>Zea mays</i>	Dobbins y col., 1983 Hackett y col., 1987 Poethig, 1990
	Nº ramas/cm ² ↑	Nº ramas/cm ² ↓	<i>Larix laricina</i>	Greenwood y col., 1989
Hojas	Sin peciolo, opuestas, ovaladas	Pecioladas, alternas, lanceoladas	<i>Eucaliptus spp</i>	Doorenbos, 1965
	Compuestas	Filodios	<i>Acacia mangium</i> <i>Acacia koa</i>	Monteuuis 2004 Poethig, 2010
	Ovaladas	Lanceoladas	<i>Marcgravia rectifolia</i>	Dobbins y col., 1983
	Enteras, alternas	Lobuladas, espiral	<i>Hedera helix</i>	Hackett y col., 1987
	En forma de escama Presencia de ceras y tricomas	Aciculares Ausencia de ceras y tricomas	<i>Sequoiadendron giganteum</i> <i>Zea mays</i>	Monteuuis y Bon, 1990 Poethig, 1990

B) CITOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS				
Característica diferencial	Juvenil	Adulto	Especie	Referencia
Ápices	Menor tamaño, células más grandes	Mayor tamaño, células pequeñas	<i>Hedera helix</i>	Stein y Foster, 1969
	Ancho en la base, longitud corta	Estrechos en la base, mayor longitud	<i>Sequoiadendrom giganteum</i>	Monteuuis, 1987 a;1987b
	Relación núcleo/citoplasma ↑	Reducción de la relación núcleo/citoplasma	<i>Sequoiadendrom giganteum</i>	Monteuuis y Bon, 1990
	Simplasto central forma triangular	Simplasto central forma redondeada	<i>Sinapis alba</i>	Ormenese y col., 2002
		Aumento en el nº de cromocentros y ADN nuclear (~22 %)	<i>Olea europaea</i>	Mazzuca y col., 1995
Tallo	Nº vasos conductores ↓	Aumento en el nº de vasos conductores	<i>Tectona grandis</i>	Husen y Pal, 2006
Cambium	Nº nucleolos/célula ↑ Contenido extranuclear de carbohidratos solubles ↓	Nº de nucleolos/célula ↓ Contenido extranuclear de carbohidratos solubles ↑	<i>Larix laricina</i>	Mellerowicz y col., 1995

C) FISIOLÓGICAS				
Característica diferencial	Juvenil	Adulto	Especie	Referencia
Fotosíntesis	Actividad fotosintética y de la Rubisco ↓	Actividad fotosintética y de la Rubisco ↑	<i>Hedera helix</i>	Bauer y Bauer, 1980
	Contenido en clorofila a ↑	Contenido en clorofila a ↓	<i>Sequoia sempervirens</i>	Huang y col., 2003b
	Área foliar	Reducción del área foliar	<i>Acer rubrum</i>	Niklas y Cobb, 2010
Actividades enzimáticas	Actividad de DHFR ¹ ↑	No actividad DHFR	<i>Hedera helix</i>	Murray y Hachett, 1991
	Cianidin-3glucósido (CG) ¹ ↑	Reducción de los niveles de CG	<i>Acer palmatum</i>	Schmitzer y col., 2009
	Fenilalanina-amonioliasa (FAL) y Chalcona-sintetasa (ChS) ² ↑	Reducción de la actividad FAL y ChS	<i>Juglans regia</i>	Claudot y col., 1993
	Peroxidasas ↑	Reducción de la actividad	<i>Sequoia sempervirens</i>	Huang y col., 1996
	Peroxidasas ↓	Aumento de la actividad	<i>Persea americana</i>	Sánchez-Romero y col., 1993
	Citoquinina-deshidrogenasa (CKX)	No actividad CKX	<i>Pynus sylvestris</i>	Valdés y col., 2007
Contenidos hormonales	↑ 2-iP y ↓ AIA Citoquininas tipo-Z/ tipo-2iP ↓ ↑ ABA - ↓ AIA Niveles elevados de Z	↓ 2-iP y ↑ AIA Citoquininas tipo-Z/ tipo-2iP ↑ ↓ ABA - ↑ AIA Disminución niveles de Z	<i>Corylus avellana</i> <i>Pinus radiata</i> <i>Pinus radiata</i> <i>Malus spp</i>	Andrés y col., 2002 Valdés y col., 2002 Materán y col., 2009 Zhang y col., 2008
Niveles de poliaminas	Putrescina Putrescina ↑ Bajos Putrescina/espermidina	Putrescina ↑ Putrescina Elevados Putrescina/espermidina ↑	<i>Picea abies</i> <i>Corylus avellana</i> <i>Olea europaea</i> <i>Zea mays</i>	Königshofer, 1989,1990 Rey y col., 1994 Rugini y Muganu, 2008 Schwartz y col., 1986
Presencia de pigmentos en el tallo	Presencia de antocianos	Sin antocianos	<i>Hedera helix</i>	Murray y Hackett, 1991 Murray y col., 1994
	Ausencia de flavonoides	Presencia de flavonoides	<i>Castanea sativa (in vitro)</i> <i>Pyracantha coccinea</i>	Férrandez-Lorenzo y col., 1999 Fico y col., 2000

Capacidad de enraizamiento	Elevada (80-100 %)	Descenso acusado	<i>Especies leñosas en general</i>	Bonga ,1982; Franclet, 1983
----------------------------	--------------------	------------------	------------------------------------	-----------------------------

D BIOQUIMICAS Y MOLECULARES				
Característica diferencial	Juvenil	Adulto	Especie	Referencia
Perfiles proteicos	Proteína de membrana J16	Ausente	<i>Sequoiadendron giganteum</i>	Bon, 1988
	Proteínas específicas	Ausentes	<i>Sequoia sempervirens</i>	Huang y col., 1992b
	Proteína de 59.7 kDa	Ausente	<i>Citrus paradisi</i>	Snowball y col., 1991
	Ausentes	Polipéptidos (43.6 kDa y 38.8 kDa)	<i>Castanea sativa</i>	Amo-Marco y col., 1993
	Polipéptido de 28 kDa	Ausente	<i>Prunus avium</i>	Besford y col., 1996; Hand y col., 1996
	Polipéptidos de 29 kDa y 63 KDa ↑	Polipéptidos de 29 kDa y 63 KDa ↓	<i>Olea europaea</i>	García y col., 2000a
Ácidos nucleicos	Acumulación de transcritos del gen QRCPE	Transcritos del gen QRCPE ↓	<i>Quercus robur</i>	Gil y col., 2003
	RNA/DNA ↑	RNA/DNA ↓	<i>Sequoiadendrom giganteum</i>	Monteuuis y Gendraud,1987; Monteuuis y Bon, 1990
	Presencia de 2 fragmentos de restricción en el mtADN ³ y cuatro moléculas de ADN circular	Ausencia de estos marcadores	<i>Sequoia sempervirens</i>	Huang y col., 1995
Niveles de metilación del ADN	30-35 %	60 % Aumento en los niveles de metilación del ADN y bajos niveles de acetilación de histonas	<i>Pinus radiata</i> <i>Pinus radiata</i>	Fraga y col., 2002b;2002c Valledor y col., 2010
	3 fragmentos de amplificación específicos de fase (MSAP) ⁴	Cambios en los patrones de amplificación (MSAP)	<i>Acacia mangiun</i>	Baurens y col., 2004
Nucleósidos trifosfato	ATP/NTP ↑	ATP/NTP ↓	<i>Sequoiadendrom giganteum</i>	Monteuuis y Gendraud,1987; Monteuuis y Bon, 1990

¹Enzimas relacionadas con la síntesis de antocianos; ² Enzimas relacionadas con la síntesis de flavonoides; ³ ADN mitocondrial; ⁴ Methylation Sensitive Amplified Polymorphism

I.2.3. Cambio de fase

I.2.3.1. Descripción y bases de su desarrollo

El cambio gradual de la fase juvenil a la adulta, designada como maduración, se encuentra asociado con alteraciones no reversibles o difícilmente reversibles a nivel de los meristemas (Hackett, 1987). Estas alteraciones se manifiestan morfológicamente en la estabilidad de determinadas características como el tipo y forma de la hoja, filotaxia y la formación de las flores. Simultáneamente, el incremento de puntos de crecimiento da lugar al aumento del tamaño y complejidad de la planta y al envejecimiento fisiológico (Wareing, 1959).

A lo largo del desarrollo de la planta, se van formando diferentes puntos de crecimiento que, con el tiempo, se separan y siguen procesos de maduración diferentes. El tallo muestra un crecimiento polar, de manera que a medida que elonga, se van añadiendo nuevas estructuras en su parte apical; esto hace que las estructuras que se formaron en etapas tempranas del desarrollo permanezcan en la parte basal del tallo, mientras que las más recientes se localizan en las partes superiores (Figura 2); de esta manera, las estructuras formadas durante una determinada fase retienen las características morfológicas y fisiológicas propias de esta fase (topófisis) aunque la planta entera haya entrado en una nueva fase (Poethig, 1990).

La transición de la fase adulta vegetativa a la reproductiva suele ser abrupta, mientras que la transición del crecimiento vegetativo juvenil a adulto, suele ser gradual y, a menudo implica la formación de estructuras intermedias que presentan características propias de las distintas fase de desarrollo; Poethig (2003) señala que cuanto mayores son los cambios que ocurren en la morfología de los órganos durante el desarrollo, más graduales serán los patrones de variación. Un ejemplo clásico de estas estructuras intermedias se observa en *Acacia heterophylla* (Taiz y Zeiger, 2010), que presenta hojas compuestas en la fase juvenil y

filodios en la fase adulta; en la fase de transición, aparecen formas intermedias que indican que diferentes regiones de la misma hoja pueden expresar diferentes programas de desarrollo (Figura 3). Para explicar la formación de estas estructuras intermedias durante la transición de la fase juvenil a la adulta, Poethig (1990) propuso un modelo de maduración combinatorio, según el cual el desarrollo del tallo puede ser descrito por la superposición de una serie de programas de desarrollo (juvenil, adulto y reproductivo), regulados de manera independiente, que modulan la expresión de un proceso de desarrollo común. Así, estas formas intermedias indican que diferentes regiones de una misma hoja pueden expresar diferentes patrones de desarrollo; las células de la parte superior de la hoja se desarrollan según el programa de desarrollo juvenil, mientras las células de la base comienzan a desarrollar el programa de desarrollo adulto.

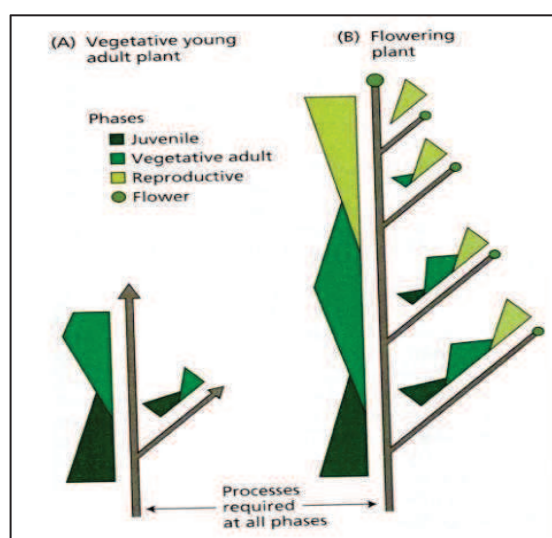


Figura 2.- Esquema de la expresión de las características juveniles y adultas en una planta adulta joven (A) y adulta en floración (B). Los procesos requeridos durante todas las fases de desarrollo para el crecimiento del meristemo apical y la iniciación de órganos laterales se ilustran con líneas en negro (Poethig, 1990).

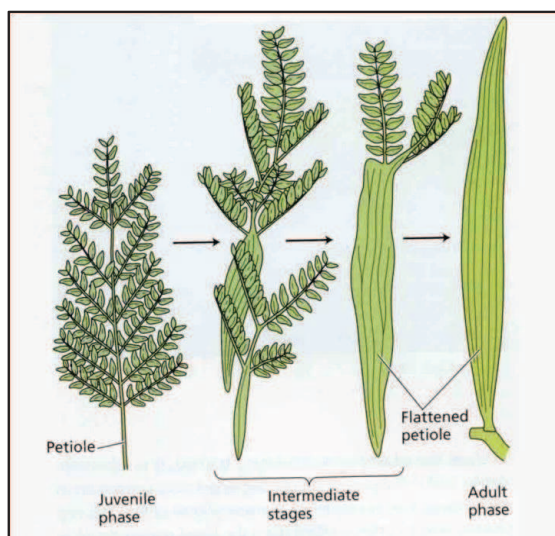


Figura 3.- Hojas de *Acacia heterophylla* mostrando la transición desde la forma juvenil (hojas compuestas) hasta la forma adulta (filodios). Las características de las hojas juveniles son retenidas en las partes superiores de las formas intermedias (Taiz y Zeiger, 2010).

En la evolución ontogenética de una planta leñosa de origen seminal, la floración es el único criterio que permite afirmar que se produjo el cambio de fase (Zimmerman, 1972). Tal fenómeno resulta como secuencia de alteraciones que tienen lugar en varios tejidos y órganos de la planta, en los que también se incluye el propio meristemo apical a partir del cual se forma la nueva estructura, la flor. Efectivamente, las relaciones existentes entre las características del cambio de fase y la evolución ontogenética sugieren una estrecha relación de dependencia con lo que ocurre en los meristemos. Puesto que el crecimiento se basa en modificaciones en este grupo de células, cabe suponer que es precisamente ahí donde actúan los estímulos resultantes de los distintos equilibrios fisiológicos según un mecanismo que

todavía parece poco claro (Hackett *y col.*, 1992; Huala y Sussex, 1993; Meeks-Wagner, 1993).

Para abordar el estudio del proceso de maduración, es necesario conocer los cambios que ocurren en las células del ápice, en particular los procesos de determinación y diferenciación (Hackett *y col.*, 1992). La determinación la definen Mc Daniel *y col.* (1987) como el estado en que una célula o grupo de células manifiesta igual capacidad para responder a estímulos ambientales con total independencia de su situación (*in situ*, aislada o en una nueva posición, como resultado por ejemplo de un injerto). Durante la diferenciación, los tejidos formados por células “determinadas” se transforman en estructuras bioquímica y morfológicamente distintas.

La actividad de los genes en el fenómeno de “determinación” de las células fue estudiada por Hackett *y col.* (1992) quienes explican su funcionamiento mediante un sistema de interruptores. Así, los distintos cambios fenotípicos que se registran en el cambio de fase serían el resultado, en su expresión más simple, de la acción de un solo interruptor o, en una hipótesis más compleja, de la acción de varios interruptores que de una u otra forma desencadenan los cambios, tal y como se indica en la figura 4.

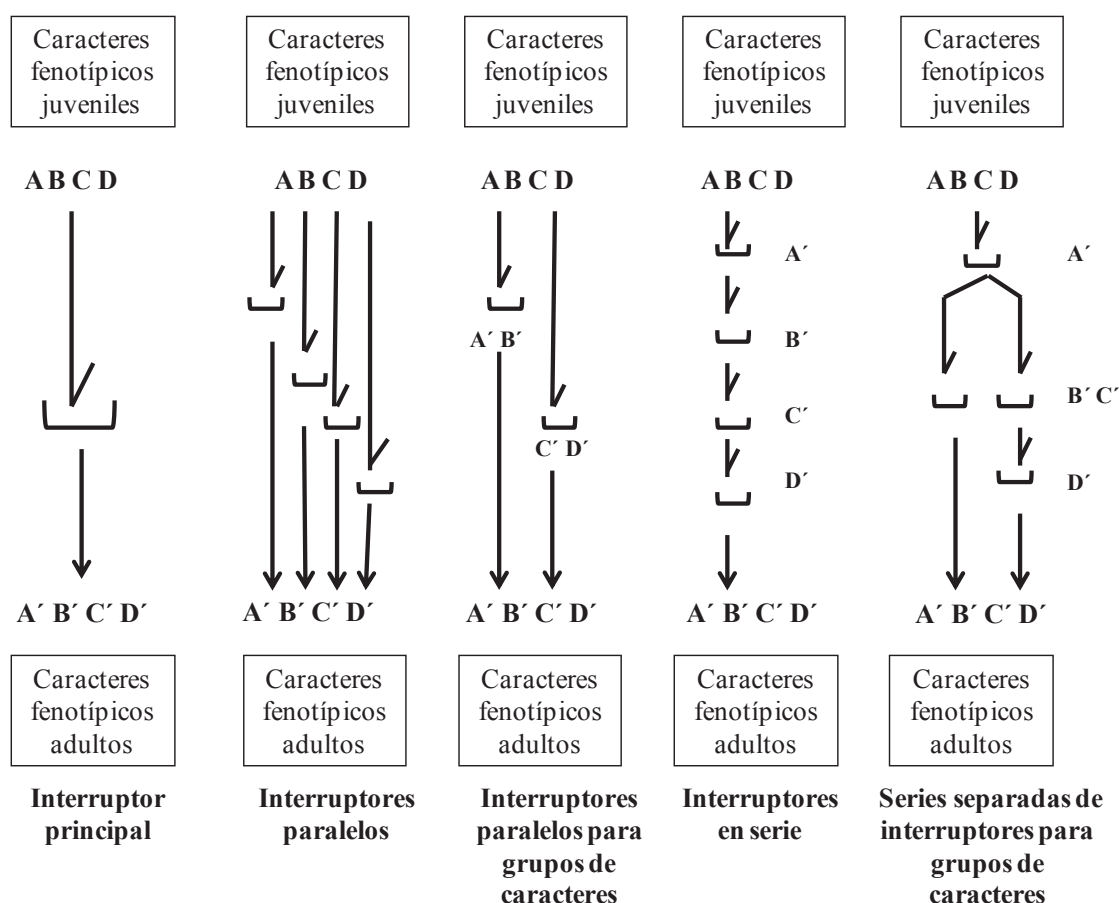


Figura 4.- Modelos alternativos de maduración (Hackett y col., 1992)

Una vez diferenciados los meristemos terminales, se asiste a la transmisión, por vía celular, de la información hacia los tejidos que se van originando. Esta operación, según Wareing (1987), no implica alteraciones a nivel nuclear puesto que los tejidos adultos ya diferenciados pueden producir embriones que, naturalmente, son juveniles. Por lo tanto, el cambio de fase se acepta como resultado de interacciones en la “determinación” de las células, puesto que su expresión final, traducida por diversas modificaciones como puede ser la inducción floral, se mantiene aún cuando el estímulo desaparece (Hackett, 1983).

I.2.3.2. Factores que controlan el cambio de fase

A medida que se produce la elongación del tallo, el meristemo apical aumenta su edad, cambia su posición en relación a otras estructuras de la planta y produce nuevos órganos, por lo que en su desarrollo han de estar implicados factores temporales, espaciales y cuantitativos (Poethig, 1990).

I.2.3.2.1. Tamaño de la planta

McDaniel (1996) en *Nicotiana tabacum* puso de manifiesto que la floración ocurría cuando la planta alcanzaba un determinado tamaño (alrededor de 41 nudos), y que en plantas florecidas y decapitadas por encima del nudo 34, la yema de este nudo, tomaba la dominancia apical y formaba 7 nudos más antes de volver a desarrollar flores; sin embargo, si esta misma yema era escindida de la planta original y enraizada o injertada (sobre un patrón sin hojas, cerca de la base), no florecía hasta que formaba 41 nudos; en otro experimento, la planta era decapitada por encima del nudo 37 y la floración ocurría tras formarse 4 nudos más, en las mismas tres situaciones anteriores (escindida, enraizada e injertada), lo que puso de manifiesto que la yema no está determinada para florecer hasta que no ha producido 37 nudos. Estos experimentos sugieren que más que alcanzar un determinado tamaño (como sugirieron Robinson y Wareing, 1969), la capacidad para florecer se alcanza cuando el meristemo sufre un número de divisiones determinado, tal y como señaló Zimmerman (1971, 1973) en *Malus hupehensis*. Por su parte, Moreno-Alías y col. (2010) determinaron que la primera producción de flores en plantas de olivo procedentes de semillas (cv. Arbequina), ocurre en los brotes situados a 200 cm del suelo; dicho valor resulta de la suma de la distancia a la que la rama se inserta en el tronco principal más la longitud de la propia rama en la que se diferencia el meristemo floral; similares resultados obtuvieron Suárez y col. (2011) analizando la progenie de 8 cruces entre diferentes cultivares de olivo; estos autores

concluyeron que la distancia entre el suelo y la primera flor (alrededor de 2,07-2,41 m) se correlacionaba con la duración del periodo juvenil y el genotipo de los parentales, proponiéndolo como un carácter constante entre los diferentes cultivares.

Hackett (1983), sugirió que las razones por las que es importante alcanzar un determinado tamaño para que se produzca el cambio de fase pueden ser debidas a la variación de la posición del ápice en relación a otras partes de la planta (como la raíz) y la consiguiente variación de la distancia de translocación de fotosintatos, agua, hormonas... etc., y a que la existencia de diversos meristemos (laterales, radicales) en una misma planta hace que entren en competencia por los nutrientes. Por su parte, Meilan (1997) señaló que aunque la planta haya alcanzado la madurez no florecerá hasta que no pueda producir suficiente cantidad de asimilados para sostener la producción de semillas, lo que a su vez dependerá del número de hojas que posea. Estas consideraciones están de acuerdo con lo observado en coliflor por Hand y Atherton (1987), especie en la que la juvenilidad persiste hasta que la planta produce un determinado número de hojas, siendo además este número dependiente del genotipo; así, hasta que las plantas no alcanzan ese umbral no responden a los tratamientos de frío para inducir la floración. De igual forma, en *Malus domestica*, Zhang y col. (2007) observaron que mientras que la floración se inicia espontáneamente en plantas de semilla en el nudo nº 122, ésta puede ser inducida en el nudo nº 77 mediante la aplicación foliar de reguladores de crecimiento, lo que llevó a estos autores a afirmar que este punto marcaría la transición de la fase juvenil a adulta y que, aunque la planta haya alcanzado la madurez, la floración no tiene que producirse inmediatamente. Por su parte, Brenton y col. (2004) al estudiar el comportamiento de algunos árboles de *Juglans regia* que florecían precozmente a los pocos meses de la germinación, observaron que durante la propagación *in vitro* de estos genotipos había producción de flores entre el 3º y 6º subcultivo y que ello era independiente de la presencia, o no, de raíces; asimismo la longitud de los brotes

desarrollados *in vitro* era menor en aquellas que producían flores; por otra parte, tras la aclimatación de las plantas se observó cómo la producción de flores reducía casi en un 50 % el tamaño de los individuos.

I.2.3.2.2. Reguladores de crecimiento

Werner *y col.*, (2001) sobreexpresaron el gen de la citoquinina oxidasa (*AtCKX*), en plantas de *Nicotiana tabacum*, obteniendo clones deficientes en contenidos endógenos de 2-*iP* y zeatina (31-63 % de reducción con respecto a los clones control). Las alteraciones fenotípicas observadas en las plantas transformadas consistían, a nivel de la parte aérea, en retrasos en el desarrollo (entrenudos cortos, hábitos de crecimiento enanizantes, reducido número de flores, mayor duración del plastocrono); por el contrario, las raíces presentaron mayor crecimiento (mayor longitud y número de raíces secundarias) que los respectivos clones control; las plantas transformadas comenzaron a producir flores tres meses después que los controles aunque el número de hojas producido por ambos tipos de plantas, antes de la floración, fue el mismo, lo que confirma la teoría de que poseer un determinado número de hojas es determinante en el proceso de floración de esta especie. De acuerdo con Werner *y col.* (2001), el papel de las citoquininas estaría ligado a su efecto en el número y duración de los ciclos de división celular en los ápices radiculares y apicales. Por su parte, Poethig (2003) señaló, en el mismo sentido, que los patrones de variación observados (tamaño y forma de las hojas, longitud de los entrenudos) a lo largo del ciclo de vida de la planta sugieren que los factores que regulan el CF también actuarían regulando la duración del ciclo de las células del meristemo apical; así, las variaciones en la longitud de los entrenudos se relacionan con la frecuencia de las divisiones del meristemo apical del tallo, mientras que las variaciones en el tamaño vienen determinadas por la duración de la fase de expansión.

El papel de las giberelinas en el cambio de fase no está del todo claro; así, aplicaciones exógenas producen diferentes respuestas en diferentes especies; en el caso de *Hedera helix*, produce la reversión de la forma adulta hacia formas más juveniles (Robins, 1957), en cítricos también son inhibidoras de la floración (Snowball *y col.*, 1988), mientras que en coníferas acelera la producción de estróbilos (Philipson, 1990) y también en *Zea mays* promueven el CF (Evans y Poethig, 1995).

De todas estas observaciones, podríamos concluir que más que la implicación de una hormona específica en el CF, habría que tener en cuenta los balances en las concentraciones endógenas de varias de ellas, considerando además, que existen grandes variaciones estacionales en los niveles endógenos de las distintas hormonas.

I.2.3.2.3. Disponibilidad de nutrientes

Trippi (1990) señaló que mientras el contenido en hidratos de carbono sea bajo, tendrá lugar un tipo de crecimiento indeterminado con formación de brotes y raíces, pero con el aumento progresivo en el contenido de azúcares comenzaría un efecto modulador del potencial morfogénico que induciría la floración, cese del crecimiento, dormancia y senescencia; esta hipótesis parece estar confirmada con el trabajo de Tsai *y col.* (1997) con el uso de plantas de tabaco transformadas con el gen de la rubisco en antisentido; estas plantas mostraron un retraso en la transición a la fase adulta, aunque una vez alcanzada ésta, su desarrollo era normal, debido probablemente a las adaptaciones que presentaban para maximizar los niveles de fotosíntesis (mayor número de hojas y elevada relación tallo/raíz).

I.2.3.2.4. Regulación génica

El hecho de que el cigoto tuviera la información genética para formar un nuevo individuo, habría llevado a pensar que los genes se activaban de forma progresiva a lo largo

del desarrollo (Bonga, 1982); sin embargo, actualmente parece más aceptado que lo que se produce son fenómenos de represión en los que estarían implicados todos aquellos procesos que suponen un control en los niveles de expresión génica como la metilación del ADN nuclear (Holliday, 2005) o la eucromatización y heterocromatización por modificación de histonas (Jaenish y Bird, 2003). Bonga (1982) señaló que los procesos de maduración no están exclusivamente determinados por el núcleo, sino también por la acumulación de determinados elementos autorreplicantes (ADN de mitocondrias y cloroplastos) en el citoplasma a lo largo de muchas generaciones celulares. Por su parte, Meier-Dinkel y Kleinschmit (1990) señalaron que el proceso de maduración podía ser explicado por actividades génicas selectivas, de modo que diferentes complejos génicos serían activos en las diferentes fases del desarrollo; en estos procesos de regulación génica estarían implicadas las poliaminas, que inducen cambios en la conformación del ADN y por lo tanto en sus niveles de transcripción (Panagiotides y *col.*, 1995) y los cambios en los niveles de metilación/desmetilación del ADN (Holliday, 2005).

Las diferencias bioquímicas y moleculares observadas entre individuos juveniles y adultos de determinadas especies (Tabla 4D), suponen indicios indirectos del papel de los genes en el control del CF. Por otra parte, la posibilidad de inducir mutaciones y ver su efecto en el desarrollo de la planta, ha permitido la identificación de genes específicos implicados en estos procesos, inicialmente en especies modelo, como *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*, y posteriormente, de forma paralela al desarrollo de las técnicas de biología molecular, en especies leñosas.

La primera evidencia directa de que el cambio de fase está bajo control génico fue propuesta por Poethig (1988) mediante el estudio de tres mutaciones semidominantes en maíz: Teopod1 (Tp1), Teopod2 (Tp2) y Teopod3 (Tp3), que prolongan la expresión de las características juveniles de las plantas afectadas. La observación de que estas mutaciones no

afectaban al tiempo de floración o a la sensibilidad al fotoperiodo de los brotes (Bassiri *y col.*, 1992), sugirió que el cambio de fase es regulado independientemente de la inducción floral. En esta misma especie, Vega *y col.* (2002) aislaron el gen *epc* (early phase change); las mutaciones de *epc* reducían la duración de la fase juvenil vegetativa y causaban una rápida floración, además de bloquear el rejuvenecimiento de los primordios foliares escindidos de sus ápices, lo que llevó a estos autores a sugerir que *epc* es requerido para la expresión de las características propias de la fase juvenil. Posteriormente, Lauter *y col.* (2005) indicaron que el CF en maíz es regulado por la acción de dos genes antagonistas, el gen *glossy 15* (*gl15*) que mantiene la fase juvenil y *miR172* que promueve la transición hasta la fase adulta, mediante regulación negativa de *gl15*.

En *Arabidopsis* se han descrito los siguientes genes: TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) cuya sobreexpresión retrasa la floración y regula el crecimiento de la planta mediante el mantenimiento de un estado de indeterminación en el ápice (Shannon y Meeks-Wagner, 1991); LEAFY (LFY), APETALA1 (AP1) y CAULIFLOWER (CAL) entre otros (Mandel y Yanofsky, 1995; Pelaz *y col.*, 2001) que regulan la producción de meristemas florales determinados; EAF1 (early flowering1) cuyos mutantes muestran floración precoz (Scott *y col.*, 1999); SQN (SQUINT) cuyos mutantes poseen un número reducido de hojas juveniles y una morfología floral alterada, aunque no afecta al tiempo de floración (Berardini *y col.*, 2001). Por otra parte, se ha observado que existen relaciones entre estos genes, así TFL1 previene el desarrollo floral mediante el bloqueo de la expresión de LFY y AP1 en el domo central del ápice (Liljegren *y col.*, 1999).

En *Oriza sativa*, Asai *y col.* (2002) observaron cómo mutantes del gen MORIL-1 (*moril*) presentaban una extensión de la fase juvenil y no florecían ni siquiera bajo condiciones inductivas; el corto plastocrono, las altas tasas de división del ápice y la menor

actividad fotosintética de las plantas mutadas ponían de manifiesto que se encontraban permanentemente en fase juvenil.

Recientemente se han identificado genes relacionados con la floración en diversas especies leñosas, así en *Citrus sinensis* se han aislado genes como el CsTFL (Pillitteri y col., 2004a), CsLFY y CsAP1 (Pillitteri y col., 2004b); estudios mediante RT-PCR demostraron que la juvenilidad en *Citrus* se correlaciona positivamente con la acumulación de transcritos CsTFL y negativamente con los genes de floración CsLFY y CsAP1.

En *Populus spp.*, Hsu y col. (2006) describieron el FLOWERING LOCUS T2 (FT2), relacionado con los genes FT de *Arabidopsis*, que controla la primera floración y las floraciones estacionales, una vez alcanzada la fase adulta, de esta especie; estos autores observaron cómo los transcritos de este gen son escasos durante la fase juvenil, y aumentan durante el crecimiento; por otra parte, cuando plantas juveniles son transformadas con este gen, el nivel de transcritos aumenta y las plantas florecen en un año, mientras que en condiciones normales su periodo juvenil oscila entre 7-10 años.

En *Malus x domestica*, se han descrito también varios genes relacionados con la juvenilidad: MdTFL1 (Kotoda y col., 2006), que mantiene la juvenilidad de las plantas en las que se expresa y MdFT1 y MdFT2 (Kotoda y col., 2010), que se expresan diferencialmente en tejidos adultos y órganos reproductivos respectivamente y cuya expresión ectópica induce floración precoz en *Arabidopsis*.

I.2.4. Estabilidad de los meristemos

Las características que determinan la madurez se van acumulando progresivamente porque se transmiten de una generación celular somática a la siguiente, a través del proceso de mitosis (Hackett y col., 1990). Cuando se alcanza la fase adulta de desarrollo, ésta es relativamente estable, de manera que la floración puede continuar tanto tiempo como lo

posibiliten los procesos de inducción floral (Hackett, 1987); esta capacidad de floración se mantiene incluso durante los procesos de propagación vegetativa; así, en plantas maduras de *Hedera helix*, las estaquillas tomadas de la región basal desarrollan plantas juveniles, mientras que las tomadas de la parte superior dan lugar a plantas adultas (Taiz y Zeiger, 2010).

La estabilidad génica es un prerequisite en los procesos de propagación vegetativa y quizás deberíamos preguntarnos cómo se mantiene si las tasas de mutación son proporcionales a las tasas de división celular y el meristemo debe experimentar múltiples divisiones durante el ciclo de vida de cada planta. Bonga (1982) señala que los mecanismos para asegurar esta estabilidad se centran por un lado, en limitar los procesos de división y, por otra, en la no segregación al azar de las hebras de ADN. En la mayoría de las plantas, los meristemos poseen zonas de baja actividad mitótica; así en el ápice vegetativo del brote, la zona central es relativamente inactiva mientras los brotes permanecen en estado vegetativo, por lo que en el ápice adulto existirá una región que habrá sufrido un número limitado de divisiones celulares; también se ha demostrado la existencia de un centro de quiescencia en el meristemo de la raíz que muestra bajas tasas de mutación incluso en situaciones adversas (radiaciones X, α , β ; mutagénos químicos, choques térmicos... etc.).

Charlesworth (1989), señala que las plantas que presentan largos ciclos de vida, acumulan una gran cantidad de variaciones somáticas, debidas al gran número de divisiones que experimentan sus meristemos tras la formación del cigoto. Existen mecanismos que permiten la acumulación de estas variaciones: líneas germinales separadas (mientras en los animales los gametos descienden directamente de una línea germinal, las plantas no establecen una línea germinal, sino que todas sus células retienen el poder de la reproducción, y la probabilidad de que originen un gameto depende de su posición en el organismo), sistemas abiertos de crecimiento (la existencia de los meristemos permite producir

periódicamente y de forma casi perenne nuevos órganos y tejidos), organizaciones meristemáticas flexibles y el hecho de que la mayoría de estas mutaciones no son incompatibles con la vida (Klekowsky y Godfrey, 1989). De esta manera, la cuestión de la estabilidad genética en las plantas perennes tendría que estar referida a cómo se reduce el impacto de estas variaciones; en esta línea, Klekowsky (1988) se pregunta si las células mutantes se mantendrían en los meristemas o si por el contrario serían eliminadas hacia órganos y tejidos a término; muchas de las características del meristemo apical podrían explicar el porqué no se fijan estas variaciones: el número de divisiones celulares que experimenta las células iniciales por entrenudo es limitado, la existencia de meristemas en estado latente, la organización celular estratificada y la existencia de divisiones periclinales que favorecen el movimiento de las células entre las diferentes capas del meristemo.

En cuanto al mantenimiento de las características estables de los meristemas, existen tres hipótesis que tratan de explicarlo (Hackett, 1985; 1987):

1. Hipótesis celular.- las bases de la estabilidad se determinan a nivel celular, existiendo diferencias intrínsecas en las células meristemáticas de los ápices juveniles y adultos, que son el fruto de la determinación celular que implica el proceso de maduración.
2. Hipótesis estructural y de organización.- las características del meristemo apical están determinadas por la estructura y organización del meristemo apical como un todo.
3. Hipótesis correlativa.- la estructura y función del meristemo apical están controladas o estabilizadas por la influencia de tejidos diferenciados que se encuentran localizados en partes más o menos lejanas de la planta, habiendo por lo tanto efectos correlativos que involucran a la planta completa.

Medford (1992) afirma que el meristemo apical del tallo funciona como una unidad autónoma puesto que si se escinde de la planta y se pone en cultivo es capaz de seguir creciendo independientemente de señales externas; ahora bien, si se divide en partes

pequeñas, primero comenzará a desarrollar el ápice entero antes de formar ninguna estructura o asumir algún tipo de función (esto ocurre incluso cuando el meristemo es 1/20 de su tamaño original); por ello, dado que las diferentes zonas se forman sólo cuando el meristemo está completo, debe haber algún tipo de comunicación entre sus células de manera que se coordinen para formar las diferentes estructuras. Trabajos más recientes han demostrado la existencia de diversos tipos de comunicación entre las células del meristemo, como por ejemplo, la relación entre los genes WUSCHEL (WUS) y CLAVATA (CLV); el gen WUS es un factor de transcripción requerido para la formación y mantenimiento de las células madre meristemáticas, de manera que los mutantes de este factor de transcripción carecen de meristemo apical. En situaciones normales, el tamaño de la zona donde se expresa este gen está controlado por los genes CLV. Así, un incremento en el número de células que expresan WUS produce un incremento en la transcripción del gen CLV3. CLV3 es un péptido de pequeño peso molecular que se expresa en la capa exterior del meristemo, pasa a capas interiores donde se une a CLV1 y éste suprime la expresión del WUS. Al disminuir el número de células madre se reduce el nivel de expresión de CLV3, permitiendo la expresión de WUS e incrementando de nuevo el número de células madre (Schoof *y col.*, 2000; Clark, 2001).

Poethig (1990) señala que la tendencia de las células vegetales a desdiferenciarse cuando se cultivan *in vitro*, y la facilidad con la que pueden ser inducidas a regenerar, soportaría la hipótesis de que el desarrollo de las células estaría regulado principalmente por el órgano o tejido del que forman parte. Sin embargo, se han detectado diferencias en el comportamiento de las células derivadas de órganos o tejidos en diferentes fases de desarrollo; así, cultivos de callo de *Hedera hélix* derivados de formas juveniles y adultas difieren en su capacidad de regeneración, los tejidos juveniles crecen más rápidamente que los adultos y los tejidos adultos producen brotes en lugar de embriones (Polito y Alliata, 1981). Sin embargo, en el cultivo *in vitro* de yemas aisladas de la base y de la copa de un

mismo individuo de *Robinia pseudoacacia* Kyung-Hwan y col. (1997), no encontraron diferencias de comportamiento entre ambos tipos de explantos, pese a que existían entre ellos diferencias morfológicas asociadas con la juvenilidad y la madurez respectivamente, por lo que estos autores concluyen que es la influencia de los tejidos adyacentes, lo que determina el diferente comportamiento de explantos con diferente edad ontogenética.

I.2.5. Manipulación del cambio de fase como herramienta para la mejora y la propagación

I.2.5.1. Acortamiento del periodo juvenil para acelerar el proceso de mejora

Uno de los mayores impedimentos en el desarrollo de programas de mejora de especies leñosas, es la duración de su periodo juvenil, que puede durar entre 5-40 años (Tabla 3); durante este periodo, no es posible realizar de cruzamientos ni evaluar las posibilidades productivas de los individuos seleccionados, de manera que, en esta fase, sólo pueden seleccionarse individuos por sus características morfológicas. Consecuentemente se han realizado muchos y variados estudios para acortar la fase juvenil de las especies leñosas.

I.2.5.1.1. Elección de genitores

La existencia de individuos con periodos juveniles cortos, en relación a los estándares de su especie, permite realizar cruzamientos dirigidos para seleccionar este carácter. Así, en *Eucalyptus grandis* Missiaggia y col. (2005) describieron un individuo que florecía aproximadamente a los 90 días de la germinación; el carácter mostró una segregación mendeliana 1:1 tras el cruzamiento entre individuos de periodo corto y de duración estándar. En *Citrus paradisi*, *Citrus grandis* (y sus respectivos híbridos), *Citrus intermedia* y *Citrus reticulata* también se ha descrito la existencia de individuos de floración precoz. En estas especies, la floración precoz también puede ser inducida por procedimientos agroclimáticos;

sin embargo, en estos casos, tras la primera floración las plantas revierten al estado juvenil durante algunos años (Holland *y col.*, 1995).

I.2.5.1.2. Técnicas de cultivo

Los procedimientos adoptados son muy variables, pero la mayoría se basan en que la planta alcance una determinada altura antes de ser inducida a floración (McDaniel, 1996). En olivo, tratamientos que promueven el crecimiento vegetativo mediante el control del fotoperiodo/temperatura (Clavero-Ramírez y Pliego-Alfaro, 1993), y la aplicación de sistemas de riego, poda y fertilización en campo (Lavee *y col.*, 1996; Moreno-Alías *y col.*, 2010) aceleran la entrada en producción de las plantas de semilla.

La aplicación de solarización también ha dado resultados positivos en el crecimiento de las plantas; así, en albaricoquero y nogal se detectó una tasa de crecimiento superior (25 %) en los individuos tratados respecto de los testigos (Stapleton y Devay, 1983); en olivo, Riachy *y col.* (2011) observaron cómo el diámetro del tronco y el número de plantas que alcanzaban la fase adulta era superior en las progenies que crecían en suelos solarizados respecto de los controles.

En plantas de 2-3 años de *Pinus banksiana* (Cecich *y col.*, 1994) y en otras coníferas (Philipson, 1990), se han descrito floraciones precoces tras la aplicación exógena de giberelinas, aunque su efecto es contrario en otras especies como la hiedra, en la que produce la reversión de la forma adulta a formas más juveniles (Robins, 1957), o los cítricos, en los que son inhibidoras de la floración (Snowball *y col.*, 1988).

I.2.5.1.3. Transformación con genes que controlan el cambio de fase

La transformación con genes directamente implicados en la floración está produciendo resultados prometedores en algunas especies; la mayoría de estos genes

pertenecen a una familia génica, MADS-box, caracterizada por la presencia de secuencias génicas altamente conservadas. La sobreexpresión de FRUITFULL (FUL)-homólogo de *BpMADS4*- induce floraciones precoces en abedul (Elo *y col.*, 2007) y manzano (Flachowsky *y col.*, 2007) con una reducción dramática del periodo juvenil, aunque no se observaron dichos efectos en plantas transgénicas de álamo.

El gen FT de *Arabidopsis* y sus homólogos en álamo, *PtFT* y *PtFT2*, inducen floración en este último con una alta eficiencia (Hsu *y col.*, 2006); las plantas transgénicas producen flores tanto masculinas como femeninas. El gen de cítricos, *CiFT* (homólogo de FT) descrito por Hisada *y col.*, (1997) ha dado buenos resultados acelerando la floración de *P. trifoliata* L. Raf (Endo *y col.*, 2005) y *Pyrus communis* (Matsuda *y col.*, 2006); en esta última especie la sobreexpresión de este gen produce floraciones de los tallos que crecen *in vitro*. Resultados similares se han obtenido en olivo tras la transformación con el gen FT de *Medicago truncatula* (Cerezo *y col.*, 2010).

I.2.5.2. Rejuvenecimiento para mejorar la propagación vegetativa

Uno de los principales problemas para la propagación vegetativa de plantas leñosas es la relación inversa que existe entre el estado adulto y la capacidad morfogénica; para mitigar este problema, se pueden utilizar dos vías: i) seleccionar los tejidos más juveniles dentro del árbol o ii) inducir rejuvenecimiento en algunas partes del mismo (Bonga, 1982, 1987; Hackett, 1985).

I.2.5.2.1. Cono de juvenilidad

En un árbol adulto procedente de semilla, existen tejidos ontogenéticamente juveniles en la base del tronco y en las ramas bajas (Hackett, 1985). Los brotes epicórmicos que crecen a partir de yemas latentes en la base del tronco y ramas primarias tienen características

juveniles y alta capacidad de enraizamiento, ya que proceden de yemas que han permanecido fuertemente reprimidas y conservan por tanto un cierto grado de juvenilidad.

En la figura 5 se puede apreciar un esquema sobre la distribución de los tejidos juveniles en plantas leñosas procedentes de semilla (Bonga, 1982); en una conífera (figura 5, izquierda), el grado de juvenilidad de un meristemo apical, es inversamente proporcional a la distancia (a través del tronco y las ramas) entre la zona de unión raíz-tallo (A); de esta manera el meristemo B sería el más adulto y el meristemo F el más juvenil. En una planta leñosa con alto grado de ramificación (figura 5, derecha), las zonas más densamente marcadas son las más juveniles. Brotes epicórmicos (E); esferoblastos (Sp); brotes procedentes de la raíz (R) y brotes procedentes de árboles severamente podados (S, P) son juveniles.

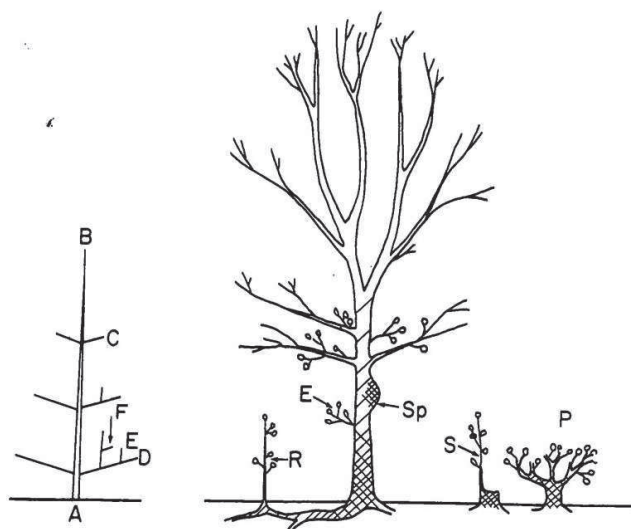


Figura 5.- Gradiente de juvenilidad en plantas leñosas (Bonga, 1982). 1) Conífera (izquierda) A.- zona de unión raíz-tallo. B.- meristemo apical del tallo. C, D, E y F.- meristemos laterales. 2) Hoja ancha (derecha). E.- brotes epicórmicos. P y S.- brotes procedentes de árboles severamente podados. R.- brotes procedentes de la raíz. SP.- esferoblastos.

El crecimiento forzado en invernadero de secciones de tallo de *Quercus rubra* puso de manifiesto la existencia de este gradiente de juvenilidad, de manera que las porciones basales produjeron mayor número de tallos que las porciones superiores; de forma similar, los brotes inducidos a partir de estas secciones presentaban un porcentaje de enraizamiento del 40 % cuando procedían de la base del árbol disminuyendo progresivamente esta cifra al aumentar la distancia de la yema a la base del árbol (Fishel y col., 2003).

I.2.5.2.2. Inducción de rejuvenecimiento

El término rejuvenecimiento hace referencia al incremento de la capacidad morfogenética de una planta. Bonga (1982) y Franclet y col. (1987) distinguen entre i) rejuvenecimiento parcial, que implica la desaparición de algunas características de la madurez y la reaparición de características juveniles en ciertas partes de la planta, que serían capaces de formar raíces y brotes adventicios y ii) rejuvenecimiento total o completo, en el que se recobraría la juvenilidad total y simultáneamente para todas las características; este proceso ocurre durante la formación del cigoto en los procesos de reproducción sexual y durante la formación de embriones somáticos o apomícticos.

Existen métodos que permiten un rejuvenecimiento progresivo, aunque incompleto y a menudo rápidamente reversible, a la fase adulta (Franclet, 1991), lo que sería una ventaja ya que no interesa que el incremento en el vigor vegetativo y el potencial de enraizamiento vaya acompañado de una reducción o retraso en la capacidad de floración (Howard y col., 1988).

Pierik (1990b), resalta las siguientes consideraciones generales sobre el rejuvenecimiento:

1. Es muy difícil distinguir el verdadero rejuvenecimiento de la reversión del envejecimiento; el verdadero rejuvenecimiento es más difícil de conseguir que la reversión del envejecimiento o revitalización.
2. La eficacia del rejuvenecimiento disminuye con el grado de envejecimiento del árbol. Cuando más adulta sea la planta, más fuerte será el tratamiento necesario para rejuvenecerla y frecuentemente, las características juveniles solo podrán ser recuperadas mediante tratamiento repetidos.
3. Las partes terminal y periférica de un árbol, cronológicamente las más jóvenes, son ontogenéticamente las más antiguas. A medida que aumenta la distancia entre el ápice del brote y el sistema radicular, desaparece gradualmente la condición juvenil de los meristemos de los brotes, excepto en la base del árbol. En principio, las partes basal e interior pueden retener características juveniles.
4. Es importante seleccionar yemas jóvenes en crecimiento activo para facilitar el rejuvenecimiento. El aislamiento posterior, *in vivo* o *in vitro*, es un prerequisite esencial, y cuanto menor sea el tamaño del material aislado, mayor es la posibilidad de rejuvenecerlo.
5. Las técnicas de rejuvenecimiento, salvo la formación de órganos adventicios y la embriogénesis somática, no provocan pérdida del plagiotropismo.
6. La capacidad de enraizamiento, considerada como un parámetro importante para el rejuvenecimiento, disminuye con la edad de la planta, aunque no existe una correlación estricta entre enraizamiento y rejuvenecimiento.
7. La benciladenina puede considerarse como una sustancia anti envejecimiento importante y facilita la revitalización tanto *in vivo* como *in vitro*. La BAP promueve el crecimiento de yemas laterales y yemas en dormancia y puede inducir la formación de yemas adventicias, a menudo ligadas a un verdadero rejuvenecimiento.

I.2.5.2.2.1. Bases del rejuvenecimiento

El rejuvenecimiento más dramático ocurre durante la profase meiótica, en la que se produce una reducción del número de ribosomas citoplasmáticos, y una simplificación de las mitocondrias; parece que la finalidad de este proceso sería la eliminación de ARNm asociado a ribosomas viejos en el citoplasma y la reducción de la complejidad de los orgánulos, al mismo tiempo que tienen lugar en el núcleo procesos de lisis similares a los observados en el citoplasma; durante la última fase de la meiosis, el citoplasma será repoblado con nuevos orgánulos, presumiblemente juveniles, formándose nuevas mitocondrias a partir de las parcialmente lisadas. Aunque parece cierto que la antigua información del citoplasma se pierde, no está claro cómo se provee posteriormente de nueva información, y cómo y cuándo es reprogramada la información genética nuclear (Bonga, 1982). Por otra parte, y de acuerdo con este autor, no se sabe si los mecanismos de reprogramación de las células para la morfogénesis, son efectivamente similares a los mecanismos de rejuvenecimiento activos durante la reproducción sexual, pero sería interesante determinar, si algunos de los procesos que tienen lugar durante el rejuvenecimiento sexual, pueden ser reproducidos en las células somáticas por medios físicos o químicos, y en consecuencia, esto sería seguido por la morfogénesis.

Bonga (1984) demostró que tejidos somáticos de los estróbilos femeninos de *Larix decidua*, recolectados en una época próxima a la meiosis, pueden formar brotes adventicios *in vitro*. El hecho de que durante la meiosis, los tejidos somáticos próximos al lugar físico donde ésta ocurre, ganen competencia morfogenética, hizo postular a Meier-Dinkel y Kleinschmit (1990) la existencia de factores de rejuvenecimiento presentes en el meiocito; si esto es correcto, existen dos posibilidades, i) que estos factores sean producidos en las células en meiosis y se difundan a los tejidos anexos o ii) que sean producidos en los tejidos somáticos y posteriormente translocados a las células sexuales. Este hecho parece estar en

consonancia con lo observado por García *y col.* (2002b) en flores de *Olea europaea*, en las que se encontraron polipéptidos de 29 kDa y 63 kDa, que anteriormente habían sido identificados como marcadores de juvenilidad en olivo (García *y col.*, 2000a).

En cualquier caso, parece que los mecanismos implicados en el rejuvenecimiento tienen mucha relación con las situaciones de estrés (Von Aderkas y Bonga 2000); así, en el cultivo *in vitro* de granos de polen de tabaco, Heberle-Bors (1989) observó cómo la privación de nutrientes en el medio de cultivo causaba la degradación parcial del citoplasma de las células, con la formación de espacios estructuralmente vacíos, reducción del número de plastidios, granos de almidón y ribosomas, aunque la integridad de las mitocondrias se mantenía y también su capacidad para convertir los nutrientes de reserva en energía; por otra parte y dado que la privación de nutrientes es también uno de los mecanismos utilizados para inducir embriogénesis, podríamos preguntarnos si este proceso también requiere la eliminación de orgánulos viejos del citoplasma de modo similar a lo ocurrido en meiosis. En *Quercus suber*, la combinación de la privación de sacarosa junto con un ligero choque de calor a los cultivos de anteras, estimula la embriogénesis en microsporas (Bueno *y col.*, 1997). Nyitrai *y col.* (2004) indujeron rejuvenecimiento en hojas de guisante sometidas a condiciones de estrés, mediante su exposición a bajas concentraciones de metales pesados (Cd, Pb, Ni y Ti); en las hojas tratadas, se produjo una mayor síntesis de clorofila y actividad fotosintética que en las hojas no tratadas; un ensayo con extractos de estas hojas puso de manifiesto que las citoquininas intervenían en los efectos producidos por los agentes estresantes, ya que la dinámica de las curvas de concentración de clorofila y citoquininas fueron similares durante el proceso de rejuvenecimiento, lo que llevó a estos autores a afirmar que los agentes estresantes generaban reacciones inespecíficas de alarma que producían un incremento en la síntesis de citoquininas y que, por lo tanto, implicarían cambios en el equilibrio hormonal de la planta.

I.2.5.2.2.2. Técnicas de rejuvenecimiento

Los métodos para la inducción del rejuvenecimiento se basan en que las características relacionadas con la maduración son estables, pero reversibles. No todas las características revierten con la misma facilidad, algunas son más manipulables que otras, existiendo una gran influencia del tipo de tratamiento, su duración y la intensidad con la que se aplique (Hackett y Murray, 1993). Hackett (1985) señala que una técnica de rejuvenecimiento será más efectiva si se realizan varios ciclos de un mismo tratamiento y los resultados pueden mejorar si se combinan técnicas de rejuvenecimiento *in vivo* e *in vitro* (Howard y col., 1989).

I.2.5.2.2.2.1. Técnicas de rejuvenecimiento *in vivo*

Inducción de yemas adventicias.

La inducción de crecimiento adventicio a partir de raíz o tallo, puede restaurar la condición juvenil en plantas adultas (Kester, 1976, Lyrene, 1981). Este rejuvenecimiento puede ser debido a la formación *di novo* de nuevos meristemas y no necesariamente porque provengan de partes juveniles de las plantas (Hackett, 1985).

Injerto de púas adultas sobre patrones juveniles.

El injerto de brotes de árboles adultos sobre patrones juveniles produce un incremento de vigor vegetativo y algún retraso en la floración, lo que se interpreta como un rejuvenecimiento parcial (Hackett, 1985) y, por regla general, las características adultas vuelven a expresarse tras un corto periodo de tiempo (Franclet y col., 1987).

El éxito de la técnica depende del intervalo de tiempo transcurrido entre dos injertos sucesivos (Franclet, 1972); el tipo de patrón empleado, que ha de ser fuerte y vigoroso (Pierik, 1990b); la proximidad entre el ápice adulto y el sistema radicular juvenil (Hackett,

1988; Ballester *y col.*, 1990) y la eliminación de las hojas adultas tras la realización del injerto (Franclet *y col.*, 1987).

En *Pinus radiata*, Valdés *y col.* (2003) utilizaron la relación del contenido en citokininas (tipo- Z /tipo -iP) para valorar el grado de revigorización obtenido tras el injerto *in vivo* de ápices caulinares de árboles adultos sobre semillas de un año de edad; los resultados obtenidos fueron de 0,02 para el material adulto, 0,25 para el material injertado una vez y 0,5 para el injertado dos veces, corroborando observaciones previas de Valdés *y col.* (2002) que consideraban esta relación como un marcador de juvenilidad.

Los efectos positivos del injerto sobre la revigorización se atribuyen:

i. A la posición del meristemo en zonas cercanas a la raíz cuando es injertado. En teoría, esto resulta en una mejora en la disponibilidad de nutrientes y hormonas en el ápice que origina un crecimiento revitalizado de los brotes que pueden expresar, incluso, características juveniles como la forma o disposición de las hojas (Bonga y Von Aderkas, 1992).

ii. Al estrés temporal que sigue a la fase de injerto. La realización del injerto implica la rotura del sistema vascular tanto del patrón como de la púa, con la consiguiente pérdida de agua y el cese temporal del transporte de solutos, que debe ser restaurado para evitar la muerte de la planta por falta de nutrientes y desecación (Parkinson *y col.*, 1990); es decir, el tallo puede sufrir una fase de inanición que causa un pequeño y reversible grado de degradación del citoplasma de las células del meristemo hasta que se restablece el aporte de nutrientes desde la raíz (Von Aderkas y Bonga 2000).

Greenwood (1995) sugiere que la expresión de las características de madurez está determinada por la proporción de células maduras y juveniles en el ápice del tallo en un momento dado. Si esto es correcto, las condiciones que favorecen la rápida multiplicación de las células juveniles podrían justificar el gradual rejuvenecimiento observado en los injertos

seriados; así, el estrés nutricional que ocurre de forma sucesiva hasta que se establecen conexiones vasculares patrón-púa, en los injertos seriados, puede estar involucrado en la selección de células juveniles sobre las maduras. Este mecanismo y los que causan degeneración parcial del citoplasma pueden operar simultánea o separadamente.

Aplicación de reguladores de crecimiento.

El ácido giberélico puede inducir reversión hacia la fase juvenil, aumentando la capacidad de enraizamiento, aunque como señalan Zimmerman y col., (1985) en muchos casos, este efecto es temporal; sin embargo, la aplicación de GA₃ puede resultar útil como pretratamiento de la planta antes de su introducción *in vitro* (Franclet y col., 1987).

También los tratamientos con BAP promueven el crecimiento de yemas en dormancia y pueden inducir la formación de yemas adventicias, a menudo ligadas a un verdadero rejuvenecimiento (Pierik, 1990b).

Estaquillado sucesivo.

Por lo general, las características adultas son estables tras la propagación por estaquillado (Hackett, 1985), y aunque cabría esperar que estas características se acumularan progresivamente dando lugar a la senilidad de los clones, se ha comprobado que generaciones sucesivas no sólo no llegan a ser más adultas, sino que incluso se puede obtener cierto grado de rejuvenecimiento (Bonga, 1982; Hackett, 1985). Así tras el estaquillado sucesivo se ha conseguido cierto grado de rejuvenecimiento en *Ficus pumila* (Davies, 1983).

Podas repetidas

Podar repetidamente un árbol es una práctica común en los procesos de propagación; se trata de forzar el crecimiento de nuevas ramas en la parte basal del tallo, constituyendo estas ramas la fuente de estaquillas para el enraizamiento. Así, en *Corylus avellana* (Rey y col., 1990) y *Picea sitchensis* (Selby y col., 1990), se ha observado un aumento en la capacidad de enraizamiento de las estaquillas procedentes de árboles podados. En *Eucalyptus grandis* x

urophylla, la capacidad de enraizamiento de las estaquillas varió entre el 5 % y el 95 % para el material no podado y podado cinco veces, respectivamente (Yang, 1995).

En *Corylus avellana*, Rey y col. (1998) observaron diferencias en el contenido endógeno de poliaminas del material no podado y podado y cómo estas variaciones se relacionaban con la intensidad de la poda, indicando que se estaba produciendo un fenómeno de revigorización. Algunos autores atribuyen este efecto a la selección y forzado de unos meristemas que se encontraban en la base del árbol, fuertemente reprimidos y que, por ello, han retenido la juvenilidad (Bonga, 1982; Franclet, 1983), mientras que otros autores hacen referencia a su origen adventicio (Read y Bavougian, 2013).

En *Pinus radiata*, Libby y col. (1972) comprobaron que el mantenimiento de plantas cortadas a 1-2 m del suelo proporcionaba estaquillas que enraizaban antes y en mayores porcentajes que aquellas obtenidas a partir de árboles sin podar; la evaluación posterior de las plantas desarrolladas, puso de manifiesto que tras 7 años de crecimiento en las mismas condiciones, las plantas procedentes de las estaquillas de los setos tenían mayor volumen, ramas más largas y producían menos conos que las plantas derivadas de las estaquillas que procedían de los árboles sin podar (Bolstad y Libby, 1982). La formación de setos bajos mediante podas se ha utilizado en varias especies, como *Eucalyptus grandis* para proporcionar material con mayor capacidad de enraizamiento (Hartney, 1980).

I.2.5.2.2.2. Técnicas de rejuvenecimiento *in vitro*

Las características relacionadas con la fase adulta de desarrollo pueden ser modificadas como resultado del cultivo *in vitro*; en este proceso intervienen factores tales como el genotipo, la edad y estado fisiológico de la planta madre, posición y tamaño del explanto, frecuencia y duración de los subcultivos y composición de los medios nutritivos (Pierik, 1990a). Nas y col. (2002) sugirieron que el rejuvenecimiento inducido por el cultivo *in vitro*,

en explantos obtenidos a partir de material adulto, es transitorio y que una vez que las plantas son sacadas de los medios de cultivo recuperan las características de la madurez, entre ellas la capacidad de floración, más rápidamente que el material procedente de semilla y en un tiempo similar al que lo harían si hubieran sido propagadas mediante los sistemas tradicionales de propagación vegetativa.

Cultivo de meristemos

No es fácil regenerar plantas leñosas a partir del cultivo de meristemos, pero cuando se consigue, éstas presentan características juveniles (Margara, 1982); el aislamiento de estos meristemos en el momento fisiológico indicado y su introducción *in vitro*, ayudaría a contrarrestar los efectos correlativos del resto de la planta (Monteuuis y Bon, 1990). Con este método se ha conseguido el rejuvenecimiento de un espécimen de *Sequoiadendrom giganteum* de 100 de edad; las plantas regeneradas mostraban características morfológicas análogas a las plantas juveniles utilizadas como control (Monteuuis, 1990; 1991); además, estas plantas presentaban la proteína de membrana J16 descrita como un marcador de juvenilidad en esta especie (Bon, 1988).

Subcultivos sucesivos

El subcultivo en serie es un proceso similar a las podas sucesivas, siendo la exposición de la planta a las citoquininas, la principal causa de los efectos rejuvenecedores del cultivo *in vitro* (Franclet y col., 1987).

La tasa de rejuvenecimiento adquirida depende tanto de la especie, como de la variedad y el número de subcultivos, siendo muchas las especies leñosas en las que se ha observado un incremento de las tasas de proliferación y enraizamiento cuando fueron cultivadas *in vitro* repetidamente; así, en *Corylus avellana*, Díaz-Sala y col. (1990b); observaron que el material adulto mantenido *in vitro* durante nueve subcultivos sucesivos, presentaba perfiles peptídicos y de metilación, diferentes a los del material adulto a partir del

que se inició el cultivo y a los del material juvenil procedente de semillas del mismo y mantenido en invernadero, aunque no pudieron averiguar si ello se debía a la mayor capacidad organogénica del material *in vitro* o eran inducidas por las condiciones del cultivo (Díaz-Sala y col., 1995). Por el contrario, Parra y col. (2001) en *Myrtus communis* no encontraron diferencias en los niveles de metilación entre el material adulto establecido en campo y el mismo material tras el proceso de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro*.

El cultivo *in vitro* de árboles adultos de *Metrosideros excelsa* causó reversión hacia formas juveniles; el aparente rejuvenecimiento observado afectaba tanto a la morfología como a la fisiología de las plantas micropropagadas; así, se observó cómo las hojas de las plantas rejuvenecidas presentaban formas menos redondeadas y carecían de las vellosidades, en la parte inferior, típicas de las hojas maduras; además las plantas rejuvenecidas tardaron tres o más años en volver a florecer, mientras que las estaquillas tomadas de las mismas plantas adultas pueden hacerlo en un año (Clemens y col., 1999). En *Castanea spp* la capacidad de proliferación de los cultivos *in vitro* se incrementó considerablemente entre los subcultivos 6-12 estabilizándose después (Sánchez y Vieitez, 1991).

El porcentaje de enraizamiento *in vitro* de material adulto de *Diospyros kaki* aumentó del 3,3 % al 90 % entre los subcultivos 3 y 38 respectivamente; los respectivos controles juveniles presentaban un porcentaje del 70 % tras tres subcultivos (Tao y col., 1994).

Por su parte, Grant y Hammatt (1999), observaron que las tasas de proliferación y enraizamiento *in vitro* de *Prunus avium*, se incrementaban a medida que aumentaba el tiempo de cultivo, pero estos parámetros eran independientes del intervalo entre subcultivo; así los cultivos mantenidos a 4 °C enraizaban en la misma proporción que aquellos incubados a 24 °C que eran subcultivados más frecuentemente. Finalmente, en plantas adultas de

Juglans regia, el porcentaje de enraizamiento *in vitro* se incrementó desde el 0 % (en los subcultivos 1-10), hasta el 40 % (a partir del 30 subcultivo) (Dolcet-San Juan y col., 2004).

Además de los subcultivos sucesivos, otras estrategias, como el recultivo horizontal de brotes decapitados, se han utilizado con éxito para aumentar el enraizamiento de *Camelia reticulata* y *Quercus robur* (Ballester y col., 1990; Vieitez y col., 1994) y *Passiflora* spp (Drew, 1991). En *Prunus avium*, el cocultivo de dos variedades, con diferente capacidad de enraizamiento permitió obtener un aumento de la capacidad rizogénica de la variedad recalcitrante (Ranjit y Kester, 1988); los autores lo atribuyeron al paso de sustancias de tipo giberelina desde la variedad fácil de enraizar a la difícil, a través de difusión por el medio de cultivo, ya que este efecto podía ser reproducido mediante la adición de GA₃ al medio.

Formación de brotes adventicios y embriogénesis somática

La condición juvenil de plantas adultas puede ser restaurada mediante la formación de embriones adventicios (Lyrene, 1981). Este fenómeno ocurre de forma natural a partir de la nucela de algunas variedades de cítricos, aunque sus propágulos no siempre producen plantas dentro de tipo. En el proceso de desarrollo de la nucela, los orgánulos citoplasmáticos de sus células se reducen en número y llegan a desorganizarse, lo que recuerda a los procedimientos de rejuvenecimiento sexual (Bonga, 1982).

Martínez y col. (2012) introdujeron *in vitro* material procedente de brotes epicórmicos de un árbol de 100 años de *Quercus robur* y lo matuvieron en proliferación mediante brotación de tallos axilares. Asimismo, establecieron líneas embriogénicas derivadas de explantos de hoja de estos brotes epicórmicos, manteniéndolos en proliferación mediante embriogénesis secundaria. Al cabo de un año los brotes derivados de las líneas embriogénicas mostraron una mayor proporción de brotes elongados y con mayor capacidad de enraizamiento (3,3 – 45,6 % a 23,2 – 89,8 %) que los tallos que provenían directamente de

los brotes epicórmicos. Por tanto, parece que ocurre un cierto grado de rejuvenecimiento durante el proceso de embriogénesis somática.

La formación de yemas adventicias también es un proceso de rejuvenecimiento que puede utilizarse para aumentar la capacidad morfogenética de clones adultos (Hackett, 1983); así, Rugini y Caricato (1995) consiguieron la formación de embriones somáticos a partir de material adulto que previamente había sido rejuvenecido *in vitro*; la inducción de los embriones se produjo a partir de peciolo de hoja procedentes de brotes *in vitro* que habían sido regenerados mediante organogénesis adventicia.

Microinjertos

El injerto sucesivo *in vitro*, de secciones nodales (2-20 mm) adultas sobre patrones juveniles, ha sido un método de rejuvenecimiento en especies leñosas para facilitar su propagación. Las púas procedentes de brotes *in vitro* y de plantas mantenidas en invernadero muestran mayores tasas de prendimiento y menores problemas de oxidación que las de árboles en campo (Toma y Duhoki, 2010). La respuesta obtenida depende tanto del genotipo como del número de ciclos de microinjertos sucesivos aunque, en general, se observó un aumento en la capacidad de enraizamiento y de proliferación del brote microinjertado a medida que aumenta el número de injertos sucesivos. A continuación se presentan los avances obtenidos en diferentes especies leñosas.

Especies frutales de clima subtropical.

Anacardium

Mneney y Mantell (2001) realizaron diversos ensayos para optimizar un método de microinjerto en *Anacardium occidentale*, concluyendo que se obtenía un mayor porcentaje de éxito cuando se injertaba la micropúa sobre uno de los lados del patrón que cuando se injertaba sobre el ápice del mismo. El porcentaje de enraizamiento de los tallos regenerados (13 %) fue mayor que el de los tallos adultos (0 %) pero todavía muy alejado de los

porcentajes obtenidos para el material juvenil, con lo cual, estos autores sugirieron que son necesarios más ciclos de microinjerto para lograr su rejuvenecimiento. En esta misma especie, Puthra y Anil (2002) obtuvieron un 80 % de microinjertos viables cuando el tamaño de la púa era de 5mm; pero, no evaluaron la capacidad de enraizamiento de las plantas regeneradas.

Annona

Con objeto de mejorar la capacidad de enraizamiento del chirimoyo (*Annona cherimola*) se ha utilizado la técnica del microinjerto sucesivo en tres cultivares (Fino de Jete, Bonita y Pazicas). El microinjerto de yemas subapicales sobre patrones juveniles (cv. Fino de Jete) mejoró significativamente la tasa de brotación de los tres cultivares (70 %, 53 % y 31 %, respectivamente). La capacidad de enraizamiento de los brotes adultos fue muy baja, sin embargo, la de los brotes procedentes de las yemas microinjertadas fue aumentando con los ciclos sucesivos, presentando sus valores máximos tras el 3º microinjerto (70 %, 60 % y 50 % para "Fino de Jete", "Bonita" y "Pazicas" respectivamente). Los brotes enraizados fueron micorrizados y aclimatados, presentando una alta tasa de supervivencia (90 al 100 %) lo que indica que el microinjerto también tuvo efectos positivos en la fase de aclimatación (Padilla y Encina, 2011).

Citrus

Huang y col., (1992a) obtuvieron una progresiva restauración de la capacidad de enraizamiento y vigor de los tallos regenerados de *Citrus reticulata* y *C. sinensis*, cuando ápices de 0,2 cm de longitud de árboles adultos fueron microinjertados de forma repetitiva cada 8 semanas, sobre semillas de Citrange Troyer; microtallos de 2 cm de longitud eran escindidos de los microinjertos cuando éstos brotaban, se cultivaban *in vitro*, y se comprobaba su capacidad organogénica a varios niveles; aproximadamente el 80 % de los tallos procedentes del primer microinjerto desarrollaban hojas cloróticas que presentaban

unos niveles de abscisión del 50 %; pero este valor descendía progresivamente a medida que los tallos provenían de microinjertos posteriores, de manera que, tras el quinto microinjerto los tallos mostraban un buen desarrollo en cuanto a tamaño, forma y aspecto de las hojas. La capacidad de enraizamiento aumentó de forma progresiva observándose unos valores de 45 %, 50 % y 69 % para el quinto, sexto y séptimo microinjerto respectivamente, frente al 100 % que presentaba el material juvenil; sin embargo, cultivos de callo iniciados a partir de explantos procedentes de los tallos microinjertados sucesivamente, no desarrollaron tallos adventicios ni embriones somáticos. La persistencia de la capacidad de enraizamiento de estos materiales hizo postular a estos autores que habían conseguido la reversión del ápice adulto hacia formas más juveniles.

Garcinia

Garcinia indica, es una planta originaria de la India, de la familia del mangostán (Clusiaceae), comúnmente conocida como *kocum*, es un árbol frutal que se utiliza como alimento y en la industria farmacéutica. El árbol también es usado como ornamental, con una densa cubierta de hojas verdes y con las hojas nuevas, teñidas de rojo rubí. Para la realización de los microinjertos se utilizaron púas de 2–3 mm, procedentes de brotes *in vitro* obtenidos a partir de secciones nodales de un árbol élite de 20 años; estos brotes eran cortados en su base en forma de V y se insertaban en una incisión vertical realizada al patrón juvenil. Los microinjertos eran mantenidos durante 8 semanas en el medio de Murashige y Skoog ($^{1/2}$ MS), tras las cuales, la parte apical del brote emergido era de nuevo injertada sobre otro patrón. Tras la realización de cinco microinjertos sucesivos se consiguió aumentar hasta un 75 % la capacidad de enraizamiento *in vitro* de estos brotes que no enraizaban antes de ser microinjertados (Chabuskwar y Deodhar, 2006).

Persea

Pliego-Alfaro y Murashige (1987) restauraron la capacidad de enraizamiento del patrón de aguacate Duke-7 (*Persea americana*) mediante el microinjerto de yemas laterales aisladas de plantas adultas, sobre patrones juveniles. Aproximadamente el 50 % de los brotes procedentes de los microinjertos mostraron capacidad de enraizamiento, indicando la reversión hacia la fase juvenil.

Tallos adultos del portainjerto de aguacate Gvar-am-13, tolerante a salinidad (Kadman y Ben Ya'acov, 1980), mostraban un porcentaje de enraizamiento *in vitro* del 5 %; mientras que tras la realización de 17 microinjertos sucesivos esta capacidad aumentó hasta el 79 %; estos valores eran similares a los obtenidos para el material juvenil (84 %), sin embargo, en la fase de multiplicación el comportamiento del material microinjertado fue similar al mostrado por el material adulto (Barceló-Muñoz y col., 1990).

Zizyphus

El microinjerto seriado de secciones apicales y nodales de 5-10 mm de longitud en *Zizyphus mauritiana* sobre patrones de semilla mostró que independientemente del ciclo de microinjerto, éstos sobrevivían a la fase de inicio en la misma proporción que el material juvenil; sin embargo, el crecimiento de la púa aumentaba a medida que lo hacía el número de ciclos de microinjerto. El porcentaje de enraizamiento de las estaquillas tomadas de los brotes microinjertados fue muy bajo tras el primer ciclo (4 %), pero tras cada ciclo este parámetro se incrementaba progresivamente (29 % y 40 % para el segundo y tercer ciclo de microinjerto respectivamente) y aunque no llegaba a alcanzar el valor de los controles juveniles (71 %), las longitudes de los brotes axilares y las raíces desarrolladas en el material microinjertado tres veces eran iguales a la de los controles juveniles (Danthu y col., 2004).

Especies frutales de clima templado.

Castanea

La realización de tres microinjertos seriados de árboles maduros de *Castanea sativa*, sobre patrones juveniles (Fernández-Lorenzo y Fernández-López, 2005) no logró aumentar la capacidad de enraizamiento *in vitro* de este material; y aunque no se observaron diferencias en la tasa de multiplicación de los brotes microinjertados 1, 2 ó 3 veces, ésta fue siempre significativamente superior a la del material adulto (2,1 frente a 1,3 respectivamente).

Ceratonía

Hsina y El Milti (2009) pusieron a punto la técnica para micropropagar el algarrobo (*Ceratonía siliqua*) mediante microinjertos a partir de tallos adultos de individuos femeninos, cultivados *in vitro*; obtuvieron un porcentaje de éxito del 92,5 % cuando realizaban el injerto en la parte central del hipocótilo; observando que el crecimiento de la púa se restablecía tras cuatro semanas, con una tasa de proliferación de 3,22 nuevos tallos por explanto y 34 mm de longitud, indicando así que esta técnica podía ser utilizada para inducir rejuvenecimiento en plantas adultas.

Juglans

Dolcet-San Juan y col. (2004) intentaron el rejuvenecimiento de *Juglans regia*, injertando ápices adultos sobre patrones juveniles de la misma especie; tras dos ciclos de microinjerto sucesivos no se consiguió el enraizamiento de los brotes regenerados a partir de los microinjertos; mientras que los cultivos iniciados *in vitro*, a partir del mismo material sin injertar, mostraron valores de enraizamiento superiores al 40 % tras 30 ciclos de subcultivos sucesivos.

Malus

En *Malus domestica*, Toma y Duhoki (2010) obtuvieron un porcentaje de prendimiento de la púa del 80 %, cuando injertaron ápices provenientes de plantas adultas establecidas *in vitro*, mientras que cuando los ápices provenían de árboles de campo el porcentaje se reducía al 60 %; en cuanto al patrón, los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizaron brotes micropropagados (60 %) en lugar de semillas germinadas *in vitro* (48 %); el uso de medio líquido y la colocación de una gota de agar en la zona de unión incrementó las probabilidades de éxito. Desgraciadamente, se detectó una elevada mortalidad (85 %) durante la fase de aclimatación. Por el contrario, Dobránszki y col. (2000) obtuvieron un 95 % de efectividad en los microinjertos del cv. Royal Gala, y 100 % en la fase de aclimatación. Estos autores utilizaron púas adultas provenientes de brotes que crecían *in vitro* y que fueron lavados previamente con una solución antioxidante. Con este método se pudieron superar los problemas de necrosis y establecer *in vitro* los cvs. Remo, Rewena y Reanda (Dobránszki y col., 2005).

Olea

El microinjerto de brotes de olivo (cv. 'Arbequina') de 1-1.5 cm de longitud sobre estaquillas juveniles aumentó el porcentaje de enraizamiento *in vitro* del 2- 50 % (material adulto vs. material injertado); un segundo ciclo de microinjerto no produjo un aumento adicional del porcentaje de enraizamiento en los brotes derivados de los microinjertos (Revilla y col., 1996); sin embargo, cuando estos brotes eran enraizados y aclimatados y se mantenían creciendo en invernadero, las estaquillas derivadas de ellos mostraban porcentajes de enraizamiento propios de material juvenil (100 %). Por su parte, Rache-Cardenal y col., (2008) observaron que las púas derivadas de plantas que crecían en invernadero se comportaban mejor (en términos de formación y desarrollo de los brotes axilares) tras el microinjerto *in vitro*, que las que provenían de plantas que crecían en el campo. Farahani y

col. (2011a) desarrollaron un protocolo para la micropropagación y microinjerto del cv. Zard; para ello, púas adultas (10-15 mm) fueron microinjertadas sobre semillas de tres semanas, observando que la longitud de los brotes desarrollados aumentaba a medida que lo hacía el número de ciclos de microinjerto (3,7 cm; 4,4 cm y 5,2 cm para 1º, 2º y 3º, respectivamente).

Pistacia

En *Pistacia vera*, Abousalim y Mantell (1992), describieron el microinjerto de púas provenientes de árboles de cuatro años de edad en patrones de semilla cultivados en medio líquido, con este sistema observaron que el 60 % de los púas mostraban un crecimiento medio de 12,5 mm y un número de 5,7 nuevas yemas formadas, aunque no muestran datos de enraizamiento de los brotes desarrollados. Posteriormente en el cv. Siirt, Onay y *col.* (2003, 2004) consiguieron un buen desarrollo de las yemas microinjertadas provenientes de púas de árboles de 10 y 30 años de edad, observando que los mejores resultados se obtenían cuando las púas provenían de brotes cultivados *in vitro* más que cuando procedían directamente del árbol donador; estos autores además consiguieron la aclimatación *ex vitro* de las plantas microinjertadas, pero no ofrecen datos de la capacidad morfogénica del material procedente de los microinjertos.

Prunus

El almendro (*Prunus dulcis*) posee una baja capacidad de enraizamiento cuando se propaga mediante estaquillado; Yildirim y *col.* (2010) consiguieron la producción de plantas de los cvs. Ferragnes y Ferranduel injertando *in vitro* púas de 4- 15 mm de longitud sobre patrones de semillas, obteniéndose unos porcentajes de éxito del 93 y 100 % respectivamente; no se detectaron diferencias significativas en relación al tamaño de la púa; la aclimatación de las plántulas microinjertadas no presentó ningún problema y se establecieron exitosamente en campo.

Pyrus

La eficacia del microinjerto en *Pyrus spp* está estrechamente relacionada con el origen de la púa; así, Toma y Duhoki (2010) obtuvieron un 80 % de microinjertos viables cuando la púa derivaba de brotes que crecían *in vitro*, frente al 40 % cuando provenía de árboles de campo. Desgraciadamente, un 90 % de las plantas microinjertadas no sobrevivieron a la fase de aclimatación.

Vitis

Ben-Abdallah y col. (1997) propusieron el uso del microinjerto como medio de clonación rápido de las variedades de vid Belda, Muscat de Rafta y Asli, autóctonas de Túnez; para aumentar el porcentaje de prendimiento de los microinjertos proponían usar elevadas concentraciones de $MgSO_4$ (450 mg/L), y Fe-EDTA (40 mg/L) en el medio de cultivo. La colocación del ápice en la superficie cortical externa del hipocótilo incrementó las posibilidades de unión patrón-púa (63 %) y reducía un 35-36 % la incidencia de ennegrecimiento y desecación de la púa, sin embargo, no ofrecen datos sobre el comportamiento de los tallos regenerados.

Especies forestales (Angiospermas)

Acacia

Para el microinjerto de *Acacia tortilis*, Detrez (1994) recomendó el uso de púas procedentes de brotes mantenidos *in vitro*, el porcentaje de supervivencia fue del 42 % aunque no se muestran datos del comportamiento posterior de los brotes microinjertados. En otra investigación, Khalafalla y Daffalla (2008) describieron un método para la obtención de plantas de *Acacia senegal*, a partir del microinjerto de ápices de tallos mantenidos *in vitro* sobre semillas de 7-14 días de edad, con un 100 % de efectividad; la aclimatación de la unidad patrón-púa se producía de forma exitosa, de manera que estos autores lo propusieron como un sistema para la producción de plantas de esta especie con fines de reforestación.

Tallos adultos de *Acacia mangium* se mostraban recalcitrantes a las técnicas de propagación mediante injertos *in vivo*, sin embargo, utilizando la técnica del microinjerto, Monteuis (1995a, 1996) consiguió establecer *in vitro* este material con un porcentaje de éxito del 45 %; en este caso, deberíamos hablar de revigorización del material más que de un posible rejuvenecimiento puesto que las hojas desarrolladas a partir de los tallos regenerados mostraban morfología adulta (filodios) en contraste con las hojas juveniles (compuestas-pinnadas) típicas de la fase juvenil de esta especie heteroblástica.

En *Acacia albida*, Danthu y col. (2002) consiguieron la restauración total de la capacidad de enraizamiento tras cuatro ciclos de microinjertos sucesivos de secciones nodales con una yema sobre patrones juveniles.

Hevea

En *Hevea brasiliensis*, la eficacia de la técnica del microinjerto *in vitro* para inducir rejuvenecimiento depende del genotipo; así, Perrin y col. (1997) consiguieron aumentar hasta el 60 % el porcentaje de enraizamiento del clon PB 235 con un solo ciclo de microinjerto y hasta un 34 % el del clon GT1 tras seis microinjertos sucesivos. Estos autores utilizaron los niveles endógenos de citoquininas libres como marcadores de juvenilidad, comprobando que los niveles de zeatina eran mayores en las plantas derivadas de los microinjertos que en los controles; en contraste, los niveles de iPA (isopenteniladenosina) fueron superiores en los tallos adultos en relación con el material rejuvenecido de ambos clones.

Santalum

Santalum album, es una especie de gran interés económico que se muestra altamente recalcitrante a las técnicas de propagación *in vivo* e *in vitro*. Muthan y col., (2006) lograron establecer esta especie *in vitro* con un porcentaje de éxito del 60 % microinjertando púas de 1-2 cm de longitud provenientes de árboles de 50-60 años sobre el hipocótilo de patrones

juveniles germinados *in vitro*, aunque no muestran datos del comportamiento posterior de las plantas regeneradas.

Sterculia

Sterculia setigera, es un especie tropical cuyo exudado (goma) es usado en nutrición y medicina. Niang y col. (2010) establecieron *in vitro* material adulto de esta especie después de tres microinjertos sucesivos sobre patrones juveniles. Los tallos rejuvenecidos mostraron un vigor y una capacidad de enraizamiento similar a la del material procedente de semilla.

Especies forestales (Gimnospermas)

Araucaria

Anselmini y Zanette, (2008) pusieron a punto la técnica para la micropropagación de *Araucaria angustifolia*, mediante el autoinjerto de ápices sobre patrones juveniles de 6 a 12 meses de edad, pero no ofrecen datos del comportamiento de los brotes regenerados.

Larix

Ewald y Kretzschmar (1996) investigaron el efecto rejuvenecedor del microinjerto en *Larix decidua*, y para ello injertaron meristemos de árboles de 140 años sobre patrones de semilla *in vitro*. Cinco meses después del microinjerto y la transferencia de las plantas a condiciones *ex vitro*, brotes nuevos de estas plantas fueron establecidos *in vitro*, comparándose el comportamiento de los materiales procedentes del árbol madre y de los microinjertos. En la fase de multiplicación, los explantos provenientes de las plantas microinjertadas se incrementaron durante los tres primeros subcultivos, mientras el número medio de explantos originados a partir de los árboles adultos decrecía continuamente a partir del primer subcultivo. Microestaquillas de las plantas procedentes de microinjerto enraizaban en un porcentaje del 50 % mientras que no observó formación de raíces en ninguna de las estaquillas provenientes de los árboles madre.

Picea

En *Picea abies* (Monteuuis, 1994) se observó que la incubación de las plantas microinjertadas en oscuridad durante 2-3 semanas, aumentaba el porcentaje de prendimiento de los microinjertos. Las plantas microinjertadas fueron aclimatadas *ex vitro* sin problemas y aunque no aportaron datos de la capacidad morfogenética de estas plantas, el autor resalta la aparición de características juveniles en los brotes desarrollados.

Pinus

Fraga y col. (2002a) injertaron púas adultas de *Pinus radiata*, de diferente edad ontogenética sobre estaquillas juveniles y demostraron que la edad del material de partida fue crítica en la capacidad de proliferación de los tallos tras el microinjerto; es decir, las púas juveniles mostraron mayor capacidad de proliferación. Además, el 50 % de las púas provenientes de brotes basales, mostraron crecimiento, frente al 10 % que lo hacía cuando las púas provenían de la copa del árbol donador. Estos resultados fueron confirmados por Materán y col. (2008).

Los niveles endógenos de ácido abscísico (ABA) y ácido-3-indolbutírico (AIA) en *P. radiata* tras el microinjerto sobre *P. radiata* (homoinjertos) o *P. caribea* (heteroinjertos) mostraron un incremento en el contenido en ABA, paralelo al descenso en los niveles de AIA, a lo largo del tiempo, en los brotes injertados; los valores máximos de ABA (32 ug g^{-1} Fw) y los niveles mínimos de AIA (3 ug g^{-1} Fw) se detectaron a los 120 y 60 días del microinjerto, respectivamente; estos resultados fueron similares a los encontrados en yemas juveniles y fueron independientes del patrón utilizado (Materán y col., 2009). En *Pinus pinea* L., Cortizo y col. (2004) mostraron que el éxito de los microinjertos es cultivar dependiente y que las púas que mejor respondían fueron las recolectadas en Mayo-Junio.

Pseudotsuga

La técnica empleada en el microinjerto de ápices de *Pseudotsuga menziessi* influyó de manera significativa en el porcentaje de prendimiento, así Monteuis (1995b) obtuvo un 50 % de éxito en los injertos laterales en contraste con el 8,6 % cuando se injertaba en la parte superior del patrón; para la obtención de plantas completas este autor realizó la aclimatación exitosa de las plantas microinjertadas, pero no ofrece datos del comportamiento posterior de este material.

Sequoia

Tranvan y col. (1991) observaron que tras el injerto de púas provenientes de un ejemplar de 500 años de *Sequoia sempervirens*, los brotes desarrollados presentaron características morfológicas y fisiológicas juveniles, como la restauración del crecimiento ortotrópico. Por su parte, Huang y col. (1992b) observaron cómo, tras la realización de cinco microinjertos sucesivos, la capacidad de enraizamiento *in vitro* aumentó desde el 22 % para el material adulto hasta el 100 % para el cuarto y quinto microinjerto; este aumento se correlacionaba con la desaparición de formas isoenzimáticas esterasas e isoperoxidasas asociadas a la fase adulta y aparición, a partir del 4º microinjerto, de otras formas isoenzimáticas propias de la fase juvenil (Huang y col., 1996); también detectaron pequeñas moléculas, en el ADN mitocondrial, que son exclusivas de las fases juvenil y que no aparecen ni en los tallos procedentes del 1-3º microinjerto ni en los adultos (Huang y col., 1995); estos mismos autores constataron que estas moléculas no hibridaban ni con el ADN del cloroplasto ni con el ADN nuclear y además no detectaron variaciones en su secuencia durante más de 20 años de subcultivos sucesivos del material (Huang y col., 2003a).

Kuo y col. (1995) han descrito cambios en los patrones de fosforilación de proteínas en tallos adultos microinjertados. Tras cuatro microinjertos sucesivos los tallos muestran aspecto juvenil y patrones de fosforilación proteica similares a los de tallos juveniles, que a

su vez son mayores que los observados en tallos adultos. El análisis de determinadas características fisiológicas puso de manifiesto que los tallos rejuvenecidos *in vitro* tras cinco ciclos de microinjerto, muestran características fisiológicas similares al material juvenil como mayores tasas de crecimiento, mayor contenido en nitrógeno y mayores tasas de fotosíntesis y respiración que las observadas en el material adulto (Huang y *col.*, 2003b).

II. OBJETIVOS

La micropropagación es, hoy día, una herramienta biotecnológica ampliamente utilizada tanto para fines comerciales como de investigación, ya que el establecimiento de modelos con plántulas *in vitro*, completas o no, hace posible estandarizar fácilmente gran cantidad de factores, dando lugar a un modelo experimental de enorme valor para el estudio de cualquier proceso de crecimiento, desarrollo o respuesta a estreses, entre otros. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de trabajos publicados, no en todas las especies se ha alcanzado el grado de desarrollo tecnológico *in vitro* suficiente o, habiéndose alcanzado, no es reproducible.

En el caso de las especies leñosas en general, y del olivo en particular, el nivel de desarrollo está limitado por la edad ontogenética del material, y la falta de reproducibilidad puede ser debida, entre otras cosas, a que la respuesta es muy genotipo dependiente. Preguntas tales como si se puede utilizar el cultivo *in vitro* para micropropagar el olivo, si es posible micropropagar cualquier variedad o cómo influye el cultivo *in vitro* en el comportamiento agronómico posterior, no tienen aún respuesta, y el objetivo fundamental de este trabajo es contribuir a dársela estudiando qué influencia tienen factores como la edad o la variedad de olivo sobre la respuesta a la micropropagación y cómo afectan los métodos de rejuvenecimiento, en concreto los microinjertos sucesivos, a la estabilidad genética y a la entrada en producción del material obtenido. Este objetivo general se divide en los siguientes objetivos parciales:

1. Establecimiento de un protocolo de micropropagación para material juvenil.
2. Evaluación del comportamiento del material adulto de los cvs. Arbequina y Picual en las diferentes fases de la micropropagación.
3. Evaluación del uso de los microinjertos sucesivos *in vitro* como método de rejuvenecimiento para mejorar la respuesta morfogénica del material adulto de olivo:

- 3.1. Evaluación de posibles variaciones genéticas en las plantas adultas rejuvenecidas mediante microinjerto.
- 3.2. Evaluación *in vitro* de la respuesta morfogénica del material rejuvenecido.
- 3.3. Evaluación del comportamiento, en cuanto a la entrada en producción, de las plantas rejuvenecidas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL VEGETAL

Para la realización de los experimentos se utilizó material vegetal de olivo (*Olea europaea* L.) de los cultivares Arbequina y Picual.

III.1.1. Procedencia del material

En la figura 6 se presenta un esquema con la procedencia de los materiales utilizados en este trabajo.

Material juvenil

Como fuente de material juvenil se utilizaron plantones de unos tres años de edad, mantenidos en invernadero, procedentes de la germinación de semillas del cv. Arbequina, proporcionadas por el Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba (BMGO, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA).

Material adulto

Se utilizó un árbol de cada uno de los cvs. Arbequina y Picual, establecidos en una parcela situada en el IFAPA- Churriana (Málaga) y severamente podados a la salida del invierno. A partir de estos árboles se seleccionaron tres tipos de explantos para el inicio de los cultivos *in vitro*:

- Explanto C.- procedente de la copa de los árboles antes de la poda.
- Explanto R.- procedente de las ramas (de 3-12 cm de diámetro y 20 cm de longitud).
obtenidas de la poda e inducidas a brotar en invernadero.
- Explanto B.- procedente de los brotes basales de los árboles tras la poda.

Material adulto microinjertado

Este material fue obtenido tras un proceso de microinjertos sucesivos *in vitro* de púas procedentes de un árbol adulto del cv. Arbequina, mantenido en invernadero en crecimiento

activo, mediante podas severas. Las púas se injertaron sobre plántulas obtenidas tras la germinación *in vitro* de embriones del cv. Picual. Los brotes microinjertados, tras su enraizamiento y posterior aclimatación, se mantuvieron creciendo en invernadero podándose regularmente para mantenerlos en seto, y fueron utilizados como planta madre para realizar los distintos experimentos con este tipo de material.

III.1.2. Desinfección superficial de los explantos y establecimiento de los cultivos asépticos

Secciones nodales

Las secciones nodales se obtuvieron a partir de ramas en crecimiento activo (figura 7a) de los árboles mantenidos en campo o en invernadero. Tras la eliminación de las hojas (figura 7b), las varetas se frotaron con un algodón empapado en alcohol (70 % v/v), se sumergieron en una solución de hipoclorito sódico (0,5 % de cloro activo) con tween 20 (10 gotas/litro) durante 10 minutos y se lavaron con agua corriente. Tras la desinfección, las varetas se cortaron en secciones nodales (1,5 – 2 cm), con dos yemas laterales (Figura 8a) y se desinfectaron nuevamente con hipoclorito sódico (0,5 % de cloro activo) durante 10 minutos. Finalmente, se realizaron tres lavados, de cinco minutos cada uno, con agua destilada estéril en condiciones asépticas. Tras eliminar los extremos dañados por el hipoclorito sódico, las secciones nodales se cultivaron individualmente y en posición vertical (figura 8b), en tubos de ensayo (25 x 150 mm) donde se mantenían hasta que la longitud de los brotes axilares desarrollados era suficiente (1,5-2 cm), para formar stocks con los que realizar los diferentes experimentos.

Embriones

Frutos maduros a los que se les había eliminado el mesocarpo (figura 9a), se desinfectaron mediante inmersión en una solución de hipoclorito sódico (0,5% de cloro

activo) suplementada con tween 20 (10 gotas/litro) durante 15 minutos. Tras la desinfección, se lavaron con agua corriente y se procedió a la rotura del endocarpo y a la extracción de la semilla (figura 9b). Las semillas se desinfectaron mediante inmersión durante 10 minutos en una solución igual a la anteriormente descrita, seguida de tres lavados, de cinco minutos cada uno, en agua destilada estéril y se mantuvieron en imbibición durante 24 horas para facilitar su disección (figura 9c). Trascurrido este tiempo, se realizó una segunda desinfección en las mismas condiciones especificadas anteriormente y se extrajeron los embriones, junto con los cotiledones (figura 9d), que fueron cultivados individualmente y en posición vertical (figura 9e) en tubos de ensayo (25 x 150 mm).

Microinjertos *in vitro*

Como patrones se utilizaron plántulas procedentes de embriones germinados *in vitro* (Clavero-Ramírez, 1994) y como púas, en el primer ciclo de microinjertos, se utilizaron secciones nodales de brotes adultos, en crecimiento activo, obtenidas de un árbol madre mantenido en invernadero; ambos materiales se desinfectaron como se detalló en el apartado anterior.

Las plántulas se dejaron crecer hasta alcanzar una longitud de 3-4 cm (figura 10a), momento en el que se decapitaron por debajo de los cotiledones, desechándose la parte aérea y realizándose una incisión longitudinal (0,5 cm) en la parte superior del hipocótilo (figura 10b). Las secciones nodales se cortaron en su parte basal en forma de cuña y se introdujeron en la incisión realizada en el portainjerto (figura 10c). La unión patrón-púa se estabilizó con un anillo de silicona de 0,2 cm de diámetro interior (figura 10d), previamente desinfectado con hipoclorito sódico (0,5% de cloro activo) durante 20 minutos y lavado con agua estéril.

Los microinjertos se revisaban periódicamente, para asegurar que los brotes procedían de las yemas de la púa y no del callo producido en la zona de unión del microinjerto,

eliminándose los brotes que emergían del portainjerto (figuras 11a, y 11b), en caso de que los hubiera.

Las plántulas microinjertadas se dejaron crecer, recultivándose a las 6 semanas (figura 12a) en medio fresco; de los dos brotes axilares desarrollados por cada sección nodal, se eliminaba el que presentaba menor longitud. Las secciones nodales microinjertadas que presentaban crecimiento fueron numeradas del 1- 30 con objeto de individualizar las líneas que procedían de la misma sección nodal original para poder localizar, si las hubiera, posibles variaciones; dicha numeración se mantuvo durante los microinjertos sucesivos. Tras doce semanas, la longitud de los brotes procedentes de las yemas microinjertadas era de 4-5 cm (figura 12b), momento en que eran cortados, utilizándose la parte apical (1,5 cm) para la evaluación de la capacidad de enraizamiento y la parte basal como púa para la realización del siguiente microinjerto. Se realizaron cinco ciclos de microinjertos sucesivos por cada una de las 30 líneas originales (figura 13).

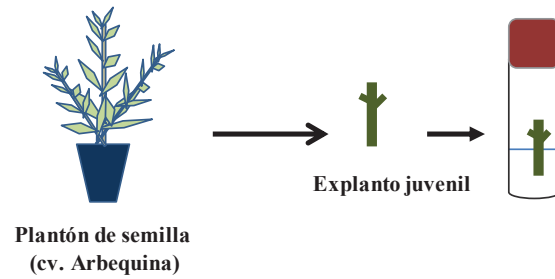
Los brotes microinjertados que enraizaron y superaron la fase de aclimatación se dejaron crecer en invernadero, manteniéndose en seto y obteniéndose de esta manera 41 plantas de las diferentes líneas/microinjerto (tabla 5).

Los brotes enraizados *in vitro* (figura 14a) procedentes de las diferentes líneas y ciclos sucesivos de microinjerto, se lavaron con agua corriente para eliminar los restos del medio de cultivo de su base (figura 14b), y se trasplantaron a alvéolos de turba prensada (figura 14c) que contenía una mezcla de turba- perlita (1:1) más un abono de liberación lenta (Osmocote® Exact® Mini, Scotts Internacional B.V., The Netherlands). Las bandejas, con los brotes enraizados, se colocaron en mesas con calefacción cubiertas por un túnel de polipropileno (figura 14d). La humedad relativa se mantuvo al 90 % durante dos semanas, sometiéndose posteriormente el material a ambientes de baja humedad relativa, durante periodos de tiempo crecientes, hasta conseguir la aclimatación de las plantas, momento en el

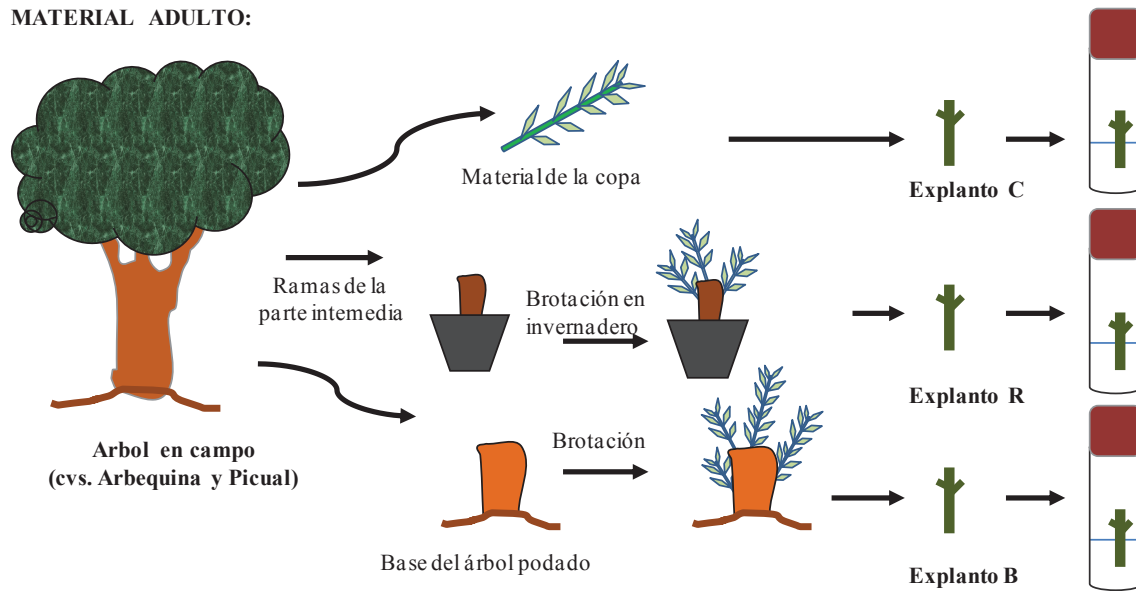
que pasaban a mesas desprovistas de túnel (Marín *y col.*, 1988). Posteriormente, las plantas se dejaron crecer y se trasplantaron a macetas de mayor volumen (figura 15a), hasta alcanzar un tamaño aproximado de 1 m (figura 15b) y manteniéndose en seto mediante podas repetidas.

La temperatura del invernadero se mantuvo en el rango de 15 °C - 30 °C mediante calefacción y un sistema “cooling” de refrigeración. La luminosidad se mantuvo por debajo de los $65 \mu\text{m m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mediante una malla exterior de sombreo.

MATERIAL JUVENIL:



MATERIAL ADULTO:



MATERIAL ADULTO MICROINJERTADO:

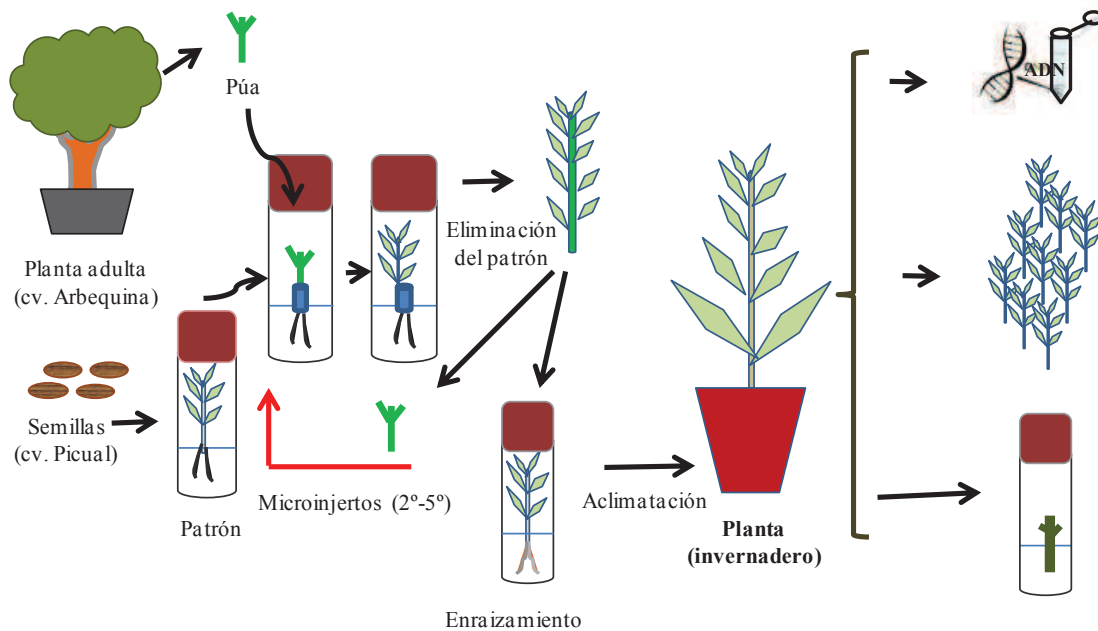


Figura 6. Material vegetal de olivo, en distintos estados ontogenéticos (juvenil, adulto y adulto microinjertado) utilizado en los experimentos llevados a cabo en este trabajo.



Figura 7.- Ramas de olivo del árbol madre: a) inmediatamente tras su recolección; b) tras la eliminación de las hojas.

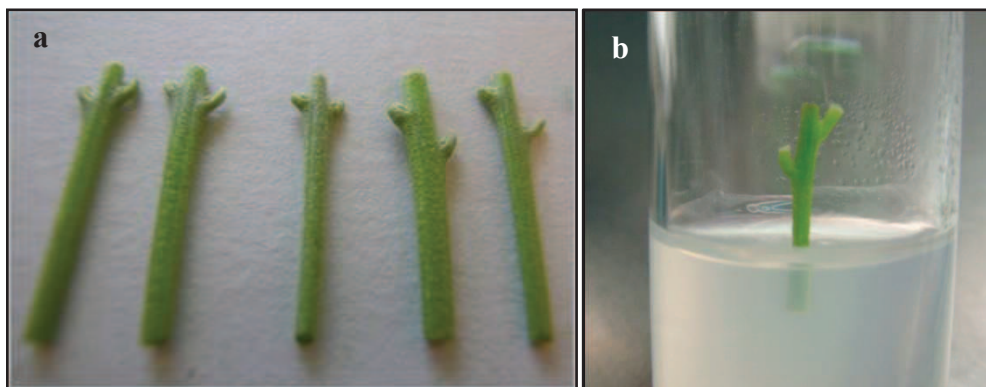


Figura 8.- Secciones nodales de olivo: a) preparadas para ser desinfectadas, b) cultivadas en el medio de inicio.



Figura 9.- Aislamiento de embriones de olivo y establecimiento *in vitro*: a) semillas a las que se les había eliminado el mesocarpo; b) rotura del endocarpo; c) embrión tras la imbibición; d) detalle de embrión y cotiledones aislados y e) embriones en el medio de germinación.

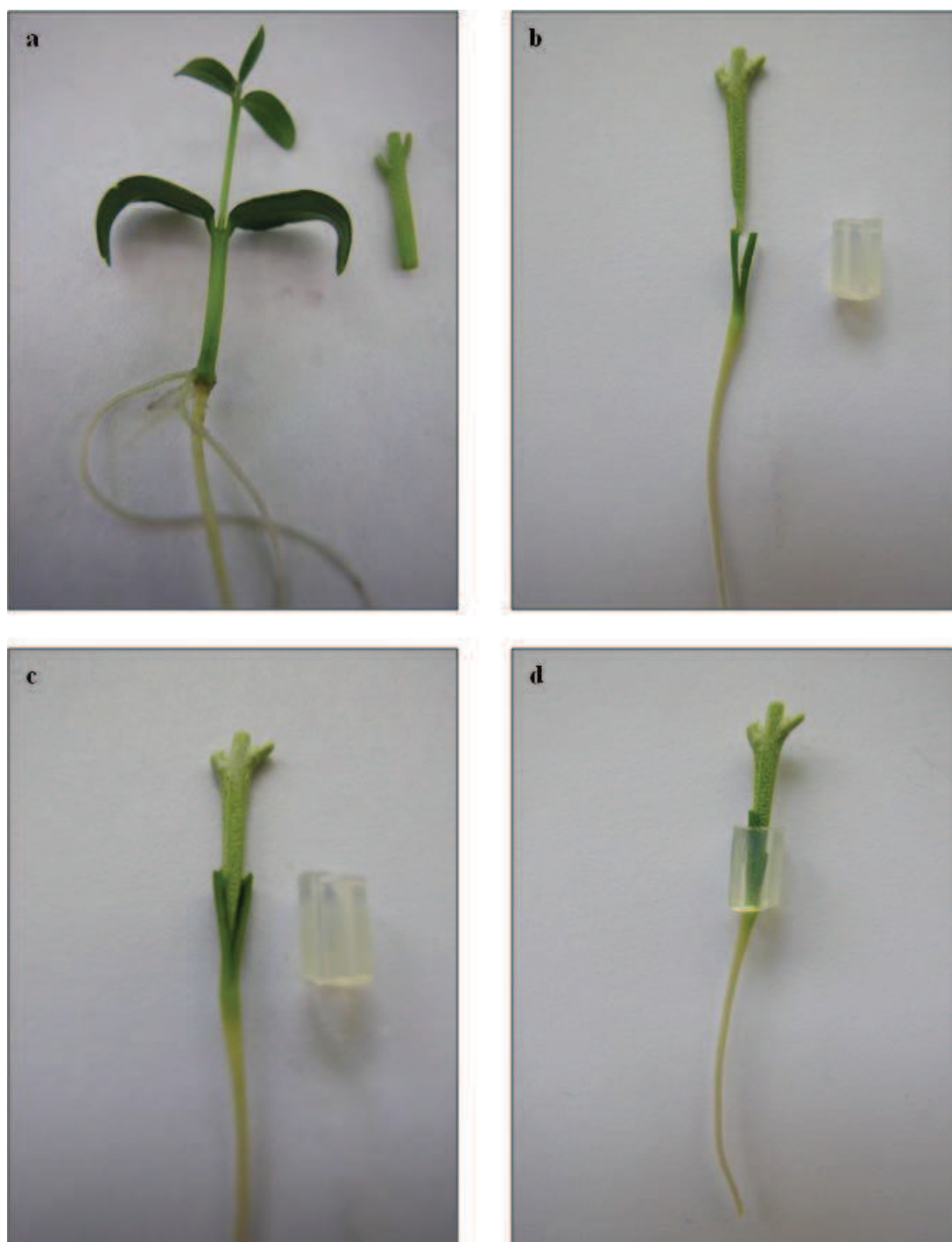


Figura 10.- Realización de los microinjertos *in vitro* de material adulto de olivo: a) material vegetal: plántula juvenil (portainjerto) y sección nodal adulta (púa); b) incisión longitudinal en hipocótilo y preparación de la base de la púa en forma de cuña; c) la parte basal de la púa se aloja en la incisión del hipocótilo y d) estabilización de la unión mediante un anillo de silicona.

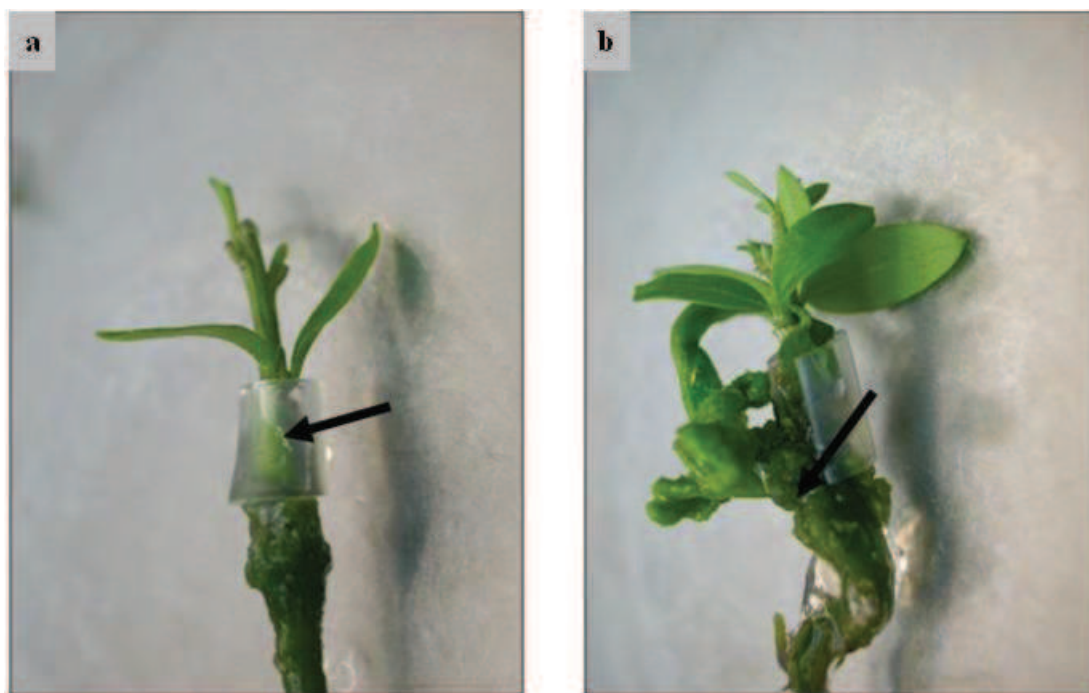


Figura 11.- Brotes de naturaleza adventicia, en los microinjertos de material adulto de olivo, emergiendo del patrón: a) en la zona de unión patrón-púa; b) por debajo de la zona de unión.

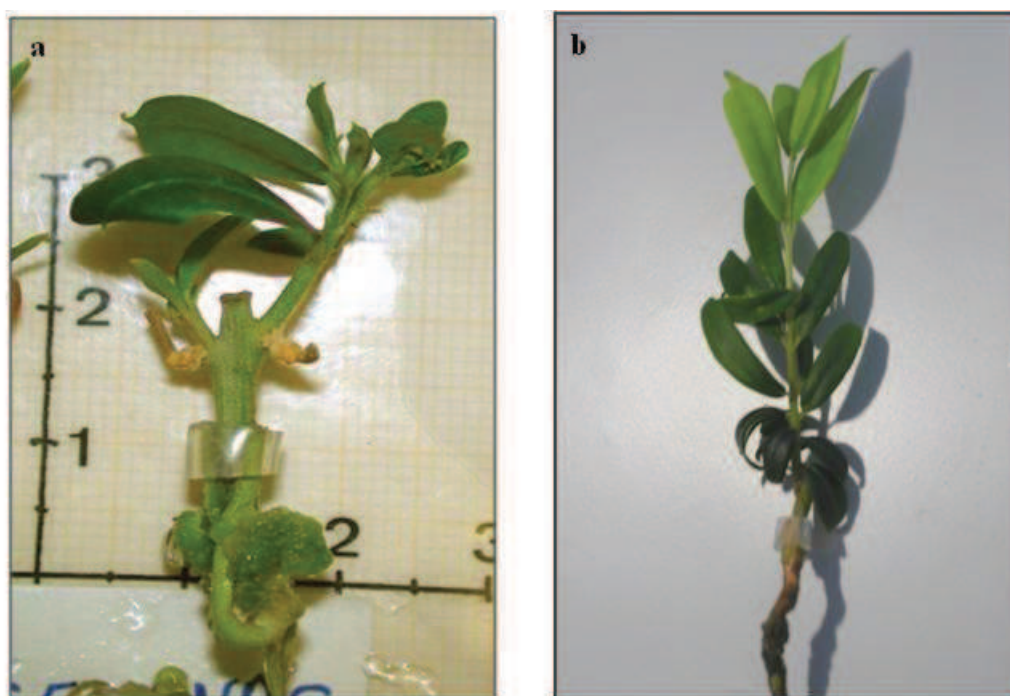


Figura 12.- Aspecto del microinjerto de material adulto de olivo tras a) seis y b) doce semanas en el medio de cultivo.

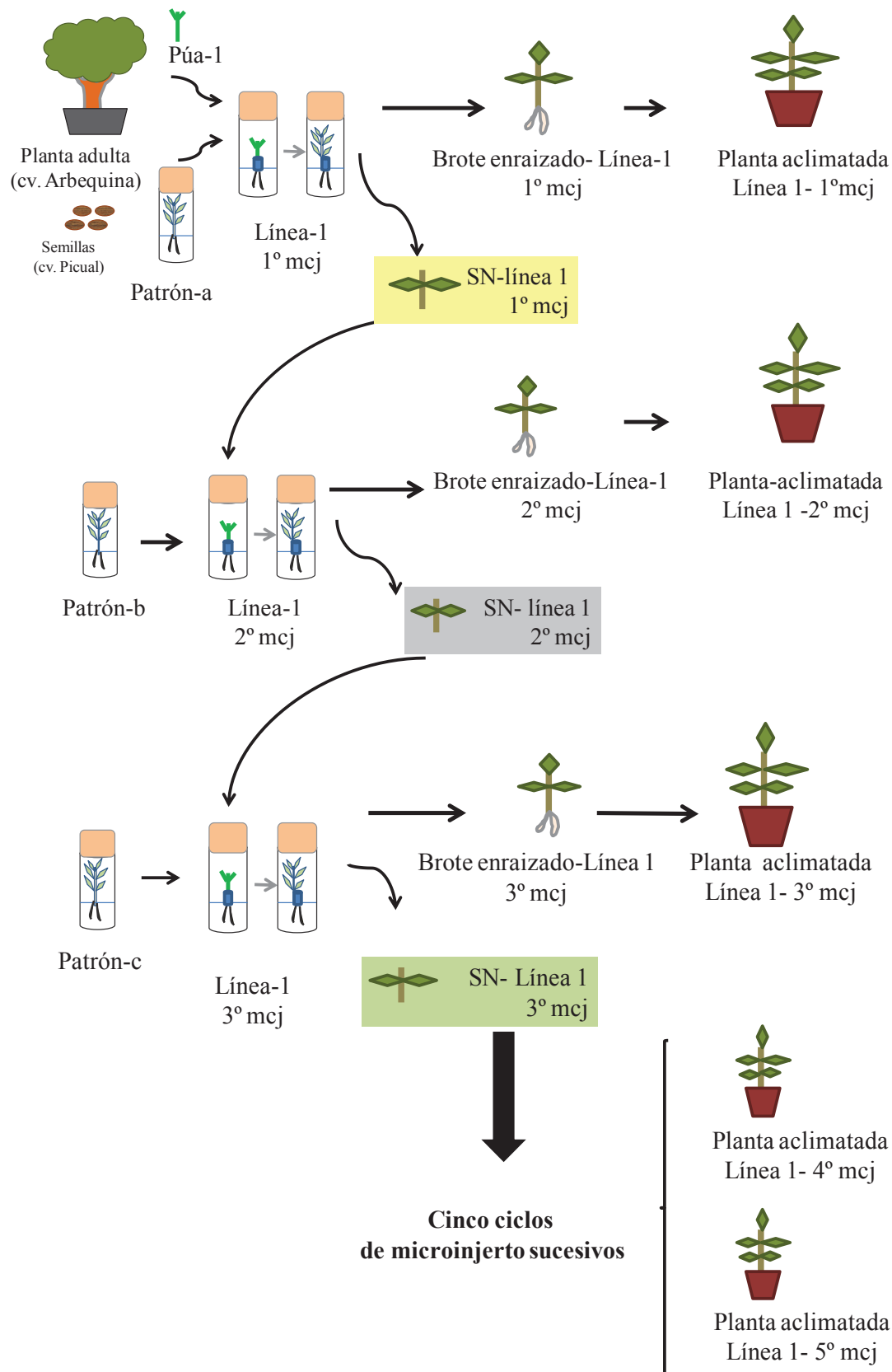


Figura 13.- Realización de microinjertos sucesivos *in vitro* de secciones nodales adultas de olivo sobre patrones juveniles. Establecimiento de la línea-1. El proceso entero se repite con 30 secciones nodales del mismo árbol madre adulto, para establecer 30 líneas diferentes con sus respectivos ciclos de microinjerto.

Tabla 5.- Procedencia de las 41 plantas de olivo aclimatadas y mantenidas en invernadero, obtenidas tras los cinco ciclos de microinjerto sucesivos.

Líneas	Ciclos de Microinjerto Sucesivos				
	1	2	3	4	5
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			♣	♣	
Total	9	5	14	8	5

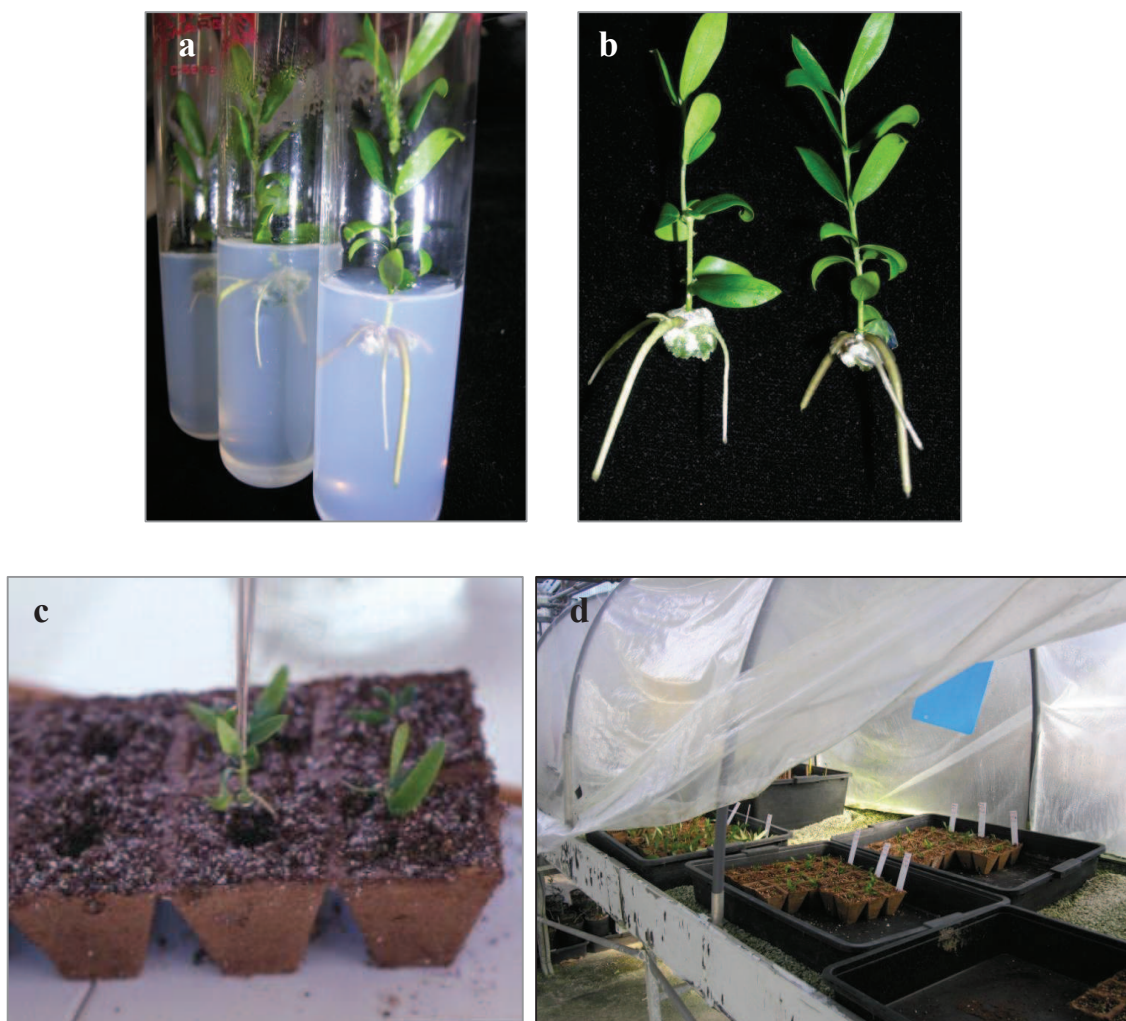


Figura 14.- Aclimatación de los brotes enraizados procedentes de microinjertos de yemas adultas de olivo del cv. Arbequina sobre patrones juveniles: a) brote en el medio de cultivo; b) eliminación del medio de cultivo mediante lavado; c) trasplante a sustrato y d) colocación en el túnel de aclimatación.



Figura 15.- Plantas procedentes de las distintas líneas y ciclos de microinjerto sucesivos, de yemas adultas de olivo del cv. Arbequina, sobre patrones juveniles: a) trasplante a maceta y b) crecimiento en invernadero climatizado.

III.2. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones stocks de sales minerales (Merck), aminoácidos, vitaminas y reguladores de crecimiento (Sigma- Aldrich) en agua destilada-desionizada. Los reguladores de crecimiento se disolvieron añadiendo unas gotas de HCl (1N) o NaOH (1N), según fueran citoquininas o auxinas, respectivamente. El 24-epibrasinólido se disolvió en DMSO. Como fuente de hidratos de carbono se utilizaron sacarosa (0,09M) o manitol (0,11M). El pH se ajustaba al 80 % del volumen final del medio, a 5,74 con Na OH (0,1 y 1 N) ó HCl (0,1 y 1N).

A los medios con textura sólida se les añadieron 6 g/l de agar (Sigma- Aldrich, A-1292); se calentaron en autoclave (121 °C y 0,1 MPa) durante 7 minutos para disolver el agar, y se distribuyeron en alícuotas de 25 ó 30 ml, en tubos de ensayo (25 x 150 mm) o frascos de vidrio (250 ml) respectivamente. Los tubos y frascos se cubrieron con tapones y tapaderas de polipropileno y se esterilizaron en autoclave, a la misma temperatura y presión anteriores durante 15 ó 20 minutos, según se tratase de tubos de ensayo o frascos, respectivamente. En los experimentos con medio líquido, tras ajustar el pH y completar el volumen final, el medio se repartió en alícuotas de 5 ml en tubos de ensayo (25 x 150 mm), esterilizándose durante 15 minutos en autoclave (121 °C, 0,1 MPa). En la preparación de los medios de doble fase se siguió la metodología descrita para los medios sólidos, y una vez que habían solidificado tras la esterilización en autoclave, se les añadió la fase líquida (10 ml/frasco).

III.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

Salvo que expresamente se señalen otras condiciones, los cultivos *in vitro* se incubaron en una cámara a 25 ± 1 °C con fotoperiodo de 16 horas e irradiancia de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lámparas Sylvania GroLux).

III.3.1. Material juvenil

III.3.1.1. Establecimiento de cultivos asépticos

III.3.1.1.1. Experimento 1.- Efecto de los medios IM y RV sobre el desarrollo de material juvenil en la fase de establecimiento *in vitro*

Se testó el efecto de dos medios utilizados para el inicio de olivo *in vitro*, el IM (Rugini, 1984) y RV (Revilla y col., 1996). Las secciones nodales permanecieron en el medio de inicio durante 6 semanas. La composición de éstos, y del resto de medios utilizados en los distintos experimentos, se recoge en la tabla 6.

III.3.1.2. Fase de multiplicación

Para los experimentos de multiplicación se utilizaron brotes apicales (1,5-2cm) y subapicales (dos nudos y cuatro hojas) procedentes de la fase de inicio; el periodo de subcultivo fue de 8 semanas.

III.3.1.2.1. Experimento 1.- Efecto de los medios OM y RV sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil

Se testó el efecto, en esta fase, de los medios OM (Rugini, 1984) y RV (Revilla y col., 1996).

III.3.1.2.2. Experimento 2.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de bencilaminopurina y medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil

Se testó el efecto, sobre el crecimiento de brotes subapicales, del cultivo alternado en medio RV líquido y sólido; los cultivos se mantuvieron durante dos semanas en medio líquido con agitación en rotor (figura 16), con distintas concentraciones de BAP (0- 0,4- 1,3

y 4,4 μM) recultivándose a continuación en medio sólido de multiplicación estándar (RV) durante 6 semanas adicionales. Como control se utilizó RV sólido con un período de subcultivo de 8 semanas.

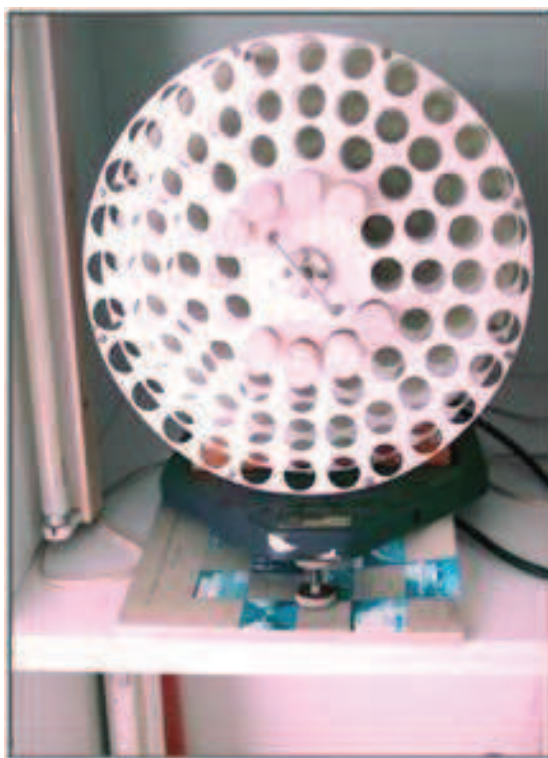


Figura 16.- Tambor rotatorio (5 rpm) utilizado para el cultivo de los explantos de olivo en medio líquido.

III.3.1.2.3. Experimento 3.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de bencilaminopurina y medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes apicales de material juvenil

Se testó el efecto, sobre el crecimiento de brotes apicales, del cultivo alternado en medio RV líquido y sólido. Los cultivos se mantuvieron durante dos semanas en medio líquido con agitación en rotor (figura 16), con distintas concentraciones de BAP (0 - 0,4 - 1,3

y 4,4 μ M), recultivándose a continuación en el medio de multiplicación estándar (RV) sólido, durante 6 semanas más. Como control se utilizó RV sólido con un período de subcultivo de 8 semanas.

III.3.1.3. Fase de enraizamiento

Para los experimentos de enraizamiento de material juvenil se partió de brotes mantenidos en el medio de proliferación estándar (RV). La fase de enraizamiento se prolongó durante 8 semanas.

III.3.1.3.1. Experimento 1.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes apicales de material juvenil

Se testó el efecto en el enraizamiento de los medios RVr (Revilla y *col.*, 1996) y OMr/OMe (Cañas y *col.*, 1987); la composición de estos medios se recoge en la tabla 7. Los cultivos en el medio RVr se mantuvieron una semana en oscuridad, tras la cual se incubaron en condiciones estándar durante un periodo de 7 semanas, tal y como describen Revilla y *col.*, (1996). En el otro tratamiento, tal y como especifican Cañas y *col.* (1987), en una primera fase, que se prologó durante dos semanas, los explantos se cultivaron en el medio de inducción (OMr) para luego ser recultivados, durante el resto de la fase de enraizamiento (6 semanas), en el medio de elongación (OMe). Se utilizaron brotes apicales de 2 cm de longitud.

III.3.1.3.2. Experimento 2.- Efecto del tipo de explanto sobre el enraizamiento *in vitro* de material juvenil

Se testó si el porcentaje de enraizamiento de los explantos se veía afectado por la eliminación de la yema apical de los brotes; para ello se utilizaron brotes apicales (2 cm) y subapicales (2 nudos) que se cultivaron en los medios OMr/OMe.

III.3.1.3.3. Experimento 3.- Enraizamiento *ex vitro* de las microestaquillas procedentes de los cultivos mantenidos en el medio de proliferación

Se utilizaron estaquillas apicales y subapicales de 3 cm de longitud; las bases de las microestaquillas se sumergieron en una solución de AIB (14,8 mM) durante 10 seg. Dicha solución se preparó disolviendo el AIB en unas gotas de NaOH (1N) y diluyendo con agua destilada hasta el volumen final. El pH fue ajustado a 5,8.

Tras la inmersión en auxina, las estaquillas se plantaron en alvéolos de turba prensada con sustrato compuesto por turba:perlita (1:1), manteniéndose en mesas de aclimatación en invernadero climatizado durante 8 semanas. Como control se utilizaron brotes enraizados *in vitro*, en el medio de Cañas y col. (1987), procedentes del mismo stock de multiplicación.

Tabla.- 6 Composición de los medios de cultivo utilizados en las fases de inicio y multiplicación *in vitro* de olivo.

Componentes mg l ⁻¹		IM (Rugini, 1984)	OM (Rugini, 1984)	RV* (Revilla y col., 1996)	RP** (Roussos y Pontikis, 2002)
Macronutrientes	KNO ₃	500	1.100		
	NH ₄ NO ₃	100	412	1.410	1.410
	CaCl ₂ - 2H ₂ O	50	440	147	111
	Ca(NO ₃) ₂ - 4H ₂ O		600	1.960	1.960
	KCl		500		
	KH ₂ PO ₄		340	250	250
	KH ₂ SO ₄			760	780
	MgSO ₄ - 7H ₂ O	250	1.500	740	1500
Micronutrientes	Na ₂ EDTA	18,4	37,5	44	90
	FeSO ₄ - 7H ₂ O	13,9	27,8	33	
	H ₃ BO ₃	1,5	12,4	4,8	6,2
	CuSO ₄ - 5H ₂ O	0,006	0,25	0,25	0,25
	MnSO ₄ - H ₂ O	5,5	22,3	33	33
	Na ₂ MoO ₄ - 2H ₂ O	0,6	0,25	0,38	0,2
	Zn(NO ₃) ₂ - 6H ₂ O		14,3	17	17
	ZnSO ₄ - 7H ₂ O	2,1			
	CoCl ₂ - 6H ₂ O	0.006	0,025		
	KI	0,2	0,83		
Vitaminas y compuestos nitrogenados	Glicina	4	2	1,99	1,99
	Acido nicotínico	0,25	5	0,99	0,5
	Tiamina - HCl	10	0,5	1,99	1,9
	Piridoxina	0,25	0,5		0,5
	Biotina		0,05		
	Myo-inositol	50	100	1.000	1.000
	Acido F6lico		0,5		0,5
	Glutamina		2,17		1,200
	Cistina				10
Reguladores de crecimiento	BAP			1	
	Zeatina	0,5	4		
	Ribósido de Zeatina				2
	AIB			0,01	
Hidratos de carbono					
	Sacarosa	20.000	30.000	30.000	
	Manitol				20.000

* Macronutrientes, micronutrientes y vitaminas DKW (Driver y Kuniyuki, 1984).

** Macronutrientes y micronutrientes DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) modificados por Roussos y col., (1999) y Roussos y Pontikis (2002); vitaminas RP (Roussos y Pontikis, 2002).

Tabla 7.- Composición de los medios de cultivo utilizados en la fase de enraizamiento.

Componentes del medio	Denominación de los medios		
	OMr (Cañas y col., 1987)	OMe (Cañas y col., 1987)	RVr (Revilla y col., 1996)
Macronutrientes	OM ¹ (0,5 x)	OM (0,25 x)	DKW ² (0,5 x)
Micronutrientes	OM (0,5 x)	OM (0,25 x)	DKW (0,5 x)
Vitaminas y compuestos nitrogenados	No	OM (0,5 x)	No
Reguladores de crecimiento	AIB (4,9µM)	Zeatina (6,8µM)	AIB (0,49µM)
Hidratos de Carbono	Sacarosa (0,06M)	Sacarosa (0,06M)	Sacarosa (0,06M)

¹Macronutrientes y micronutrientes OM (Rugini, 1984)

²Macronutrientes y micronutrientes DKW (Driver y Kuniyuki, 1984)

III.3.2. Material adulto

III.3.2.1. Micropropagación del cv. Arbequina

III.3.2.1.1. Establecimiento de cultivos asépticos

Las secciones nodales iniciadas a partir del material adulto, debido a su menor reactividad, tras las 6 primeras semanas, se recultivaron en medio fresco en el que se mantuvieron durante otro periodo de 6 semanas. A partir de estos brotes se establecieron los stocks con los que se realizaron todos los experimentos.

III.3.2.1.1.1. Experimento 1.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre sobre el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto

Se analizó el comportamiento de secciones nodales obtenidas de la copa (explanto C), de ramas brotadas en invernadero (explanto R) y de la base (explanto B) del árbol madre (ver figura 6). Las secciones nodales se cultivaron en el medio RV.

III.3.2.1.2. Fase de multiplicación

Para los experimentos de multiplicación se utilizaron brotes de 1,5 – 3 cm a los que se les eliminaba la yema apical, procedentes de la fase de inicio; el periodo de subcultivo fue de 8 semanas.

III.3.2.1.2.1. Experimento1.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación *in vitro* de material adulto

Se testó el efecto de los medios de cultivo RV (Revilla *y col.*, 1996), ZAD (Zachini y de Agazio, 2004), RP (Roussos y Pontikis, 2002), SS (Sghir *y col.*, 2005) y Px (Peixe *y col.*, 2007), previamente utilizados para la multiplicación de distintos cultivares de olivo. La composición de estos medios se recoge en la tabla 8.

A partir de este experimento se eligió el medio RP como estándar para la multiplicación del cv. Arbequina.

Tabla 8.- Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados en la fase de multiplicación de material adulto de olivo.

Medios	Componentes del medio					
	Macronutrientes	Micronutrientes	Vitaminas	Reguladores de Crecimiento	Hidratos de Carbono	Otros
RV (Revilla <i>y col.</i> , 1996)	¹ DKW	DKW	DKW	BAP (4,4 µM) AIB (0,05 µM)	Sacarosa (0,09M)	
ZAD (Zachini y de Agazio, 2004)	² OM	OM	OM	Z (13,68 µM) GA3 (4,33 µM) AIB (0,49 µM)	Manitol (0,2 M)	
RP (Roussos y Pontikis, 2002)	³ DKWm	DKWm	⁴ RP	RZ (5,7 µM)	Manitol (0,11 M)	
SS (Sghir <i>y col.</i> , 2005)	OM	OM	OM	RZ (13,6 µM)	Sacarosa (0,09M)	
Px (Peixe <i>y col.</i> , 2007)	OM	OM	OM	BAP (8,88 µM)	Manitol (0,165 M)	Leche de coco (50 ml/l)

¹DKW (Driver y Kuniyuki, 1984); ² OM (Rugini, 1984); ³ DKWm (modificación del medio DKW por Roussos *y col.*, 1999 y Roussos y Pontikis, 2002) y ⁴RP (Roussos y Pontikis, 2002).

III.3.2.1.2.2. Experimento 2.- Efecto del cultivo alternado en presencia de ribósido de zeatina o tidiazurón y de la combinación de ribósido de zeatina y ácido giberélico (GA₃) en la tasa de multiplicación de material adulto

En este experimento, se estudió el efecto de distintas combinaciones hormonales en la multiplicación del olivo.

Se ensayaron los siguientes tratamientos:

- Cultivo en RZ (5,7 μ M), medio control.
- Cultivo alternado en RZ (5,7 μ M) y TDZ (1 μ M), como proponen Roussos y Pontikis (2002).
- Cultivo en RZ (5,7 μ M) + GA₃ (4,33 μ M), como proponen Zacchini y de Agazio (2004).

III.3.2.1.2.3. Experimento 3.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y GA₃, sobre la tasa de multiplicación de material adulto

Se evaluó el efecto de distintas dosis de RZ (0,0 - 2,85 - 4,28 y 5,7 μ M) y GA₃ (2,17 y 4,33 μ M), sobre la tasa de multiplicación media. Como control se utilizó el medio RP estándar.

III.3.2.1.2.4. Experimento 4.- Efecto de distintas concentraciones de bencilaminopurina ó tidiazurón junto con ribósido de zeatina, sobre la tasa de multiplicación de material adulto

Se testó el efecto de RZ a la concentración 2,85 μ M, suplementado con diferentes concentraciones (1,1 - 2,2 - 4,4 - 8,8 y 17,6 μ M) de BAP ó TDZ, en la tasa de multiplicación. Durante el experimento se utilizaron como control los cultivos en el medio RP estándar (RZ, 5,7 μ M).

III.3.2.1.2.5. Experimento 5.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y 24- epibrasinólido sobre la tasa de multiplicación de material adulto

En este experimento se testó el efecto del 24-epibrasinólido (BR) junto al RZ sobre las tasas de multiplicación *in vitro*. Se utilizaron 7 concentraciones de BR (0- 0,01- 0,03- 0,1- 0,3- 1 y 3 μM) junto con dos concentraciones de RZ (2,85 y 5,7 μM).

III.3.2.1.3. Fase de enraizamiento

III.3.2.1.3.1. Experimento 1.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro* de material adulto

Se testó el efecto en el enraizamiento de los medios RVr y OMr/OMe. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las especificadas para el material juvenil (ver apartado III.3.1.3.1). Se utilizaron brotes apicales de 2 cm de longitud, procedentes de stocks en proliferación, mantenidos en medio RP estándar.

III.3.2.1.3.2. Experimento 2.- Efecto de la adición de GA_3 al medio de proliferación sobre el posterior enraizamiento *in vitro* de material adulto

Se testó el efecto que tenía la adición de GA_3 al medio de proliferación, sobre el comportamiento de los brotes durante la fase de enraizamiento en el medio RVr. Se partió de brotes apicales adultos mantenidos durante 3, 4 y 5 subcultivos sucesivos en los medios RP estándar y RP + GA_3 (4,33 μM).

III.3.2.1.3.3. Experimento 3.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de ácido indolbutírico en el enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de material adulto

El ensayo se realizó durante los meses de Octubre y Noviembre de 2009 (otoño) y también en Marzo y Junio de 2010 (primavera), con microestaquillas subapicales, de tres centímetros de longitud, procedentes de stocks de proliferación de material adulto en el medio RP.

La base de la estaquilla se sumergió en una solución con diferentes concentraciones de AIB: 0-3,7-7,4-11,1-14,8-18,5 y 22,2 mM, para el material de otoño; en los ensayos de primavera se utilizaron, además, 25,9 mM y 29,6 mM.

Tras la inmersión en auxina, las estaquillas se plantaron en alvéolos de turba prensada con sustrato compuesto por turba:perlita (1:1), manteniéndose en túnel de aclimatación con una humedad relativa cercana al 100%, en invernadero climatizado durante 12 semanas. La temperatura del invernadero se mantuvo en el rango de 15 °C - 30 °C mediante calefacción y un sistema “cooling” de refrigeración. La luminosidad se mantuvo por debajo de los 65 $\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mediante una malla exterior de sombreo.

III.3.2.2. Micropropagación del cv. Picual

III.3.2.2.1. Establecimiento de cultivos asépticos

La fase de inicio tuvo una duración de 12 semanas con un cambio de los cultivos a medio fresco tras las 6 primeras. A partir de estos brotes se establecieron los stocks con los que se realizaron todos los experimentos.

III.3.2.2.1.1. Experimento 1.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto

Tal y como se indicó para el cv. Arbequina (apartado III.3.2.1.1.1), se llevó a cabo un estudio comparativo sobre la respuesta en el medio RV de los tres tipos de explanto, de la

copa (explanto C), de ramas brotadas en invernadero (explanto R) y de la base (explanto B) del árbol madre (ver figura 6).

III.3.2.2.2. Fase de multiplicación

Para los experimentos de multiplicación se utilizaron brotes de 1,5–3cm a los que se les eliminaba la yema apical, procedentes de la fase de inicio; el periodo de subcultivo fue de 8 semanas.

III.3.2.2.2.1. Experimento1.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación *in vitro* de material adulto

Se testó el efecto de los medios de cultivo RV (Revilla y *col.*, 1996) control, ZAD (Zachini y de Agazio, 2004), RP (Roussos y Pontikis, 2002), SS (Sghir y *col.*, 2005) y Px (Peixe y *col.*, 2007), previamente utilizados en la micropropagación de distintos cultivares de olivo. La composición de estos medios se recoge en la tabla 8.

III.3.2.2.2.2. Experimento 2.- Efecto de las combinaciones entre formulaciones basales y suplementos hormonales de los medios RP y ZAD, sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de material adulto

En este experimento se combinaron los medios basales RP y ZAD con la formulación hormonal del otro medio. Se testaron, por lo tanto, los siguientes tratamientos:

1. Medio ZAD + Z (13,68 μ M) + GA₃ (4,33 μ M) + AIB (0,49 μ M) (Zachini y de Agazio, 2004).
2. Medio basal ZAD + RZ (5,7 μ M).
3. Medio basal RP + Z (13,68 μ M) + GA₃ (4,33 μ M) + AIB (0,49 μ M).
4. Medio RP + RZ (5,7 μ M) (Roussos y Pontikis, 2002).

III. 3.2.2.2.3. Experimento 3.- Efecto de ribósido de zeatina con GA₃ sobre la tasa de multiplicación de material adulto

Se testó la influencia de la adición de GA₃ (4,33μM) al medio RP estándar. El medio RP se utilizó como control.

III.3.2.2.2.4. Experimento 4.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina, en medio de doble fase, sobre la tasa de multiplicación de material adulto

Se utilizaron medios de doble fase en los que la fase sólida estaba compuesta por medio basal RP con dos concentraciones diferentes de RZ (2,85 y 5,7 μM); sobre este medio se añadió el medio líquido RP con varias concentraciones de RZ (0,285; 0,85 y 2,85 μM). Como control se utilizó el medio RP sólido estándar.

III.3.2.2.3. Fase de enraizamiento

III.3.2.2.3.1. Experimento 1.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro* de material adulto

Tal y como se llevó a cabo en el cv. Arbequina (III.3.2.1.3.1), se testó el efecto en el enraizamiento de los medios RVr y OMr/OMe. Se utilizaron brotes apicales, del cv. Picual, de 2 cm de longitud, procedentes de stocks en proliferación mantenidos en medio RP estándar.

III.3.2.2.3.2. Experimento 2.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de ácido indolbutírico en el enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de material adulto

Se llevó a cabo el mismo experimento indicado en el apartado III.3.2.1.3.3 para el cv. Arbequina, viéndose el efecto de la respuesta al enraizamiento de microestaquillas del cv.

Picual en los meses de Octubre y Noviembre (otoño) así como en Marzo y Junio (primavera).

III.3.3. Material microinjertado

III.3.3.1. Efecto de los microinjertos sucesivos en la estabilidad genética

III.3.3.1.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la estabilidad genética de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero

Todas las plantas procedentes de la aclimatación de los brotes microinjertados del cv. Arbequina, se analizaron a nivel genético para descartar posibles variaciones o errores durante el proceso de rejuvenecimiento *in vitro*. En total se analizaron 41 plantas, procedentes de 22 líneas distintas y de los diferentes ciclos de microinjertos (ver tabla 5), más la planta madre adulta a partir de la cual se iniciaron los microinjertos.

Para el estudio del ADN de estos materiales se eligieron como marcadores los microsatélites, (SSRs, Simple Sequence Repeats).

El análisis del ADN se llevó a cabo en cuatro etapas:

i) Extracción y purificación del ADN.

El método de extracción se basó en el protocolo de Doyle y Doyle (1987) con algunas modificaciones. Se utilizaron 0,05g de material vegetal procedente de hojas en crecimiento activo, de los diferentes árboles, a las que se les eliminaron las nervaduras. Tras la trituración de este material en nitrógeno líquido, se le añadió 400 µl de tampón de extracción (TrisHCL a pH 8; NaCl; EDTA; CTBA; PVP y bisulfito sódico) junto a 2µl de mercaptoetanol. Tras la incubación de las muestras durante 30 minutos a 65 °C, se les añadió 400 µl de Sevag (cloroformo y alcohol isoamílico 24:1) y se mezclaron hasta obtener una mezcla homogénea. Los restos de paredes celulares se eliminaron por centrifugación (9000 g, 4 °C , durante 15

minutos); el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se añadieron lentamente 240 µl de isopropanol frío para precipitar el ADN. Tras un nuevo ciclo de centrifugación (15,000 g, 4°C, 5 minutos) se eliminó el sobrenadante, las muestras se mantuvieron en frío y el ADN precipitado se mantuvo durante 20 minutos con 800 µl de tampón de lavado (etanol- acetato de amonio). El tampón de lavado se eliminó tras una centrifugación a 15.000 g durante 5 minutos a 4 °C. Se realizó un segundo lavado con 200 µl de etanol frío y se repitió el proceso de centrifugación especificado anteriormente. Se eliminó el etanol y las muestras se dejaron secar. El ADN precipitado se resuspendió en 200 µl de MTE (TrisHCl- EDTA) a 65°C. Las muestras se centrifugaron a 15.000 g durante 5 minutos a 4 °C, para eliminar posibles residuos y obtener el ADN en el sobrenadante. Finalmente, se añadieron 0,2 µl de RNAsa para eliminar contaminaciones con ARN (Sambrook y col., 2001).

ii) *Cuantificación y calidad del ADN extraído.*

La determinación de la cantidad de ADN/muestra se realizó en un espectrofotómetro (NANODROP, N-D1000, spectrophotometer) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm y la relación 260/280.

La calidad del ADN se determinó mediante la realización de un gel de agarosa al 1 % (Seakem LE) en 0,25X Búfer NEB (Tris- EDTA.Na -AcNa.3H₂O a pH 8,1 ajustado con ácido acético) que se visualizó tras teñirlo con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad–Segrate,Milan, Italy) ajustado a un sistema de análisis de imagen (Quantity One) (Hormaza, 2002).

iii) *Amplificación de secuencias por PCR*

La amplificación del ADN se llevó a cabo en un volumen de 15 µl, para cada muestra, que contenía: 1,8 µl de ADN (10 µg/ml); 9,3 µl de agua ultrapura; 1,5 µl de tampón (16 mM (NH₄)₂ SO₄, 67 mM Tris- ClH pH 8,8; 0,01 % Tween 20); 0,6 µl de cada uno de los cuatro

desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP); 1,2 µl de CL₂Mg; 0,15 µl de cada primer y 0,3 µl de Taq DNA polimerasa (Bioline, London).

Se utilizaron los 6 loci siguientes:

- ssrOeUA-DCA3; ssrOeU-DCA9; ssrOeU-DCA15; ssrOeU-DCA16; ssrOeU-DCA18 (Sefc y col. ,2000).
- UDO99-043 (Cipriani y col., 2002).

De cada par de cebadores, uno de ellos se encontraba marcado con fluorocromo WellRED D₂, D₃ y D₄ (Proligo, Paris).

En la tabla 9 se recogen los motivos de repetición, la secuencia del primer (5'-3') y su temperatura de unión. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.) según este protocolo: 1 minuto a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C (ó 55 ° C, según la temperatura de anillamiento del cebador) , 1 minuto a 72 °C y finalmente 5 minutos a 72 °C.

iv) *Detección.*

Las secuencias amplificadas se analizaron en un secuenciador automático, CEQ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton. Calif.).

Tabla 9.- Secuencias de los cebadores utilizados en los análisis de conformidad genética en los individuos procedentes de los microinjertos *in vitro*.

Locus	Motivo repetido	Secuencia del cebador	Tª de unión
ssrOeUA-DCA3 AJ 279854	(GA) ₁₉	ccaagcggaggtgtatattgttac tgcttttgcgtgtttgaggtgtatattgttac	50 °C
ssrOeU-DCA9 AJ279859	(GA) ₂₃	aatcaaagtcttccttcatttcg gatccttccaaaagtataacctctc	55 °C
ssrOeU-DCA15 AJ279864	(GA) ₃ G(AC) ₁₄	gatcttgtctgtatatccacac tatacttttccatcttgacgc	50 °C
ssrOeU-DCA16 AJ279865	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	gatcaaattctacaaaaatata tttaggtgagttcatagaattagc	50 °C
ssrOeU-DCA18 AJ279867	(CA) ₄ CT(CA) ₃ (GA) ₁₉	aagaagaaaaaggcagaattaagc gttttcgtctctctacataagtgac	50 °C
UDO99-043	(GT) ₁₂	aattccgacaagttgtgtgtg cacagcaccaaccagattt	55 °C

A partir de este momento se seleccionaron 2 árboles de las líneas 8 y 15 de cada uno de los microinjertos 1º, 3º y 5º; es decir un total de seis plantas con las que se realizaron los experimentos de evaluación de la capacidad morfogénica *in vitro* del material microinjertado y el análisis del comportamiento en campo.

III.3.3.2. Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad morfogénica

III.3.3.2.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de enraizamiento *in vitro* de los brotes obtenidos

Se testó la capacidad de enraizamiento, en el medio RVr, de los brotes procedentes directamente de las secciones nodales microinjertadas una, tres y cinco veces sucesivamente (ver figura 13). Se utilizaron brotes apicales de 1,5 cm de longitud.

III.3.3.2.2. Experimento 2.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de enraizamiento mediante estaquillado semileñoso de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero

Se testó la capacidad de propagación mediante estaquillado semileñoso, de las plantas aclimatadas en invernadero, procedentes de todas las líneas de los microinjertos 1º, 3º y 5º. Las plantas fueron obtenidas tras el enraizamiento *in vitro* de los brotes microinjertados y su posterior aclimatación en condiciones de invernadero. Como control se utilizaron estaquillas procedentes del árbol madre adulto.

El proceso se realizó con estaquillas de 5 cm de longitud, cuya base se sumergió durante 10 seg. en una solución 14,8 mM de AIB (Caballero y del Río, 1994); fueron plantadas en alvéolos de turba prensada que contenían una mezcla de turba:perlita (1:1) y mantenidas en el túnel de aclimatación durante 12 semanas, tras las cuales se dejaban crecer en invernadero climatizado.

III.3.3.2.3. Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de micropropagación de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero

Las plantas procedentes de las líneas 8 y 15 de los ciclos de microinjerto 1º, 3º y 5º se utilizaron como árboles madre a partir de los que se iniciaron los cultivos *in vitro*.

III.3.3.2.3.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos en la fase de establecimiento *in vitro*.

Se testó si existían diferencias en la fase de inicio, entre las plantas procedentes de las líneas 8 y 15 de los diferentes microinjertos (1º, 3º y 5º); para ello, secciones nodales de estas plantas, tratadas como se detalló en el apartado III.1.2, se cultivaron en el medio RV. La fase

de inicio se prolongó durante doce semanas con un cambio a medio fresco tras las seis primeras.

III.3.3.2.3.2. Experimento 2.- Efecto de los microinjertos sucesivos sobre la tasa de multiplicación *in vitro*

Se testó la tasa de multiplicación, durante cuatro subcultivos sucesivos, en el medio RP. Como explantos se utilizaron brotes subapicales con dos nudos, procedentes de los stocks de inicio establecidos a partir de las plantas de las líneas 8 y 15, del 1º, 3º y 5º microinjerto.

III.3.3.2.3.3. Experimento 3.- Efecto de los microinjertos sucesivos en la capacidad de enraizamiento *in vitro*

Se testó la capacidad de enraizamiento en los medios RVr y OMr/OMe de brotes apicales, procedentes de stocks de las líneas 8 y 15 del 1º, 3º y 5º microinjerto, mantenidos en el medio de proliferación RP.

III.3.3.3. Efecto de los microinjertos sucesivos sobre la entrada en producción

III.3.3.3.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la precocidad de entrada en producción de las plantas obtenidas y transplantadas a campo

Se evaluó el comportamiento agronómico de las plantas obtenidas por estaquillado semileñoso a partir de plantas madre del 1º, 3º y 5º microinjerto (líneas 8 y 15) y la planta madre adulta del cv. Arbequina, tras un año de su trasplante a campo. Para ello, tras el enraizamiento y aclimatación de las estaquillas, se podaron para hacerlas crecer en un solo eje (figura 17a) hasta que alcanzaron 1m de longitud y entonces se les dejó formar la copa; tras dos años aproximadamente de permanencia en invernadero climatizado, 81 plantas

resultantes de este proceso fueron trasladadas al centro del IFAPA- Alameda del Obispo (Córdoba) y plantadas en una parcela de experimentación (figura 17b). Las 81 plantas se correspondían con:

- 11 plantas adultas del cv. Arbequina.
- 8 plantas de la línea 8 del primer microinjerto.
- 6 plantas de la línea 15 del primer microinjerto.
- 15 plantas de la línea 8 del tercer microinjerto.
- 15 plantas de la línea 15 del tercer microinjerto.
- 15 plantas de la línea 8 del quinto microinjerto.
- 11 plantas de la línea 15 del quinto microinjerto.

La plantación se estableció en condiciones de riego, a un marco de 2,5 m x 6 m (entre árboles de la misma fila y entre filas consecutivas respectivamente), lo que se correspondía a una densidad de 666 árboles/ha. Como guardas se plantaron 13 árboles procedentes de los distintos tratamientos.



Figura 17.- Plantas de olivo, cv. Arbequina, procedentes de los microinjertos 1º, 3º y 5º propagadas por estaquillado semileñoso: a) creciendo a un solo eje en invernadero climatizado y b) trasplantadas a la parcela experimental del BMGO (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA).

III.4. TOMA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la fase de inicio se tomaron datos del número de cultivos contaminados y necrosados, brotación de las yemas así como del número y longitud de los brotes axilares producidos, tras 6 y 12 semanas del inicio. Para determinar el número medio de brotes axilares así como la longitud de los mismos, no se tuvieron en cuenta las secciones nodales necrosadas o contaminadas.

En la fase de multiplicación del material juvenil se tomaron datos del número de explantos que desarrollaron axilares, la longitud de éstos así como del número de hojas, durante tres subcultivos sucesivos. En el material adulto y microinjertado, se calculó la tasa de multiplicación de los cultivos durante cuatro subcultivos sucesivos. Para ello, definimos un parámetro que denominamos unidades de multiplicación (u.m), siendo éste, el número de explantos obtenidos (con un tamaño mínimo de 1,5 cm de longitud), a partir de un único explanto original y tras un periodo de subcultivo. Cuando aparecían, también se evaluaba el porcentaje de explantos necrosados.

En la fase de enraizamiento *in vitro* se tomaron datos del número de brotes enraizados, así como el número y la longitud de las raíces desarrolladas tras 8 semanas. En el enraizamiento *ex vitro* de las microestaquillas, se contabilizaron el número de plantas enraizadas tras un periodo de 12 semanas.

El tamaño de la muestra fue de un mínimo de 30 explantos para los ensayos de multiplicación y de 25 para los de enraizamiento.

Salvo para el material de la copa, los ensayos de inicio se repitieron 2 veces; los de multiplicación se mantuvieron durante tres subcultivos sucesivos para el material juvenil y durante cuatro subcultivos sucesivos para el material adulto y microinjertado. Los ensayos de enraizamiento *in vitro* se realizaron tres veces, con explantos procedentes de stocks de

proliferación durante tres subcultivos sucesivos. Los ensayos de enraizamiento *ex vitro* se realizaron dos veces en otoño y dos veces en primavera.

Para evaluar la capacidad de propagación por estaquillado semileñoso, de las 41 plantas resultantes del enraizamiento y aclimatación de los brotes microinjertados (tabla 5), se tuvo en cuenta el número de plantas enraizadas tras doce semanas de permanencia en el túnel de aclimatación; se utilizaron 24 estaquillas/árbol. El proceso se realizó solo una vez.

Para el estudio del comportamiento en campo de las plantas resultantes de los microinjertos, se utilizaron 81 plantas que se establecieron en campo siguiendo un modelo de bloques al azar (6), con 7 tratamientos (plantas de las líneas 8 y 15 procedentes del 1º, 3º y 5º microinjerto, más el control adulto) y un árbol por parcela elemental.

Tras el primer año de crecimiento en la parcela de experimentación se evaluó el número de árboles florecidos, la producción y el vigor de los árboles procedentes de cada tratamiento (en este caso línea/ciclo de microinjerto). Tanto para floración como para producción, se considera que un determinado tratamiento ha florecido o producido, cuando lo hace más del 50% de los árboles plantados. Para evaluar el vigor alcanzado por los árboles de los diferentes tratamientos, se midieron la altura (m), la superficie productiva de la copa (m²), la sección del tronco (cm²) y el diámetro del tronco (cm), siguiendo la metodología de del Río y col. (2005b).

Para el análisis de los datos expresados en porcentaje (tasas de brotación, necrosis y enraizamiento) se utilizó el test de análisis de frecuencias R×C (BiomStat 3.2c). Para los datos relacionados con la multiplicación (número y longitud de los brotes axilares, tasa de multiplicación) se utilizó ONE WAY ANOVA (programa Statistix 12.0) para diseños totalmente al azar y el test de Tukey B^{a,b}, para la detección de diferencias entre medias. En todos los experimentos, letras distintas señalan diferencias significativas ($P \geq 0,05$).

IV. RESULTADOS

IV.1. MATERIAL JUVENIL

IV.1.1. Establecimiento de cultivos asépticos

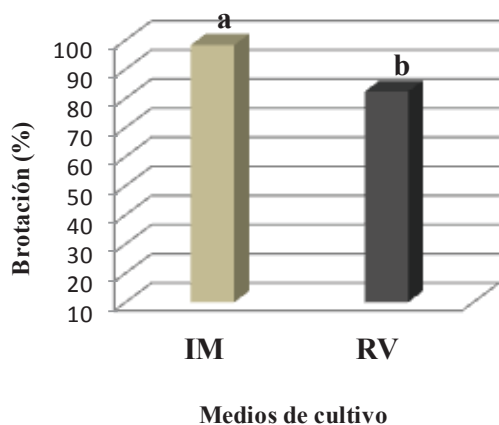
IV.1.1.1. Experimento 1.- Efecto de los medios IM y RV sobre el desarrollo de material juvenil en la fase de establecimiento *in vitro*

Tras seis semanas, los porcentajes de brotación fueron del 98 % en el medio IM frente al 82 % en el medio RV (figura 18a); por otra parte, mientras que en el IM no se apreciaron casos de necrosis, en el medio RV ésta fue del 12 % (figura 18b).

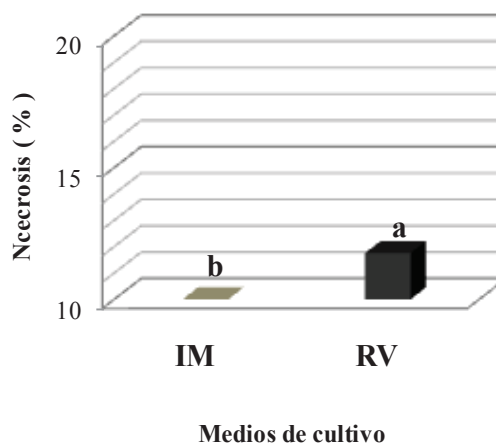
Como se puede apreciar en la figura 18c, no se observaron diferencias significativas en cuanto al número medio de brotes axilares desarrollados en ambos medios, pero sí en la longitud de los mismos, así mientras que en el medio IM los brotes presentaron una longitud de 0,4 cm, en el medio RV la longitud media fue de 1,4 cm (figura 18d).

A pesar del mejor comportamiento obtenido, en cuanto a porcentajes de brotación y necrosis en el medio IM, se eligió como estándar para la fase de inicio el medio RV ya que en este medio, los brotes axilares desarrollados alcanzaban una longitud media superior, que hacía posible el subcultivo de los mismos y por tanto pasar a la fase de multiplicación, lo que resultaba imposible con los brotes obtenidos en el medio IM.

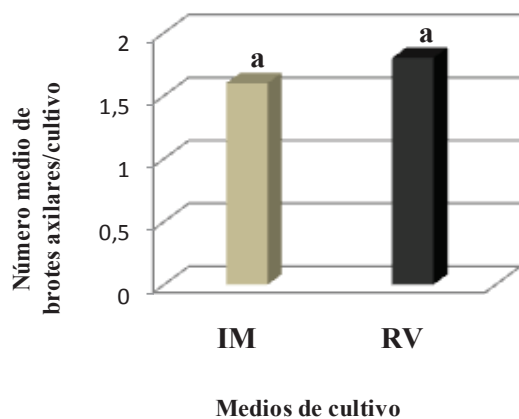
a)



b)



c)



d)

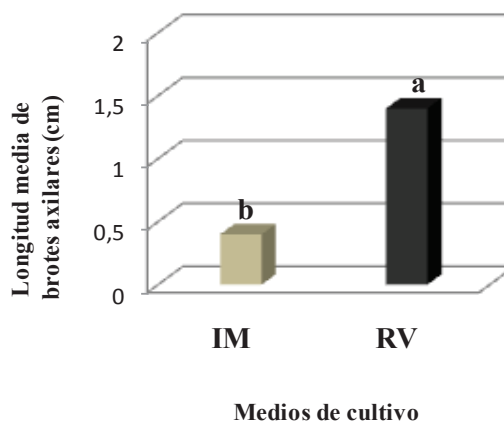


Figura 18. Efecto de los medios IM (Rugini, 1984) y RV (Revilla y *col.*, 1996) sobre el desarrollo durante la fase de establecimiento *in vitro*, de secciones nodales de material juvenil de olivo: a) porcentaje de brotación; b) porcentaje de necrosis; c) número medio de brotes axilares/cultivo y d) longitud media de los brotes axilares. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

IV.1.2. Fase de multiplicación

IV.1.2.1. Experimento 1.- Efecto de los medios OM y RV sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil

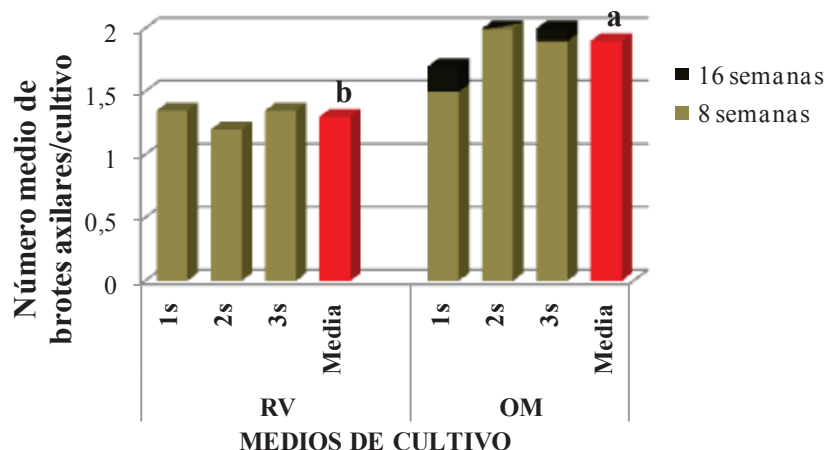
Debido a los mejores resultados obtenidos en la elongación de los brotes tras 6 semanas de cultivo en el medio RV durante la fase de inicio, se decidió comparar el efecto del cultivo continuado en este medio sobre la multiplicación del material, frente al medio OM, utilizado generalmente para la multiplicación de olivo. Debido a la fuerte dominancia apical que presenta el olivo cuando se cultiva *in vitro*, se decidió utilizar, como propágulos para la fase de multiplicación, brotes subapicales. En experimentos preliminares se había observado que era muy importante que esos brotes tuvieran un tamaño mínimo de 1,5 cm.

Tras el primer subcultivo, se pudo observar que en ambos tratamientos se obtuvo un número medio de 1,5 brotes axilares/cultivo (figura 19a), con una longitud media de 1,8 cm en el medio RV y de 0,6 cm en el OM (figura 19b). La longitud de los brotes axilares en el medio OM, tras 8 semanas de cultivo, no permitía subcultivar el material, por lo que fue necesario recultivarlo y dejarlo crecer hasta su subcultivo en la semana 16.

Como podemos observar, en la figura 19, el número medio de brotes axilares fue significativamente mayor en el medio OM (2 brotes axilares/cultivo) que en el RV (1 brote axilar/cultivo), sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la longitud media de los brotes axilares, siendo en ambos casos de 2 cm. Se observaron diferencias en el aspecto de las plantas, así en el medio OM presentaban entrenudos muy cortos y hojas minituarizadas de color verde claro; por el contrario, las que crecían en el medio RV desarrollaron hojas de mayor tamaño, de color verde más intenso y con mayor longitud de entrenudos (figura 20).

A la vista de los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta que el periodo de subcultivo necesario era de 8 semanas en el medio RV frente a 16 semanas en el medio OM, se eligió como estándar el primero para la multiplicación del material juvenil.

a)



b)

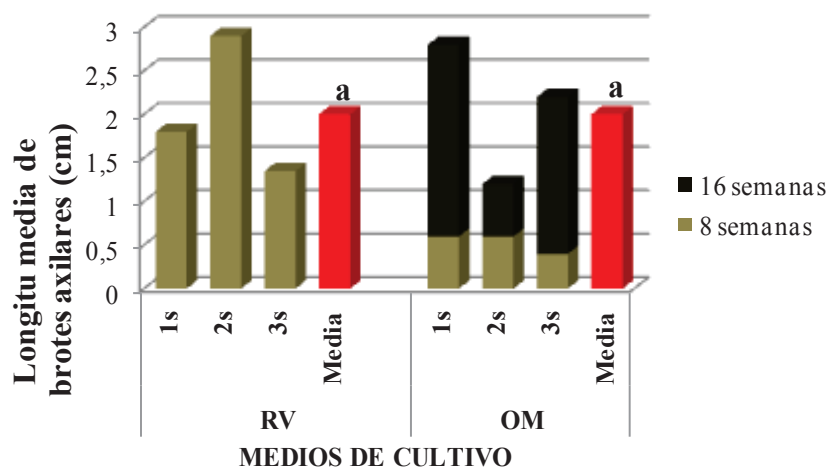


Figura 19.- Efecto de los medios OM (Rugini, 1984) y RV (Revilla y col., 1996) sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil de olivo: a) número medio de brotes axilares/cultivo y b) longitud media de los brotes axilares. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

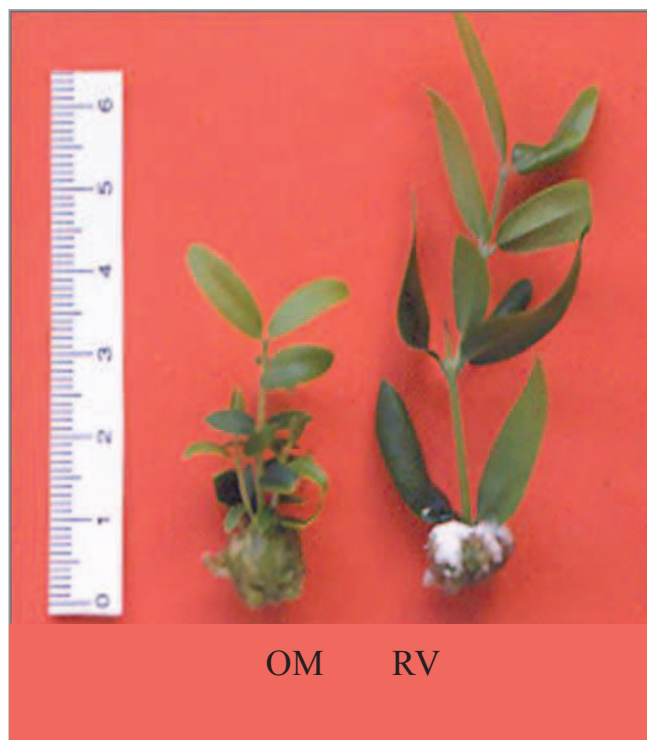


Figura 20.- Aspecto de brotes juveniles de olivo tras un periodo de cultivo de 16 y 8 semanas en los medios OM (Rugini y *col.*, 1984) y RV (Revilla y *col.*, 1996), respectivamente.

IV.1.2.2. Experimento 2.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de bencilaminopurina y medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil

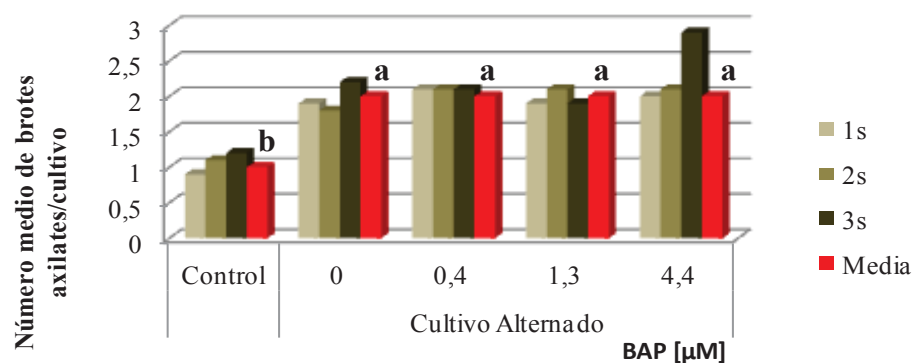
Tratando de mejorar las tasas de multiplicación obtenidas en el medio RV sólido, se planteó un experimento en el que se comparó la multiplicación en el medio control, RV sólido con un período de subcultivo de 8 semanas, frente al cultivo durante 2 semanas en medio basal RV líquido con distintas concentraciones de BAP (0; 0,4; 1,3 y 4,4 μM), recultivándose a continuación en el medio de multiplicación estándar sólido durante 6 semanas más.

Los datos de multiplicación, durante tres subcultivos sucesivos y las medias de ellos se presentan en la figura 21. Se observaron diferencias significativas en las tasas de multiplicación; así, mientras en el tratamiento control se obtuvo un número medio de 1 brote axilar/cultivo, en cualquiera de los tratamientos con medios líquidos se producía una media de 2 brotes axilares/cultivo (figura 21a). La longitud media de los brotes desarrollados (figura 21b) fue en todos los tratamientos del cultivo alternado, significativamente superior a la observada en el medio control (> 2 cm y 1,6 cm respectivamente); y aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en medio líquido, los mayores valores se lograron con los tratamientos 0,4 μ M BAP (2,7 cm) y 4,4 μ M BAP (2,6 cm).

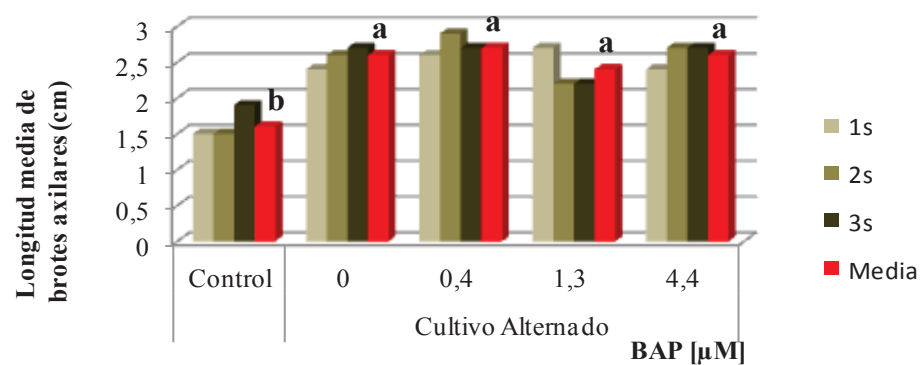
El mayor crecimiento observado no se debía sólo a una elongación de los entrenudos, sino que como podemos apreciar en el figura 21c, los brotes que se cultivaron en medio líquido presentaron mayor número de hojas (7 hojas/brote axilar) que los controles (5 hojas/brote axilar) y por lo tanto, en el primer caso hubo mayor número de yemas, que fueron la fuente de explantos para continuar el proceso de multiplicación.

El aspecto de los cultivos se refleja en la figura 22, en la que puede apreciarse que a la dosis más elevada de BAP, los cultivos presentaron un aspecto hiperhidratado y aberrante.

a)



b)



c)

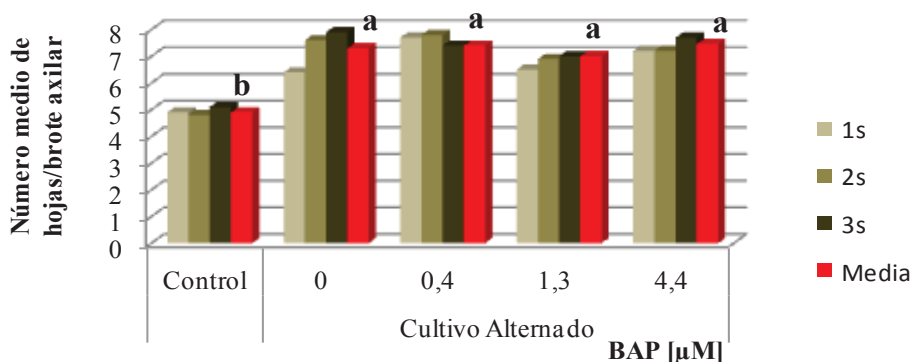


Figura 21. Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con diferentes concentraciones de BAP y agitación en rotor, y posterior transferencia a medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil de olivo: a) número medio de brotes axilares/cultivo, b) longitud media de brotes axilares y c) número medio de hojas/brote axilar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Control.- 8 semanas en medio RV sólido (Revilla y col., 1996).



Figura 22.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con diferentes concentraciones de BAP y agitación en rotor y posterior transferencia a medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil de olivo. Aspecto de los cultivos en los distintos tratamientos.

Control.- Cultivo de explantos durante 8 semanas en medio estándar RV sólido (Revilla y col., 1996).

Tratamientos.- Cultivo en medio basal RV líquido con agitación en rotor y diferentes concentraciones de BAP (0-0,4-1,3 y 4,4 μM) durante dos semanas, alternado con recultivo durante 6 semanas en medio estándar RV sólido.

IV.1.2.3. Experimento 3.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de bencilaminopurina y medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes apicales de material juvenil

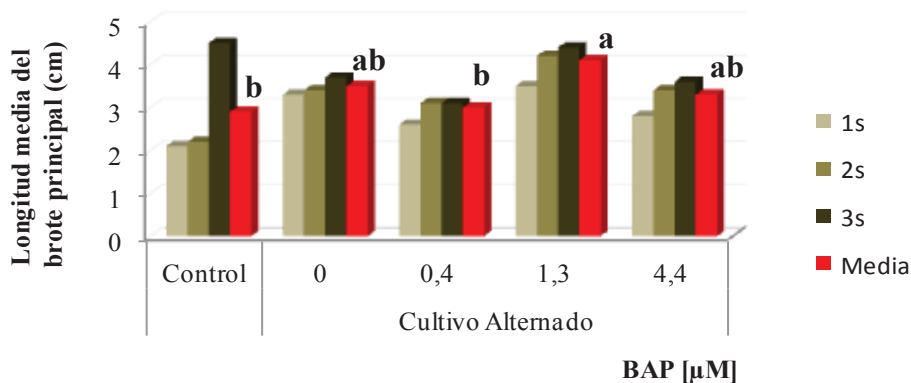
Dado que se observó un efecto positivo de los medios líquidos sobre la multiplicación y elongación de los brotes axilares en el experimento anterior, se decidió testar su efecto sobre brotes apicales con el fin de comprobar si estos medios podrían romper la fuerte dominancia apical que presenta el olivo cuando se cultiva *in vitro*.

Como podemos apreciar en las figuras 23a y 23b, el crecimiento de los brotes que fueron tratados con 1,3 μM BAP, fue significativamente mayor que en el resto de los tratamientos, con 4,1 cm de longitud media y un número medio de 11 hojas/brote. La longitud media y el número de hojas siempre fue mayor en el resto de los tratamientos en medio líquido (3-3,5 cm; 9 hojas/brote) que en el control (2,9 cm; 7 hojas/brote), aunque estas diferencias no fueron significativas.

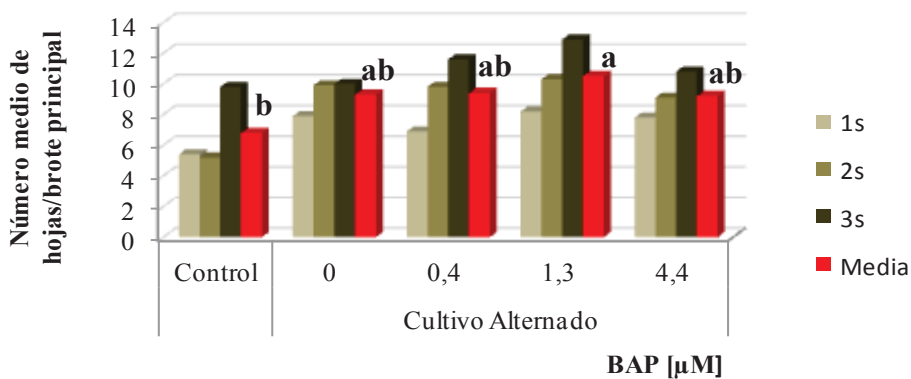
El número medio de brotes axilares formados fue muy bajo (figura 23c), 0,2 brotes axilares/cultivo para el control y entre 0,1-0,3 brotes axilares/cultivo para los tratamientos en medio líquido, aunque estas diferencias no fueron significativas, de manera que incluso a la dosis más elevada de BAP (4,4 μM) no se pudo romper la dominancia apical y sólo se produjo la elongación del brote principal.

En la figura 24, puede apreciarse el aspecto de las plántulas desarrolladas en los diferentes tratamientos tras 8 semanas. A las dos semanas de permanencia del material en los medios líquidos aparecen síntomas de hiperhidricidad en todos los tratamientos, pero van disminuyendo a lo largo del periodo de recultivo en el medio sólido, desapareciendo en todos los brotes salvo en aquéllos que fueron cultivados en el tratamiento 4,4 μM BAP, donde las plantas presentan aspecto hiperhidratado y aberrante.

a)



b)



c)

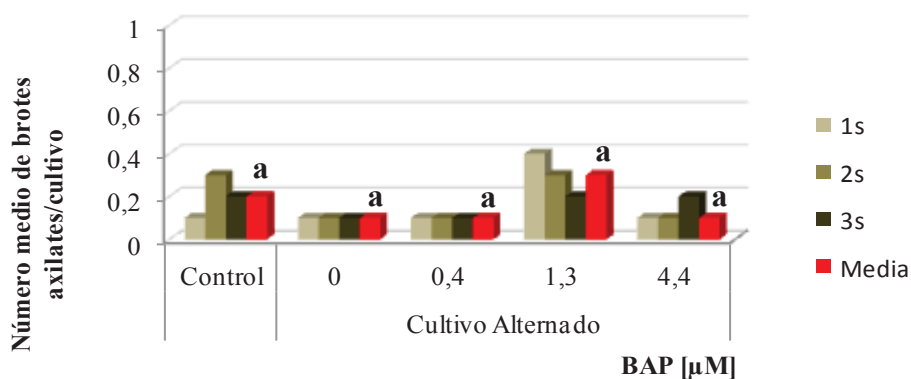


Figura 23.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de BAP y posterior transferencia a medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes apicales de material juvenil de olivo: a) longitud media del brote principal, b) número medio de hojas del brote principal y c) número medio de brotes axilares/cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Control.- 8 semanas en medio RV sólido (Revilla y col., 1996).

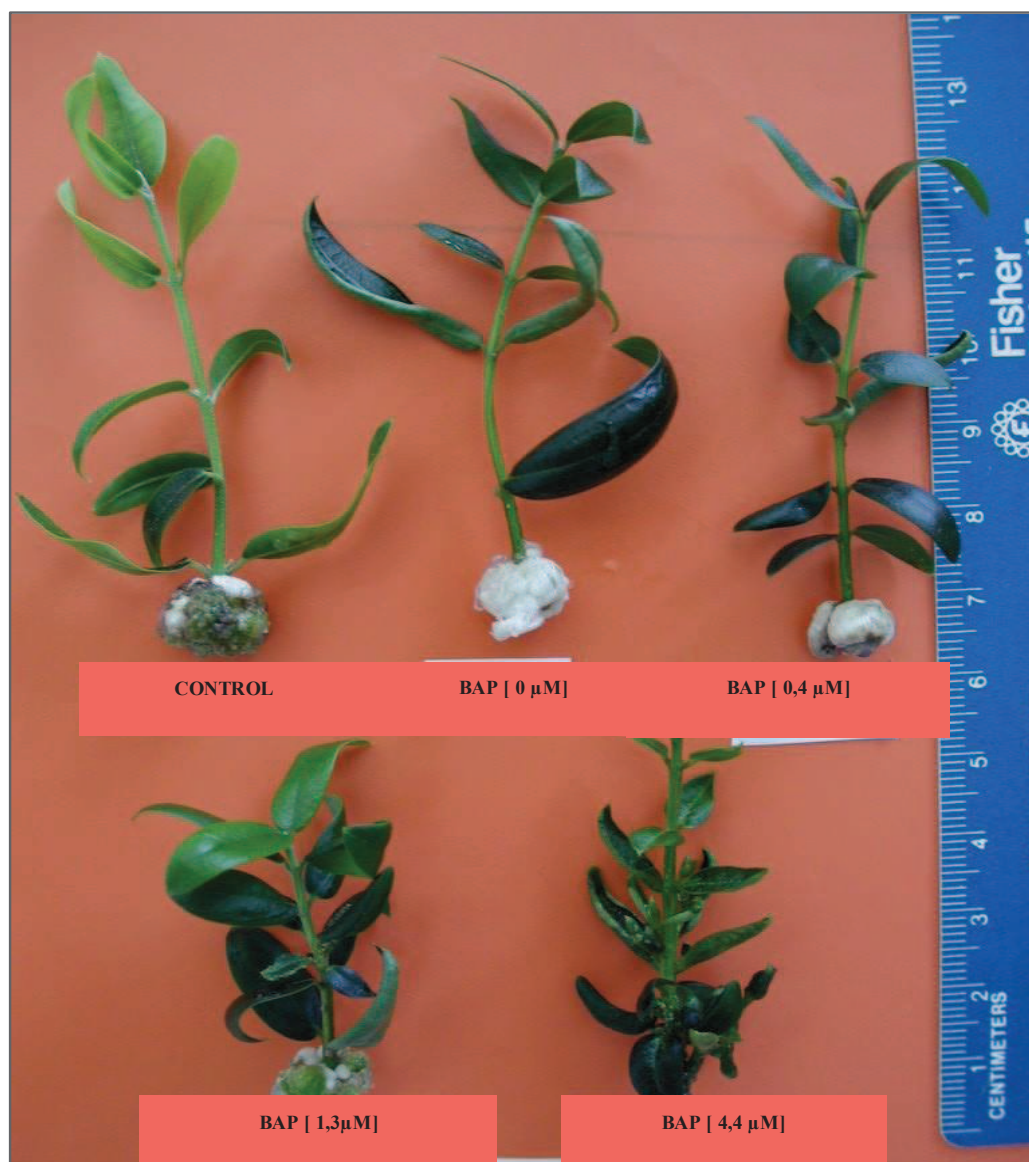


Figura 24.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de BAP y posterior trasferecia a medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes apicales de material juvenil de olivo. Aspecto de los cultivos en los distintos tratamientos.

Control.- Cultivo de explantos durante 8 semanas en medio estándar RV sólido (Revilla y col., 1996).

Tratamientos.- Cultivo en medio basal RV líquido con agitación en rotor y diferentes concentraciones de BAP (0-0,4-1,3 y 4,4 μM), durante dos semanas, alternado con recultivo durante 6 semanas en medio estándar RV sólido.

IV.1.3. Fase de enraizamiento

IV.1.3.1. Experimento 1.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes apicales de material juvenil

Se encontraron diferencias significativas en el comportamiento frente al enraizamiento en estos dos medios; así en el medio OMr se obtuvo un porcentaje de enraizamiento del 94 %, y un número medio de 3 raíces/brote enraizado; mientras que en el medio RVr el porcentaje de enraizamiento fue del 62 % y un número medio de 2 raíces/brote enraizado; no se observaron diferencias entre la longitud de las raíces desarrolladas en ambos medios (tabla 10).

Tabla 10. Efecto de los medios RVr y OMr/OMe, sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes apicales de material juvenil de olivo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Medio	Enraizamiento (%)	Nº de raíces/brote enraizado	Longitud de raíces (cm)
RVr (Revilla y col., 1996)	62 b	2 b	2 b
OMr/OMe (Cañas y col., 1987)	94 a	3 a	2 b

IV.1.3.2. Experimento 2.- Efecto del tipo de explanto sobre el enraizamiento *in vitro* de material juvenil

Se evaluó la capacidad de enraizamiento de brotes subapicales frente a brotes apicales en el medio OMr/OMe, seleccionado en el experimento anterior.

Como se puede apreciar en la figura 25, en un primer momento, los brotes subapicales enraizaban más rápidamente que los brotes apicales y esas diferencias fueron significativas,

pero tras 6 semanas los porcentajes se igualaron, alcanzándose el valor máximo de enraizamiento (100 %) tras ocho semanas.

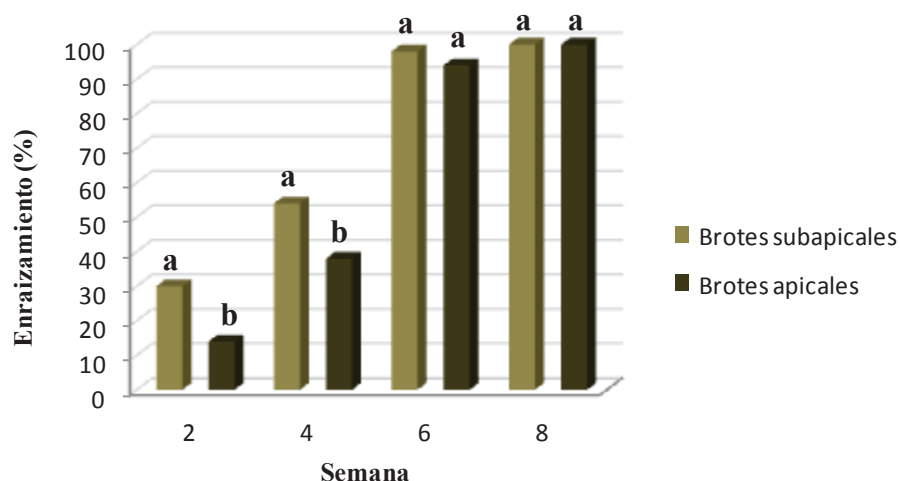


Figura 25. Efecto del tipo de explanto (brote apical vs brote subapical) sobre el enraizamiento *in vitro* de material juvenil de olivo en el medio OMr/OMe (Cañas y col., 1987).

IV.1.3.3. Experimento 3.- Enraizamiento *ex vitro* de las microestaquillas procedentes de los cultivos mantenidos en el medio de proliferación

En este experimento se utilizaron microestaquillas apicales y subapicales procedentes de stocks *in vitro* mantenidos en el medio de proliferación estándar (RV). Como control se comparó la capacidad de enraizamiento *in vitro* de este mismo material en los medios OMr/OMe (Cañas y col., 1987).

Como podemos observar en la figura 26, no se produjeron diferencias significativas en el comportamiento de las diferentes microestaquillas, observándose unos porcentajes de

enraizamiento *ex vitro* del 96,4 % y 95 % para las microestaquillas subapicales y apicales respectivamente, mientras que el correspondiente control *in vitro* mostró un porcentaje del 100 %.

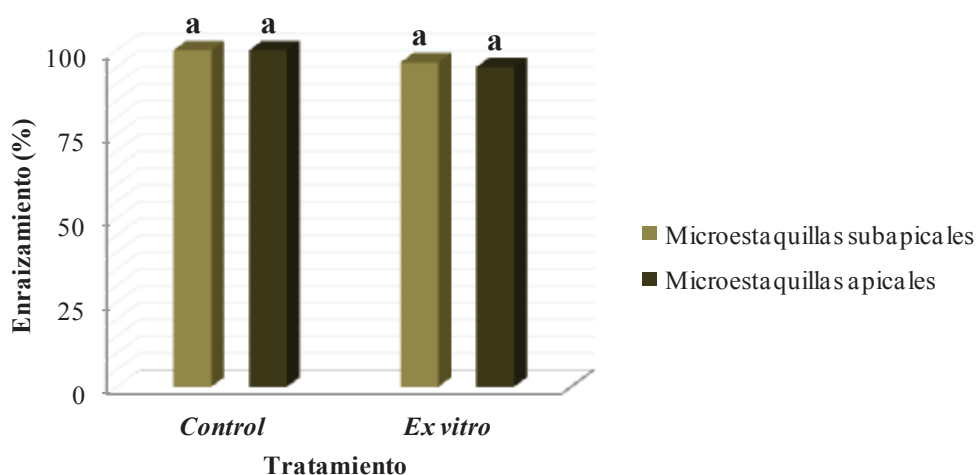


Figura 26.- Enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de material juvenil de olivo, procedentes de cultivos en medio estándar de proliferación RV (Revilla y col., 1996), tras la inmersión durante 10 seg en una solución de AIB (14,8 mM). Como control se utilizaron brotes procedentes de los mismos stocks de proliferación, enraizados *in vitro* en el medio OMr/OMe (Cañas y col., 1987). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

IV.2. MATERIAL ADULTO

IV.2.1. Micropropagación del cv. Arbequina

IV.2.1.1. Establecimiento de cultivos asépticos

IV.2.1.1.1. Experimento 1.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre sobre el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto

En la fase de establecimiento *in vitro* de los explantos, se comparó el comportamiento de secciones nodales procedentes de ramas de la copa del árbol madre antes de ser podado (explanto C), de las ramas cortadas de la copa del árbol e inducidas a brotar en invernadero (explanto R) y de los brotes emergidos de la base del tronco tras una poda severa (explanto B). Dichas secciones nodales se cultivaron en el medio RV, seleccionado como medio de inicio a partir de los experimentos con el material juvenil.

Tras 6 semanas (figura 27), no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados; así, el porcentaje de brotación se mantuvo por encima del 80 % en todos los casos; los porcentajes de necrosis fueron bajos (por debajo del 14 %) en todos los tratamientos; el número medio de brotes axilares desarrollados fue de 1,8 para los explantos procedentes de la copa y de 1,5 para los procedentes de las ramas intermedias y de los brotes basales con una longitud 0,3 - 0,8 y 0,7 cm respectivamente.

Independientemente de la procedencia del explanto, tras estas 6 semanas, la longitud de los brotes axilares era demasiado pequeña para iniciar la fase de multiplicación (figura 28), por lo que fue necesario realizar un recultivo en el mismo medio durante otras 6 semanas; de esta manera la fase de inició se prolongó hasta 12 semanas.

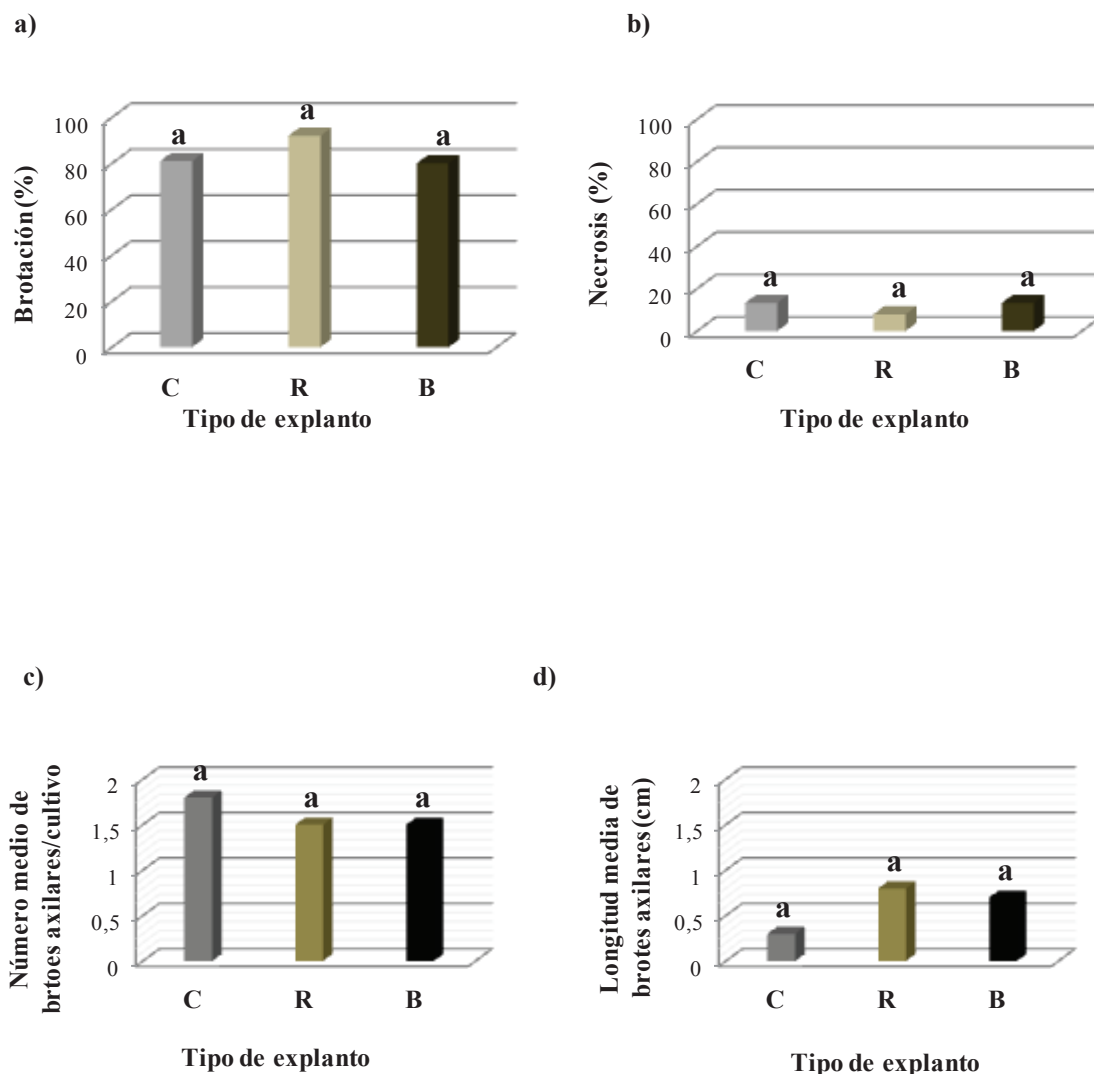


Figura 27.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo cv. Arbequina: a) porcentaje de brotación, b) porcentaje de necrosis, c) número medio de brotes axilares/cultivo y d) longitud media de brotes axilares. Datos de 6 semanas.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

C: explanto procedente de la copa.

R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias.

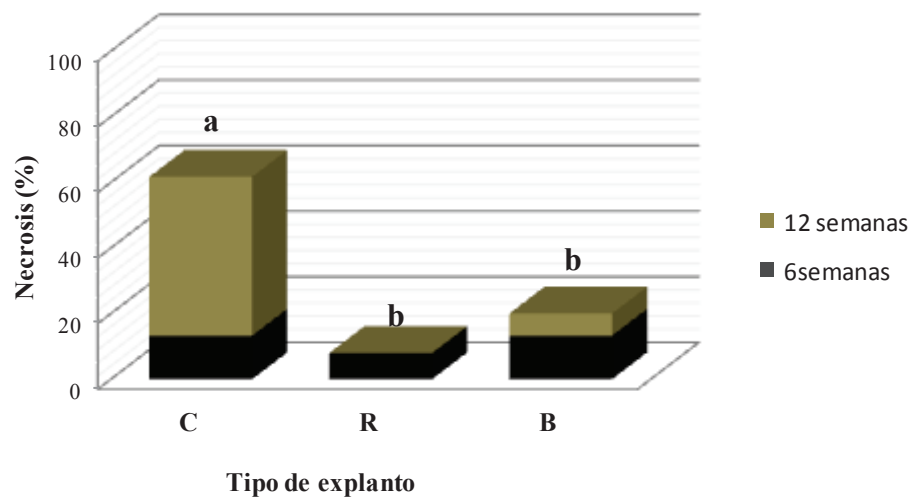
B: explanto procedente de la base del tronco.



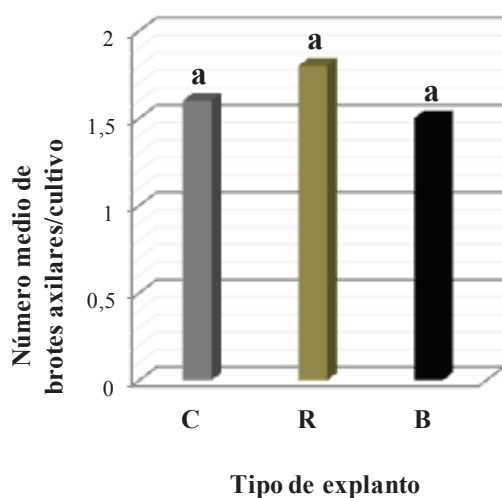
Figura 28.- Aspecto de los brotes adultos de olivo cv. Arbequina, desarrollados tras 6 semanas en el medio de inicio RV (Revilla y col., 1996).

Como podemos observar en la figura 29, tras 12 semanas sí se apreciaron diferencias significativas en el comportamiento de los distintos tipos de explanto; así, la tasa de necrosis de los cultivos provenientes de las ramas y la base se mantenía prácticamente estable (8 % -20 % respectivamente) mientras que la del material procedente de la copa se elevó desde el 13 % que se observaba tras 6 semanas hasta el 61 %, (figura 29a). No se apreciaron diferencias significativas en cuanto al número de brotes axilares/cultivo (figura 29b) pero sí en la longitud de los mismos, que fue superior para los cultivos procedentes de las ramas (2,1 cm) y de los brotes basales (1,6 cm) en relación al material de la copa (0,8 cm) (figura 29c); de esta manera se pudo iniciar la fase de multiplicación a partir de los cultivos iniciados de las ramas de la parte intermedia y de la base del tronco. El aspecto de los cultivos, tras doce semanas puede observarse en la figura 30.

a)



b)



c)

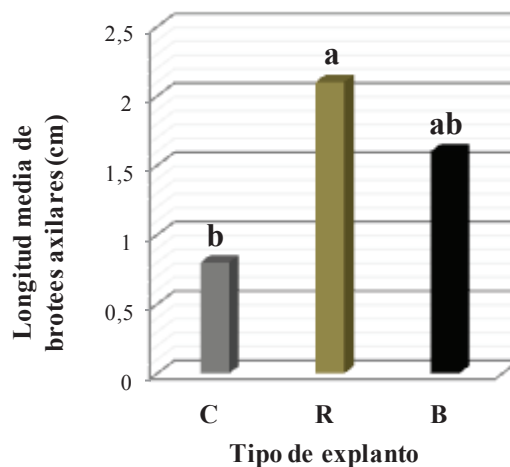


Figura 29.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo, cv. Arbequina: a) porcentaje de necrosis, b) número medio de brotes axilares/cultivo y c) longitud media de brotes axilares. Datos de 12 semanas.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

C: explanto procedente de la copa.

R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias.

B: explanto procedente de la base del tronco.

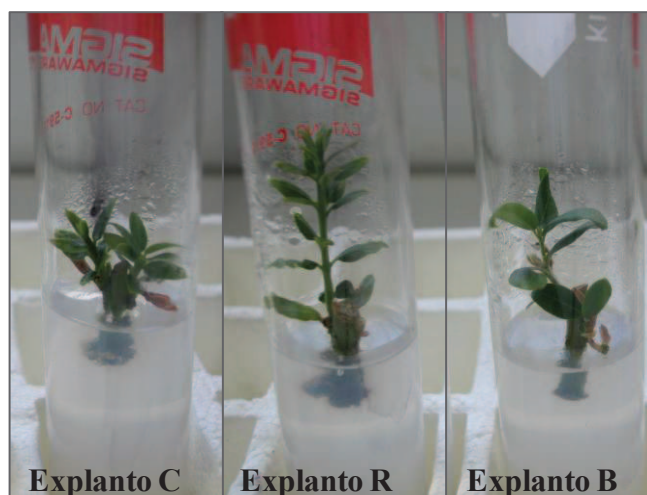


Figura 30.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo cv. Arbequina. Aspecto de los brotes desarrollados a partir de los distintos tipos de material, tras 12 semanas en el medio de inicio RV (Revilla y col., 1996).

C: explanto procedente de la copa.

R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias.

B: explanto procedente de la base del tronco.

IV.2.1.2. Fase de multiplicación

IV.2.1.2.1. Experimento1.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación *in vitro* de material adulto

Se testó el efecto de cinco medios de cultivo optimizados para otros cultivares de olivo, sobre la tasa de multiplicación de nuestro material:

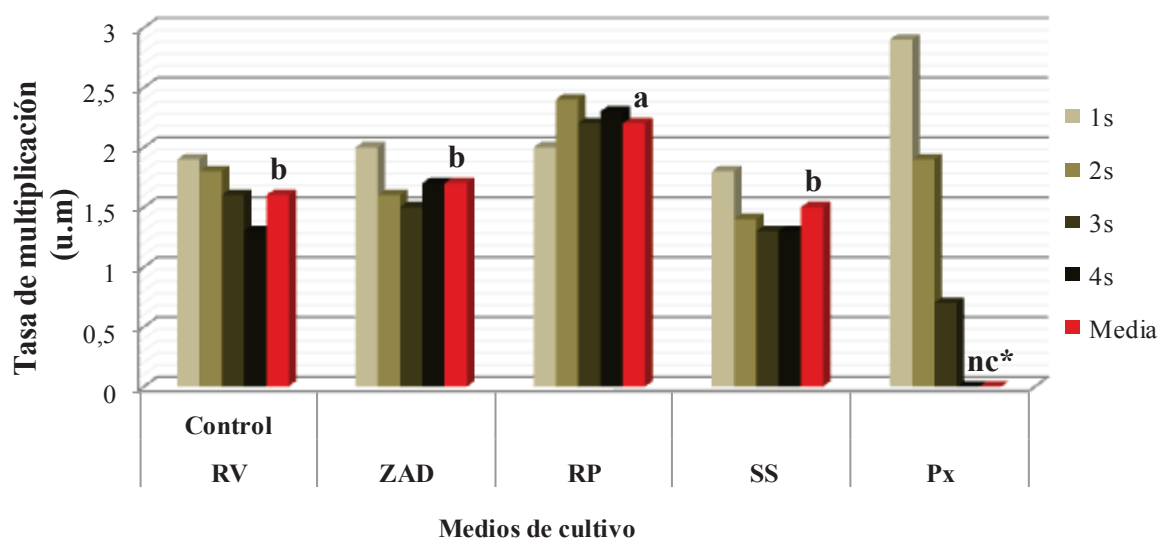
1. RV (Revilla y col., 1996)
2. ZAD (Zachini y de Agazio, 2004)
3. RP (Roussos y Pontikis, 2002)
4. SS (Sghir y col., 2005)
5. Px (Peixe y col., 2007)

El medio RV, seleccionado en los experimentos con el material juvenil fue utilizado como control. Se observaron diferencias significativas en el comportamiento de los cultivos, obteniéndose los mejores resultados en el medio RP con 2,2 u.m, frente a una tasa de multiplicación de 1,6 u.m en el medio control, 1,7 u.m en el medio ZAD y 1,5 u.m en el medio SS. Además, es de destacar que mientras en el medio RP, la tasa de multiplicación iba aumentando en el curso de los subcultivos, en el resto de los medios la tendencia fue la contraria, llegando en el caso de los medios RV y SS a valores de 1,3 u.m en el cuarto subcultivo (figura 31a). De la misma manera, no se observaron casos de necrosis de los cultivos en el medio RP, frente al 16 % observada en el medio control (RV) y 19 % en el medio SS (figura 31b).

En el medio Px las tasas de multiplicación fueron descendiendo progresivamente a lo largo de los subcultivos (2,9 u.m, 1,9 u.m y 0,7 u.m para el primero, segundo y tercero, respectivamente), también se observó una elevada tasa de contaminación bacteriana y necrosis de los cultivos, de manera que al final del periodo de experimentación todos los explantos aparecieron contaminados por bacterias (75 %) o necrosados (25 %). El aspecto que presentaron los cultivos en los distintos medios puede apreciarse en la figura 32.

El análisis de estos datos permitió la elección del medio de Roussos y Pontikis (2002) como el más adecuado para llevar a cabo la multiplicación *in vitro* del cv. Arbequina, eligiéndose desde este momento como medio estándar.

a)



b)

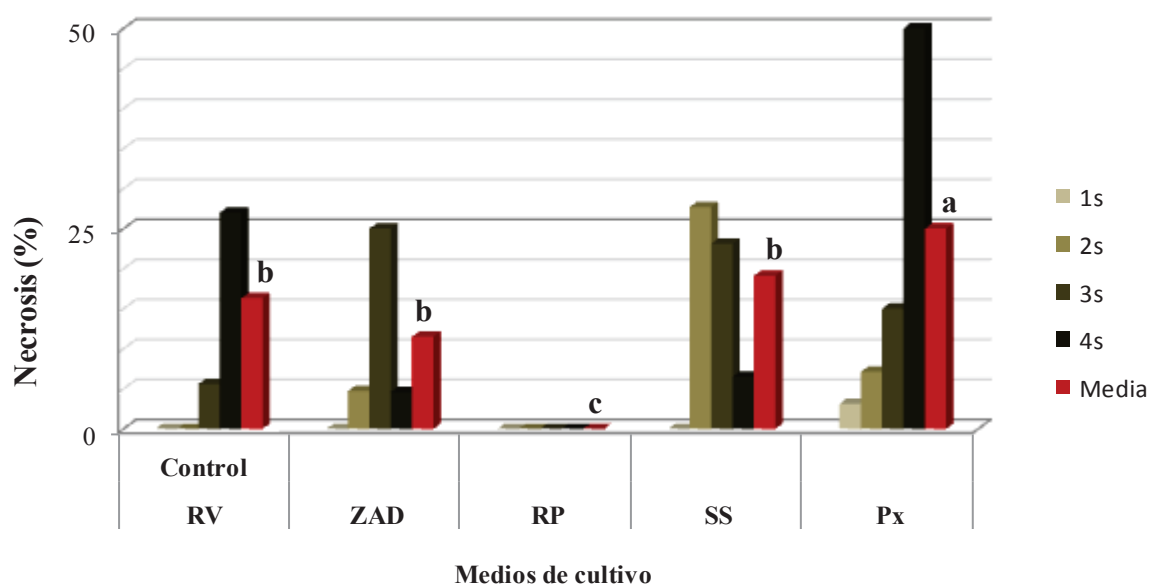


Figura 31.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Arbequina. RV (Revilla y col., 1996); ZAD (Zachini y de Agazio, 2004); RP (Roussos y Pontikis, 2002); SS (Sghir y col., 2005) y Px (Peixe y col., 2007): a) tasa media de multiplicación y b) porcentaje de necrosis. Datos de cuatro subcultivos sucesivos y media de los cuatro subcultivos.

*nc.- no contabilizado

Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

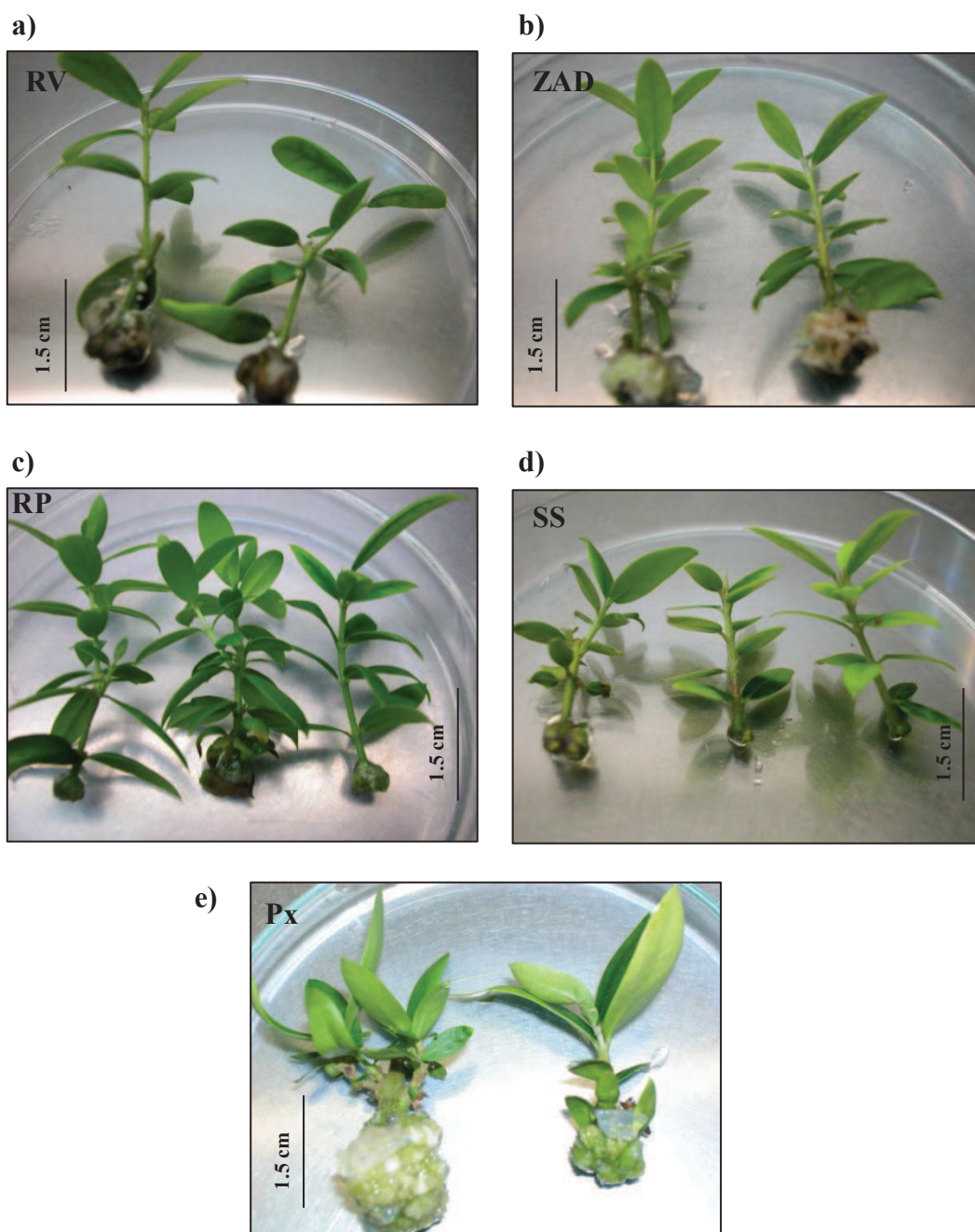


Figura 32.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Arbequina. Aspecto de los cultivos en los medios: a) RV (Revilla y col., 1996); b) ZAD (Zachini y de Agazio, 2004); c) RP (Roussos y Pontikis, 2002); d) SS (Sghir y col., 2005) y e) Px (Peixe y col., 2007).

IV.2.1.2.2. Experimento 2.- Efecto del cultivo alternado en presencia de ribósido de zeatina o tidiazurón y de la combinación de ribósido de zeatina y ácido giberélico (GA₃) en la tasa de multiplicación de material adulto

Elegido el medio RP (Roussos y Pontikis, 2002) en el experimento anterior, se planteó un nuevo experimento para conocer si el cultivo alternado en presencia de TDZ o el suplemento del medio RP con GA₃ podrían mejorar la multiplicación del material. Se analizaron los siguientes tratamientos:

- RZ (5,7 μ M), medio control RP.
- Subcultivo alternado en RZ (5,7 μ M) y TDZ (1 μ M), como proponen Roussos y Pontikis (2002).
- RZ (5,7 μ M) + GA₃ (4,33 μ M), como proponen Zacchini y de Agazio (2004).

Como se puede observar en la figura 33, la combinación de GA₃ (4,33 μ M) y RZ (5,7 μ M), aumentó de manera significativa la tasa de multiplicación media (2,5 u.m) frente al medio estándar (2 u.m), mientras que el subcultivo alternado en RZ y TDZ bajó la tasa de multiplicación a 1,7 u.m, aunque no difería estadísticamente del control. No se apreciaron casos de necrosis en ninguno de los tratamientos. En la figura 34 se puede observar el aspecto de los explantos, tras cuatro subcultivos sucesivos en los tratamientos con RZ y RZ suplementado con GA₃.

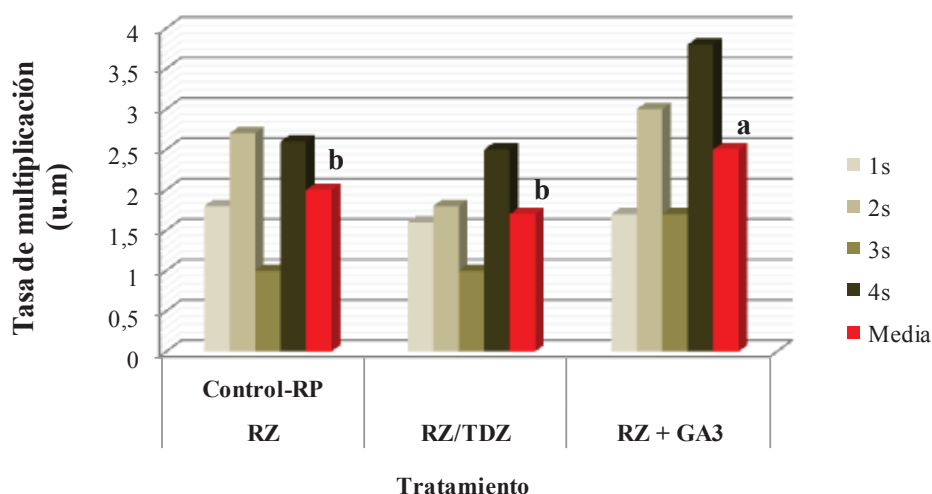


Figura 33.- Efecto del cultivo alternado en presencia de RZ o TDZ y de la combinación RZ y GA₃ en la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina.

Tratamientos: control.- medio RP estándar (5,7 μ M de RZ); RZ/TDZ.- cultivo alternado en medio RP estándar y medio basal RP con TDZ (1 μ M); RZ+GA₃.- cultivo en medio RP estándar + GA₃ (4,33 μ M). Datos de cuatro subcultivos sucesivos y media de los cuatro subcultivos. Letras distintas indican diferencias significativas (p= 0,05).



Figura 34.- Efecto del cultivo alternado en presencia de RZ o TDZ y de la combinación RZ y GA₃ en la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina. Aspecto de los cultivos en los medios RP estándar (izquierda) y RP + GA₃ (4,33 μ M) (derecha).

IV.2.1.2.3. Experimento 3.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y GA₃, sobre la tasa de multiplicación de material adulto

En el experimento anterior se observó un incremento en las tasas de multiplicación al incorporar GA₃ al medio de cultivo. En este experimento y con el objeto de abaratar el coste de los medios de cultivo, se testó el efecto, sobre la tasa de multiplicación media, de la reducción de la concentración estándar de RZ (0,0- 2,85 - 4,28 y 5,7 μ M) suplementada con dos concentraciones de GA₃ (2,17 y 4,33 μ M). Se utilizó como control el medio RP estándar, lo que haría un total de 9 tratamientos:

1. RZ (0,0 μ M) + GA₃ (2,17 μ M).
2. RZ (0,0 μ M) + GA₃ (4,33 μ M).
3. RZ (2,85 μ M)+ GA₃ (2,17 μ M).
4. RZ (2,85 μ M)+ GA₃ (4,33 μ M).
5. RZ (4,28 μ M) + GA₃ (2,17 μ M).
6. RZ (4,28 μ M) + GA₃ (4,33 μ M).
7. RZ (5,7 μ M)+ GA₃ (2,17 μ M).
8. RZ (5,7 μ M)+ GA₃ (4,33 μ M).
9. RZ (5,7 μ M), control (medio RP estándar).

Aunque no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (figura 35), la adición de GA₃ incrementó la tasa de multiplicación con respecto al medio estándar (superiores a 2 u.m y 1,9 u.m respectivamente); los mejores resultados se obtuvieron con RZ (5,7 μ M) + GA₃ (2,17 μ M) con una tasa de proliferación de 2,3 u.m. El aspecto de los cultivos en los diferentes tratamientos puede observarse en la figura 36.

Como era de esperar, la ausencia de RZ en el medio de cultivo, paralizó el crecimiento de los explantos y si bien éstos se mantenían, no se observaba ningún crecimiento durante los

cuatro subcultivos que se mantuvo el experimento (figuras 35 y 37). Resulta interesante señalar que la incorporación de GA₃ al medio de cultivo nos permitía reducir la concentración de RZ a 2,85μM (tratamientos 3 y 4), sin que se produjera una reducción significativa de la tasa de multiplicación, ya que se mantenía por encima de 2 u.m.

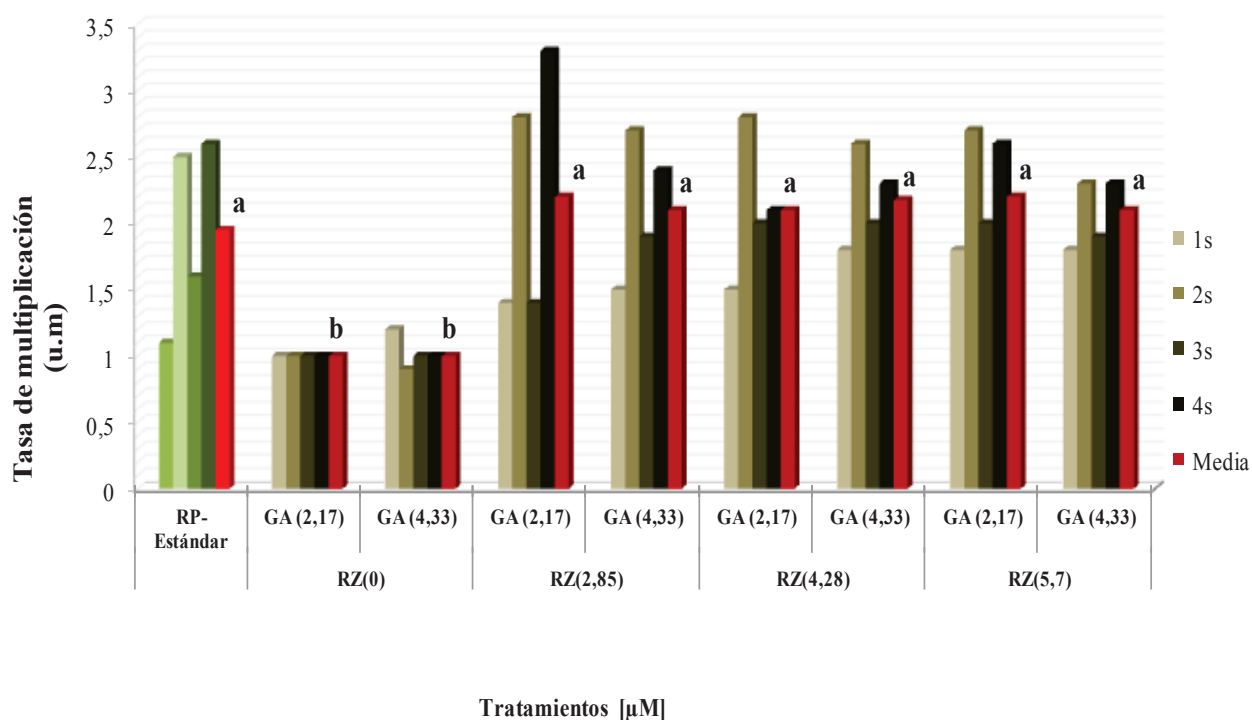


Figura 35.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y GA₃ incorporadas al medio basal RP, sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina. Datos de cuatro subcultivos sucesivos y media de los cuatro subcultivos. Control.- medio RP estándar (Roussos y Pontikis, 2002). Letras distintas indican diferencias significativas (p= 0,05).

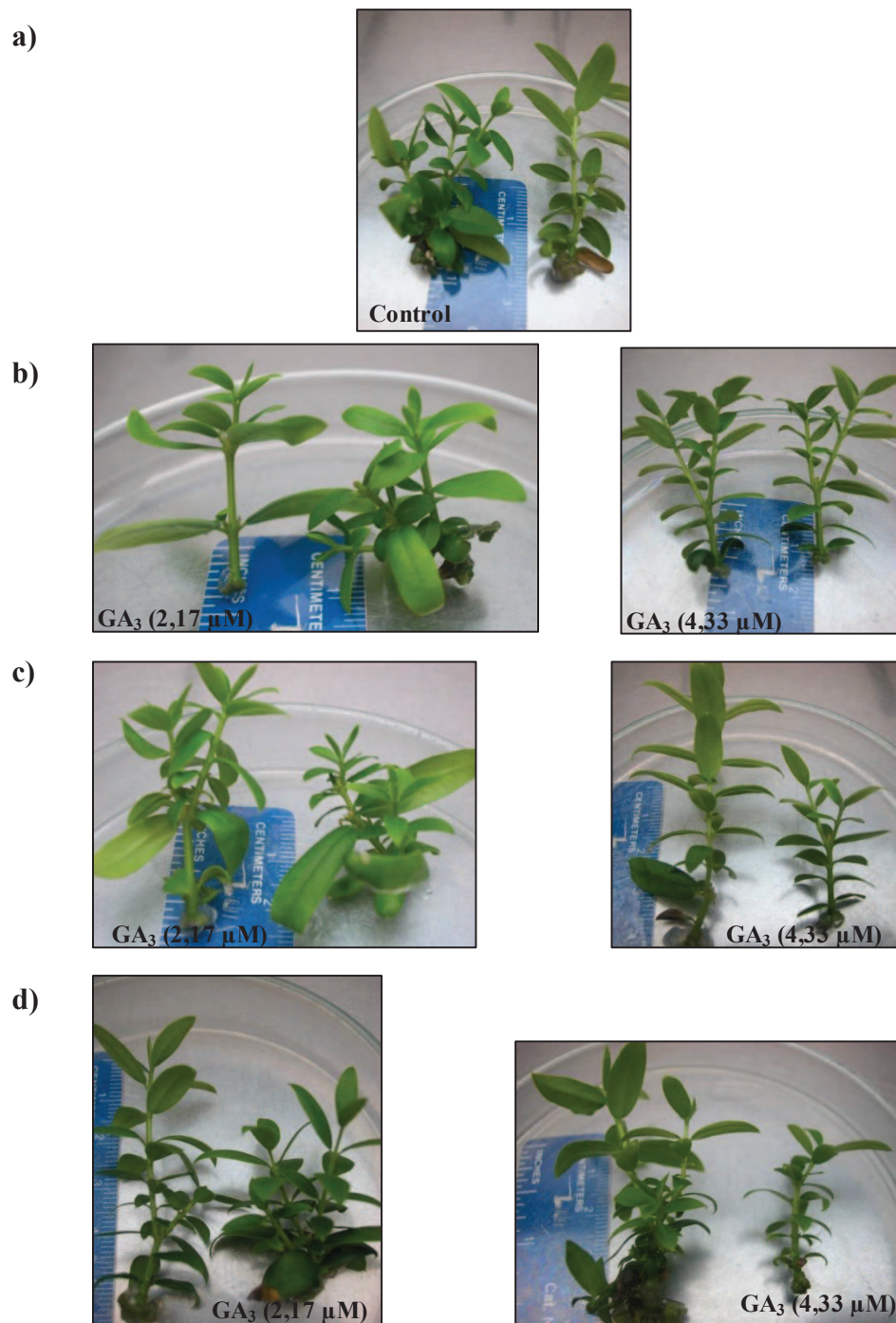
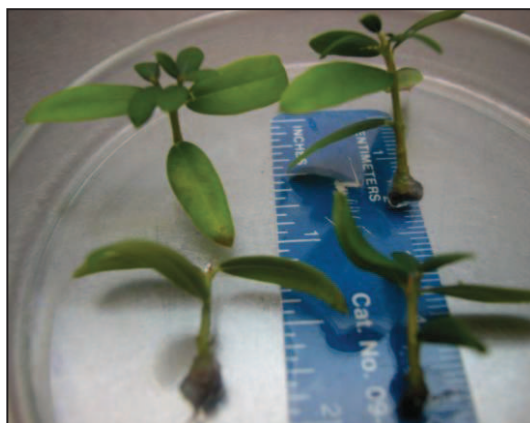


Figura 36.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y GA₃ (2,17 y 4,33 μM) incorporadas al medio basal RP, sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina. Aspecto de los cultivos en los diferentes tratamientos: a) RP-estándar; b) RZ (2,85 μM); c) RZ (4,28 μM) y d) RZ (5,7 μM).

Figura 37.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y GA_3 incorporadas al medio basal RP, sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina.. Aspecto de los cultivos con GA_3 ($4,33 \mu M$) como único regulador de crecimiento.



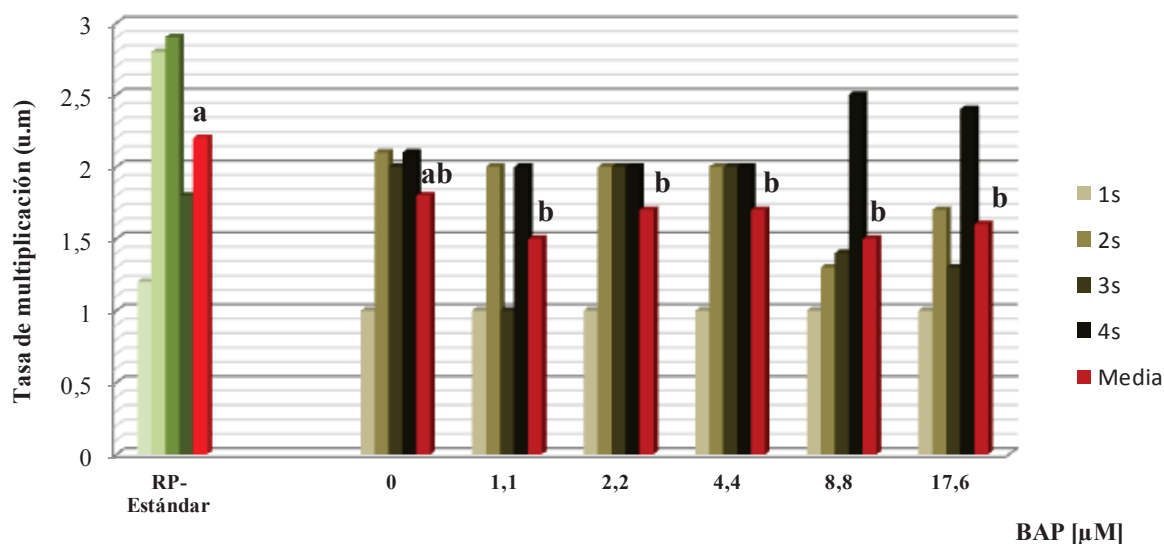
IV.2.1.2.4. Experimento 4.- Efecto de distintas concentraciones de bencilaminopurina ó tidiazurón junto con ribósido de zeatina sobre la tasa de multiplicación de material adulto

En este experimento se testó el efecto, sobre las tasas de multiplicación *in vitro*, de la reducción de la concentración de RZ a la mitad de lo propuesto por Roussos y Pontikis (2002) complementándola con diferentes concentraciones de BAP ó TDZ (0- 1,1- 2,2- 4,4- 8,8 y $17,6 \mu M$). Durante el experimento se utilizó como control el medio RP estándar.

Como podemos apreciar en la figura 38, ninguno de los tratamientos mejoró las tasas de multiplicación obtenidas con el medio estándar ($2,2 \text{ u.m}$); la reducción de la concentración de RZ ($2,85 \mu M$), sin la adición de ningún regulador más, produjo una disminución no significativa de la tasa de multiplicación hasta $1,8 \text{ u.m}$. La adición de BAP redujo de forma significativa la tasa de multiplicación del material en todas las concentraciones testadas (figura 38 a).

En cuanto al TDZ (figura 38b), solo a las concentraciones $0 \mu M$; $1,1 \mu M$ y $8,8 \mu M$ se obtuvieron resultados que no diferían estadísticamente de los obtenidos con el medio estándar, aunque inferiores en términos absolutos ($1,8$; $1,8$; $1,8$ y $2,2 \text{ u.m}$ respectivamente). Incluso a las dosis más altas de BAP y TDZ no se apreciaron casos de necrosis en los cultivos.

a)



b)

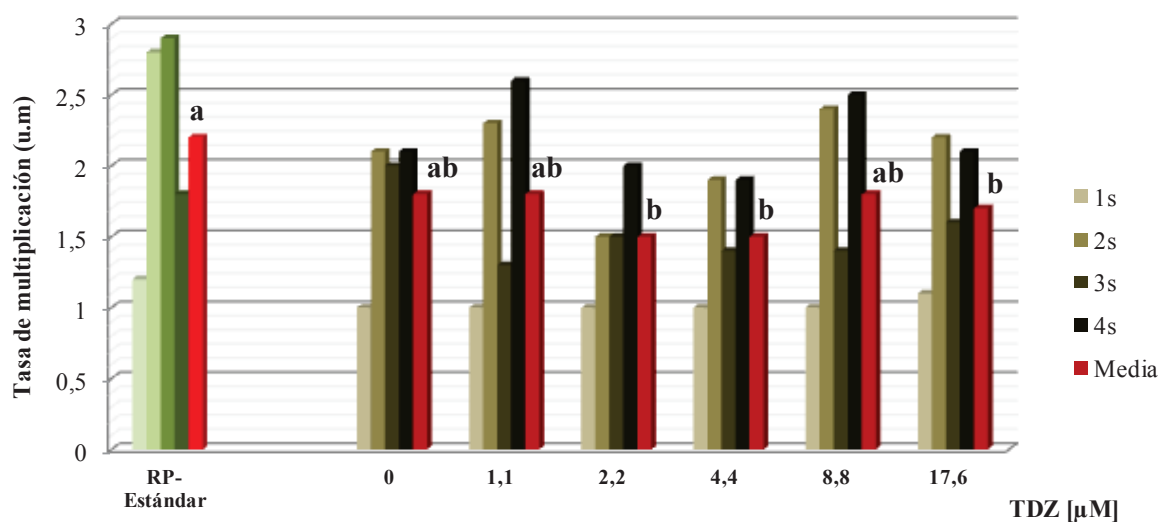


Figura 38.- Efecto de distintas concentraciones de bencilaminopurina ó tidiazurón junto con ribósido de zeatina sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo, cv. Arbequina: a) medio basal RP suplementado con RZ (2,85 μM) + BAP (0- 1,1- 2,2- 4,4- 8,8 y 17,6 μM); b) medio basal RP suplementado con RZ (2,85 μM) + TDZ (0- 1,1- 2,2- 4,4- 8,8 y 17,6 μM). Letras distintas indican diferencias significativas (p= 0,05). Control: medio RP estándar (5,7 μM RZ).

IV.2.1.2.5. Experimento 5.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y 24- epibrasinólido sobre la tasa de multiplicación de material adulto

En este experimento se testó el efecto del 24-epibrasinólido (BR) junto al RZ sobre las tasas de multiplicación *in vitro*. Se utilizaron 7 concentraciones de BR (0- 0,01- 0,03- 0,1- 0,3- 1 y 3 μM) junto con dos concentraciones de RZ (2,85 y 5,7 μM).

Los resultados se muestran en la figura 39, en la que se puede observar que las mayores tasas de multiplicación: 2,5 - 2,4 y 2,1 u.m se obtuvieron con el control (RZ a 5,7 μM), RZ (5,7 μM) + BR (0,01 μM) y RZ (2,85 μM) + BR (0,01 μM), respectivamente.

Los resultados muestran que cuando la concentración de RZ es la estándar (5,7 μM), no se observó efecto positivo de los BRs (figura 39a), de hecho, las tasas de proliferación fueron descendiendo a medida que aumentaba la concentración de BR.

Cuando la concentración de RZ se reduce a 2,85 μM (figura 39b), disminuye significativamente la tasa de multiplicación (2,5 vs. 2,0), aunque este efecto puede ser contrarrestado con la adición de BR (0,01 μM).

Respecto al resto de los tratamientos, la tasa de multiplicación se mantuvo por encima de 1,5 u.m salvo para concentraciones de BR iguales o superiores a 0,3 μM .

La mayor concentración testada de BR (3 μM) resultó tóxica, no pudiéndose mantener los cultivos tras el primer subcultivo debido a la necrosis de los mismos (100 %).

En cualquier caso, la adición de brasinólido no tuvo efecto positivo, en el rango de concentraciones testadas, sobre la tasa de multiplicación de nuestro material, de manera que los mejores resultados (2,5 u.m) se obtuvieron en el medio control.

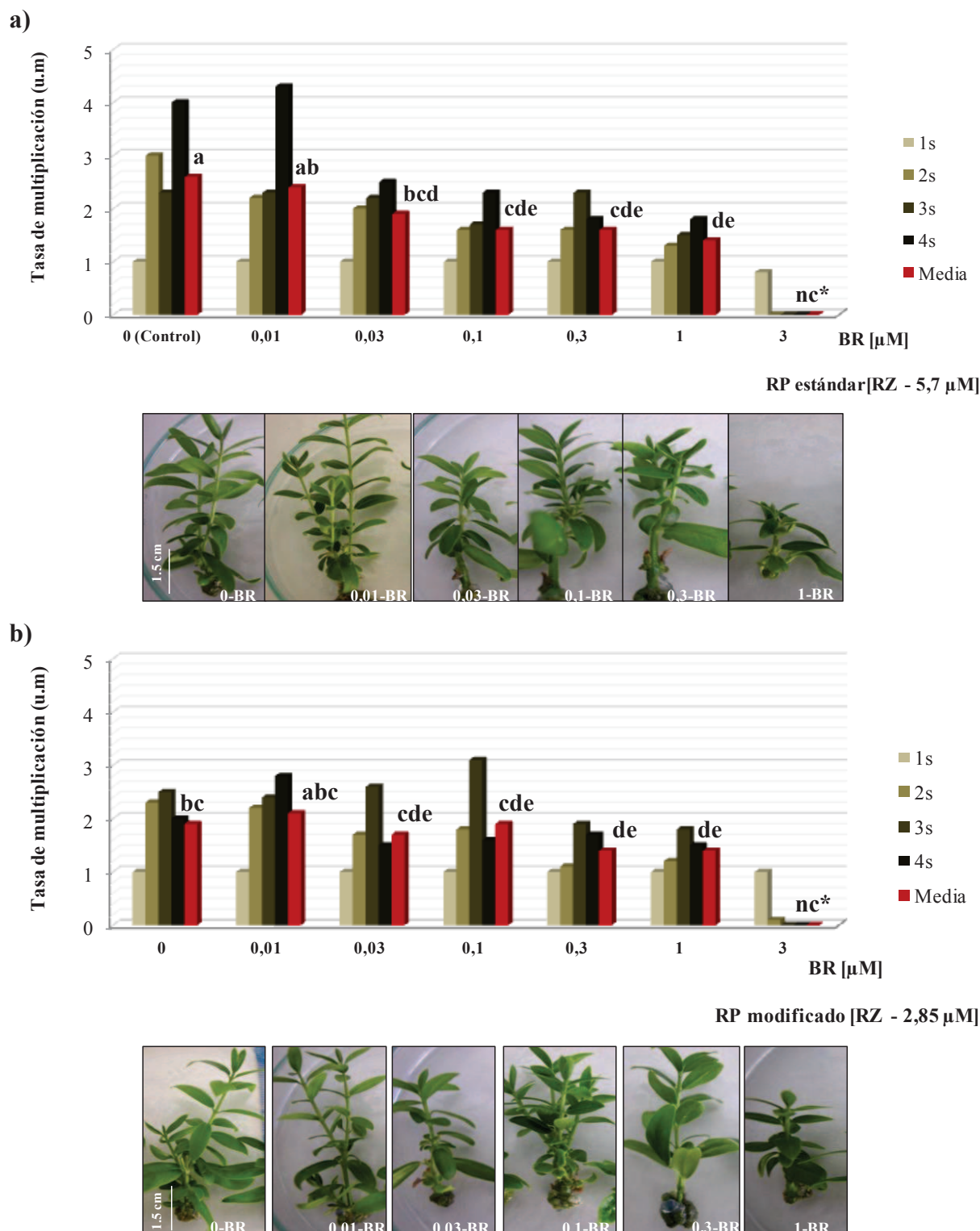


Figura 39.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y 24- epibrasinólido sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina. Tasa de multiplicación y aspecto de los cultivos en: a) medio RP estándar (RZ, 5,7μM) adicionado con varias concentraciones de BR (0- 0,01- 0,03- 0,1- 0,3- 1 y 3 μM) y b) medio RP modificado (RZ, 2,85μM) adicionado con varias concentraciones de BR (0- 0,01- 0,03- 0,1- 0,3- 1 y 3 μM).

Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). *nc.- no contabilizado.

IV.2.1.3. Fase de enraizamiento

IV.2.1.3.1. Experimento 1.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro* de material adulto

Se evaluó el comportamiento en la fase de enraizamiento, de brotes mantenidos en el medio estándar de multiplicación durante tres subcultivos sucesivos. Se obtuvieron unos porcentajes medios de enraizamiento del 71 % en el medio RVr y del 37 % en el medio OMr (figura 40). Hay que señalar que el comportamiento del material fue homogéneo en el medio RVr en el que se obtuvieron los mejores resultados, mientras que en el medio OMr las tasas de enraizamiento fueron muy variables, fluctuando entre 10 % - 70 %. Los brotes enraizados en el medio RVr presentaron 3 raíces/brote enraizado con una longitud de 2,6 cm, mientras en el medio OMr se desarrollaron 1 raíz/brote enraizado con una longitud de 4,4 cm (Tabla 11); por otra parte, en el medio RVr (figura 41 a) las raíces se formaron en la base de la estaquilla y apenas si se observa callo, en contraste con la apariencia de los brotes enraizados en el medio OMr (figura 41b) en el que se apreció una gran cantidad de callo del que emergían las raíces; por ello, se seleccionó el medio RVr para el resto de los experimentos.

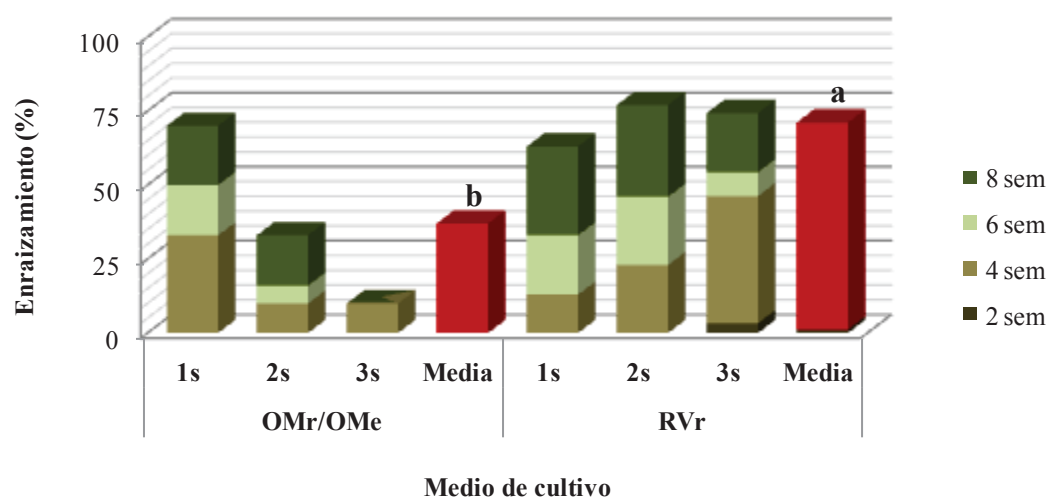


Figura 40.- Efecto de los medios RVr (Revilla y *col.*, 1996) y OMr/OMe (Cañas y *col.*, 1987) sobre el enraizamiento *in vitro* de material adulto de olivo, cv. Arbequina, durante tres subcultivos sucesivos y media de los tres subcultivos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$)

Tabla 11.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe, sobre el enraizamiento *in vitro* de material adulto de olivo, cv. Arbequina, durante tres subcultivos sucesivos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$)

Medio de enraizamiento	Nº de raíces/brote enraizado	Longitud de raíces (cm)
RVr (Revilla y <i>col.</i> , 1996)	3a	2,6 b
OMr/OMe (Cañas y <i>col.</i> , 1987)	1b	4,4 a

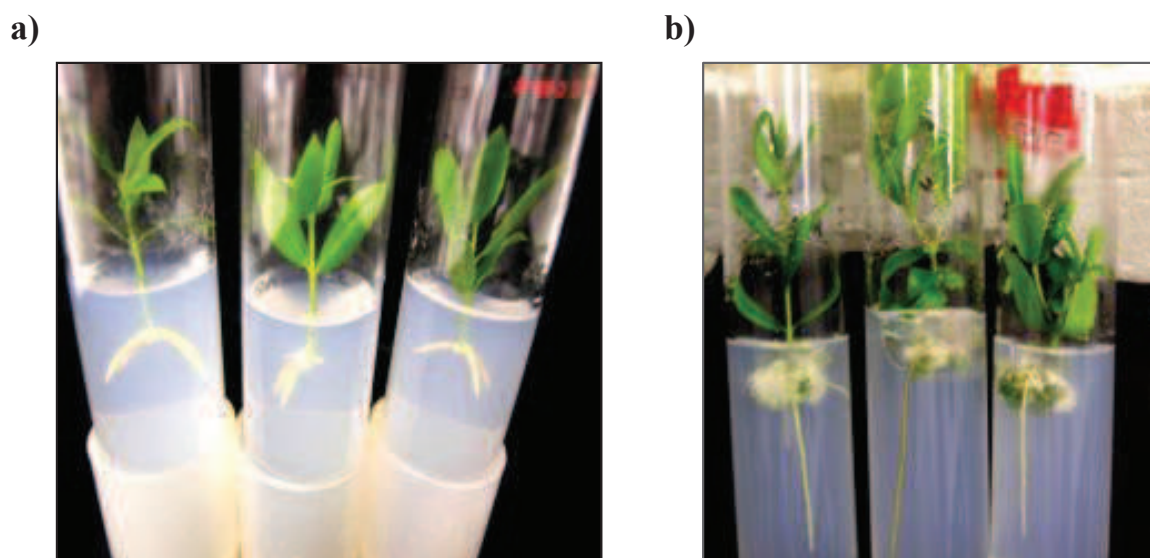


Figura 41.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro* de material adulto de olivo, cv. Arbequina. Aspecto de los cultivos tras cuatro semanas en los medios de enraizamiento: a) RVr (Revilla y col., 1996) y b) OMr/OMe (Cañas y col., 1987).

IV.2.1.3.2. Experimento 2.- Efecto de la adición de GA₃ al medio de proliferación sobre el posterior enraizamiento *in vitro* de material adulto

Puesto que la adición de GA₃ (4,33μM) al medio estándar RP produjo un aumento en las tasas de multiplicación del material, pareció lógico testar el potencial de enraizamiento en el medio RVr de los cultivos mantenidos durante 3, 4 y 5 subcultivos sucesivos en el medio con giberelinas.

No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de enraizamiento de los cultivos (figura 42) mantenidos en los medios de proliferación con y sin giberelinas (72 % y 71 % respectivamente). Tampoco se detectaron diferencias entre el número medio ni en la longitud media de las raíces desarrolladas siendo de 1 raíz/brote enraizado con una longitud

de 2,6 cm para el medio RP y de 2 raíces/brote enraizado de 3,1 cm de longitud en el medio RP con giberelinas (tabla 12).

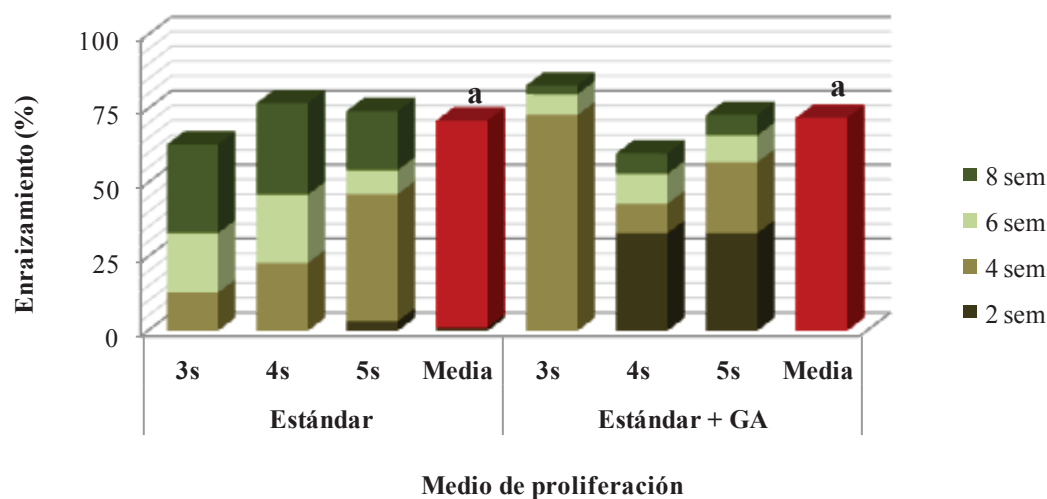


Figura 42.- Efecto de la adición de GA₃ al medio de proliferación sobre el posterior enraizamiento *in vitro*, en el medio RVr (Revilla y col., 1996), de material adulto de olivo cv. Arbequina. Porcentaje de enraizamiento tras 3, 4 y 5 subcultivos en los medios RP – estándar (Roussos y Pontikis, 2002) y RP adicionado con GA₃ (4,33 μ M). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Tabla 12.- Efecto de la adición de GA₃ al medio de proliferación sobre el enraizamiento *in vitro*, en el medio RVr (Revilla y col., 1996), de material adulto de olivo, cv. Arbequina. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Medio de proliferación	Nº de raíces/brote enraizado	Longitud de raíces (cm)
RP (estándar) (Roussos y Pontikis, 2002)	1 a	2,6 a
RP + GA ₃ (4,33 μ M)	2 a	3,1 a

IV.2.1.3.3. Experimento 3.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de ácido indolbutírico en el enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de material adulto

Como podemos observar en la figura 43a, el material de Octubre mostró buena capacidad de enraizamiento; así, en ausencia de auxina exógena se observó un porcentaje de enraizamiento de 66 %, aumentando tras la aplicación de 7,4 mM y 11,1 mM de AIB (77 % y 72 %, respectivamente), aunque estas diferencias no fueron significativas; concentraciones superiores a 14,8 mM produjeron un descenso del porcentaje de enraizamiento.

Para las estaquillas de Noviembre no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con 0- 3,7- 7,4 -11,1 y 14,8 mM de IBA, alcanzándose el mayor valor para el tratamiento 14,8 mM (77 %); concentraciones superiores produjeron un descenso significativo de los porcentajes de enraizamiento (figura 43b).

En los ensayos de Marzo (figura 43c), las estaquillas mostraron un porcentaje de enraizamiento de 16 % cuando no fueron tratadas con auxina, observándose un aumento significativo con la aplicación de 3,4 y 7,4 mM de AIB (54 % y 50 % respectivamente); concentraciones superiores no fueron capaces de aumentar significativamente estos valores.

A finales de primavera (Junio) se observó que los porcentajes de enraizamiento fueron elevados mostrándose independientes de la cantidad de auxina utilizada, siendo de 79 %- 66 %- 45 %- 83 % y 70 % para 0 mM y concentraciones crecientes de AIB respectivamente (figura 43d).

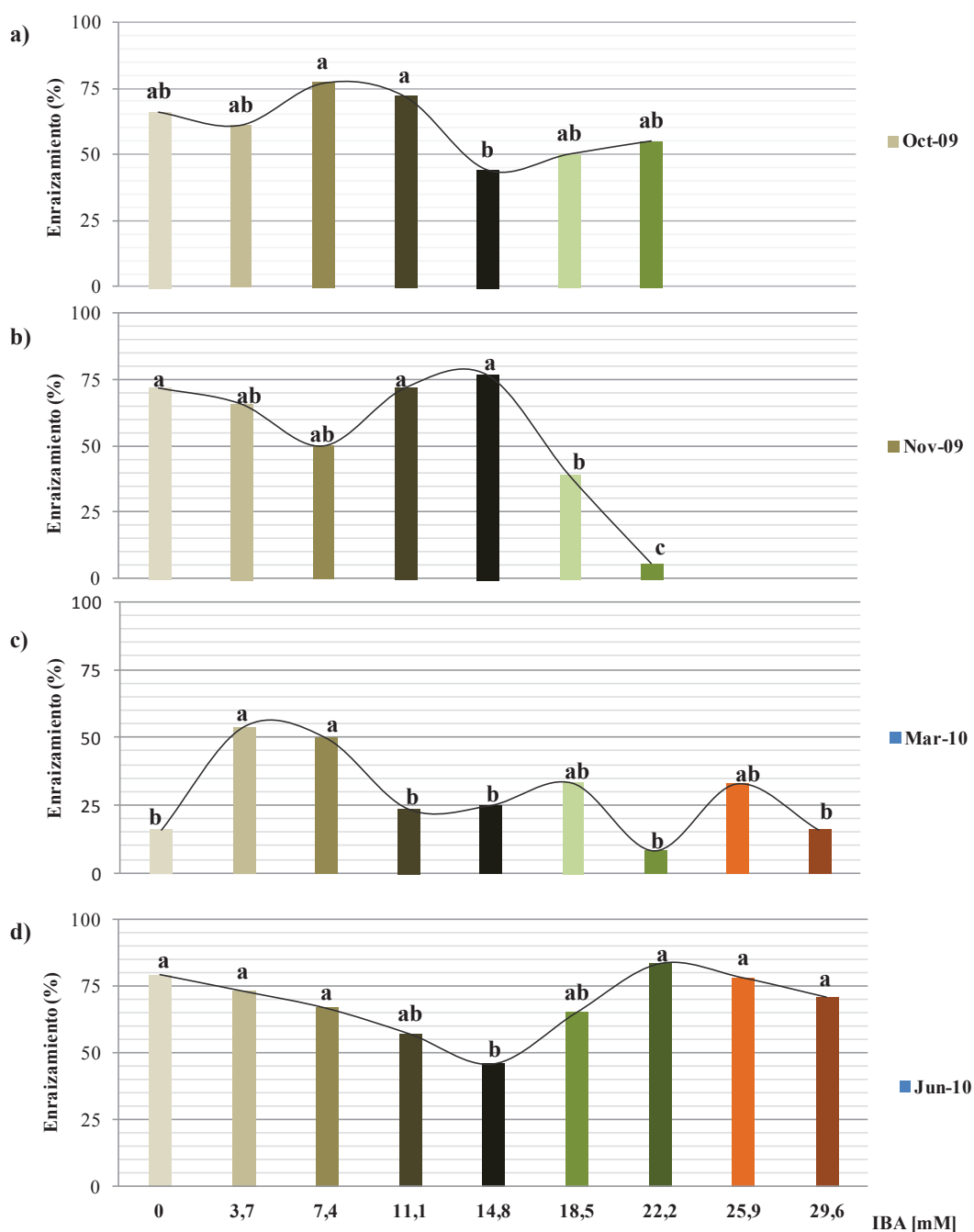


Figura 43.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de ácido indolbutírico en el enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de material adulto de olivo, cv. Arbequina: a) Octubre de 2009, b) Noviembre de 2009, c) Marzo de 2010 y d) Junio de 2010. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

IV.2.2. Micropropagación del cv. Picual

IV.2.2.1. Establecimiento de cultivos asépticos

IV.2.2.1.1. Experimento 1.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto

Tal y como se indicó para el cv. Arbequina (Apartado III.3.2.1.1.1), se llevó a cabo un estudio comparativo con los tres tipos de explantos: de la copa del árbol madre antes de ser podado (explanto C), de las ramas cortadas de la copa del árbol e inducidas a brotar en invernadero (explanto R) y de los brotes emergidos de la base del tronco tras una poda intensa (explanto B).

Tras 6 semanas (figura 44a), no se observaron diferencias significativas en la tasa de brotación, que fue superior al 67 % en todos los casos; por el contrario, sí se observaron diferencias significativas en el porcentaje de necrosis, que como puede apreciarse en la figura 44b, descendió progresivamente a la vez que lo hacía la posición del explanto en la planta madre, así se obtuvieron porcentajes del 27 %, 12 % y 0 % para el material de la copa, ramas y base del árbol respectivamente. No hubo diferencias significativas en el número medio de brotes axilares y la longitud (figuras 44c y 44d), aunque éstos valores eran mayores para el material procedente de los brotes basales (1,8 brotes axilares/explanto y 0,9 cm de longitud) que para los explantos procedentes de las ramas (1,5 brotes axilares/explanto y 0,7 cm de longitud) y de la copa (1,5 brotes axilares/explanto y 0,3 cm de longitud). Tras las primeras 6 semanas, la longitud de los brotes axilares era demasiado pequeña para iniciar la fase de multiplicación, por lo que fue necesario realizar un recultivo en el mismo medio durante otro periodo de 6 semanas; de esta manera la fase de inició se prolongó hasta 12 semanas.

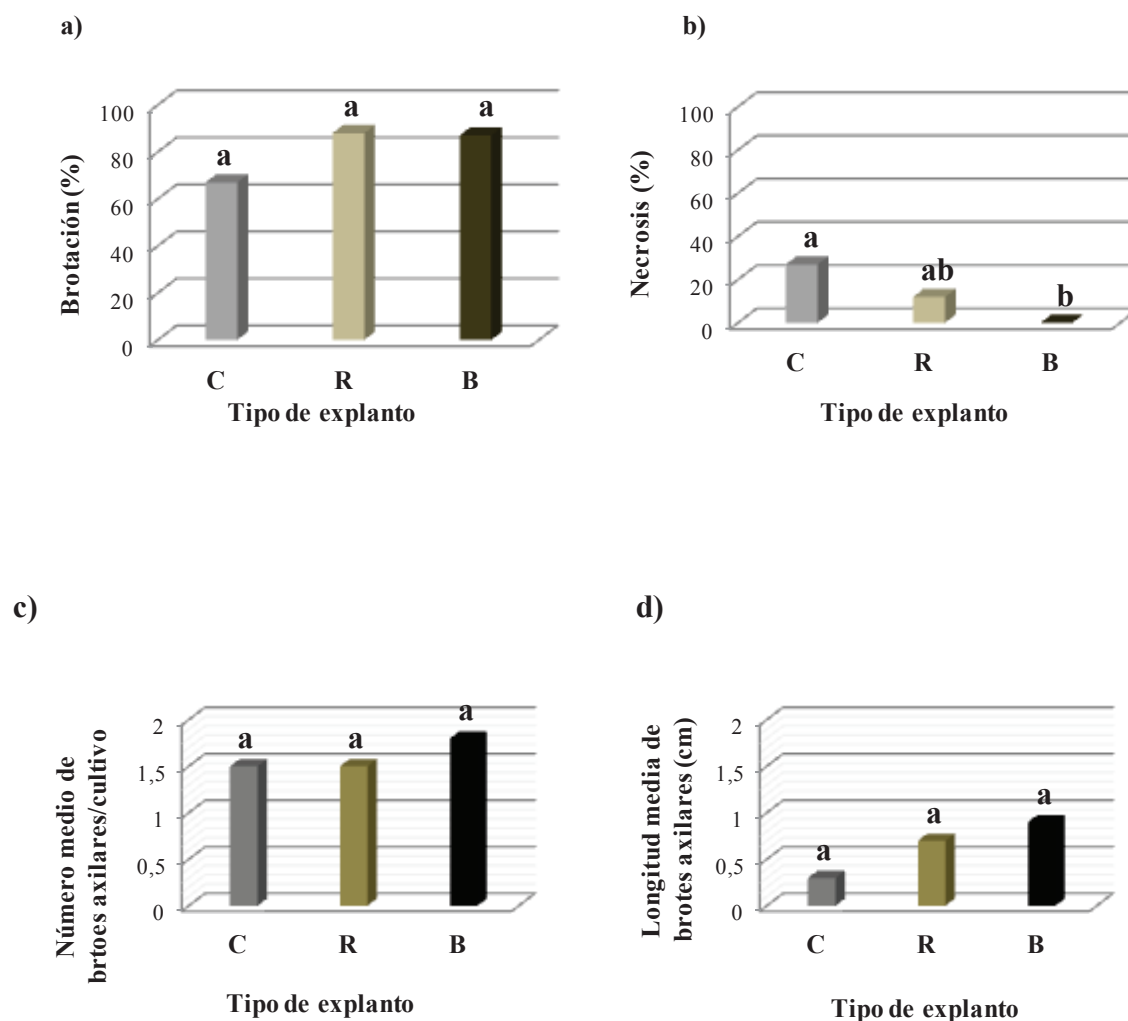


Figura 44.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo cv. Picual: a) porcentaje de brotación, b) porcentaje de necrosis, c) número medio de brotes axilares/cultivo y d) longitud media de brotes axilares. Datos de 6 semanas.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

C: explanto procedente de la copa.

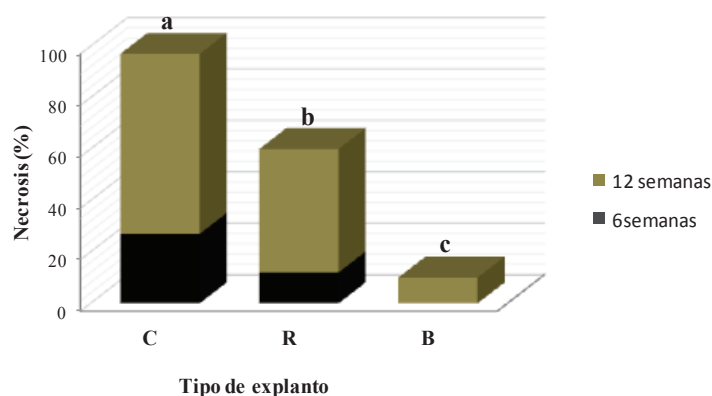
R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias.

B: explanto procedente de la base del tronco.

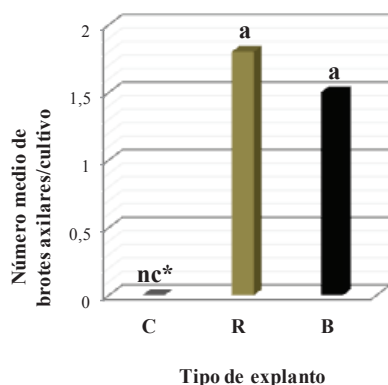
Como podemos observar en la figura 45, tras 12 semanas se observaron diferencias significativas en los porcentajes de necrosis, así todo el material procedente de la copa se necrosó (97 %), mientras que la necrosis observada para las ramas fue del 60 %; el menor

valor se obtuvo para el material procedente de la base del tronco (10 %); para estos dos últimos tipos de explantos (figuras 45b y 45c), no se observaron diferencias en cuanto al número medio de brotes axilares ni a la longitud de los mismos (1,8 y 2,1 cm; 1,5 y 2,8 cm respectivamente). El aspecto de los diferentes cultivos puede apreciarse en la figura 46.

a)



b)



c)

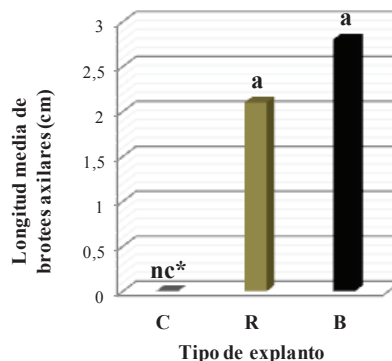


Figura 45-. Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo cv. Picual: a) porcentaje de necrosis, b) número medio de brotes axilares/cultivo y c) longitud media de brotes axilares. Datos de 12 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

C: explanto procedente de la copa.

R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias.

B: explanto procedente de la base del tronco.

* nc.- no contabilizados.

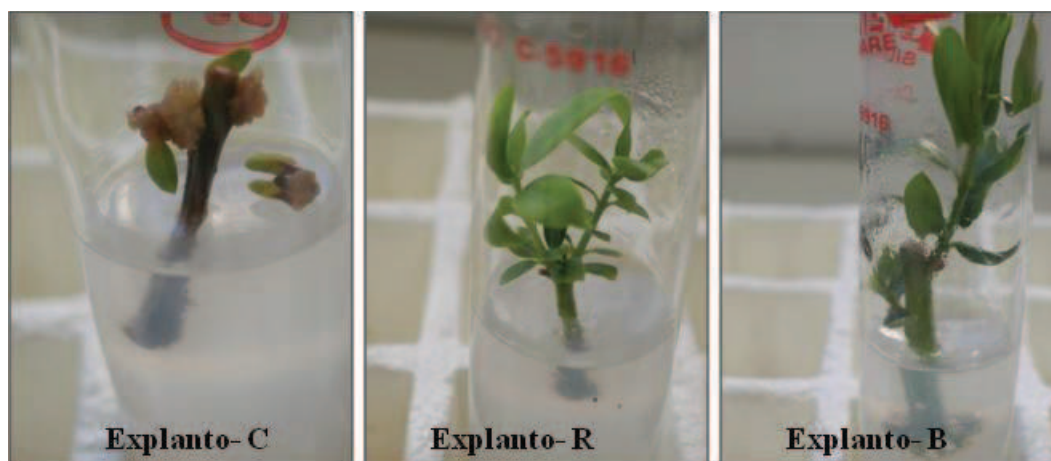


Figura 46.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo cv. Picual. Aspecto de los brotes desarrollados a partir de los distintos tipos de material tras 12 semanas en el medio de inicio.

C: explanto procedente de la copa.

R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias.

B: explanto procedente de la base del tronco

IV.2.2.2. Fase de multiplicación

IV.2.2.2.1. Experimento 1.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación *in vitro* de material adulto

Se llevó a cabo el mismo experimento que en el caso del cv. Arbequina (Apartado III.3.2.2.2.1) ensayándose el efecto de estos cinco medios en el cv. Picual.

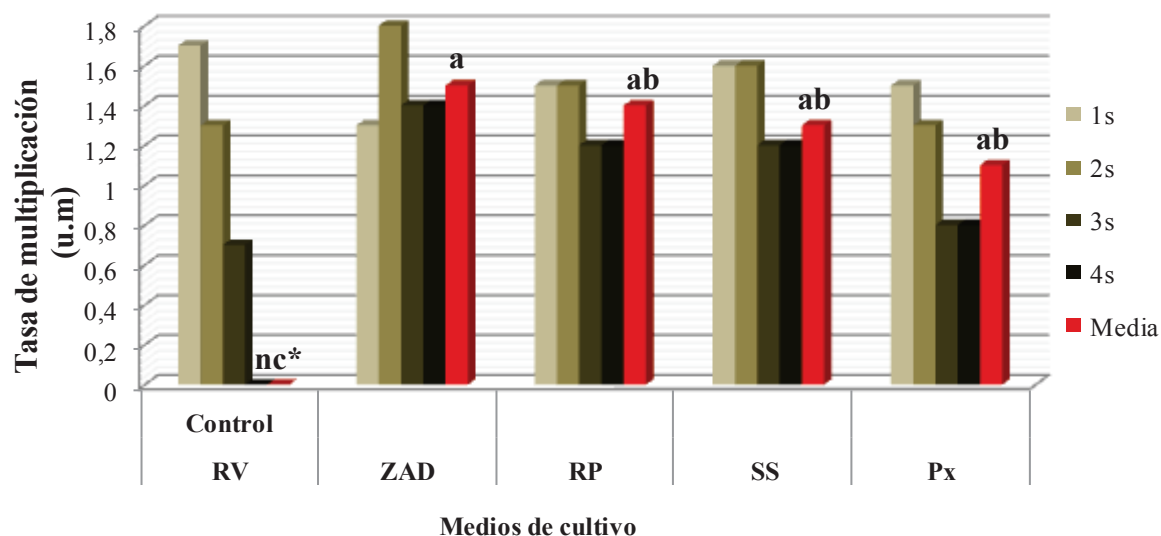
1. RV (Revilla y col., 1996).- Control
2. ZAD (Zachini y de Agazio, 2004)
3. RP (Roussos y Pontikis, 2002)
4. SS (Sghir y col., 2005)
5. Px (Peixe y col., 2007)

Como podemos apreciar en la figura 47a los mejores resultados en cuanto a la tasa de multiplicación se obtuvieron con el medio ZAD (1,5 u.m), seguido por los medios RP y SS (1,4 u.m y 1,3 u.m respectivamente); en cuanto al medio Px, aunque nos ofrecía un valor medio de multiplicación de 1,1 u.m a lo largo de los cuatro subcultivos y estadísticamente no se diferenciaba de los otros medios, hay que tener en cuenta que ésta fue decreciendo paulatinamente de manera que a partir del 2º subcultivo fue inferior a 1 (0,8 u.m). Estas tasas medias de multiplicación fueron significativamente diferentes a las observadas en el medio RV (control), en el que la reactividad de los explantos fue decreciendo a lo largo del tiempo, de manera que no fue posible mantener los cultivos.

La necrosis media observada (figura 47b) fue muy elevada y significativamente superior en el medio RV (control) (100 % en el cuarto subcultivo) que en el resto, siendo del 6 %- 8 % - 7 % y 40 % para los medios ZAD, RP, SS y Px respectivamente.

El análisis de estos datos justificó la elección de los medios ZAD (Zachini y de Agazio, 2004) y RP (Roussos y Pontikis, 2002) como los más adecuados para llevar a cabo la multiplicación *in vitro* del cv. Picual; el medio SS (Sghir y col., 2005) se descartó porque a pesar de incluir una mayor concentración de RZ (13,6 µM) que el medio RP, no aumentaron las tasas de multiplicación. El aspecto que presentaron los cultivos, en los distintos medios puede apreciarse en la figura 48.

a)



b)

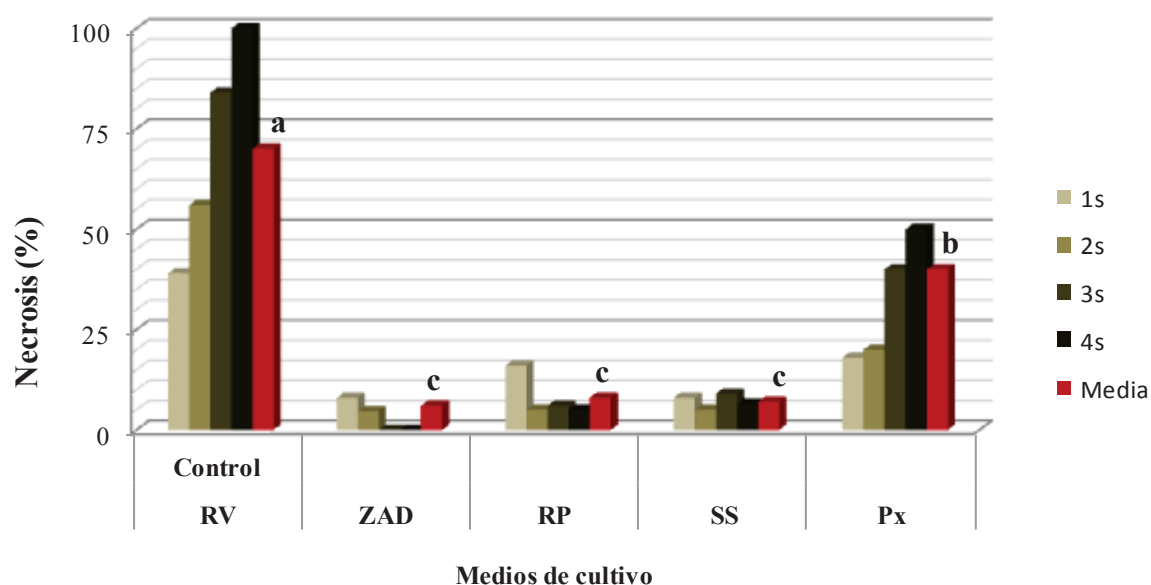


Figura 47.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Picual. RV (Revilla y col., 1996); ZAD (Zachini y de Agazio, 2004); RP (Roussos y Pontikis, 2002); SS (Sghir y col., 2005) y Px (Peixe y col., 2007): a) tasa media de multiplicación y b) porcentaje de necrosis. Datos de cuatro subcultivos sucesivos y media de los cuatro subcultivos.

*nc.- no contabilizado

Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

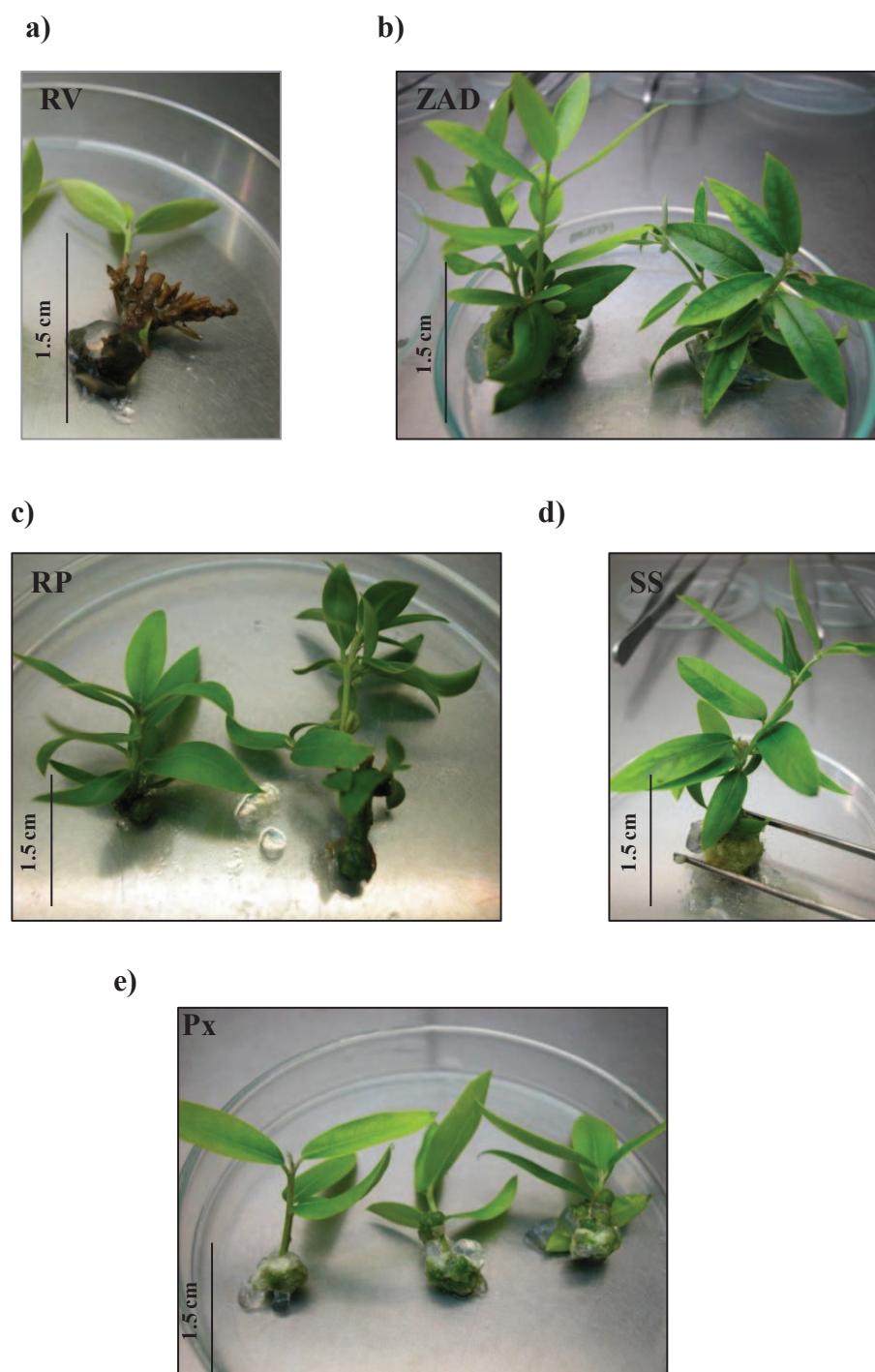


Figura 48.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Picual. Aspecto de los cultivos en los medios: a) RV (Revilla y col., 1996); b) ZAD (Zachini y de Agazio, 2004); c) RP (Roussos y Pontikis, 2002); d) SS (Sghir y col., 2005) y e) Px (Peixe y col., 2007).

IV.2.2.2.2. Experimento 2.- Efecto de las combinaciones entre formulaciones basales y suplementos hormonales de los medios RP y ZAD, sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de material adulto

Dado que en el experimento anterior se seleccionaron los medios RP y ZAD, se llevó a cabo un nuevo experimento con estos dos medios y en el que además se combinaron medios basales y concentraciones hormonales; así, se ensayaron 4 tratamientos:

- Medio ZAD estándar (Zachini y de Agazio, 2004).
- Medio basal ZAD con la combinación hormonal de Roussos y Pontikis (2002).
- Medio basal RP con la combinación hormonal de Zachini y de Agazio (2004).
- Medio RP estándar (Roussos y Pontikis, 2002).

Como podemos observar en la figura 49, se obtuvieron diferencias significativas en las tasas de multiplicación, obteniéndose los mejores resultados con el medio RP estándar (1,5 u.m); la adición de Z (13,68 μ M) + GA₃ (4,33 μ M) + AIB (0,49 μ M) al medio basal RP produjo un descenso, no significativo, de las tasas de multiplicación a 1,3 u.m.

Las hormonas añadidas al medio basal ZAD no afectaron a la tasa de multiplicación media de los cultivos, siendo en ambos casos de 1,2 u.m; sin embargo, habría que resaltar que en el medio ZAD estándar, las tasas de multiplicación fueron disminuyendo en el curso de los subcultivos y previsiblemente, a la vista de la evolución en la figura 49, no sería posible el mantenimiento de los cultivos en este medio; con la utilización de RZ como único regulador de crecimiento los cultivos se estabilizaron, de manera que a partir del segundo subcultivo, se mantenían aunque apenas se observaba crecimiento.

A la vista de los resultados obtenidos, parece que el medio RP era más adecuado para la multiplicación que el medio ZAD, ya que existían diferencias significativas en las tasas de multiplicación obtenidas en ambos medios independientemente de la combinación hormonal

utilizada, seleccionándose a partir de este momento el medio RP como estándar para la multiplicación de este cultivar. El aspecto de los cultivos en los diferentes medios puede observarse en la figura 50.

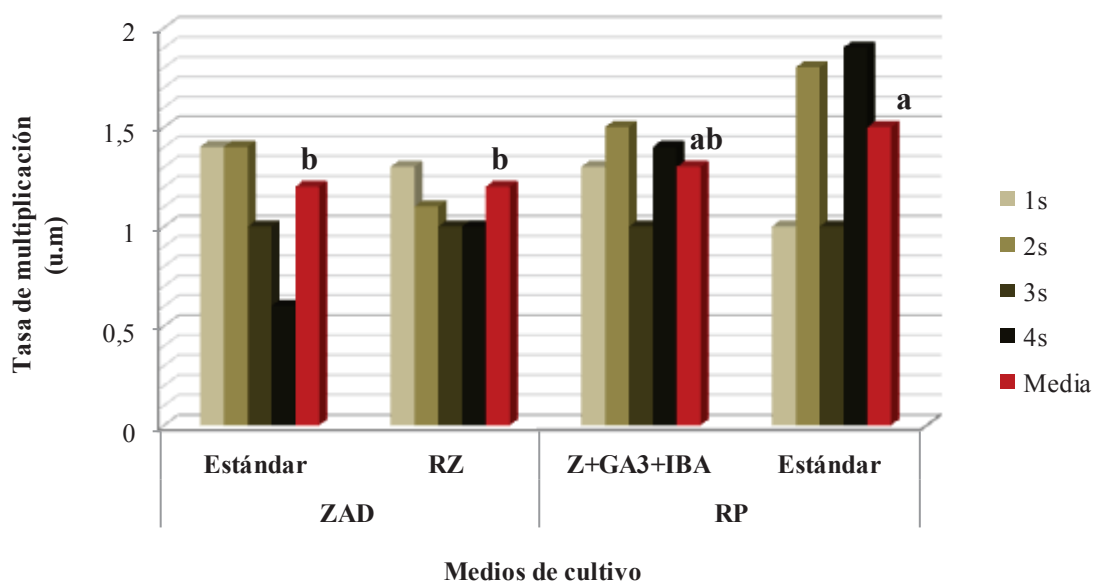


Figura 49.- Efecto de las combinaciones entre formulaciones basales y suplementos hormonales de los medios RP (Roussos y Pontikis, 2002) y ZAD (Zachini y de Agazio, 2004) sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo, cv. Picual. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

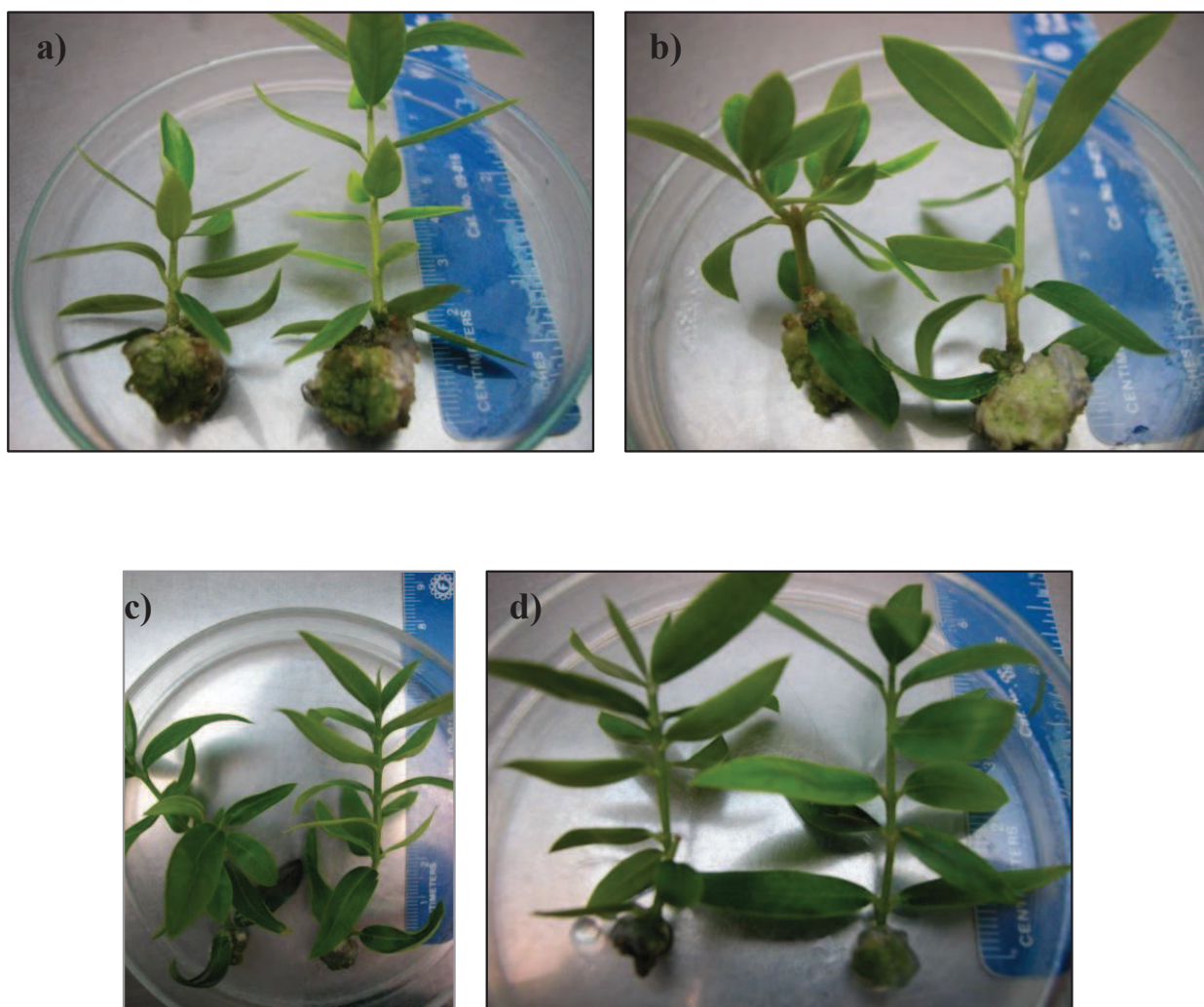


Figura 50.- Efecto de las combinaciones entre formulaciones basales y suplementos hormonales de los medios RP (Roussos y Pontikis, 2002) y ZAD (Zachini y de Agazio, 2004) sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo, cv. Picual. Aspecto de los cultivos en los distintos tratamientos:

- a) ZAD + Z ($13,68\mu\text{M}$) + GA_3 ($4,33\mu\text{M}$) + AIB ($0,49\mu\text{M}$) (Zachini y de Agazio, 2004),
- b) ZAD + RZ ($5,7\mu\text{M}$),
- c) RP + Z ($13,68\mu\text{M}$) + GA_3 ($4,33\mu\text{M}$) + AIB ($0,49\mu\text{M}$) y
- d) RP + RZ ($5,7\mu\text{M}$) (Roussos y Pontikis, 2002).

IV.2.2.2.3. Experimento 3.- Efecto de ribósido de zeatina con GA₃ sobre la tasa de multiplicación de material adulto

Como vimos en el experimento anterior, el medio RP se seleccionó para el mantenimiento de los stocks del cv. Picual; sin embargo, las tasas de multiplicación obtenidas, no fueron demasiado elevadas. Teniendo en cuenta el efecto positivo en las tasas de multiplicación del cv. Arbequina con la adición de GA₃ (ver apartado IV.2.1.2.3.), testamos si esta hormona podría también provocar la misma respuesta en el cv. Picual; para ello añadimos GA₃ (4,33 μM) al medio estándar RP.

No se obtuvieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, observándose una tasa media de multiplicación de 1,5 u.m en ambos casos (figura 51); sin embargo, a partir del cuarto subcultivo se observó un ligero aumento de la tasa de multiplicación en el medio con GA₃ (2,1 u.m) frente al medio estándar (1,9 u.m).

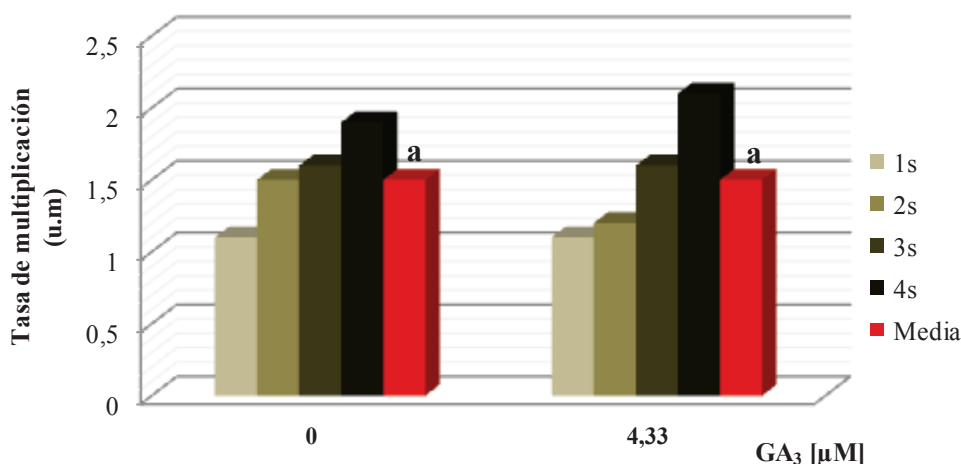


Figura 51- Efecto de la incorporación de GA₃ (4,33 μM) al medio estándar RP (Roussos y Pontikis, 2002), sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Picual. Tasa de multiplicación durante cuatro subcultivos sucesivos y media de los cuatro subcultivos. Letras distintas indican diferencias significativas (p= 0,05).

IV.2.2.2.4. Experimento 4.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina, en medio de doble fase, sobre la tasa de multiplicación de material adulto

Como podemos observar en la figura 52, el cultivo en medio de DF produjo un aumento significativo de las tasas de multiplicación, de hecho en el medio sólido RP estándar se produjeron 1,6 u.m, mientras que en los tratamientos en medio de DF fueron superiores a 1,8 u.m

Cuando la concentración de RZ en la fase sólida fue la estándar ($5,7\mu\text{M}$), no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, obteniéndose los mejores resultados (2,2 u.m) con RZ ($0,285\mu\text{M}$) en la fase líquida. Por el contrario, sí se obtuvieron diferencias significativas cuando la concentración de RZ de la fase sólida fue de $2,58\mu\text{M}$, observándose la mayor tasa media de multiplicación (2,3 u.m) con RZ ($0,85\mu\text{M}$) en el medio líquido. Por tanto, el cultivo de los explantos en medio RP de DF permite reducir la concentración de RZ a la mitad de la estándar, produciéndose además un aumento significativo de las tasas de multiplicación de este cultivar. El aspecto que presentaron los cultivos puede apreciarse en la figura 53.

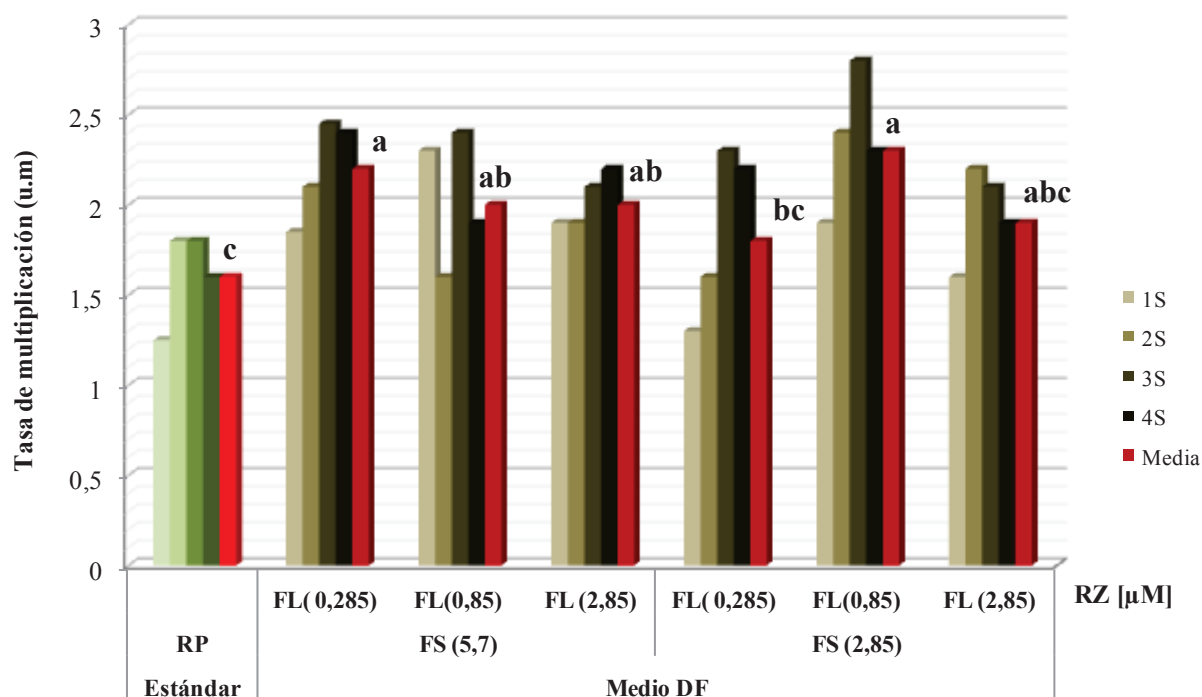


Figura 52.- Efecto de distintas concentraciones de RZ, en medio basal RP de doble fase, sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Picual.
 FS.- medio sólido RP (estándar [RZ - 5,7 μ M] y modificado [RZ - 2,85 μ M]).
 FL.- medio basal RP líquido y diferentes concentraciones de RZ [0,285 – 0,85 y 2,85 μ M]
 Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,05$).

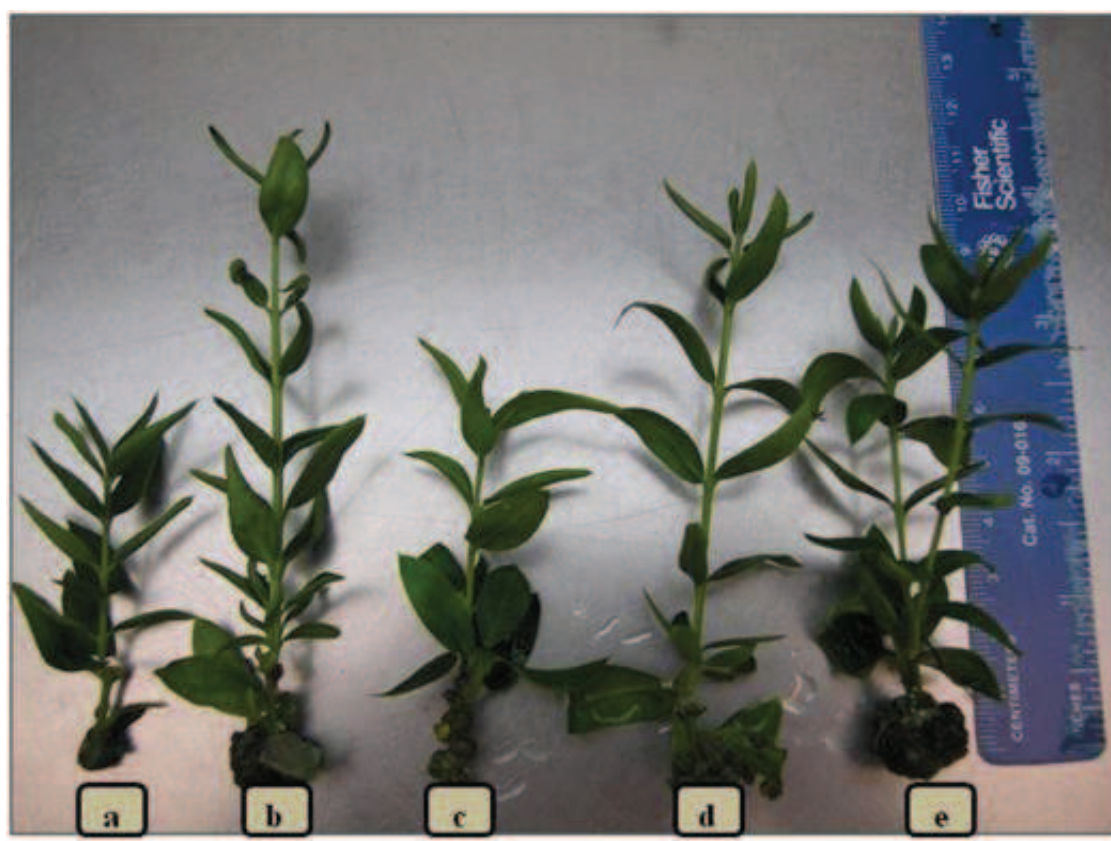


Figura 53.- Efecto de distintas concentraciones de RZ, en medio basal RP de doble fase, sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Picual.

- a) medio estándar RP (Roussos y Pontikis, 2002).
- b) fase líquida RZ ($0,285\mu\text{M}$)/fase sólida RP estándar (RZ - $5,7\mu\text{M}$)
- c) fase líquida RZ ($0,285\mu\text{M}$)/fase sólida RP modificado (RZ - $2,85\mu\text{M}$)
- d) fase líquida RZ ($0,85\mu\text{M}$)/ fase sólida RP modificado (RZ - $2,85\mu\text{M}$)
- e) fase líquida RZ ($2,85\mu\text{M}$)/ fase sólida RP modificado (RZ - $2,85\mu\text{M}$).

IV.2.2.3. Fase de enraizamiento

IV.2.2.3.1. Experimento 1.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro* de material adulto

Se evaluó el comportamiento en la fase de enraizamiento de brotes mantenidos en el medio estándar de multiplicación durante tres subcultivos sucesivos. Se obtuvieron unos porcentajes medios de enraizamiento del 37 % en el medio RVr y del 60 % en el medio OMr (figura 54). El comportamiento del material fue homogéneo en el medio OMr (56 % - 67 % - 56 %) en el que se obtuvieron los mejores resultados, mientras que en el medio RVr las tasas de enraizamiento fueron muy variables, aunque se observó un aumento desde el 10 % al 70 % para el primer y tercer subcultivo respectivamente.

Los brotes enraizados en el medio RVr presentaron una media de 2 raíces/brote con una longitud de 1 cm, mientras en el medio OMr se desarrollaron 3 raíces/brote con una longitud de 4,6 cm (tabla 13).

El aspecto de los brotes enraizados en el medio OMr se recoge en la figura 55.

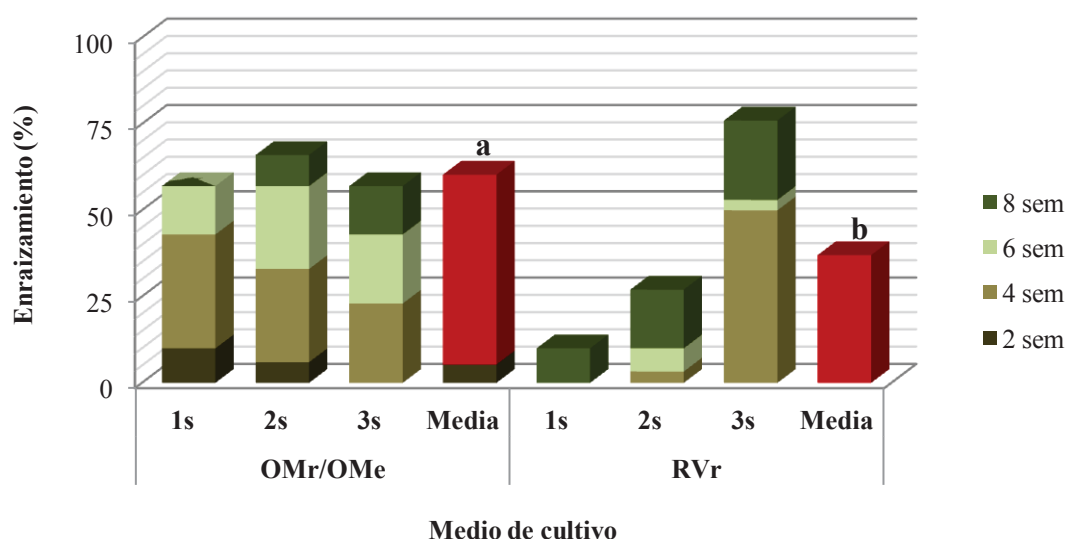


Figura 54.- Efecto de los medios RVr (Revilla *y col.*, 1996) y OMr/OMe (Cañas *y col.*, 1987) sobre el enraizamiento *in vitro*, de brotes apicales de material adulto de olivo cv. Picual, durante tres subcultivos sucesivos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Tabla 13.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro*, de material adulto de olivo, cv. Picual. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Medio de enraizamiento	Nº de raíces/brote enraizado	Longitud de raíces (cm)
RVr (Revilla y col., 1996)	2a	1b
OMr/OMe (Cañas y col., 1987)	3a	4,6a

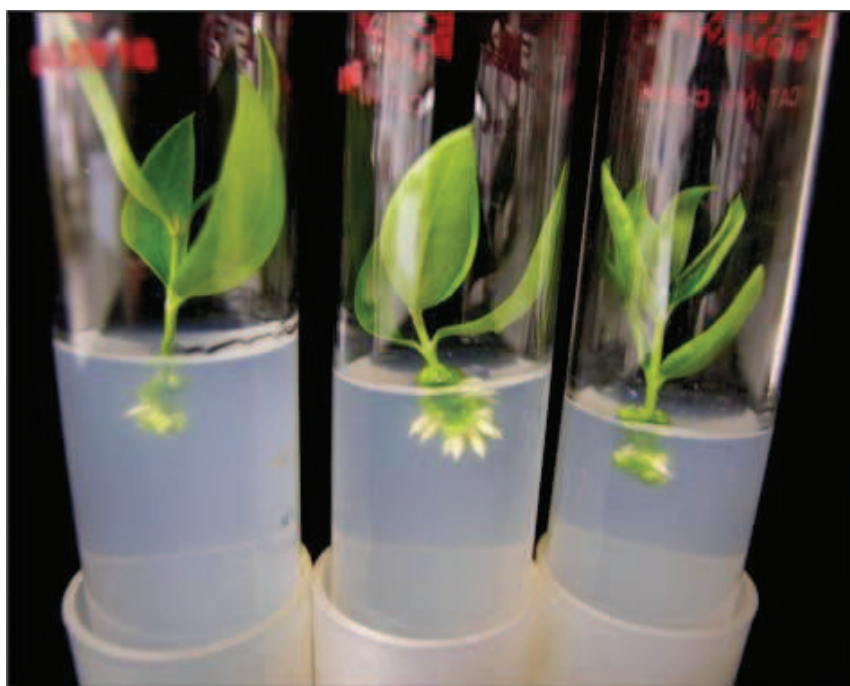


Figura 55.- Efecto de los medios RVr (Revilla y col., 1996) y OMr/OMe (Cañas y col., 1987) sobre el enraizamiento *in vitro*, de brotes apicales de material adulto de olivo cv. Picual. Aspecto de los brotes tras dos semanas en el medio de enraizamiento OMr/OMe.

IV.2.2.3.2. Experimento 2.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de ácido indolbutírico en el enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de material adulto

Como podemos observar en la figura 56a, en ausencia de auxina exógena, el porcentaje de enraizamiento en Octubre fue de 61%; el tratamiento con AIB produjo respuestas significativamente diferentes, así para concentraciones entre 3,7 mM y 14,8 mM se produjo un descenso significativo del porcentaje de enraizamiento (39 % y 33% respectivamente) mientras que concentraciones superiores a 14,8 mM produjeron un aumento significativo del porcentaje hasta el 83 %, cuando se utilizaron 22,2 mM de AIB.

En los ensayos de Noviembre, se observó un efecto positivo de los tratamientos con auxina, observándose el mayor porcentaje de enraizamiento cuando las microestaquillas eran tratadas con 14,8 mM de AIB (93%) frente al 61 % observado cuando no se utilizó auxina (figura 56b).

El material de Marzo (figura 56c) presentó un comportamiento errático, así sólo a concentraciones de 3,7 mM y de 25,9 mM de AIB se observó un aumento del porcentaje de enraizamiento frente al obtenido en ausencia de auxina (54 %- 58 % y 46 % respectivamente).

Para las estaquillas de Junio (figura 56d) se observó un aumento significativo del porcentaje de enraizamiento en todos los tratamientos con auxina frente al control (38 %), alcanzándose valores del 100 % cuando la concentración de AIB fue de 25,9 mM.

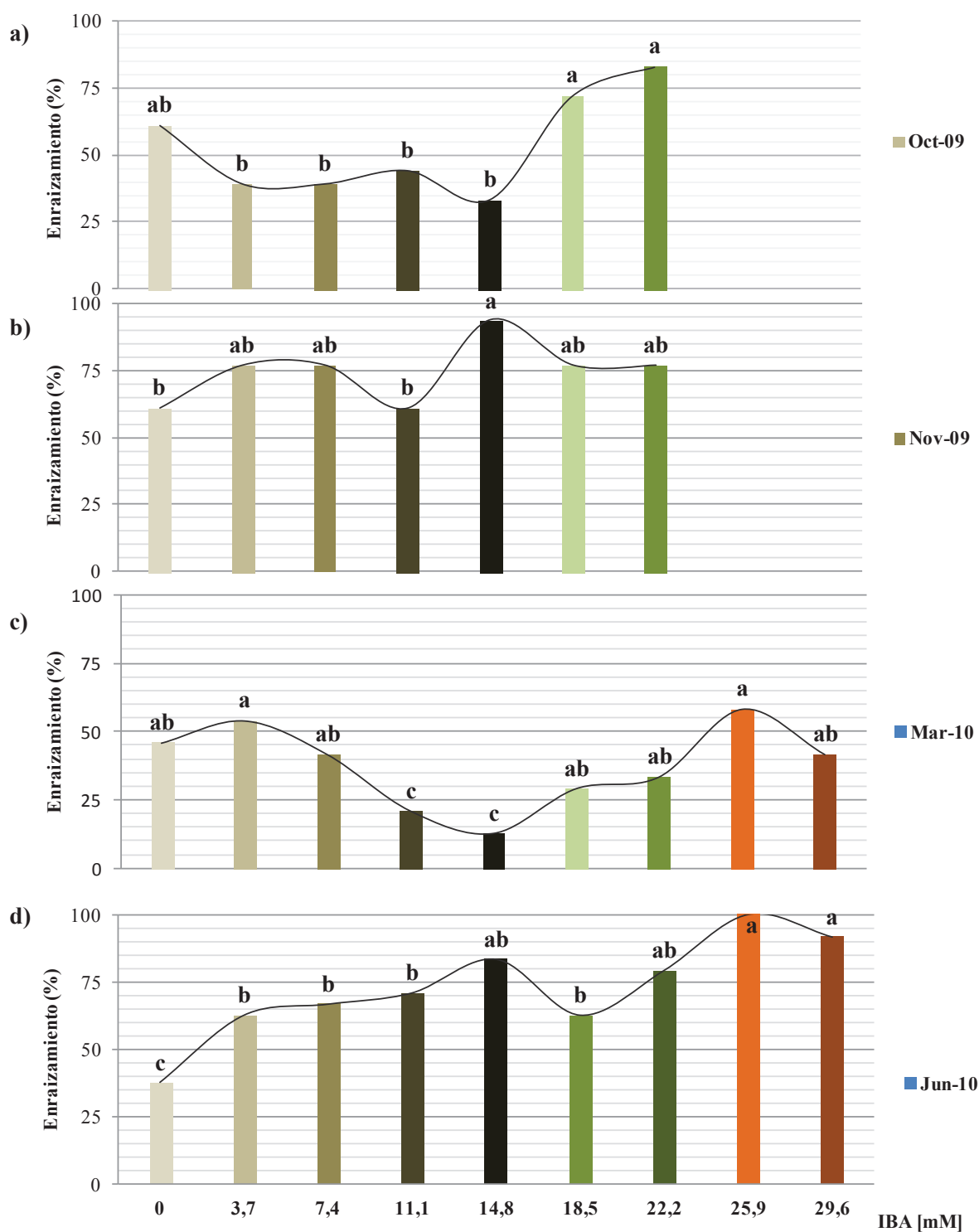


Figura 56.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de olivo adulto cv. Picual: a) Octubre de 2009, b) Noviembre de 2009, c) Marzo de 2010 y d) Junio de 2010. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

IV.3. MATERIAL MICROINJERTADO

IV.3.1. Efecto de los microinjertos sucesivos en la estabilidad genética

IV.3.1.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la estabilidad genética de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero

En la tabla 14 se recogen los fragmentos de amplificación obtenidos para cada uno de los cebadores utilizados en los diferentes grupos de individuos; como puede observarse no se detectaron diferencias en los patrones de amplificación obtenidos para los marcadores: *ssrOeUA-DCA3*; *ssrOeU-DCA9*; *ssrOeU-DCA15*; *ssrOeU-DCA16*; *ssrOeU-DCA18* (Sefc y *col.*, 2000) y UDO99-043 (Cipriani y *col.*, 2002), cuando se compararon las plantas resultantes de las diferentes líneas y ciclos de microinjertos sucesivos con la planta madre adulta.

Una vez descartada la existencia de variaciones entre los individuos de las diferentes líneas solo se tuvo en cuenta el ciclo de microinjerto del que procedían las plantas aclimatadas, para evaluar su capacidad morfogenética.

Tabla 14.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la estabilidad genética de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero.

Fragmentos de amplificación obtenidos con 6 loci SSR en 41 plantas procedentes de diferentes líneas y ciclos de microinjertos sucesivos *in vitro* y la planta madre adulta.

Material	Línea	Loci					
		ssrOeUA-DCA3	ssrOeU-DCA9	ssrOeU-DCA15	ssrOeU-DCA16	ssrOeU-DCA18	UDO99-043
Adulto	-	231/242	185/204	246	126/148	168/178	178
1º microinjerto	1	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	8	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	9	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	13	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	15	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	20	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	22	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	23	ok	ok	ok	ok	ok	ok
2º Microinjerto	4	231/242	185/204	246	126/148	168/178	178
	11	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	17	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	21	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	24	ok	ok	ok	ok	ok	ok
3º microinjerto	2	231/242	185/204	246	126/148	168/178	178
	8	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	10	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	11	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	15	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	17	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	18	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	19	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	20	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	21	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	24	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	28	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	29	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	30	ok	ok	ok	ok	ok	ok
4º microinjerto	7	231/242	185/204	246	126/148	168/178	178
	11	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	15	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	18	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	19	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	23	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	25	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	30	ok	ok	ok	ok	ok	ok
5º microinjerto	8	231/242	185/204	246	126/148	168/178	178
	10	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	15	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	25	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	28	ok	ok	ok	ok	ok	ok

IV.3.2. Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad morfogénica

IV.3.2.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de enraizamiento *in vitro* de los brotes obtenidos

Se comparó el comportamiento en la fase de enraizamiento, en el medio RVr, de los brotes procedentes directamente del 1º, 3º y 5º microinjertos. Como podemos apreciar en la figura 57, el porcentaje de enraizamiento se incrementó con el número de microinjertos, obteniéndose unos valores del 13 %, 33 % y 62 % tras el 1º, 3º y 5º microinjerto respectivamente, siendo este último significativamente superior a los anteriores. El aspecto de uno de los brotes del 5º microinjerto, durante las primeras fases del enraizamiento, puede apreciarse en la figura 58.

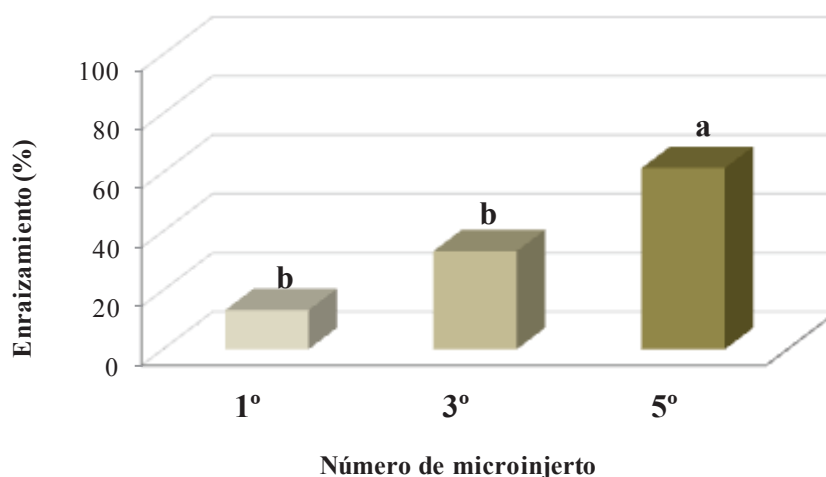


Figura 57.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, en patrones juveniles, sobre la capacidad de enraizamiento *in vitro* de los brotes obtenidos en el medio RVr (Revilla y col., 1996). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).



Figura 58.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, en patrones juveniles, sobre la capacidad de enraizamiento *in vitro* de los brotes obtenidos, en el medio RVr (Revilla y col., 1996). Aspecto de uno de los brotes del 5º microinjerto tras dos semanas en el medio de enraizamiento.

IV.3.2.2. Experimento 2.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de enraizamiento mediante estaquillado semileñoso de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero

Se testó la capacidad de enraizamiento de estaquillas semileñosas procedentes de las 41 plantas aclimatadas y mantenidas en invernadero obtenidas de los microinjertos 1º, 3º y 5º (tabla 5). Como control se utilizaron estaquillas procedentes del árbol madre adulto.

Como se puede observar en el figura 59, no existían diferencias significativas entre el material adulto (75 %) y las plantas del 3º y 5º microinjerto, siendo la capacidad de enraizamiento de estos materiales del 81 % y 80 % respectivamente; plantas del 1º microinjerto, con un 30 % de enraizamiento mostraron diferencias significativas con los otros dos grupos.

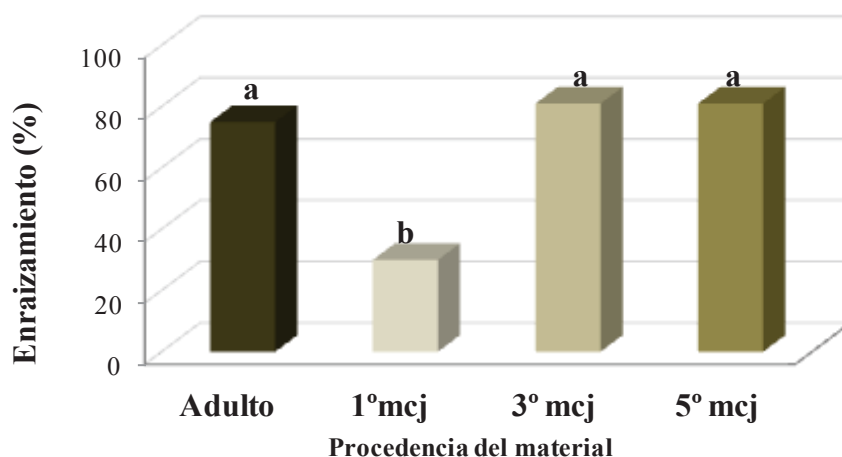


Figura 59.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la capacidad de propagación por estaquillado semileñoso de las plantas obtenidas (porcentaje de enraizamiento). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Mcj.-microinjerto.

IV.3.2.3. Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la capacidad de micropropagación de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero

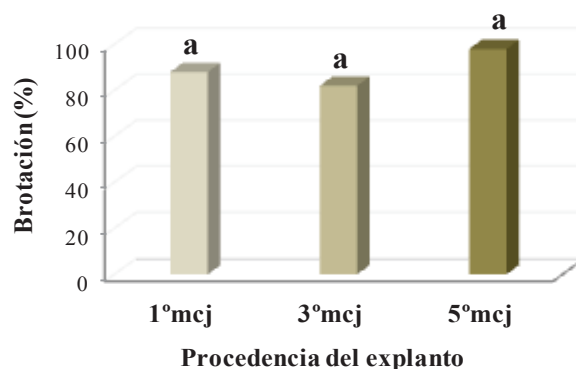
IV.3.2.3.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos en la fase de establecimiento *in vitro*

A las 6 semanas de cultivo en el medio RV se observaron unos porcentajes de brotación muy elevados, 98 % para las secciones nodales procedentes del 5º microinjerto y superior al 80 % en los demás (figura 60a). No se observaron diferencias en la tasa de necrosis, siendo del 6 %, 16 % y 2 % para los explantos procedentes de material del 1º, 3º y 5º microinjerto respectivamente (figura 60b).

Tras doce semanas, se observó un aumento en la tasa de necrosis que afectó a todos los materiales por igual, independientemente de su procedencia, siendo del 18 %, 26 % y 16 % para los cultivos procedentes de plantas del 1º, 3º y 5º microinjerto respectivamente (figura

60b). No se observaron diferencias significativas en el número medio de brotes axilares/cultivo, aunque los mayores valores (1,6) se obtuvieron en los cultivos procedentes de plantas del 1º microinjerto (figura 61a). La longitud media de los brotes fue significativamente superior en los cultivos del 1º y 5º microinjertos que en los del 3º microinjerto (1,7 - 1,9 y 1,1 cm respectivamente (figura 61b).

a)



b)

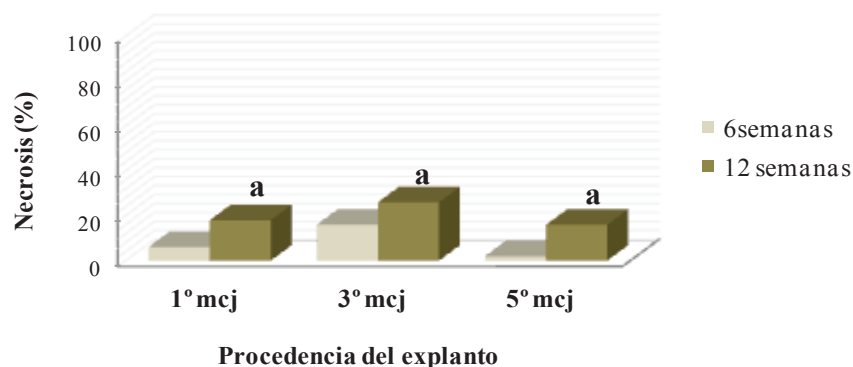
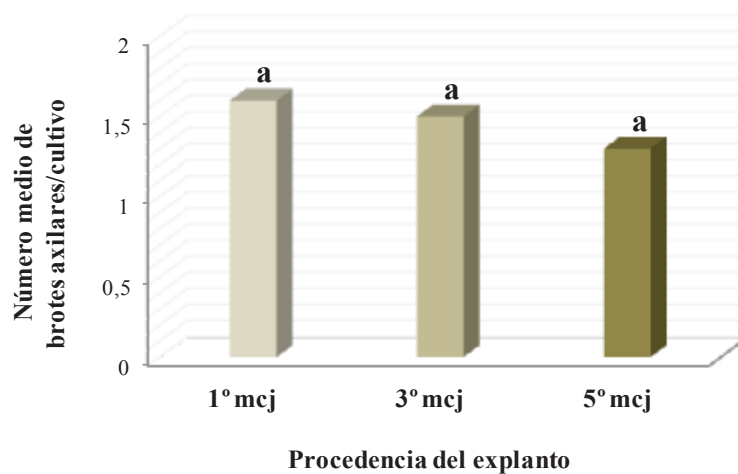


Figura 60.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la fase de establecimiento *in vitro* de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en invernadero, tras el cultivo en el medio RV (Revilla y col., 1996): a) porcentaje de brotación a las seis semanas y b) porcentaje de necrosis a las 6 y 12 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Mcj.-microinjerto.

a)



b)

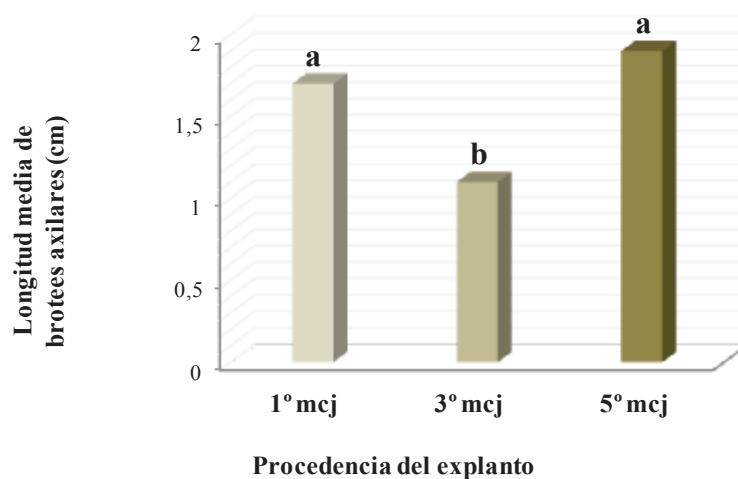


Figura 61. Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la fase de establecimiento *in vitro* de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en invernadero, tras 12 semanas de cultivo en el medio RV (Revilla y col., 1996): a) número de brotes axilares/cultivo y b) longitud media de brotes axilares. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Mcj.-microinjerto.

IV.3.2.3.2. Experimento 2.- Efecto de los microinjertos sucesivos sobre la tasa de multiplicación *in vitro*

Como se puede observar en la figura 62, la tasa media de multiplicación aumenta con el número de ciclos de microinjerto, siendo mayor en el 5º microinjerto (1,9 u.m) y significativamente diferente del 1º microinjerto (1,5 u.m).

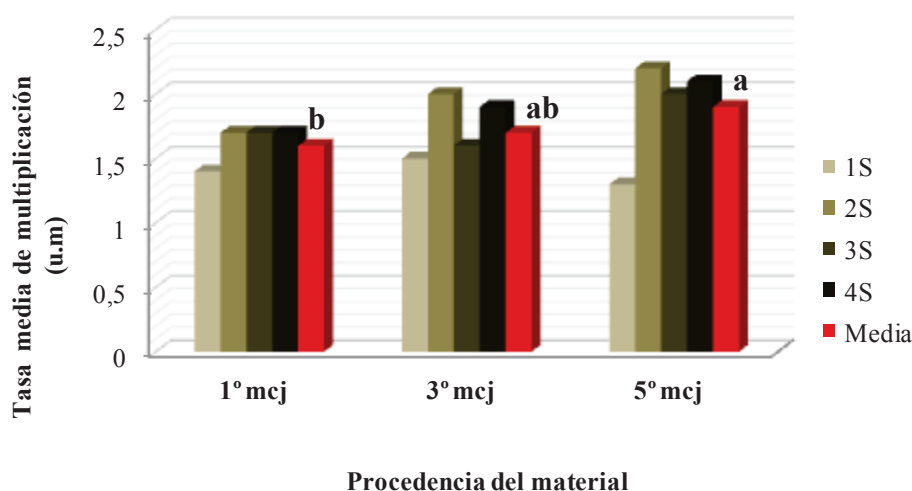


Figura 62.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la fase de multiplicación *in vitro*, de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en invernadero. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).
Mcj.-microinjerto.

IV.3.2.3.3. Experimento 3.- Efecto de los microinjertos sucesivos en la capacidad de enraizamiento *in vitro*

Se observaron grandes diferencias en la respuesta de los brotes en el enraizamiento dependiendo del medio que se utilizase (figura 63). Así, en el medio RVr se obtuvieron los mejores resultados, observándose una homogeneidad en el comportamiento del material

durante las tres repeticiones del experimento; no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de enraizamiento del material procedente de las plantas microinjertadas 1, 3, y 5 veces, con unos valores del 92 % - 95 % y 94,4 % respectivamente ; el número de raíces/brote enraizado se incrementó tras el primer microinjerto, mientras que la longitud se mantuvo en el rango (2,1-3 cm) (tabla 15).

En el medio OMr (figura 63) se observaron diferencias significativas entre los diferentes microinjertos, de manera que los mejores resultados se obtuvieron para los cultivos procedentes del 1º microinjerto (37,7 %), mientras que los valores obtenidos para el 3º (14,4 %) y 5º microinjerto (21,1 %) eran inferiores; sin embargo, no se encontraron diferencias para el número (1-1,7) y la longitud de las raíces (4,5- 4,8 cm) (tabla 15).

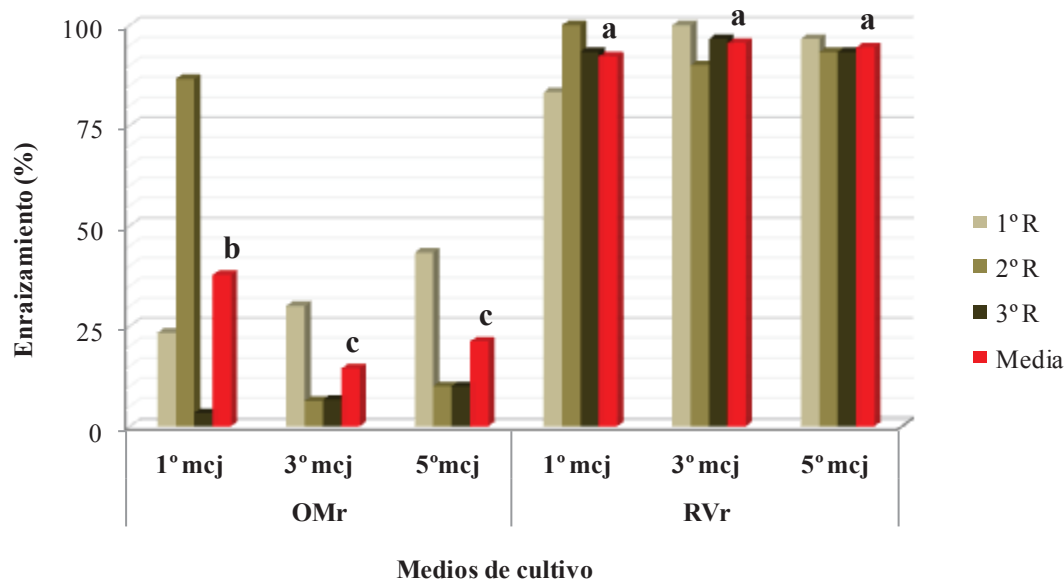


Figura 63.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la capacidad de enraizamiento *in vitro*, de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en invernadero, en los medios OMr (Cañas y col., 1987) y RVr (Revilla y col., 1996). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Mcj.-microinjerto.

Tabla 15.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina sobre patrones juveniles, en la capacidad de enraizamiento *in vitro*, de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en invernadero, en los medios OMr/OMe y RVr. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Medio de enraizamiento	Número de microinjerto	Nº de raíces/brote enraizado	Longitud de raíces (cm)
RVr (Revilla y col., 1996)	1º	1,6 b	3 a
	3º	2,3 a	2,7 a
	5º	2,1 a	2,1 a
OMr/OMe (Cañas y col., 1987)	1º	1 b	4,5 a
	3º	1 b	4,8 a
	5º	1,7a	4,5 a

El aspecto de los brotes enraizados del 5º microinjerto, tal y como puede apreciarse en la figura 64, fue mucho mejor en el medio RVr que en el OMr, de manera que en el primero se observa la elongación de los brotes y éstos presentan mayor número de raíces.

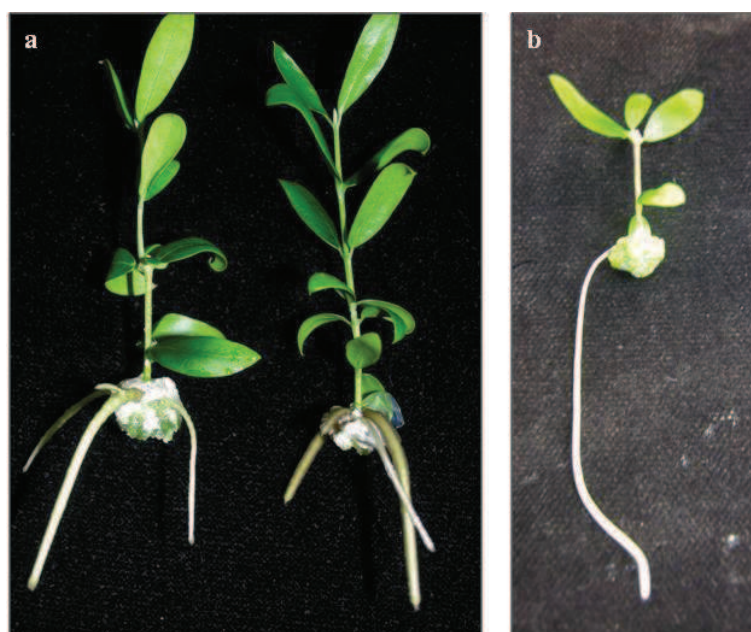


Figura 64.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la capacidad de enraizamiento *in vitro*, de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en invernadero. Aspecto de los brotes enraizados procedentes de plantas del 5º microinjerto tras 8 semanas en los medios de enraizamiento: a) RVr (Revilla y col., 1996) y b) OMr (Cañas y col., 1987).

IV.3.3. Efecto de los microinjertos sucesivos en la entrada en producción

IV.3.3.1. Experimento 1.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la precocidad de entrada en producción de plantas obtenidas y transplantadas a campo.

Tras un año de permanencia en campo no se observaron diferencias significativas, en cuanto al porcentaje de árboles florecidos (figura 65 y 66), entre los que procedían de estaquillas del árbol madre adulto y estaquillas de plantas con diferente número de microinjerto, siendo del 83 % para individuos adultos y del 1º y 5º microinjerto y del 100 % para los individuos del 3º microinjerto, independientemente de la línea (8-15) de la que procedían. Se considera que un determinado tratamiento ha florecido cuando lo hacen, al menos, el 50 % de los individuos que forman parte de ese tratamiento.

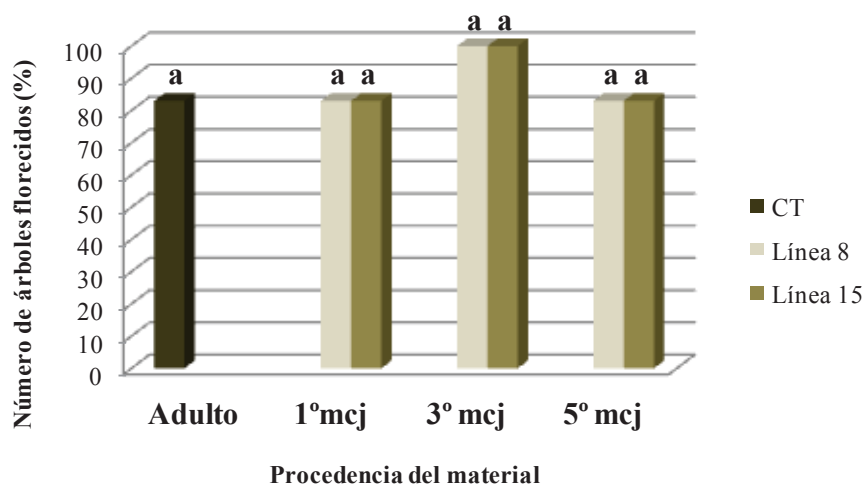


Figura 65.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la precocidad de entrada en floración de plantas, procedentes de las líneas 8 y 15 y distintos microinjertos (1º, 3º y 5º). Porcentaje de plantas con flores tras un año de su establecimiento en campo en la parcela de experimentación del BMGO (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA).

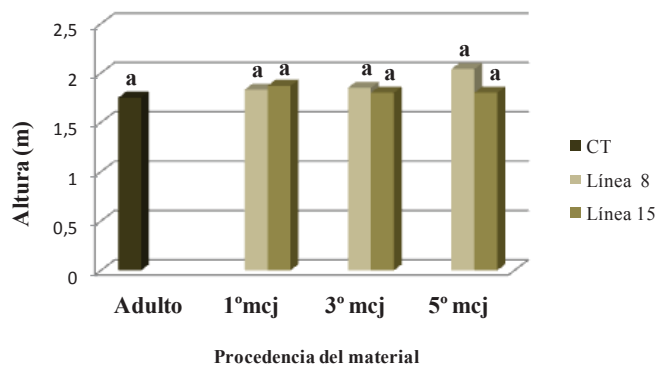
Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).



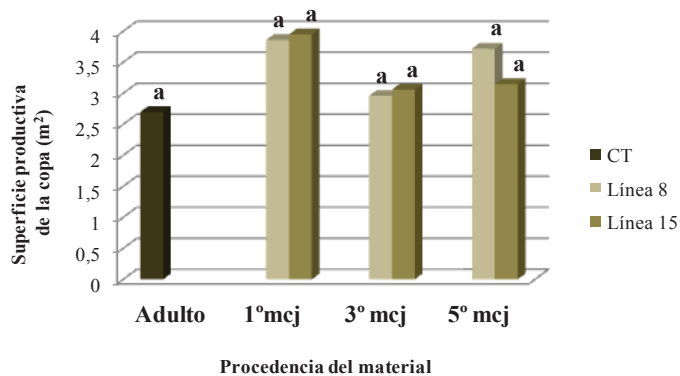
Figura 66.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la precocidad de entrada en floración, de plantas procedentes de las líneas 8 y 15 y distintos microinjertos (1º, 3º y 5º). Planta con flores tras un año de su establecimiento en campo en la parcela de experimentación del BMGO (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA).

Como puede observarse en la figura 67, el vigor de las plantas, tras un año de permanencia en la parcela de experimentación, fue superior para todos los parámetros evaluados, en el material microinjertado que en el material adulto, aunque estas diferencias no fueron, sin embargo, significativas; así la altura media de las plantas (figura 67a) fue de 1,75 m para el material adulto, mientras que todas las plantas del material microinjertado presentaron alturas superiores a 1,80 m, siendo el mayor valor para las plantas procedentes de la línea 8 del quinto microinjerto (2 m). La superficie productiva de la copa fue de 3 m² en las plantas procedentes de los microinjertos y 2,7 m² para las que procedían del material adulto (figura 67b); en cuanto al diámetro del tronco, para el material adulto fue de 2 cm y superior a 2,3 cm en el resto de los materiales, siendo la línea 8 del 5º microinjerto la que mostró un mayor diámetro con 2,7 cm (figura 67c).

a)



b)



c)

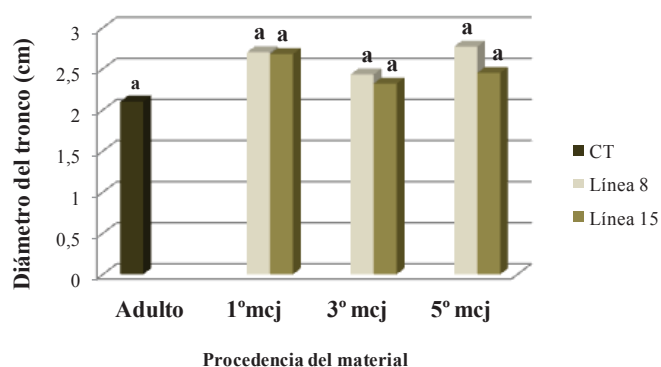


Figura 67.- Comportamiento en campo de plantas de olivo cv. Arbequina, procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3 y 5) y de la planta madre adulta. Vigor de las plantas de distinta procedencia tras un año de permanencia en la parcela de experimentación del BMGO (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA): a) altura (m), b) superficie productiva de la copa (m²) y c) diámetro del tronco (cm). Letras distintas indican diferencias significativas (p= 0,05). Mcj.- microinjerto

En cuanto a la producción media (figura 68) no se observaron diferencias significativas entre los grupos, oscilando entre los 0,145 Kg para las plantas provenientes del árbol madre adulto y 0,290 kg, para los individuos procedentes de las plantas del 5º microinjerto (yema 8).

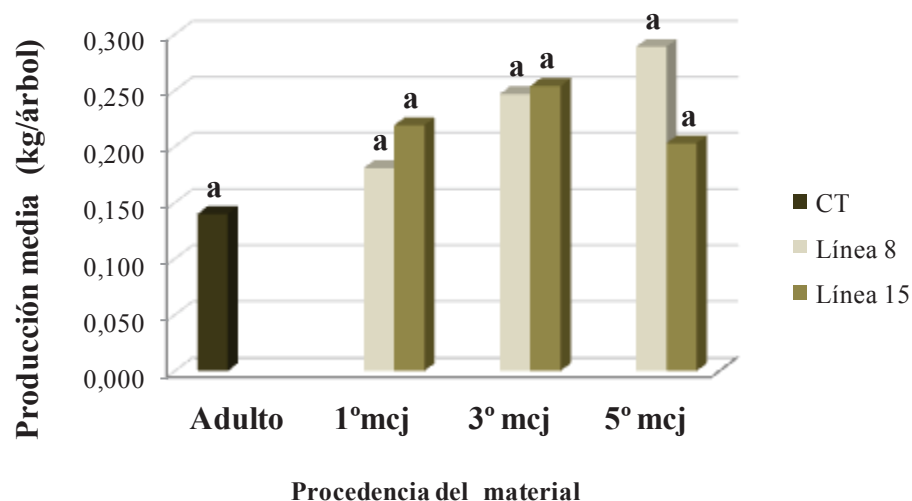


Figura 68.- Precocidad de entrada en producción de las plantas de olivo cv. Arbequina, procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3 y 5) y de la planta madre adulta. Producción media (kg/árbol), de las plantas procedentes de estaquillado semileñoso, tras un año de permanencia en la parcela de experimentación del BMGO (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Mcj.- microinjerto

V. DISCUSIÓN

El olivo, al igual que otras especies leñosas, sufre con la edad una pérdida progresiva de su capacidad morfogenética (Poethig, 1990; 2003) lo que dificulta en gran medida su propagación vegetativa. La propagación a partir de individuos juveniles no resulta demasiado útil, a efectos prácticos, porque se está propagando un material del que desconocemos su comportamiento agronómico (Hackett, 1985). No obstante, Bonga (1982) recomienda comenzar desarrollando métodos de propagación para material juvenil y una vez establecidos los parámetros básicos del cultivo, aplicarlos al material adulto. Otras recomendaciones a la hora de propagar árboles adultos son seleccionar los tejidos más juveniles dentro del árbol (Bonga, 1987; Franclet *y col.*, 1987; Hackett 1987; San-José *y col.*, 1990; Vieitez *y col.*, 1994; Meier y Reuther, 1994; Chalupa, 2000) o aplicarles tratamientos de revigorización o rejuvenecimiento, que han demostrado ser efectivos para lograr una mayor reactividad de los explantos (Bonga, 1982, 1987; Hackett, 1985).

V.1. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS ASÉPTICOS

El establecimiento *in vitro* del material juvenil del cv. Arbequina, se ha llevado a cabo de forma exitosa tanto en el medio IM (Rugini *y col.*, 1984; formulación mineral IM suplementada con 2,3 μ M de zeatina) como en RV (Revilla *y col.*, 1996; formulación mineral DKW suplementada con 4,4 μ M de BAP y 0,05 μ M de AIB), con porcentajes de brotación superiores al 80 %; sin embargo, la mayor longitud de los brotes desarrollados indica que el medio RV es más adecuado para llevar a cabo la fase de inicio de este tipo de material. Nuestros resultados corroboran observaciones previas de Revilla *y col.*, (1996), también en material juvenil del cv. Arbequina; así, estos autores alcanzaron porcentajes de supervivencia del 98 % con una longitud media de los brotes desarrollados del 2,9 cm, aunque estos datos se refieren a un periodo de cultivo superior (60 días) al utilizado en este trabajo (42 días: 82 % brotación y 1,5 cm).

El cultivo de secciones nodales adultas del cv. Arbequina en el medio RV, ha puesto de manifiesto la influencia del estado ontogenético de la planta madre en la fase de inicio; así, mientras que los cultivos juveniles pudieron establecerse tras 6 semanas, el material adulto necesitó un tiempo mayor, 12 semanas, para que la longitud de los brotes desarrollados fuera suficiente para iniciar la fase de proliferación. No se observaron diferencias en los porcentajes de brotación (alrededor del 80 % en ambos casos), pero sí en la incidencia de necrosis, del 60 % en el material adulto frente al 14 % del material juvenil. También se ha constatado la influencia del genotipo; así, en el mismo medio y condiciones de cultivo, los porcentajes de brotación del cv. Picual (67 %) fueron inferiores a los del cv. Arbequina. (82 %). Estos resultados contrastan con lo observado por Revilla y col. (1996), que no lograron establecer *in vitro* las secciones procedentes de brotes terminales de las ramas laterales de un árbol adulto del cv. Arbequina, describiendo problemas de abscisión de hojas y desecación de los explantos.

La mayor reactividad en el establecimiento *in vitro* del material juvenil con respecto al adulto, ha sido también puesta de manifiesto en otras especies como *Prosopis chilensis* (Caro y col., 2002), *Cedrela odorata* (Peña-Ramírez, 2010) o *Malosorbus florentina* (Martini y col., 2013), en las que el material adulto presentó problemas de necrosis y producción de exudados fenólicos; por el contrario, Sansberro y col. (2000), en *Ilex paraguariensis*, observaron como las diferencias de comportamiento entre el material juvenil y adulto no se pusieron de manifiesto en la fase de establecimiento, sino en la de enraizamiento.

La pérdida de capacidad morfogénica de los explantos adultos se ha atribuido a la especialización de los tejidos que reduce la plasticidad y la capacidad de diferenciación celular (Peña-Ramírez y col., 2010), lo cual, a su vez, puede ser debido a la expresión diferencial de genes que codifican para proteínas presentes en diferentes cantidades y formas en ambas fases (García y col., 2000). En esta línea, Valdés y col. (2003) señalan que durante

el desarrollo se produce una reducción en los niveles endógenos de citoquininas, reduciéndose de la misma manera las divisiones celulares e inducción de yemas, lo que podría ser la causa que explique el retraso observado en la respuesta de las yemas adultas.

Con objeto de mejorar el comportamiento del material adulto, los árboles madre se podaron severamente, utilizándose las secciones nodales de las ramas que brotaron de la base del tronco para iniciar los cultivos; de esta manera, se observó como, en el cv. Arbequina, el porcentaje de necrosis de los explantos basales fue inferior al de los explantos procedentes del árbol antes de la poda (20 % frente al 60 % respectivamente). Estas diferencias podrían estar relacionadas con el diferente grado de juvenilidad o madurez de los explantos (Hackett, 1985; Dumas *y col.*, 1989), observándose de nuevo una notable influencia del genotipo, de manera que para el cv. Picual, las diferencias fueron más acusadas (90 % y 10 % para el material de la copa y base del tronco, respectivamente).

El proceso de poda previo al establecimiento de los cultivos *in vitro*, ha demostrado ser un método eficiente para incrementar la capacidad morfogénica en diferentes especies leñosas (Howard *y col.*, 1989; Selby *y col.*, 1990). Este efecto ha sido atribuido tanto a un incremento del vigor fisiológico de la planta, debido a una mayor disponibilidad de agua y nutrientes (Fortanier y Jonkers, 1976), como a que los nuevos brotes que emergen procedan de yemas que permanecerían en estado de dormición, manteniendo características juveniles (Franclet, 1983) o bien de yemas de origen adventicio (Read y Bavougian, 2013). De hecho, las podas repetidas son un método de revigorización que se usa de forma rutinaria para forzar el crecimiento de nuevas ramas en la parte basal del tronco (Rey *y col.*, 1990; Selby *y col.*, 1990). En olivo se ha utilizado también en los cvs. Koroneiki (Roussos y Pontikis, 2002) y “Galega Vulgar” (Peixe *y col.*, 2007), aunque no se muestran datos del comportamiento de los árboles que no fueron podados.

Otra estrategia utilizada para aumentar la reactividad *in vitro* de los explantos adultos, es el uso de yemas (explantos-R) procedentes de brotes epicórmicos, obtenidos a partir de ramas del árbol madre que son forzadas a brotar en condiciones controladas de invernadero; en el cv. Arbequina, este tipo de explanto mostró tasas de necrosis muy bajas (8 %) y la longitud de los brotes desarrollados (2,1 cm) fue superior a la observada para los otros tipos de secciones nodales (0,8 cm y 1,6 cm para las procedentes de la copa y base del tronco respectivamente). Por el contrario, en el cv. Picual, los porcentajes de brotación obtenidos con este tipo de explanto, no superaron a los observados con el material procedente de la base del tronco tras la poda severa. El diferente comportamiento entre “Arbequina” y “Picual” puede ser debido al genotipo o bien a la diferente edad ontogenética de ambos cultivares (Cozza y col., 1997). En cualquier caso, los datos mostrados en este trabajo estarían de acuerdo con Vidal y col. (2003), que recomiendan el uso de explantos de las partes basal y media del árbol porque retienen características de juvenilidad durante prolongados periodos de tiempo.

La inducción de brotes epicórmicos se ha utilizado para establecer *in vitro* el cultivar de olivo “Kalamon” (Rama y Pontikis, 1990), aunque los autores no muestran datos del comportamiento de otro tipo de materiales; también se ha utilizado de forma rutinaria para la propagación de otras especies como *Arbutus unedo* (Gomes y Canhoto, 2009); *Acer saccharinum*, *Fraxinus pennsylvanica*, *Carya illinoensis*, *Tectona grandis* (Aftab y col., 2005); *Corylus avellana* (Sánchez-Olate y col., 2004) y *Sorbus aucuparia* (Chalupa, 2002).

Finalmente, la comparación entre el comportamiento *in vitro* de explantos procedentes del árbol adulto y de los materiales sometidos a microinjertos sucesivos, en el cv. Arbequina, ha puesto de manifiesto la ausencia de diferencias significativas, respecto a las tasas de brotación, de los materiales rejuvenecidos y adultos durante la fase de inicio, obteniéndose en todos los casos, porcentajes de brotación superiores al 80 %. En cuanto a la necrosis, salvo

para las secciones nodales procedentes de la copa del árbol adulto (61 %), no se observaron diferencias entre los otros tipos de yemas adultas y las procedentes del material microinjertado ($\approx$ 20% de necrosis). Curiosamente, no se detectaron diferencias entre las plantas microinjertadas distinto número de veces (1, 3 y 5 microinjertos sucesivos), a diferencia de lo observado en otras especies como *Citrus reticulata* y *C. sinensis*, en las que los brotes escindidos del primer microinjerto y cultivados *in vitro* desarrollaban hojas cloróticas con niveles de abscisión del 50%, pero este valor descendía progresivamente a medida que los brotes provenían de microinjertos posteriores de manera que, tras el quinto microinjerto, mostraron un buen desarrollo en cuanto a tamaño, forma y aspecto de las hojas (Huang y col., 1992a). En *Ziziphus mauritiana*, el microinjerto seriado de secciones apicales y nodales sobre patrones de semilla mostró que, independientemente del ciclo de microinjerto, éstos sobrevivían a la fase de inicio en la misma proporción que el material juvenil; sin embargo, el crecimiento de la púa aumentaba a medida que lo hacía el número de ciclos de microinjerto (Danthu y col., 2004).

V.2. FASE DE MULTIPLICACIÓN

La capacidad de proliferación de los cultivos *in vitro* viene determinada por el número de brotes producidos a partir de cada explanto y por el número de nudos que se producen en los nuevos brotes; en olivo se observa una fuerte dominancia apical, de manera, que las tasas de multiplicación se ven limitadas porque habitualmente sólo se produce el desarrollo de un brote y una escasa o nula producción de brotes axilares (Rugini y Fedeli, 1990; Cañas y col., 1992; Mendoza-de Gives y col., 2008). Zacchini y de Agazio (2004) evaluaron la capacidad de proliferación de explantos, con y sin la presencia de la yema apical, poniendo de manifiesto cómo la escisión del ápice influye de manera positiva en el desarrollo de las yemas laterales; estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos con el material

juvenil en este trabajo, así, el cultivo de secciones subapicales en medio RV sólido proporcionó una media de 1 brote axilar/cultivo (de 1,5 cm de longitud) mientras que en el cultivo de brotes apicales, se producía la elongación del brote principal pero sólo el 2 % de los cultivos desarrollaban brotes axilares, de pequeña longitud. En base a estos resultados, se estableció como estándar la eliminación de la yema apical de los explantos en la fase de proliferación.

V.2.1. Influencia del estado ontogenético

Se ha puesto de manifiesto la gran influencia del estado ontogenético sobre la capacidad de proliferación del cv. Arbequina; así, los explantos juveniles mostraron una mejor respuesta en el medio RV (Revilla *y col.*, 1996), que lleva las sales minerales DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), que en el medio con la formulación mineral OM (Rugini, 1984), lo que se tradujo en un acortamiento del periodo de subcultivo en el primer medio, alcanzando tasas de multiplicación similares. Por el contrario, los explantos adultos no respondieron bien a las sales DKW, las tasas de multiplicación fueron disminuyendo y la incidencia de necrosis aumentando progresivamente con el número de subcultivos. Experimentos posteriores, con material adulto, pusieron de manifiesto que el medio RP (Roussos y Pontikis, 2002) que contiene las sales minerales DKW modificadas (Roussos *y col.*, 1999 y Roussos y Pontikis 2002) mostró ser significativamente superior al resto de los medios testados, tanto por las tasas de multiplicación obtenidas (2,2 u.m) como por la ausencia de explantos necrosados.

En relación con el material procedente de los microinjertos, las tasas medias de multiplicación obtenidas con el medio RP aumentaron significativamente a partir del tercer microinjerto (1,5, 1,7 y 1,9 u.m para el 1º, 3º y 5º microinjerto respectivamente) aunque, sorprendentemente, fueron menores que las observadas para el material adulto. Resultados

similares obtuvo Barceló-Muñoz (1995) con los injertos en cascada de yemas adultas del portainjerto de aguacate Gvar-am-13; así, aunque se produjo un aumento de la capacidad de enraizamiento *in vitro* desde el 5% para el material adulto no microinjertado, hasta el 79% tras 17 ciclos de microinjerto sucesivos, en la fase de multiplicación, el comportamiento del material microinjertado fue similar al del material adulto. Probablemente, tal y como han señalado Bonga (1982) y Franclet *y col.* (1987), la aplicación de métodos de rejuvenecimiento provoca cambios parciales que afectan sólo a algunas de las características juveniles. Sin embargo, Fernández-Lorenzo y Fernández-López (2005), señalaron que en *Castanea sativa* no se observaron diferencias en la tasa de multiplicación entre brotes microinjertados 1, 2 ó 3 veces, aunque ésta fue siempre significativamente superior a la del material adulto. Por su parte, Ewald y Kretschmar (1996), en *Larix decidua*, injertaron meristemas de árboles de 140 años sobre patrones de semilla *in vitro*, transfiriendo después las plantas microinjertadas a condiciones *ex vitro*. Tras la reintroducción *in vitro*, el número de explantos originados se incrementó, durante los tres primeros subcultivos, en el caso del material proveniente de los microinjertos y disminuyó de forma progresiva, tras el primer subcultivo, en el material procedente de los árboles adultos.

V.2.2. Influencia de las sales minerales

El medio RP, que contiene la formulación mineral DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) modificada por Roussos *y col.* (1999) y Roussos y Pontikis (2002), fue utilizado para la multiplicación del cv. Koroneiki obteniéndose una media de 1,5 brotes por explanto; estos valores coinciden con lo obtenido en el cv. Picual, pero son inferiores a los obtenidos para el cv. Arbequina, en este trabajo. Estos resultados estarían de acuerdo con lo observado por Cozza *y col.* (1997), quienes afirmaron que el cultivo *in vitro* del olivo es muy dependiente de la composición de los medios de cultivo y a menudo se hace necesaria la formulación de un

medio específico para cada cultivar; a conclusiones similares llegaron Das y Mitra (1990) micropropagando diferentes cultivares de *Eucaliptus teraticornis*.

En el cv. Arbequina, la comparación de las tasas de multiplicación obtenidas en los distintos medios, puso de manifiesto, desde el primer experimento, que en el medio RP estándar (Roussos y Pontikis, 2002) se obtenían resultados significativamente superiores a los de otros medios testados. En el cv. Picual, las mayores tasas de proliferación (1,5 u.m) se obtuvieron en el medio ZAD (Zacchini y de Agazio, 2004) que lleva la formulación mineral OM (Rugini, 1984), aunque no eran significativamente diferentes de las obtenidas en los medios RP (Roussos y Pontikis, 2002), SS (Sghir y col., 2005) y Px (Peixe y col., 2007) (1,4; 1,3 y 1,1 u.m. respectivamente); sin embargo, los medios RV (sales minerales DKW) y Px (sales minerales OM) se descartaron debido a las elevadas tasas de necrosis observadas (84 %) en el primer medio y al escaso crecimiento obtenido en el segundo, a lo largo del tiempo de cultivo. El cultivo continuado en los medios RP y ZAD originales y modificados (formulación mineral del medio RP/combinación hormonal ZAD y viceversa), puso de manifiesto que la formulación mineral DKWm en el medio RP, es más adecuada para la proliferación de los brotes, con independencia de la combinación hormonal utilizada.

La formulación mineral DKWm (Roussos y Pontikis, 2002) se basa en la formulación DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) pero lleva una concentración dos veces inferior de K_2SO_4 ; $Na_2Mo_4 \cdot 2H_2O$ se reduce nueve veces; el $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y Na_2EDTA son reemplazados por $NaFeEDTA$; mientras que el $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y el H_3BO_3 se incrementan el doble y un tercio respectivamente. Estos nuevos balances, que afectan de manera positiva al cv. Arbequina, son esenciales para el cv. Picual, que no prolifera en el medio RV que incluye la formulación DKW original. En cuanto a los medios ZAD, SS y Px, todos ellos llevan la formulación mineral OM (Rugini, 1984) que contiene mayores niveles de Ca^{2+} , N^{3-} y S^{2-} que las sales DKWm del medio RP; quizás estos iones afecten negativamente al cv. Arbequina mientras

que su efecto no estaría claro en el caso del cv. Picual, que mostraba un buen comportamiento en el medio ZAD, tal y como se ha señalado anteriormente.

Nuestras observaciones ponen de manifiesto el papel crucial de las sales minerales en el proceso de micropropagación, confirmando lo observado previamente en otros cultivares de olivo; así, Grigoriadou *y col.* (2002) indicaron que, para el cv. Chondrolia Chalkidikis, la formulación mineral WPM (Lloyd y McCow, 1980), era más adecuada que OM (Rugini, 1984) y QL (Quoirin y Lepoivre, 1977), resultando en un mejor aspecto de los brotes obtenidos; por su parte, Roussos y Pontikis (2002) observaron como en el cv. Koroneiki los cultivos detenían su crecimiento tras el primer subcultivo en presencia de las formulaciones minerales OM y WPM, mientras que con las sales minerales DKWm, se alcanzaban tasas de proliferación de 1,5. Resultados similares observaron Peyvandi *y col.* (2009a) en el cv. Rowghani en el que el empleo de 2iP (4 mg l⁻¹), producía mayor elongación de los brotes si se utilizaba la formulación mineral DKW en vez de la formulación OM. En el cv. Picholine Marocaine, Brhadda *y col.* (2003) llegaron a la conclusión de que en la fase de proliferación, las sales minerales ½ MS (Murashige y Skoog, 1962) y OM eran igual de efectivas, con unas tasas de producción de axilares del 65 % y 67 % respectivamente, pero recomendaban el medio con las sales OM porque los brotes no mostraban síntomas de hiperhidricidad; el uso de otros medios con las sales WPM, ^{1/2}Miller (Miller, 1967) y K&H [macros de Knop (1865) y micros de Heller (1953)] inducían clorosis, producción de callo basal y reducción del crecimiento.

V.2.3. Influencia de los reguladores de crecimiento

En el material adulto de “Arbequina” y “Picual”, la Z y el RZ son las citoquininas más efectivas en la fase de multiplicación; sin embargo, no deberíamos descartar la interacción entre los reguladores de crecimiento y la formulación mineral de los medios, ya que en el cv.

Arbequina, la mayor concentración de RZ (13,6 μ M) utilizada en el medio SS (Sghir *y col.*, 2005) que lleva la formulación mineral OM, no mejoró las tasas de multiplicación obtenidas con las sales minerales DKWm y una menor concentración de RZ (5,7 μ M) (medio RP); de la misma manera, en el cv. Picual hemos observado que altas concentraciones de Z (13,68 μ M) y RZ (13,6 μ M) con la formulación mineral OM producen tasas de multiplicación similares a las obtenidas con menores concentraciones de RZ (5,7 μ M) cuando se utiliza en combinación con las sales DKWm.

Nuestros resultados corroboran observaciones previas, también en olivo, donde se ha puesto de manifiesto que la zeatina y el ribósido de zeatina son las citoquininas más adecuadas para inducir proliferación, a concentraciones que oscilan entre 1- 4mg/l (González-Padilla *y col.*, 2009) para el material juvenil; y 2-10 mg/l para el adulto (Rugini y Fontanazza, 1981; Bartolini *y col.*, 1990; Rama y Pontikis, 1990; Rugini, 1992; Leva *y col.*, 1994; Carter, 1997; Cozza *y col.*, 1997; Briccoli-Bati *y col.*, 1999; Briccoli-Bati *y col.*, 2002; Chaari *y col.*, 2002; Grigoriadou *y col.*, 2002; Lambardi *y col.*, 2002; Leva *y col.*, 2002; Roussos y Pontikis, 2002; Brhadda *y col.*, 2003; Grigoriadou *y col.*, 2003; Leva *y col.*, 2003; Sghir *y col.*, 2005; Briccoli-Bati *y col.*, 2006; Binet *y col.*, 2007; Grigoriadou *y col.*, 2007; Donini *y col.*, 2008 a; Brito *y col.*, 2009; Leva 2009; Chaari-Rkhis *y col.*, 2011). Sin embargo, el uso de esta citoquinina natural encarece los procesos de micropropagación haciéndolos inviables a nivel comercial (Rugini y Baldoni, 2005), por esta razón es importante estudiar cómo disminuir los requerimientos de Z en el medio de cultivo, sin afectar negativamente el proceso.

La combinación RZ-BAP ha dado buenos resultados, aumentando las tasas de proliferación, en el cv. Chondrolia Chalkidikis, de 4,2 con el uso de Z (20 μ M) a 6,8 cuando adicionaban BAP (1 μ M) como fase líquida en cultivos de doble fase (Grigoriadou *y col.*, 2002), y en el cv. Moraiolo, cuando añadían BAP (0,5 mg/l) al medio basal OM con Z

(3mg/l), respecto a la obtenida cuando se adicionaba sólo Z (3mg/l) (Ansar *y col.*, 2009a). En este trabajo, el uso combinado de RZ con BAP, produjo una reducción significativa de la tasa de proliferación del cv. Arbequina, con respecto al uso de RZ sola; además, el hecho de que no se observaran diferencias significativas entre todas las dosis de BAP testadas (0 - 17,6 μ M) parece indicar que sus efectos, si los hubo, fueron enmascarados por la acción del RZ.

La sustitución de la Z, por otras citoquininas sintéticas como la BAP, ha dado buenos resultados en los cultivares Domat y Memecik (Seyhan y Özzambak, 1994), “Kalamón” (Dimassi, 1999), “Galega Vulgar” (Peixe *y col.*, 2007) y “Rowghani” (Peyvandi *y col.*, 2009a), aunque ninguno de estos autores indica la edad ontogenética del árbol madre; sin embargo, la edad fisiológica de los dos últimos cultivares (8 y 4 años respectivamente) parece indicar que aunque se trate de material adulto, éste es relativamente joven y debe estar en buen estado fisiológico. En cuanto a los resultados obtenidos por Revilla *y col.* (1996) con el empleo de BAP (4,4 μ M) y AIB (0,05 μ M), para el cv. Arbequina, habría que destacar que sólo obtuvieron resultados positivos en la propagación de material juvenil, mientras que en el caso del adulto, solo observaron crecimiento cuando las secciones fueron microinjertadas *in vitro* sobre patrones juveniles. Por otro lado, los datos obtenidos en el cv. Galega Vulgar (Peixe *y col.*, 2007) pusieron de manifiesto que el empleo de BAP como único regulador de crecimiento, no fue suficiente para alcanzar las tasas de multiplicación obtenidas con el uso de Z (2,28 μ M), que sólo pudo igualarse combinando BAP (8,88 μ M) y leche de coco (50 ml l⁻¹); en este caso, es necesario tener en cuenta que la leche de coco es un complejo que incluye altos niveles de trans-zeatina y trans-ribósido de zeatina (Dix y Van Staden, 1982).

El uso de tidiazurón ha sido recomendado, para la micropropagación de especies leñosas recalcitrantes, por su capacidad de inducir gran proliferación de brotes axilares (Lu, 1993); en nuestro caso, la adición de TDZ al medio de cultivo RP no incrementó las tasas de

proliferación del cv. Arbequina, con respecto a las obtenidas utilizando solo RZ. El efecto inductor del TDZ, en la producción de brotes axilares, se ha observado con concentraciones inferiores a $1\mu\text{M}$ y también se ha indicado que la exposición a este regulador, durante largos periodos de tiempo, causa hiperhidricidad y desarrollo anormal de los brotes, lo que dificulta su posterior enraizamiento (Lu, 1993); en nuestro caso, y a pesar de que se utilizaron concentraciones elevadas ($1,1-8,8\mu\text{M}$) durante cuatro subcultivos, no se observaron casos de necrosis ni malformaciones de los brotes.

Aunque el uso del TDZ no está demasiado extendido en los protocolos de micropropagación del olivo; se ha utilizado en los cvs. Arbequina, Picual y Empeltre (García-Férriz *y col.*, 2003) obteniéndose tasas de multiplicación que fluctuaron entre 2,5 y 2,8 cuando se añadía TDZ ($1\mu\text{M}$) al medio OM suplementado con BAP ($1\mu\text{M}$). Por su parte, Roussos y Pontikis (2002) utilizaron RZ ($5,7\mu\text{M}$) y TDZ ($1\mu\text{M}$) alternativamente, para la multiplicación del cv. Koroneiki, sin que se produjera una disminución en las tasas de proliferación; sin embargo, la aplicación de este mismo sistema, en el cv. Arbequina, durante cuatro subcultivos sucesivos, sí redujo de forma significativa la tasa de multiplicación.

Las giberelinas pueden ser utilizadas para aumentar la longitud de los brotes durante la fase de proliferación; tal práctica resulta recomendable cuando el uso de elevadas concentraciones de citoquininas induce la producción de brotes de pequeño tamaño (Valles y Boxus, 1987). La capacidad de las giberelinas para inducir la elongación de los brotes (Little y McDonald, 2003) se ha puesto de manifiesto en el cv. Arbequina, en el que el uso combinado de RZ ($2,85\mu\text{M}$) y GA_3 ($2,17\mu\text{M}$) permitió reducir a la mitad la concentración estándar de RZ utilizada en el medio RP, manteniéndose las tasas medias de multiplicación por encima de 2 u.m; se trataría de un efecto sinérgico entre ambos reguladores puesto que en ausencia de RZ no se observó elongación de los brotes. Sin embargo, la adición de GA_3

(4,33 μM) al medio estándar RP no tuvo efectos positivos en la multiplicación del cv. Picual; esta concentración de giberelinas fue propuesta por Zacchini y de Agazio (2004) para el cv. Nebbiara, en el que obtuvieron brotes axilares de 2,57 cm de longitud tras 1 mes de cultivo de las secciones nodales en el medio de proliferación ZAD (formulación mineral OM adicionada con Z (13,68 μM), GA₃ (4,33 μM) y AIB (0,49 μM)). Esta respuesta cultivar-dependiente, a la incorporación de giberelinas al medio de cultivo, concuerda con lo observado en otros genotipos de olivo; así, la Z combinada con GA₃ mejoró la tasa de multiplicación en el cv. Chondrolia Chalkidikis (Grigoriadou *y col.*, 2002), mientras que en el cv. Kalamon (Dimassi, 1999), la combinación de GA₃ y BAP producía una reducción del número de brotes desarrollados, aunque no afectaba a la longitud media de los mismos. En el cv. Koroneiki, Donini *y col.* (2008b) observaron como la adición de GA₃ (10 μM) al medio de cultivo, producía tasas de supervivencia menores (53,5 %) a las obtenidas con solo Z (5-20 μM) (82,57 %). Por otro lado, Chaari-Rkhis *y col.* (2006) indujeron floración *in vitro*, en varios cultivares de olivo, con el uso de 10 mg/l de GA₃. En otras especies como *Larix decidua*, también se ha descrito un efecto negativo de las giberelinas GA₃ y GA₄₋₇ que causaban un gran declive en la viabilidad de los brotes generados, dicho efecto se potenciaba cuando eran utilizadas conjuntamente con zeatina (Ziauka y Kuusiene, 2009).

Los brasinosteroides son un grupo de reguladores de crecimiento con efectos específicos en la elongación celular, mediante la activación de expansinas, de forma análoga a la acción de auxinas, o activando la XTH (xiloglucanoendotransglicosilasa /hidrolasa) de forma análoga a las giberelinas (Taiz y Zieger, 2010). Asimismo, tienen un efecto específico en los procesos de división celular activando una ruta específica y pudiendo sustituir a las citoquininas (Taiz y Zieger, 2010).

Con respecto a su uso en cultivo *in vitro*, pueden promover la elongación de los brotes cuando se usan en pequeñas cantidades (0,1 μM - 1 μM) y en combinación con otros

reguladores de crecimiento; así, se ha descrito un comportamiento sinérgico de los BR cuando se aplican conjuntamente con giberelinas en los procesos de elongación de los segmentos de hipocótilo de frijol chino y de pepino (Gregory y Mandava, 1982; Katsumi, 1995). El uso de 27-epibrasinólido, junto con zeatina y GA₃, favorece la elongación de las hojas en brotes de *Capsicum annuum*, cvs. “Jupiter” y “Pimiento Perfection”, pero inhibe el desarrollo de los brotes; sin embargo, cuando se usa como único regulador de crecimiento produce elongación de los brotes en el primer cultivar y no se observaron efectos en el segundo (Franck-Duchenne *y col.*, 1998); en *Arachis hypogaea*, el uso de “brasin” (brassin 2, 3, 23β-tetrahidroxy- 24β-methyl-β-homo-7 oxa-5-cholestan-6-one) junto con BAP y ácido β-naftoxiacético, estimulaba el crecimiento de las yemas regeneradas a partir de cultivos de callo (Ponsamuel *y col.*, 1998), y en la micropropagación del híbrido FHIA-21 de banana (*Musa spp.*), tuvo un efecto positivo en todas las fases de la micropropagación, cuando se adicionaba conjuntamente con BAP, AIA y ANA (Jiménez-Terry *y col.*, 2001). Finalmente, Pereira-Netto *y col.* (2006) observaron que la adición de 28-homocatasterona a los medios de cultivo, estimulaba la elongación de los brotes de *Malus prunifolia* y que dicha elongación iba acompañada de un incremento en la producción de etileno.

En nuestro caso, la adición de 24-epibrasinólido (BR) al medio RP estándar (5,7 μM de RZ) produjo una reducción de las tasas de multiplicación del cv. Arbequina, a medida que se incrementaba la concentración de BR, llegando a ser tóxica si era utilizada a una concentración 3μM (necrosis del 80 %); sin embargo, cuando la concentración de RZ era menor a la estándar (2,85 μM vs. 5,7 μM), se producía un ligero aumento de la tasa de multiplicación al incorporar 0,01μM de BR.

V.2.4. Influencia de la fuente de hidratos de carbono

Otra diferencia importante entre los medios utilizados en la fase de proliferación, es la fuente de carbono; en nuestro caso, se utilizó manitol en los medios ZAD, RP y Px (0,2 M; 0,11 M y 0,165M respectivamente) y sacarosa en los medios RV y SS (0,09M en ambos casos), obteniéndose las mayores tasas de multiplicación con el medio RP, tal y como se ha señalado anteriormente (apartado V.2.2). Sin embargo, no se debería obviar la interacción fuente de carbono-sales minerales; así, mientras que el medio RP lleva las sales minerales DKWm, los medios ZAD y Px, menos efectivos en la multiplicación, llevan las sales OM. Por su parte, Leva *y col.* (1994) observaron en el cv. Maurino, que la longitud media de los brotes aumentaba de 3,9 cm a 4,6 cm, cuando la sacarosa (34 g/l) era sustituida por manitol a la misma concentración; estos mismos autores, tras estudiar la evolución de los explantos en el tiempo, determinaron que la exposición a elevadas concentraciones de sacarosa durante periodos prolongados reduce el metabolismo de los tejidos, mientras que el empleo de manitol, a largo plazo, incrementa las tasas de proliferación, la calidad y uniformidad del material. En el cv. Rowghani, Peyvandi *y col.* (2009a) también constataron que el uso de manitol en lugar de sacarosa, además de incrementar el crecimiento de brotes axilares, producía material más homogéneo y uniforme, con menor cantidad de callo basal. Este efecto positivo del manitol en los procesos de micropropagación del olivo, puede deberse a que es fácilmente asimilable y movilizado, al ser la principal forma de transporte de carbohidratos, vía floema, en esta especie (Conde *y col.*, 2007).

El manitol ha sido muy utilizado en el cultivo *in vitro* de diferentes cultivares de olivo: “Maurino” (Leva *y col.*, 1994); “Nocellara Etnea” y “Nocellara del Belice” (Cozza *y col.*, 1997); “Manzanillo” (García *y col.*, 2002b); “Koroneiki” (Roussos y Pontikis, 2002); “Nebbiara” (Zachini y De Agazio, 2004); “Rowghani” (Farahani *y col.*, 2008); “Frantoio”, “Piantone di Moiano” y “Rosciola” (Mendoza-de Gyves *y col.*, 2008) y “Raggia” (Varlaro *y*

col., 2009), entre otros. Finalmente, en el cv. Meski, Chaari y col. (2002) señalaron que la glucosa (30 g/l), como fuente de hidratos de carbono, mejora las tasas de multiplicación y la longitud de los brotes obtenidos en el medio OM suplementado con otros azúcares (30 g/l manitol; 30 g/l sacarosa ó 14 g/l manitol +8 g/l sacarosa + 8 g/l glucosa).

V.2.5. Efecto de la textura del medio

El cultivo alternado de secciones subapicales en medio líquido y con agitación (5 rpm) y posterior transferencia a medio sólido, produjo una notable mejora en las tasas de multiplicación del material juvenil de olivo, con respecto a las obtenidas en el medio sólido de la misma composición. Además, el mayor crecimiento observado no se debió sólo a un incremento en la elongación de los entrenudos, sino a un mayor número de nudos, que son la fuente de explantos para continuar el proceso de multiplicación. Este efecto positivo fue menos evidente en las secciones apicales, en las que, ni siquiera a las concentraciones más elevadas de BAP (4,4µM), se pudo romper la fuerte dominancia apical que presenta el olivo cuando se cultiva *in vitro*, ya descrita por otros autores (Rugini y Panelli 1993). No se observaron diferencias significativas, en cuanto a las tasas de multiplicación, entre las diferentes concentraciones de BAP (0 – 4,4µM) incorporadas al medio líquido, lo que indujo a pensar, que el efecto podría deberse a que la textura del medio permite una mayor superficie de contacto con el explanto, de manera que se producía una mayor absorción de nutrientes y reguladores de crecimiento y una mejor oxigenación (George, 1993). Sin embargo, a las mayores concentraciones de BAP (4,4 µM), se observó la aparición de síntomas de hiperhidricidad, fenómeno que describió Gaspar (1991) como un problema que afecta a los cultivos en medio líquido, especialmente cuando poseen elevadas concentraciones de citoquininas. No obstante, en olivo se observó cómo los problemas de hiperhidricidad desaparecieron cuando los explantos se transfirieron a medio sólido. La

aparición de hiperhidricidad ya se había descrito en el cv. Chondrolia Chalkidikis cuando se cultivaba en medio líquido (WPM) con elevadas concentraciones de reguladores de crecimiento [Z (20 μ M), GA (10 μ M) y ANA (0,3 μ M)] (Grigoriadou y col., 2007); estos autores describen graves malformaciones en las hojas, a saber, hojas más delgadas, parénquima en empalizada con una sola capa, parénquima esponjoso con grandes espacios intercelulares y cavidades subestomáticas llenas de una sustancia mucilaginosa de tipo fibrilar, que taponaba la abertura estomática; además, afirman que aunque los síntomas de la hiperhidratación no sean siempre visibles a nivel macroscópico, son responsables de la mayoría de los problemas de aclimatación y supervivencia que presentan las plántulas tras el cultivo en medios líquidos. Resultados similares se han observado en aguacate (Barceló-Muñoz, 1995) y otras especies como *Prunus tenella* (Bouza y col., 1997) y *Centaurea erythraea* (Piatczak y col., 2005) tras el uso de medios líquidos, aunque las malformaciones desaparecían cuando los cultivos se pasaban a medios sólidos sin hormonas.

El sistema de rotación, también juega un papel importante porque impide que los explantos estén continuamente sumergidos; así en el cultivo *in vitro* de piña (*Ananas comosus*), Firoozabady y Guttererson (2003) observaron mayores tasas de crecimiento con el empleo de medios líquidos, pero si el explanto permanecía totalmente sumergido se presentan elevadas tasas de necrosis y reducción del crecimiento de los brotes desarrollados, por lo que los autores propusieron el uso de un biorreactor con un sistema de agitación; otra estrategia para evitar que los explantos se sumerjan en el medio líquido es el uso de soportes de celulosa (Prasad y Dutta- Gupta, 2006). El medio líquido ha sido utilizado con éxito para mejorar la fase de multiplicación en diversas especies como *Camelia sinensis* (Sandal y col, 2001); *Drosera anglica* y *D. binata* (Kawiak, 2003) y *Gladiolus hybridus* (Prasad y Dutta-Gupta 2006), entre otras.

La inclusión de una capa de medio líquido sobre una base solidificada con agar, es un tratamiento que mejora el crecimiento de las plantas cultivadas *in vitro* (Maene y Debergh, 1985; Molnár, 1987); de hecho, esta técnica ha sido usada con éxito en los protocolos de micropropagación de diferentes especies leñosas como *Coryllus avellana* (Díaz-Sala y col., 1990a), *Pyrus communis* (Rodríguez y col., 1991), *Quercus suber* (Romano y col., 1992), *Persea americana* (Barceló-Muñoz y col., 1999), *Pyrus pyrifolia* (Kadota y col., 2001) y *Vitis vinifera* (Couselo y col., 2006), entre otras. En *Chimonantus praecox*, además del incremento en las tasas de proliferación, se produjo una reducción de los problemas de necrosis apical que se observaban tras el cultivo en medio sólido (Kozomara y col., 2008).

En este trabajo se observó, por primera vez, cómo el empleo de medios de doble fase produjo un aumento significativo de las tasas de multiplicación *in vitro* del cv. Picual, con respecto al uso del medio RP sólido; además, este efecto positivo se observó en todos los tratamientos independientemente de la concentración de RZ en la fase líquida, aunque los mejores resultados (2,3 u.m) se obtuvieron cuando las concentraciones de RZ fueron de 2,85µM y 0,58µM en las fases sólida y líquida respectivamente; por tanto, el empleo de medios de DF permite obtener mayores tasas de multiplicación con concentraciones de RZ inferiores a la estándar de Roussos y Pontikis (2002).

No se observaron diferencias en la morfología de los cultivos desarrollados en los medios de doble fase, sólo se constató una mayor longitud de los brotes en relación a los obtenidos en medio sólido; por el contrario, en *Persea americana*, de la Viña y col. (2001), observaron que el material cultivado en medio de doble fase presentaba un brote principal con brotes axilares a lo largo de su eje, cuyo tamaño decrecía de la base al ápice; por el contrario, aquéllos que crecían en medio sólido sólo desarrollaron brotes axilares en la zona basal, además, en estas condiciones, el 30 % de los cultivos presentaban síntomas de necrosis apical tras 3 subcultivos; estas diferencias en los patrones de proliferación observados fueron

atribuidos a diferencias en el potencial hídrico de los medios de cultivo. En esta misma especie, Pliego-Alfaro *y col.* (1987) observaron que el cultivo continuado en condiciones de doble fase producía hiperhidricidad y un deterioro en el aspecto de los brotes y por consiguiente una reducción en las tasas de crecimiento; en el caso del cv. Picual, tras 7 subcultivos sucesivos en medio de doble fase, no se observaron síntomas de hiperhidricidad; por el contrario, el aspecto de los cultivos mejoró notablemente con respecto a los brotes que crecían en medio sólido, que presentaban hojas de aspecto clorótico. El efecto positivo de los medios de doble fase sobre las tasas de proliferación se ha atribuido a la mayor disponibilidad de nutrientes y hormonas en la fase líquida (Smith y Spomer, 1995); por otra parte, Viseur (1987) observó que, al final del periodo de subcultivo, se producía un incremento del pH de los medios de doble fase, mientras que cuando el medio era sólido, el pH desciende en este mismo periodo.

V.3. FASE DE ENRAIZAMIENTO

V.3.1. Enraizamiento *in vitro*

En este trabajo se testaron dos sistemas de enraizamiento, uno de ellos propuesto por Cañas *y col.*, (1987) en el que la fase de inducción (14 días) de los primordios radiculares se realiza en el medio OMr [$^{1/2}$ sales minerales OM (Rugini, 1984) con AIB (4,9 μ M)] y la fase de elongación de las raíces se realiza, en ausencia de auxina, en el medio OMe [$^{1/4}$ sales minerales OM y Z (6,8 μ M)], durante 6 semanas más; por el contrario, en el protocolo, propuesto por Revilla *y col.* (1996), los brotes se cultivan en medio RVr [$^{1/2}$ sales minerales DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) y AIB (0,49 μ M)] y se incuban una semana en oscuridad, seguida de 7 semanas en condiciones de luz.

En el cv. Arbequina se observó una respuesta diferente a ambos métodos, relacionada con el estado ontogenético del material de partida. Así, para el material juvenil, el sistema

propuesto por Cañas *y col.* (1987) resultó ser más efectivo que el de Revilla *y col.* (1996), lo que se reflejó en los porcentajes de enraizamiento y en el número de raíces desarrolladas en cada caso (94 % y 3 raíces/brote enraizado y 62 % y 2 raíces/brote enraizado, respectivamente). El mayor número de raíces en el medio OMr, puede ser debido a la retirada de la auxina en la segunda fase del proceso de enraizamiento, ya que la presencia de auxina, que en un primer momento activaría la producción de los primordios radiculares, posteriormente inhibiría su elongación (De Klerk *y col.*, 1999). Por el contrario, el material adulto respondió mejor a la exposición a bajas concentraciones de AIB (0,49 μM) mantenida durante todo el proceso, obteniéndose porcentajes de enraizamiento del 71 % y 37 % en los métodos RVr y OMr, respectivamente. En general, el material juvenil se muestra menos dependiente, de la cantidad de auxina utilizada en la fase de enraizamiento, que el material adulto (Davies y Joiner, 1980), porque la concentración de auxina endógena es superior en la base de estaquillas juveniles en relación a las adultas (Osterc *y col.*, 2009); sin embargo, tal y como se ha señalado anteriormente, el material adulto del cv. Arbequina responde mejor a concentraciones bajas de auxina durante largo tiempo. Por otra parte, para el material adulto, la exposición durante 8 semanas a concentraciones de AIB (4,9 μM) en el medio RVr, no elevó el número de estaquillas enraizadas sino que solo estimuló la producción de callo basal (datos no mostrados), un proceso que, en algunas especies, ha estado asociado a la aparición de raíces, mientras que en otras, se ha observado el efecto contrario (Hartmann *y col.*, 2011); en cualquier caso, es necesario tener en cuenta que hay otros factores endógenos en la estaquilla, diferentes a la auxina, que pueden favorecer (Kling *y col.*, 1988) o inhibir el enraizamiento (Cuir *y col.*, 1993; Paton *y col.*, 1970).

La capacidad de enraizamiento del material adulto rejuvenecido del cv. Arbequina, se testó en el medio RVr, en dos momentos diferentes del proceso de rejuvenecimiento; inicialmente, se utilizaron brotes recién emergidos de las yemas microinjertadas y

posteriormente, brotes obtenidos tras la aclimatación, mantenimiento en invernadero y reintroducción *in vitro*, de las plantas resultantes. La capacidad de enraizamiento, de los brotes procedentes directamente de los microinjertos se incrementó progresivamente a medida que aumentaba el número de microinjertos sucesivos, desde el 13 % para el primer microinjerto hasta el 61,5 % en el quinto microinjerto. Estos datos concuerdan con lo observado en otros casos en los que también se ha usado esta técnica, aunque los resultados obtenidos dependen de la especie en cuestión; así, en *Ziziphus mauritiana* (Danthu y col., 2004) el porcentaje de enraizamiento de las estaquillas era del 4 %, 29 % y 40 % para el primer, segundo y tercer ciclo de microinjerto respectivamente; en *Faidherbia albida*, Danthu y col. (2002) consiguieron la restauración total de la capacidad de enraizamiento tras cuatro ciclos de microinjertos sucesivos; en *Garcinia indica*, tras la realización de cinco microinjertos se consiguió aumentar hasta un 75% la capacidad de enraizamiento *in vitro* de brotes, que no enraizaban antes de ser microinjertados (Chabuskwar y Deodhar, 2006); en *Sequoia sempervirens*, Huang y col. (1992b) observaron cómo la capacidad de enraizamiento *in vitro* aumentó desde el 22 % para el material adulto hasta el 100 % para el cuarto y quinto microinjerto; finalmente, en *Citrus reticulata*, la capacidad de enraizamiento aumentó de forma progresiva hasta alcanzar valores de 45 %, 50 % y 69 % para el quinto, sexto y séptimo microinjerto, respectivamente (Huang y col., 1992a). Por el contrario, en *Juglans regia* (Dolcet-San Juan y col., 2004) y *Castanea sativa* (Fernández-Lorenzo y Fernández-López, 2005) no se logró aumentar la capacidad de enraizamiento *in vitro* de los brotes tras la realización de dos y tres microinjertos seriados, respectivamente.

Por otra parte, es interesante señalar que se han encontrado diferencias de comportamiento entre cultivares de una misma especie; así, en aguacate, un solo ciclo de microinjerto fue suficiente para alcanzar el 50 % de enraizamiento del portainjerto Duke-7 (Pliego-Alfaro y Murashige, 1987) mientras que para el portainjerto GvarAm-13, fueron

necesarios 13 microinjertos sucesivos sobre patrones juveniles para obtener un 56 % (Barceló-Muñoz y col., 1990); en *Hevea brasiliensis*, Perrin y col. (1997) consiguieron aumentar hasta el 60 % el porcentaje de enraizamiento del clon PB 235 con un solo ciclo de microinjerto y hasta un 34 % el del clon GT1 tras seis microinjertos sucesivos; finalmente, tras la realización de tres microinjertos sucesivos, se obtuvieron porcentajes de enraizamiento del 70 %, 60 % y 50 % para los cultivares de *Annona cherimola* "Fino de Jete", "Bonita" y "Pazicas", respectivamente (Padilla y Encina, 2011).

La evaluación de la capacidad de enraizamiento del material obtenido tras la reintroducción *in vitro* del material procedente de los distintos microinjertos, produjo resultados muy interesantes; así, el porcentaje de enraizamiento fue superior en el material rejuvenecido (> 90%) que en el adulto (71 %). Sorprendentemente, no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de enraizamiento de las plantas microinjertadas diferente número de veces, de manera que las diferencias observadas entre los distintos ciclos de microinjertos antes del proceso de aclimatación, desaparecieron cuando las plantas se mantenían creciendo en invernadero. Estos datos concuerdan con lo observado, en el mismo cultivar, por Revilla y col. (1996), quienes encontraron que el primer microinjerto aumentó el porcentaje de enraizamiento *in vitro* del 2 % al 50 % (material adulto vs. material microinjertado); el segundo ciclo de microinjerto no produjo un aumento adicional del porcentaje de enraizamiento de los brotes obtenidos, sin embargo, cuando estos brotes eran enraizados y aclimatados y se mantenían creciendo en invernadero, las microestaquillas derivadas de ellos mostraban porcentajes de enraizamiento *in vitro* próximos al 100 %. En esta misma línea, Ewald y Kretzschmar (1996) alcanzaron porcentajes de enraizamiento del 50 % en material procedente de un árbol de *Larix decidua* de 140 años, que había sido microinjertado, aclimatado y reintroducido *in vitro*, mientras que las estaquillas procedentes del árbol madre no enraizaron.

En este trabajo también se han observado diferencias en la capacidad de enraizamiento entre los dos cultivares evaluados; así, el cv. Arbequina mostró mejor comportamiento en el medio RVr (71%) que en OMr (37 %), mientras que en el cv. Picual se obtuvieron resultados opuestos. Se observó, además, un comportamiento errático de ambos cultivares en los medios menos adecuados, de manera que durante las tres repeticiones del experimento los porcentajes de enraizamiento oscilaron entre el 30 % - 70 % para el cv. Arbequina (medio OMr) y entre el 10 % -76 % para el cv. Picual (medio RVr); estos resultados estarían de acuerdo con Rugini y Fedeli (1990), quienes señalaron que el olivo presenta resultados inconsistentes en cuanto a capacidad de enraizamiento, incluso con el empleo de la misma técnica; en base a nuestros resultados, podríamos añadir que este hecho se acentúa cuando los medios de cultivo no son los más adecuados.

V.3.2. Enraizamiento *ex vitro*

Para el enraizamiento *ex vitro* del material juvenil se utilizó la concentración de auxina recomendada por Caballero (1981) y Caballero y del Río (1994) para la propagación, mediante estaquillado semileñoso de árboles adultos, y aunque este material está más lignificado que el procedente de cultivo *in vitro*, no se observaron casos de necrosis u otros daños fisiológicos en las microestaquillas. A esta concentración de AIB (14,8 mM $\approx$ 3 g/l), los porcentajes de enraizamiento fueron superiores ($\approx$ 90 %) a los obtenidos para el material adulto ($\approx$ 77 %).

Los resultados en el enraizamiento *ex vitro* del material adulto, pusieron de manifiesto un comportamiento estacional reflejado en la respuesta a concentraciones crecientes de auxina. Así, durante los meses de otoño las microestaquillas del cv. Arbequina alcanzaron porcentajes de enraizamiento elevados, incluso en ausencia de auxina exógena (70 %) y además, la presencia de este regulador no incrementó significativamente este parámetro; sin

embargo, durante el mes de Marzo se produjo un descenso del número de estaquillas enraizadas en todas las dosis testadas, mientras que, a finales de primavera (estaquillas de Junio), el porcentaje de enraizamiento volvió a aumentar y se mostró independiente de la cantidad de auxina utilizada. La buena capacidad de enraizamiento obtenida en ausencia de auxina, podría deberse a que el material procedía de stocks *in vitro* en proliferación activa, y por lo tanto, en muy buen estado fisiológico. Los porcentajes de enraizamiento obtenidos en este trabajo, coinciden con los valores estipulados para este cultivar (78 %) por del Río y Caballero (2005a), con material procedente del BMGO (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA).

El material adulto de “Picual” mostró un comportamiento similar, presentando los mayores porcentajes de enraizamiento en los meses de otoño y observándose un descenso en el invierno, época en la que, además, el material no responde ni siquiera a las mayores concentraciones de auxina. Para este cultivar, los porcentajes de enraizamiento obtenidos *ex vitro* ($\approx 80\%$), fueron superiores a los obtenidos *in vitro* ($\approx 60\%$ en el mejor de los casos) y se asemejan a los datos publicados en el “Catálogo de las Variedades de Olivo en España”, en el que se considera al cv. Picual como una variedad de fácil enraizamiento (del Río y Caballero, 2005a). En otras especies como *Siratia grosvenorii* (Yan y col., 2010), también se observó un mejor comportamiento de las plántulas cuando las microestaquillas se enraizaban *ex vitro*, lo que se tradujo en un aumento de las tasas de supervivencia al transplante porque las plántulas así obtenidas no presentaban callo en su base y poseían raíces secundarias.

El efecto de la época del año en la capacidad de enraizamiento de estaquillas de olivo, ya fue observado por Hartman y Loreti (1965), quienes señalaron que el periodo primavera-verano era mejor que el de otoño-invierno; en esta línea, del Río y Caballero (2005a) añadieron que la capacidad de enraizamiento era mínima durante la fase de reposo invernal. No obstante, del Río y col. (1991) señalan que el tipo de ramo utilizado puede modificar

dicha pauta, ya que las estaquillas tomadas de setos vigorosos, proporcionan elevados porcentajes de enraizamiento prácticamente durante todo el año. En nuestro caso, las estaquillas provenían de stocks mantenidos *in vitro*, en crecimiento activo, aunque en estos materiales también se han descrito comportamientos estacionales; así, en los cvs. Frantoio, “Dolce Agogia” y “Moraiolo”, Mencuccini (2003) observó que los porcentajes de enraizamiento *in vitro*, en los tres casos, eran menores en el mes de Enero, incrementándose progresivamente en Mayo para alcanzar los valores máximos en Septiembre. Por su parte, Leva (2011), con objeto de obtener respuestas más uniformes en el enraizamiento *ex vitro* de material micropropagado, utilizó ANA (2,7 mM) e incubación en condiciones de luz continua, constatando diferencias de comportamiento según el genotipo; así mientras que en los cvs. Coratina, “Maremmano”, “Maurino”, “Picholine” y “S. Francesco” se obtuvieron porcentajes de enraizamiento que oscilaban entre 62 % - 76 %, en los cvs. Correggiolo y “Frantoio” los valores obtenidos fueron del 28 % y 40 %, respectivamente.

Finalmente, aunque el enraizamiento *ex vitro* no es una práctica común en los procesos de micropropagación de olivo, en este trabajo ha quedado demostrado que el proceso es más efectivo que el enraizamiento *in vitro*, ya que permite llevar a cabo simultáneamente los procesos de enraizamiento y aclimatación.

V.4. ESTABILIDAD GENÉTICA Y PRECOCIDAD DE ENTRADA EN PRODUCCIÓN DEL MATERIAL PROCEDENTE DE LOS MICROINJERTOS SERIADOS

V.4.1. Efecto de los microinjertos sucesivos en la estabilidad genética

Un problema, señalado por Ponsoby y Mantell (1993), en la utilización del injerto como sistema de propagación, sería la posible confusión entre los brotes procedentes del

patrón y de la variedad; en el caso de los cítricos, se ha propuesto el empleo de patrones con hojas trifoliadas (“Troyer”, “Carrizo” y “Sacaton”), que son fácilmente distinguibles de la variedad (Edris y Burger, 1984). En nuestro caso, y no existiendo marcadores morfológicos, se utilizaron como patrones los hipocótilos de plántulas de semilla germinadas *in vitro*; sin embargo, la emergencia de brotes por debajo de la zona de inserción entre el patrón y la púa, de naturaleza adventicia, hizo necesario examinar los cultivos periódicamente durante las primeras semanas para eliminarlos.

Por otra parte, el cultivo *in vitro* puede generar variabilidad genética en las plantas micropropagadas (Larkin y Scowcroft, 1981), y como señalaron Rani y Rania (2000), un protocolo de micropropagación sólo puede ser utilizado con fines comerciales cuando, tras el análisis de las plantas micropropagadas, se descarte la producción de variaciones somaclonales. De esta manera, la evaluación de las plantas procedentes de los microinjertos se realizó desde diferentes puntos de vista: por una parte se analizaron a nivel genético, utilizando como marcadores los SSRs; y por otro, se tuvo en cuenta su comportamiento agronómico, tras un año del transplante a campo.

Los microsatélites (SSRs) son uno de los marcadores más utilizados hoy en día en la identificación varietal (Ortiz y col., 2000), por presentar características como el ser codominantes, polimórficos y reproducibles. Además, de entre las técnicas de identificación molecular más empleadas en olivo (RAPDs, AFLPs y SSRs), Belaj y col., (2003) determinaron que, aunque con las tres técnicas fueron capaces de discriminar entre 32 genotipos muy eficientemente, solo con los SSRs fueron capaces de diferenciar los cultivares italianos “Frantoio” y “Cellina”, que se encuentran genéticamente emparentados; el poder de discriminación de los SSRs es elevado, de manera que se han utilizado también para la realización de test de paternidad de determinados individuos procedentes de semilla utilizados en los procesos de mejora (de la Rosa y col., 2004). El análisis genético de los

individuos procedentes de los microinjertos se realizó utilizando 6 marcadores SSRs; dichos marcadores se encuentran en la lista de los 9 SSRs usados en la certificación varietal de olivo por el BMGO (Ojeda *y col.*, 2006). Con los seis primers utilizados no se detectaron diferencias entre el árbol madre adulto y los individuos procedentes de los microinjertos sucesivos; además, el tamaño de los fragmentos de amplificación obtenidos se encuentra dentro del rango establecido para este cultivar por Sefc *y col.* (2000) (para los loci DCA-3; DCA-9; DC-A15; DCA-16 y DC-A18) así como por Cipriani *y col.* (2002) (para el loci UDO-043). Estos resultados no excluyen la existencia de otro tipo de variaciones en el genoma nuclear, pero considerando que las características morfológicas y el comportamiento agronómico de las plantas procedentes de los microinjertos fue similar al de las plantas obtenidas mediante estaquillado semileñoso a partir del mismo árbol donador, podríamos afirmar que la técnica del microinjerto sucesivo *in vitro* no generó variabilidad entre las plantas obtenidas por este sistema. Estos resultados concuerdan con lo observado previamente tanto en “Arbequina” (García-Férriz *y col.*, 2001) como en otros cultivares de olivo, tales como “Maurino” (Leva *y col.*, 2002; 2003; Leva y Petruccelli, 2012), “Picual” y “Empeltre” (García-Férriz *y col.*, 2001), en los que se constató que las plantas micropropagadas mediante inducción de brotes axilares no mostraban diferencias en el patrón de bandas (RAPDs) con respecto a la planta madre; igualmente, en *Olea maderensis* y *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*, no se encontraron diferencias en los niveles de ploidía ni en las secuencias génicas analizadas mediante SSR, entre la planta madre y la descendencia micropropagada (Brito *y col.*, 2010). Leva (2009) se basó solamente en criterios morfológicos, hábitos de crecimiento y productividad, para afirmar que las microplantas del cv. Maurino, producidas por inducción de yemas axilares, estaban dentro de tipo; sin embargo, utilizando este mismo sistema de evaluación sí detectaron variaciones entre las plantas producidas por embriogénesis somática, afirmando que la variabilidad producida

depende del método de micropropagación utilizado. El criterio morfológico, como único parámetro de evaluación, no debería ser considerado, puesto que el aspecto de las plantas puede estar influenciado por las condiciones de cultivo (García *y col.*, 2002b; Peyvandi, 2009b). Sin embargo, en los cultivares Zard y “Rowghani” (Yari *y col.*, 2011a; Farahani *y col.*, 2011b) y “Dezful” (Peyvandi *y col.*, 2009b; Yari *y col.*, 2011b; Farahani *y col.*, 2011c), se detectaron diferencias morfológicas entre los individuos micropropagados, relacionadas con el número y forma de las hojas, longitud de los entrenudos, número y longitud de los brotes axilares y capacidad de enraizamiento, tras permanecer durante varios meses en condiciones *in vitro*; por otra parte, y aunque estas diferencias eran mayores a medida que se incrementaba el número de subcultivos (Peyvandi, 2009b), el momento de su aparición dependía de cada cultivar (Yari *y col.*, 2011a). Las diferencias morfológicas observadas, se correspondían con diferencias a nivel genético; así, ninguna de las plantas analizadas fue exactamente igual, en relación al patrón de bandas obtenido mediante RAPDs, a la planta madre (Peyvandi *y col.*, 2009b; Farahani *y col.*, 2011c).

V.4.2. Efecto de los microinjertos sucesivos en la entrada en producción

Una vez descartada la existencia de variaciones genéticas, con respecto a los marcadores utilizados en este trabajo, entre las plantas obtenidas tras el proceso de rejuvenecimiento *in vitro* por microinjertos sucesivos, éstas se mantuvieron en invernadero climatizado y se establecieron como árboles cabeza de clon, para ser propagadas por estaquillado semileñoso. El comportamiento de las plantas así obtenidas, se comparó con el de plántulas procedentes de estaquillado semileñoso del árbol madre adulto original. Una vez aclimatadas, y tras 1,5 años de permanencia en invernadero, cuando las plantas tenían un metro de altura, fueron plantadas en campo para evaluar su comportamiento agronómico.

Los resultados han mostrado que, al año de la plantación en campo, no existían diferencias significativas entre tratamientos para ninguna de las variables estudiadas (floración, producción, vigor, tasa de crecimiento), lo que indica que, en las condiciones de nuestro ensayo, todos los tratamientos han mostrado una pauta similar en parámetros de crecimiento y precocidad de entrada en producción. En cuanto a la cantidad de fruto, los valores fueron similares en todos los casos y aunque las diferencias no eran significativas, los árboles procedentes de los microinjertos produjeron más, en valor absoluto, que las plantas controles (0,1454 kg y 0,2975 kg para las plantas controles y del 3º microinjerto, respectivamente); estas cantidades, siendo bajas, concuerdan con los resultados obtenidos por Briccoli-Bati *y col.* (2002) en el cv. Nocellara Etnea, del que se recolectaron 0,15 kg/árbol y 1,48 kg/árbol en el segundo y tercer año, respectivamente, y el cv. Carolea, que no comenzó a producir hasta el tercer año (0,18 kg/árbol) de su establecimiento en campo.

“Arbequina” está considerada como una variedad de precoz entrada en producción, entre 2-3 años dependiendo de las condiciones ambientales de cultivo y considerando el 1º año productivo cuando se obtienen entre 1-2 kg por árbol (del Río *y col.*, 2005b). Es decir, desde un punto de vista agronómico, las bajas producciones obtenidas, harían recomendable esperar al año siguiente para decir que estas plantas han entrado en producción; no obstante, a efectos de los objetivos del ensayo, el que no se observen diferencias respecto al control sugiere que no deben aparecer diferencias a posteriori. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos en otros cultivares de olivo, como “Maurino” (Leva *y col.*, 2002; 2003), “Nocellara Etnea” y “Carolea” (Bricoli- Bati *y col.*, 2002), en los que se observó que su propagación mediante brotes axilares no alteraba la entrada en producción de las plantas obtenidas. Por su parte, Rugini *y col.*, (1995) describieron un componente varietal en el comienzo de la floración en plantas micropropagadas; así, observaron que las plantas de “Canino” florecían masivamente tras 18-20 meses en condiciones de campo, mientras que el

cultivar Dolce Agogia era más tardío; resultados similares se observaron en los cultivares Nocellara Etnea y “Carolea” (Briccoli-Bati *y col.*, 2006)

En otras especies, en las que también se ha evaluado el comportamiento agronómico de las plantas micropropagadas frente a las obtenidas por métodos clásicos de propagación vegetativa, se han observado diferencias notables; así, plantas de *Prunus armeniaca*, obtenidas *in vitro*, eran más vigorosas, entraban antes en producción y producían más cantidad de fruto, que las plantas de la misma edad producidas por métodos de injerto tradicionales (Pérez-Tornero *y col.*, 2006); en *Sorbus aucuparia* (Chalupa, 2002), el crecimiento de las plantas micropropagadas fue similar a aquéllas que procedían de semilla; por otra parte, las mayores tasas de crecimiento observadas en las plantas micropropagadas de *Vaccinium macrocarpon* fueron atribuidas, por Debnath (2008), al efecto rejuvenecedor de la zeatina presente en los medios de proliferación.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que las plantas de olivo, cv. Arbequina, obtenidas tras la aplicación del método de rejuvenecimiento de microinjertos sucesivos *in vitro*, no presentan características juveniles ni retraso en su entrada en producción respecto a las obtenidas por estaquillado convencional, a partir del mismo árbol madre.

VI. CONCLUSIONES

1- Se ha establecido un protocolo para la micropropagación de olivo juvenil, constatándose la alta capacidad morfogénica de este material y el buen comportamiento en cada una de las fases del proceso, destacando lo siguiente:

- El establecimiento *in vitro* puede llevarse a cabo en el medio RV (Revilla y col., 1996) con resultados satisfactorios en brotación de yemas y elongación de brotes, sin que sean relevantes en este material problemas tales como contaminaciones endógenas, presencia de compuestos fenólicos o necrosis de los cultivos.
- Se pone de manifiesto la gran dominancia apical de este material *in vitro* y aunque la BAP, a las concentraciones testadas, no es capaz de romperla, las tasas de multiplicación obtenidas son buenas, sin necesidad de añadir Zeatina o Ribósido de zeatina al medio de cultivo.
- Los resultados en multiplicación se pueden mejorar tras la decapitación de los brotes y cuando el cultivo en medio sólido se alterna con el cultivo en medio líquido con agitación en rotor, durante 2 semanas.
- El enraizamiento puede realizarse tanto *in vitro* como *ex vitro* y, en ambos casos, los porcentajes de enraizamiento obtenidos son muy elevados, 95-100 %.

2- La evaluación del comportamiento del material adulto, de los dos cultivares estudiados, ha puesto de manifiesto diferencias entre ellos y con el material juvenil, así:

- El establecimiento *in vitro* de material adulto puede llevarse a cabo, al igual que el material juvenil, en el medio RV (Revilla y col., 1996), aunque requiere tiempos superiores de respuesta.
- El origen del explanto en el árbol madre es determinante para el éxito de la fase de

establecimiento de los cultivos asépticos en ambos cultivares, siendo explantos adecuados para el inicio, las secciones nodales procedentes de brotes epicórmicos inducidos en las ramas intermedias, o procedentes de ramas brotadas en la base del tronco, tras una poda severa.

- Se ha puesto de manifiesto la dependencia del uso de Ribósido de Zeatina en la fase de proliferación *in vitro* de ambos cultivares, y la mayor capacidad de multiplicación del cv. Arbequina frente al cv. Picual.
- Las tasas de multiplicación pueden ser incrementadas en el material adulto del cv. Arbequina con la adición de GA₃ al medio. En el cv. Picual, que no responde a este regulador, se observa un notable aumento de la proliferación con el empleo de medio de doble fase.
- Los requerimientos para el proceso de enraizamiento difieren para ambos cultivares, así en “Arbequina” se obtienen mejores porcentajes de enraizamiento y un comportamiento más uniforme, tras la exposición durante todo el proceso a bajas concentraciones de auxina e incubación en oscuridad, durante la primera semana del cultivo; mientras que “Picual” requiere la exposición a concentraciones elevadas de auxina durante dos semanas, seguido del cultivo en ausencia de auxina.
- En ambos cultivares se ha observado un buen comportamiento en el enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas procedentes de los stocks de proliferación, constatándose un efecto estacional, con un aumento de los porcentajes de enraizamiento a partir del mes de mayo, alcanzándose los valores máximos durante el otoño y produciéndose una caída en invierno.

3- Es posible obtener cierto grado de rejuvenecimiento, en material adulto de olivo, tras la realización de microinjertos sucesivos *in vitro*, y el proceso de rejuvenecimiento afecta de distinta forma a diferentes características o comportamientos del material.

- Los microinjertos sucesivos *in vitro* no producen alteraciones genéticas detectables, con los marcadores utilizados, en las plantas resultantes.
- El microinjerto no tuvo efectos positivos en las fases de establecimiento ni multiplicación *in vitro*.
- El porcentaje de enraizamiento *in vitro* de los brotes procedentes de las secciones nodales microinjertadas, aumenta con el número de ciclos de microinjerto. Dichas diferencias desaparecen tras la aclimatación y reintroducción *in vitro* de las plantas rejuvenecidas, alcanzándose en todos los casos porcentajes de enraizamiento propios del material juvenil.
- No se observaron diferencias en el comportamiento en campo, entre las plantas procedentes de las plantas rejuvenecidas y las procedentes del material adulto; aunque las diferencias no fueron significativas, el vigor de las plantas rejuvenecidas fue superior al del material adulto. Tras un año de su establecimiento en campo, tanto las plantas adultas, como las rejuvenecidas entraron en producción.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- **Abousalim, A. y Mantell, S.H. 1992.** Micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Mateur). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29: 231-234.
- **Abu-Qaoud, H. 2005.** Germination of “Arbequina” olive seeds as affected by chemical scarification, hot water treatment and endosperm tissue. *Jordan Journal of Agricultural Science*, 1 (1): 12-17.
- **Acebedo, M.M.; Lavee, S.; Liñán, J. y Troncoso, A. 1997.** *In vitro* germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Scientia Horticulturae*, 69: 207-215.
- **Aftab, F.; Mansouri, K. y Preece, J.E. 2005.** The influence of environment, media, and zeritol on forcing and *in vitro* establishment of softwood shoots from large stem segments of *Acer saccharinum* L. and *Fraxinus pennsylvanica* Marsh. *Propagation of Ornamental Plants*, 5:113-118.
- **Amo-Marco, J.B.; Vidal, N; Vieitez, A.M. y Ballester, A. 1993.** Polypeptide markers differentiating juvenile and adult tissues in chesnut. *Journal of Plant Physiology*, 142: 117-119.
- **Andrés, H.; Fernández, B.; Rodríguez, R. y Rodríguez, A. 2002.** Phytohormone contents in *Corylus avellana* and their relationship to age and other developmental processes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 173-180.
- **Ansar, A.; Touqeer, A.; Abbasi, N.A. y Hafiz, I.A. 2009a.** Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultivar ‘Moraiolo’. *Pakistan Journal of Botany*, 41 (2): 783-795.
- **Ansar, A.; Touqeer, A.; Abbasi, N.A. y Hafiz, I.A. 2009b.** Effect of different concentration of auxins on *in vitro* rooting of olive cultivar ‘Moraiolo’. *Pakistan Journal of Botany*, 41 (3): 1223-1231.
- **Anselmini, J.I. y Zanette, F. 2008.** Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. *Ciencia Rural*, 38: 967-973.
- **Arrillaga, I.; Marzo, T. y Segura, J. 1991.** Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 341-348.
- **Asai, K.; Satoh, N.; Sasaki, H.; Satoh, H. y Nagato, Y. 2002.** A rice heterocronic mutant, mori 1, is defective in the juvenile-adult phase change. *Development*, 129: 265-273.
- **Bajarczuk, K. 1983.** Propagation of green magnolia cuttings using various rooting stimulants. *Plant Propagator*, 29 (1): 4-7.
- **Ballester, A.; Sánchez, M.C.; San José, M.V.; Vieitez, J.V. y Vieitez, A.M. 1990.** Development of rejuvenation method for *in vitro* stablishment, multiplication and rooting of mature trees. En: *Plant Aging: Basics and Applied Approaches*. R. Rodríguez; R. Sánchez-Tamés y D.J. Durzan (eds). Springer-Verlag, US, pp: 43-49.
- **Barceló-Muñoz, A. 1995.** Micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.). Aspectos histológicos del proceso de vitrificación. Tesis doctoral.Universidad de Málaga.
- **Barceló-Muñoz, A.; Encina, C.L.; Simón-Pérez, E. y Pliego-Alfaro, F. 1999.** Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58 (1): 11-17.

- **Barceló-Muñoz, A.; Pliego-Alfaro, F. y Soria-Torres, J.T. 1990.** Restauración de la capacidad de enraizamiento en tallos adultos de aguacate, mediante injerto en patrones juveniles. *Acta Horticulturae*, 6:229-234.
- **Barranco, D. 2004.** Variedades y patrones. En: *El Cultivo del Olivo*. D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). Mundi-Prensa, Madrid; pp: 63- 91.
- **Bartolini, G.; Fabbri, A. y Tattini, M. 1988.** Effect of phenolic acids on rhizogenesis in a grape rootstock ("140 Rugeri") cuttings. *Acta Horticulturae*, 227: 242-247.
- **Bartolini, G.; Leva, A.R. y Benelli, A. 1990.** Advances in *in vitro* culture of the olive: propagation of cv. 'Maurino'. *Acta Horticulturae*, 286: 41-44.
- **Bassiri, A.; Irish, E.E. y Poethig, R.S. 1992.** Heterochronic effects of *Teopod2* on the growth and photosensitivity of maize shoot. *Plant Cell*, 4: 497-504.
- **Bauer, H. y Bauer, U. 1980.** Photosynthesis in leaves of the juvenile and adult phase of ivy (*Hedera helix*). *Physiologia Plantarum*, 49: 366-372.
- **Baurens, F.C.; Nocolleau, J.; Legavre, T.; Verdeil, J.V. y Monteuis, O. 2004.** Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Tree Physiology*, 24: 401-407.
- **Belaj, A.; Satovic, Z.; Cipriani, G.; Baldoni, L.; Testolin, R.; Rallo, L. y Trujillo, I. 2003.** Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4):736-744.
- **Ben-Abdallah, F.; Fnayou, A. y Ghorbel, A. 1997.** Micrografting as a new rapid method for selection of indigenous Tunisian grapevine varieties. *Acta Horticulturae*, 441: 237-244.
- **Berardini, A.Z.; Bollman, K.; Sun, H. y Poethig. 2001.** Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40. *Science*, 291: 2405-2407.
- **Besford, R.T.; Hand, P.; Peppitt, S.D.; Richardson, C.M. y Thomas, B. 1996.** Phase change in *Prunus avium*: differences between juvenile and mature shoots identified by 2-dimensional protein separation and *in vitro* translation of mRNA. *Journal of Plant Physiology*, 147: 534-538.
- **Binet, M.N.; Lemoine, M.C.; Martin, C.; Chambon, C. y Gianinazzi, S. 2007.** Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment. *In Vitro Cell & Developmental Biology- Plant*, 43: 473-478.
- **Bolstad, P.V. y Libby, W.J. 1982.** Comparisons of radiata pine cuttings of hedge and tree-form origin after seven growing seasons. *Silvae Genetica*, 31 (1): 9-13.
- **Bon, M.C. 1988.** J 16: an apex protein associated with juvenility of *Sequoiadendron giganteum*. *Tree Physiology*, 4: 381-387.
- **Bonga, J. M. 1982.** Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. En: *Tissue Culture in Forestry*. J. M. Bonga and D. J. Durzan (eds.). Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers. The Hague. The Netherlands; pp: 387-412.

- **Bonga, J. M. 1984.** Adventitious shoot formation in cultures of immature female stroboli of *Larix decidua*. *Physiologia Plantarum*, 62 (3): 416-422.
- **Bonga, J. M. 1987.** Clonal micropropagation of mature trees: problems and possible solution. En: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. J. M. Bonga and D. J. Durzan (eds.). Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers. The Hague. The Netherlands, pp: 249-271.
- **Bonga, J.M y Von Aderkas P. 1992.** Clonal propagation in forestry. En: *In Vitro Culture of Trees*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- **Bouza, L. 1997.** Micropropagation of *Prunus tenella* (dwarf russian almond). En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.40: High-Tech and Micropropagation VI*. (Y.P.S. Bajaj, eds.). Springer- Verlag Berlín, pp: 276-288.
- **Bradai, F. 2009.** Effect de l'âge et du genotype sur l'embryogenise somatique de l'olivier. Evaluación morfológica de los variantes somaclonales obtenidos por esta vía. Tesis de Máster. IAML. Universidad de Lérida.
- **Brenton, C.; Cornu, D.; Chriqui, D.; Sauvanet, A.; Capelli, P.; Germain, E. y Jay-Allemand, C. 2004.** Somatic embryogenesis, micropropagation and plant regeneration of "Early Mature" walnut trees (*Juglans regia*) that flower *in vitro*. *Tree Physiology*, 24: 425-435.
- **Brhadda, N.; Abousalim, A.; Loudiyi, D.E.W. y Benali, D. 2003.** Effect du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine Marocaine. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 7 (3-4): 177-182.
- **Briccoli-Bati, C.; Fodale, A.; Mulé, R. y Trombino, T. 1999.** Trials to increase in vitro rooting of *Olea europaea* L. cuttings. *Acta Horticulturae*, 474: 91-94
- **Bricoli-Bati, C.; Godino, G. y Nuzzo, V. 2002.** Preliminary agronomic evaluation of two cultivars of olive trees obtained from micropropagation methods. *Acta Horticulturae*, 586: 867-870.
- **Bricoli-Bati, C.; Godino, G.; Monardo, D y Nuzzo, V. 2006.** Influence of propagation techniques on growth and yield of olive trees cultivars 'Carolea' and 'Nocellara etnea'. *Scientia Horticulturae*, 109: 173-182.
- **Brink, R.A. 1962.** Citado por Hackett, 1985.
- **Brito, G.; Costa, A.; Coelho, C. y Santos, C.V. 2009.** Large-scale acclimatization of *Olea maderensis* micropropagated plants: morphological and physiological survey. *Trees*, 23: 1019- 1031.
- **Brito, G; Lopes, T.; Loureiro, J.; Rodriguez, E. y Santos, C. 2010.** Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers. *Trees*, 24:723-732.
- **Bueno, M. A.; Gómez, M.; Boscaiu, J.A.; Manzanera, J.A. y Vicente, O. 1997.** Stress-induced formation of haploid plants through anther culture in cork oak (*Quercus suber*). *Physiologia Plantarum*, 99: 335-341.
- **Caballero, J.M. 1981.** Multiplicación del olivo por estaquillado semileñoso bajo nebulización. Comunicaciones del INIA. Serie Producción Vegetal, nº 31.
- **Caballero, J.M. y del Río, C. 1994.** Propagación del olivo por enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización. Comunicación I+D Agroalimentaria, 7/94. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía.

- **Caballero, J.M. y del Río, C. 2004.** Métodos de multiplicación. En: El Cultivo del Olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). Mundi-Prensa, Madrid; pp: 95-123.
- **Caballero-Moreno, B.; del Río, C.; Barceló-Muñoz, A. y Padilla, I.M.G. 2012.** Conservación del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo (BMGO) de Córdoba mediante *cultivo in vitro*. Actas de Horticultura, 62:83-84.
- **Cañas, L.A.; Ávila, J.; Vicente, M. y Benbadis, A. 1992.** Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). En Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 18: High-Tech and Micropropagation II (Y.P.S. Bajaj, eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 493- 505.
- **Cañas, L.A. y Benbadis, A. 1988.** *In vitro* plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.). Plant Science, 54: 65-74.
- **Cañas, L.A.; Carramolino, L. y Vicente, M. 1987.** Vegetative propagation of the olive tree from *in vitro* cultured embryos. Plant Science, 50: 85-90.
- **Capelo, A.M.; Silva, S.; Brito, G. y Santos, C. 2010.** Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 103: 237-242.
- **Caro, L.A.; Polci, P.A.; Lindström, L.I.; Echenique, C.V. y Hernández, L.F. 2002.** Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from young and mature plants. Biocell, 26 (1): 25:33.
- **Carter, R. 1997.** Citado por Caballero-Moreno y col., 2012.
- **Cecich, R. A.; Kang, H. y Chalupka, W. 1994.** Regulation of early flowering in *Pinus banksiana*. Tree Physiology, 14: 275-284.
- **Cerezo, S.; Mercado, J.A. y Pliego-Alfaro, F. 2011.** An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 106: 337-344.
- **Cerezo, S.; Samach, A.; Mercado, J.A. y Pliego-Alfaro, F. 2010.** Transformation of olive (*Olea europaea* L.) with a *Medicago truncatula* gene encoding a FT-like protein. 28 International Horticultural Congress. Lisboa, Agosto, p: 278.
- **Chaari, A.; Chelly-Chaabouni, A.; Maalej, M. y Drira, N. 2002.** Meski olive variety propagated by tissue culture. Acta Horticulturae, 586: 871-874.
- **Chaari, A.; Maalej, M.; Drira, N. y Standardi, A. 2011.** Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. ‘Oueslati’. Turkian Journal Agriculture and Forestry, 35: 403-412.
- **Chaari-Rkhis, A.; Maalej, M.; Messaoud, S.O. y Drira, N. 2006.** *In vitro* vegetative growth and flowering of olive tree in response to GA₃ treatment. African Journal of Biotechnology, 5 (22): 2097-2302.
- **Chaari-Rkhis, A.; Trigui, A. y Drira. 1999.** Micropropagation of tunisian cultivars olive trees: preliminary results. Acta Horticulturae, 474: 79-81.
- **Chabuskwar, M.M. y Deodhar, M.A. 2006.** Restoration of rooting competence in a mature plant of *Garcinia indica* through serial shoot tip grafting *in vitro*. Scientia Horticulturae, 108: 194-199.

- **Chalupa, V. 2000.** *In vitro* propagation of mature trees of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). Journal of Forest Science, 46 (12): 537-542.
- **Chalupa, V. 2002.** *In vitro* propagation of mature trees of *Sorbus aucuparia* L. and field performance of micropropagated trees. Journal of Forest Science, 48(12): 529–535.
- **Charlesworth, D. 1989.** A high mutation rate in a long live perennial plant. Nature, 340: 346-347.
- **Chen, J.G.; Zhao, H.I.; Zhou, X.; Mao, L.S. y Chen, X.X. 1997.** Fluctuations in levels of endogenous hormones after decapitation and 6-benylaminopurine treatment in azalea, and their relationship to apical dominance. Scientia Horticulturae, 71:49-58.
- **Cimato, A. y Fiorino, P. 1980.** Stato attuale delle conoscenze sulla moltiplicazione dell'olivo con la técnica della nebulizzazione. L'Informatore Agrario, XXXVI (3): 12227-12238.
- **Cipriani, G.; Marrazo, M.T.; Marconi, R. y Cimato, A. 2002.** Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 104: 223-228.
- **Civantos, L. 2004.** La olivicultura en el mundo y en España. En: El Cultivo del Olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). Mundi-Prensa, Madrid; pp: 17-35.
- **Clark, J.R. 1983.** Age-related changes in trees. Journal of Arboriculture, 9: 201-205.
- **Clark, S.E. 2001.** Cell signaling at the shoot meristem. Nature Review Molecular Cell Biology, 2: 276-284.
- **Claudot, A.C.; Jay-Allemand, C.; Magel, E.A. y Drouet, A. 1993.** Phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase and polyphenolic compounds in adult and rejuvenated hybrids walnut trees. Trees, 7: 92-97.
- **Clavero-Ramírez, I. 1994.** Acortamiento del periodo juvenil en olivo (*Olea europaea* L.). I: Cultivo *in vitro* de embriones. II: Efecto del fotoperiodo en el crecimiento de las plantas. Tesis doctoral, Universidad de Málaga.
- **Clavero-Ramírez, I. y Pliego-Alfaro, F. 1993.** Efecto del fotoperíodo en el crecimiento y desarrollo de plántulas de olivo. Actas de Horticultura, 10(2): 893-897.
- **Clemens, J.; Henriod, R.E.; Bailey, D.G. y Jameson, P. 1999.** Vegetative phase change in *Metrosideros*: shoot and root restriction. Plant Growth Regulation, 28: 207-214.
- **COI. 2012a.** Consejo Oleícola Internacional. Informes: L'oléiculture en Espagne. <http://www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/7132-espagne> (consultado 26/11/2014).
- **COI. 2012b.** Consejo Oleícola Internacional. Olive Nursery Production and Plant Production Techniques. Section A: Olive growing and nursery production. <http://www.internationaloliveoil.org/projects/paginas/Section-a.htm> (consultado 26/11/2014).

- **COI. 2013.** Consejo Oleícola Internacional. Estadísticas, noviembre 2013. http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=es_ES (consultado 26/11/2014).
- **Conde, C.; Silva, P.; Agasse, A.; Lemoine, R.; Delrot, S.; Tavares, R.M. y Gerós, H. 2007.** Utilization and transport of mannitol in *Olea europaea* and implications for salt stress tolerance. *Plant Cell Physiology*, 48: 42-53.
- **Cortizo, M.; Alonso, P.; Fenández, B.; Rodríguez, A.; Centeno, M.L. y Ordás, R. 2004.** Micrografting of mature stone pine (*Pinus pinea* L.) trees. *Annals of Forestry Science*, 61 (8): 843-845.
- **Couselo, J.C.; Varela, P. y Rey, M. 2006.** Effect of benzyladenine concentration and double-phase culture system on *in vitro* multiplication of adult albariño plants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (1): 109-112.
- **Cozza, R.; Turco, D.; Briccoli-Bati, C. y Bitonti, M.B. 1997.** Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51: 215-223.
- **Crisosto, C. y Sutter, E. 1985.** Role of the endocarp in 'Manzanillo' olive seed germination. *Journal American Society for Horticultural Science*, 110 (1): 50-52.
- **Cristofori, V.; Rouphael, Y. y Rugini, E. 2010.** Collection time, cutting age, IBA and putrescine effects on root formation in *Corylus avellana* L. cuttings. *Scientia Horticulturae*, 124: 189-194.
- **Cuir, P.; Sulis, S.; Mariani, F.; Van Sumere, C.F.; Marchessini, A. y Dolci, M. 1993.** Influence of endogenous phenols on rootability of *Chamaelaucium uncinatum* Schauer stem cuttings. *Scientia Horticulturae*, 55: 303-314.
- **Danthu, P.; Hane, B.; Sagna, P. y Gassana, Y.K. 2002.** Restoration of rooting competence in mature *Faidherbia albida*, a Sahelian leguminous tree through serial root sucker micrografting. *New Forest*, 24: 239-244.
- **Danthu, P.; Ramarason, N. y Rambeloarisoa, G. 2008.** Seasonal dependence of rooting success in cuttings from natural forest trees in Madagascar. *Agroforestry Systems*, 73 (1): 47-53.
- **Danthu, P.; Touré, M.A.; Soloviev, P. y Sagma, P. 2004.** Vegetative propagation of *Ziziphus mauritiana* var. *Gola* by micrografting and its potential for dissemination in the Sahelian zone. *Agroforestry Systems*, 60: 247-253.
- **Das, T. y Mitra, C.G. 1990.** Micropropagation of *Eucalyptus teraticornis* Smith. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22:95-103.
- **Davies, F.T. 1983.** Influence of juvenility and maturity in propagation. *Proceedings of International Plant Propagator's Society*, 33: 559-565.
- **Davies, F.T. 1984.** Shoot RNA, cambial activity and indolebutyric acid effectivity in seasonal rooting on juvenile and mature *Ficus pumilla* cuttings. *Physiologia Plantarum*, 62: 571-575.
- **Davies, F.T. Jr y Joiner, J.N. 1980.** Growth effects on adventitious root formation in leaf bud cuttings of juvenile and mature *Ficus pumilla*. *Journal American Society for Horticultural Science*, 105 (1): 91-95.

- **De Klerk, G.J.; Krieken, W.V. y Jong, J.C. 1999.** Review the formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 35 (3): 189-199.
- **De la Rosa, R.; James, C. M. y Tobutt, K. R. 2004.** Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. *HortScience*, 39(2): 351-354.
- **De la Viña, G.; Barceló-Muñoz, A. y Pliego-Alfaro, F. 2001.** Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65 (3): 229-237.
- **Debnath, S. C. 2008.** Zeatin-induced one-step *in vitro* cloning affects the vegetative growth of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) micropropagules over stem cuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(2): 231-240.
- **Del Río, C.; Caballero, J.M. 2005a.** Aptitud al enraizamiento. En: *Variedades de Olivo en España*. L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. del Río, A. Martín, J. Tous y I. Trujillo (eds.). Mundi-Prensa, Madrid, pp: 275-280.
- **Del Río, C.; Caballero, J.M. y García-Fernández, M.D. 2005b.** Vigor. En: *Variedades de Olivo en España*. L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. del Río, A. Martín, J. Tous y I. Trujillo (eds.). Mundi-Prensa, Madrid, pp: 245-256.
- **Del Río, C.; Rallo, L. y Caballero, J.M. 1991.** Effects of carbohydrate content on the seasonal rooting of vegetative and reproductive cuttings of olive. *Journal of Horticultural Science*, 66 (3): 301-309.
- **Detrez, C. 1994.** Shoot production through cutting and micrografting from mature tree explants in *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne subsp. *raddiana* (Savi) Brenan. *Agroforestry Systems*, 25: 171-179.
- **Díaz-Sala, C.; Rey, M. y Rodríguez, R. 1990a.** *In vitro* establishment of a cycloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23 (3):151-157.
- **Díaz-Sala, C.; Rey, M. y Rodríguez, R. 1990b.** Recovery of transient juvenile capacities during micropropagation of filbert. En: *Plant Aging: Basic and Applied Approaches*. R. Rodríguez; R. Sánchez-Tamés y D.J. Durzan (eds.), Springer-Verlag, US, pp: 27-36.
- **Díaz-Sala, C.; Rey, M.; Boronat, A.; Besford, R. y Rodríguez, R. 1995.** Variations in the DNA methylation and polypeptide patterns of adult hazel (*Coryllus avellana* L.) associated with sequential *in vitro* subcultures. *Plant Cell Reports*, 15: 218-221.
- **Dimassi, K. 1999.** Micropropagation studies of the cv. 'Kalamon' olives (*Olea europaea sativa* L.). *Acta Horticulturae*, 474: 83-86.
- **Dimassi-Theriou, K. 1994.** *In vitro* propagation of cv. 'Kalamon' olives (*Olea europaea sativa* L.). *Advances in Horticultural Science*, 8: 185-189.
- **Dix, L. y Van Staden, J. 1982.** Auxine and gibberellin-like substances in coconut milk and malt extract. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1: 239-245.
- **Dobbins, D. R.; Alden, H. y Marvel, D. 1983.** Developmental anatomy of juvenile and adult shoots of *Marcgravia rectifolia* L. *American Journal Botany*, 70 (9):1263-1271.

- **Dobránszki, J.; Jámbor-Benczúr, E.; Hudák, I. y Magyar-Tábori, K. 2005.** Model experiments for establishment of *in vitro* culture by micrografting in apple. *International Journal of Horticultural Science*, 1: 47–49.
- **Dobránszki, J.; Magyar-Tábori, K.; Jámbor-Benczúr, E. y Lazányi, J. 2000.** New *in vitro* micrografting method for apple by sticking. *International Journal of Horticultural Science*, 6 (4): 79-83.
- **Dolcet-San Juan, R.; Claveria, E.; Gruselle, R.; Meier-Dinkel, A.; Jay-Allemand, C. y Gaspar, T. 2004.** Practical factor controlling *in vitro* adventitious root formation from walnut shoot microcuttings. *Journal American Society for Horticultural Science*, 129(2): 198-203.
- **Donini, L.P.; Schuch, M.W.; Ribeiro, M.; Almeida de Souza, J. y Campos Soares, G. 2008a.** *In vitro* establishment of olive tree cultivar 'Arbequina' for micropropagation starting. *Ciência Rural*, 38 (6): 1-5.
- **Donini, L.P.; Schuch, M.W.; Ribeiro, M.; Almeida de Souza, J. y Campos Soares, G. 2008b.** Response evaluation of three olive cultivars to the *in vitro* cultivation under different light wavelength and the effects of the combination between zeatin and gibberellic acid. *Scientia Agraria, Curitiba*, 9 (2): 229-233.
- **Doorenbos, I. 1965.** Juvenile and adult phases in woody plant. *Encyclopedia Plant Physiology*, XV (1):1222-1235.
- **Doyle, J.J. y Doyle, J.L. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- **Drew, R.A. 1991.** *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 26: 23-27.
- **Driver, J.A. y Kuniyuki, A. 1984.** *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock [*Juglans hindsii* x *Juglans regia*, tissue culture]. *HorstScience*, 19 (4): 507-509.
- **Edris, M.H., y Burger, D.W. 1984.** *In vitro* propagation of *Troyer citrange* from epicotyl segments. *Scientia Horticulturae*, 23:159–162.
- **Elo, A.; Lemmetyinen, J.; Novak, A.; Keinonen, K.; Porali, I.; Hassinen, M. y Sopanen, T. 2007.** *BpMADS4* has a central role in inflorescence initiation in silver birch (*Betula pendula*). *Physiologia Plantarum*, 131:149-158.
- **Endo, T.; Shimada, T.; Fujii, H.; Kobayashi, Y.; Araki, T. y Omura, M. 2005.** Ectopic expression of an *FT* homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research*, 14: 703-712.
- **Evans, M.S. y Poethig, R.S. 1995.** Gibberellins promote vegetative phase change and reproductive maturity in maize. *Plant Physiology*, 108: 475-487.
- **Ewald, D. y Kretschmar, U. 1996.** The influence of micrografting *in vitro* on tissue culture behaviour and vegetative propagation of old European larch trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44: 249-525.
- **Fabbri, A.; Bartolini, G.; Lambardi, M. y Kailis, S. 2004.** Olive Propagation Manual. Landlinks Press; pp: 1-7. ISBN 0643 0666764. <http://www.landlinks.com> (consultado 10/11/2014)

- **FAOSTAT. 2013.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://faostat3.fao.org/download/Q/*/index (consultado 26/11/2014)
- **Farahani, F.; Peyvandi, M. y Hosseini-Mazinani, M. 2008.** Effect of sucrose and manitol on *in vitro* regeneration of Iranian olive cv. 'Rowghani'. *Acta Horticulturae*, 791: 203-208.
- **Farahani, F.; Razeghi, S.; Peyvandi, M.; Attaii, S. y Mazinani, M. H. 2011a.** Micrografting and micropropagation of olive (*Olea europea* L.) Iranian cultivar: Zard. *African Journal of Plant Science*, 5(11): 671-675.
- **Farahani, F.; Yari, R. y Sheidai, M. 2011b.** Molecular, C-value and morphological analyses of somaclonal variation in three olive cultivars. *African Journal of Plant Science*, 5(9): 493-499.
- **Farahani, F.; Yari, R. y Sheidai, M. 2011c.** Somaclonal variation in Dezful cultivar of olive (*Olea europea* subsp. *europaea*). *Geneconserve*, 40: 216-233.
- **Favre, J.M. y Juncker, B. 1987.** *In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8: 49-60.
- **Fernández-Lorenzo, J.L. y Fernández-López, M.J. 2005.** Reinvigoration of mature *Castanea sativa* by serial micrografting onto a juvenile clone. *Proceedings IIIrd International Chesnut Congress. Acta Horticulturae*, 693: 293-298.
- **Fernández- Lorenzo, J.L.; Rigueiro, A. y Ballester, A. 1999.** Polyphenols as potential markers to differentiate juvenile and mature chesnut shoot cultures. *Tree Physiology*, 19: 461-466.
- **Fico, G.R.; Bilia, A.; Morelli, L.L. y Tome, F. 2000.** Flavonoids distribution in *Pyracantha coccinea* plants at different growth phases. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 673-678.
- **Firoozabady, E. y Gutterson, N. 2003.** Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. *Plant Cell Reports*, 21 (9): 844-850.
- **Fishel, D.W.; Zaczek, J.J y Preece, J.E. 2003.** Positional influence on rooting of shoots forced from the main bole of swamp white oak and northern red oak. *Canadian Journal of Forest Research*, 33(4):705-711.
- **Flachowsky, H.; Peil, A.; Sopanen, T.; Elo, A. y Hanke, V. 2007.** Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early flowering in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Breeding*, 126 (2): 137-145.
- **Fontanazza, G. y Jacobini, N. 1976.** Il riscaldamento basale nella propagazione dell'olivo. *Frutticoltura*, XXXVII (12): 9-15.
- **Fortanier, E.J. y Jonkers, H. 1976.** Juvenility and maturity of plants influenced by their ontogenetical and physiological ageing. *Acta Horticulturae*, 56: 37-44.
- **Fraga, M.F.; Cañal, M.J.; Aragonés, A. y Rodríguez, R. y 2002a.** Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting. *Annals of Forestry Science*, 59: 155-161.
- **Fraga, M.F.; Cañal, M.J. y Rodríguez, R. 2002b.** Phase –change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata*. D. Don. *Planta*, 215: 672-678.

- **Fraga, M.F; Rodríguez, R. y Cañal, M.J. 2002c.** Genomic DNA-methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiology*, 22: 813-816.
- **Franck-Duchenne, D.M.; Wang, Y.; Tahar, S.B. y Beachy, R.N. 1998.** *In vitro* stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53 (2):78-94.
- **Franclet, A. 1972.** Citado por Franclet *y col.*, 1987.
- **Franclet, A. 1983.** Rejuvenation: theory and practical experiences in clonal silviculture. En: *Clonal Forestry: Its Impact on Tree Improvement and our Future Forest*. 19th Meeting of the Canadian Tree Improvement Association, pp: 96-134.
- **Franclet, A. 1991.** Biotechnology in “rejuvenation”: hope for the micropropagation of difficult woody plants. *Acta Horticulturae*, 289: 273-282.
- **Franclet, A.; Boulay, M.; Bekkaoui, F.; Fouret, F.; Verschoore-Martouzet, B. y Walker, N. 1987.** Rejuvenation. En: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol. 1. General Principles and Biotechnology. J.M. Bonga y D. J. Durzan (eds.). Martinus Nijhoff, Dordrech, The Netherlands, pp: 232-248.
- **García, J. L.; Avidan, N.; Troncoso, A.; Sarmiento, R. y Lavee, S. 2000a.** Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Scientia Horticulturae*, 85: 271-284.
- **García, J.L.; Sarmiento, R. y Troncoso, A. 2002b.** Some biochemical differences between juvenile and young olive plant material. *Acta Horticulturae*, 586: 537-540.
- **García, J.L.; Troncoso, J.; Sarmiento, R. y Troncoso, A. 2002c.** Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 95-100.
- **García, M.T.; Ballester, A. y Vieitez, E. 1980.** Study on the isolated growth substances in juvenile cuttings of *Castanea sativa* Mill in relation with the rooting capacity. *Ann Edafol Agrobiol.*, 40: 1235-1241.
- **García-Férriz, L. e Ibarra-Huesa, M. 2005.** Aspectos comerciales del cultivo *in vitro*: justificación de su uso.
http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_hortint/hortint_2005_E_58_61.pdf (consultado el 10/11/2014)
- **García-Férriz, L.; Ghorbel, R.; Ybarra, M.; Belaj, A. y Trujillo, I. 2002.** Micropropagation from adult olive trees. *Acta Horticulturae*, 586: 879-882.
- **García-Férriz, L.; Ghorbel, R.; Ybarra, M.; Belaj, A. y Trujillo, I. 2003.** Cultivo *in vitro* y comportamiento en campo de olivo adulto. *Horticultura: Material Vegetal*, 172: 64-66.
- **García-Férriz, L.; Ghorbel, R.; Ybarra, M.; Marí, A.; Belaj, A. y Trujillo, I. 2001.** Micropropagación de olivo a partir de material adulto. *Fruticultura Profesional*, 120: 73- 75.
- **Gaspar, T. 1991.** Vitrification in micropropagation. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 17: High-Tech and Micropropagation II. (Y.P.S. Bajaj, ed.). Springer- Verlag Berlín, pp: 116-126.

- **Gaspar, T.; Kevers, C.; Bisbis, B.; Frank, T.; Crevecouer, H.G. y Dommes, J. 2000.** Loss of plant organogenic totipotency in the course of *in vitro* neoplastic progression. In *Vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 36:171-181.
- **Gaspar, T.H. y Coumans, M. 1987.** Root formation. En: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol II. J.M. Bonga y D. J. Durzan (eds). Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands, pp: 202-217.
- **George, E.F. 1993.** *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. I: The Technology. Exegetics, Edington, UK.
- **George, E.F. 2008.** *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. I: The Background. Springer, The Netherlands.
- **Gil, B.; Pastoriza, E.; Ballester, A. y Sánchez, C. 2003.** Isolation and characterization of a cDNA from *Quercus robur* differentially expressed in juvenile-like and mature shoots. *Tree Physiology*, 23: 633-640.
- **Gomes, F. y Canhoto, J.M. 2009.** Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 45(1): 72-82.
- **Gonzalez-Padilla, I.; Vidoy, I. y Encina, C.L. 2009.** Influence of indole-butyric acid and electro-pulse on *in vitro* rooting and development of olive (*Olea europaea* L.) microshoots. *Plant Cell Report*, 28: 1411-1420.
- **Grant, N.J. y Hammatt, N. 1999.** Increased root and shoot production during micropropagation of cherry and apple rootstocks: effect of subculture frequency. *Tree Physiology*, 19: 899-903.
- **Green, P.S. y Wickens, G.E. 1989.** The *Olea europaea* complex. In: *The Davis and Hedge Festschrift: Plant Taxonomy, Phytogeography and Related Subjects*. Tan, K (ed.). Edinburgh, University Press, pp: 287-299.
- **Greenwood, M.S. 1987.** Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation*, 6: 1-12.
- **Greenwood, M.S. 1995.** Juvenility and maturation in conifers: current concepts. *Tree Physiology*, 15: 433-438.
- **Greenwood, M. S.; Hopper, C.A. y Hutchison K.W. 1989.** Maturation in Larch. I: Effect of age on shoot growth, foliar characteristics and DNA methylation. *Plant Physiology*, 90: 406-412.
- **Gregory, L.E. y Mandava, N.B. 1982.** The activity and interaction of brassinolide and gibberellic acid in mung bean epicotyls. *Physiologia Plantarum*, 54 (3): 239-242.
- **Grigoriadou, K.; Eleftheriou, E.P. y Vasilakakis M. 2007.** Hidden hyperhydricity may be responsible for abnormal development and acclimatization problems of micropropagated olive plantlets: an anatomical leaf study. *Acta Horticulturae*, 748: 103-106.
- **Grigoriadou, K.; Vasilakakis M. y Eleftheriou, E.P. 2002.** *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 47-54.

- **Grigoriadou, K.; Vasilakakis M. y Eleftheriou, E.P. 2003.** Rooting and acclimatization of *in vitro* propagated olive tree microshoots (*Olea europaea sativa* L.) cv. *Chondrolia chalkidikis*. *Acta Horticulturae*, 616: 193-197.
- **Hackett, W.P. 1976.** Control of phase change in woody plants. *Acta Horticulturae*, 56: 143-154.
- **Hackett, W. P. 1983.** Phase change and intracloal variability. *HorstScience*, 18 (6): 12-16.
- **Hackett, W.P. 1985.** Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Horticultural Reviews*, 7: 109-153.
- **Hackett, W.P. 1987.** Juvenility and maturity. En: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol. 1. General Principles and Biotechnology. J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.). Springer, Netherlands, pp: 216-227.
- **Hackett, W.P. 1988.** Citado por Pierik, 1990.
- **Hackett, W.P.; Cordero, R. E. y Srinivasan, C. 1987.** Apical meristem characteristics and activity in relation to juvenility in *Hedera*. En: *Manipulation of Flowering*. University of Nottingham, Easter School. J. G. Atherton (ed.), pp: 93-99.
- **Hackett, W.P. y Geneve, R.L. 1988.** Use of leaf petioles of *Hedera helix* to study regulation of adventitious root initiation. En: *Proceedings Congress of Genetic Manipulation of Woody Plants*. J. W. Hanover and D. E. Keathley (eds.), Springer, US, pp:139-148.
- **Hackett, W.P. y Murray, J.R. 1993.** Maturation and rejuvenation in woody species. En: *Micropropagation of Woody Plants*. M. R. Ahuja (ed.). Kluwers Academic, The Netherlands, pp: 93-105.
- **Hackett, W.P.; Murray, J.R. y Smith, A. 1992.** Control of maturation in wood species. En: *Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species*. *Proceedings Association Forêt Cellulose (AFOCEL)*. Domaine de l'Étançon, Nangis, France, pp: 14-18.
- **Hackett, W.P.; Murray, J.R.; Woo, H.; Stapfer, R.E. y Geneve, R. 1990.** Cellular, biochemical and molecular characteristics related to maturation and rejuvenation in woody species. En: *Plant –Aging: Basic and Applied Approaches*. R. Rodriguez, R. Sánchez Tamés y D.J. Durzan (eds). Springer-Verlag, US, pp: 147-152.
- **Haffner, V.; Enjalric, F.; Lardet, L. y Carron, M.P. 1991.** Maturation of woody plants: a review of metabolic and genomic aspects. *Annales Science Forestry*, 48: 615-630.
- **Hand, D. J. y Atherton J. G. 1987.** Curd initiation in the cauliflower. I. Juvenility. *Journal of Experimental Botany*, 38 (197): 2050-2058.
- **Hand, P.; Besford, R.T.; Richardson, C.M. y Peppitt, S.D. 1996.** Antibodies to phase related proteins in juvenile and mature *Prunus avium*. *Plant Growth Regulation*, 20: 25-29.
- **Haq, I.; Ahmad, T; Hafiz, I.A. y Abbasi, N.A. 2009.** Influence of microcutting sizes and IBA concentration on *in vitro* rooting of olive cv. 'Dolce Agogia'. *Pakistan Journal of Botany*, 41 (3): 1213-1222.

- **Hartmann, H. T. y Loreti, F. 1965.** Seasonal variation in rooting leafy olive cuttings under mist. In: Proceedings of the American Society for Horticultural Science, Vol. 87: 194-198.
- **Hartmann, H. T.; Kester, D.E.; Davies, F.T.Jr. y Geneve, R.L. 2011.** Hartmann and Kester's Plant Propagation, Principles and Practices. 8th edition. Prentice Hall, Boston.
- **Hartney, V. J. 1980.** Vegetative propagation of the eucalyptus. Australian Forest Research, 10: 191-222.
- **Heberle-Bors, E. 1989.** Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. Sexual Plant Reproduction, 2: 1-10.
- **Heller R. 1953.** Recherches sur la nutrition minérale des tissus cultivés *in vitro*. Ann. Sci. Nat. Biol. Vég. 14: 1-223.
- **Henry, Y.; Nato, A. y DeBuyser, J. 1998.** Genetic fidelity of plants regenerated from somatics embryos in cereals. En: Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvements. S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Ahoowalia (eds.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp: 65-80.
- **Heuser, W. Ch. 1976.** Juvenility and rooting cofactors. Acta Horticulturae, 56: 251-261.
- **Hisada, S.; Akihama, T.; Endo, T.; Moriguchi, T. y Omura, M. 1997.** Expressed sequence tags of *Citrus* fruit during rapid cell development phase. Journal of American Society for Horticultural Science, 122:808-812.
- **Holland, D.; Abied, M. A.; Nachman, S y Saad, S. 1995.** Cotyledon detachment inhibits development but does not affect precocious flowering of 'Duncan' grapefruit. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 41: 79-82.
- **Holliday, R. 2005.** DNA methylation and epigenotypes. Biochemistry, 70 (5): 500-504.
- **Hormaza, J.I. 2002.** Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics, 104: 321-328.
- **Howard, B.B.; Harrison-Murray, R.S.; Vasek, J. y Jones, O.P. 1988.** Techniques to enhance potential before cuttings collection. Acta Horticulturae, 227: 176-186.
- **Howard, B.E.; Jones, O.P. y Vasek, J. 1989.** Long-term improvement in the rooting of plum cuttings following apparent rejuvenation. Journal of Horticultural Science, 64 (2): 147-156.
- **Hsina, T. y El Mtili, N. 2009.** *In vitro* micrografting of mature carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). The Open Horticultural Journal, 2: 44-48.
- **Hsu, C.; Liu, Y.; Luthe, D.S. y Yuceer, C. 2006.** Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. The Plant Cell, 18: 1846-1861.
- **Huala, E. y Sussex, I.M. 1993.** Determination and cell interactions in reproductive meristems. Plant Cell, 5:1157-1165.
- **Huang, H; Chen, Y.; Kuo, J.I; Kuo, T.; Tzeng, Ch.; Huang, B.I.; Chen, Ch. y Huang, L. 1996.** Rejuvenation of *Sequoia sempervirens in vitro*: changes in isoesterases and isoperoxidases. Plant Cell Physiology, 37(1): 77-80.

- **Huang, L.; Chow, T.; Tseng, T.; Kuo, C.; Liu, S.; Ngoh, M.; Murashige, T. y Huang, H. 2003 a.** Association of mitochondrial plasmid with rejuvenation of the coastal redwood, *Sequoia sempervirens* (D.Don) Endl. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 44: 25-30.
- **Huang, L.; Hsiao, C.; Lee, S.; Huang B. y Murashige, T. 1992a.** Restoration of vigor and rooting competence in stem tissues of mature citrus by repeated grafting of their shoot apices onto freshly germinated seedlings *in vitro*. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 28: 30-32.
- **Huang, L.C.; Lin, L.; Chen, C.; Chen, L.; Huang, B. y Murashige, T. 1995.** Phase reversal in *Sequoia sempervirens* in relation to mtDNA. Physiologia Plantarum, 94: 379-383.
- **Huang, L.; Lius, S.; Huang, .B.; Murashige, T.; Mahdi, F.M. y Van Gundy, R. 1992b.** Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. Plant Physiology, 98: 166-173.
- **Huang, L.; Weng, J.H.; Wang, C.; Kou, C. y Shieh, Y. 2003 b.** Photosynthetic potentials of *in vitro*-growth juvenile, adult and rejuvenated *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl shoots. Botanical Bulletin Academic Sinica, 44: 31-35.
- **Husen, A. y Pal, M. 2003.** Effect of serial bud grafting and etiolation on rejuvenation and rooting cuttings of mature trees of *Tectona grandis* Linn f. Silvae Genetica, 52: 84-88.
- **Husen, A. y Pal, M. 2006.** Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. F.). New Forest, 31: 57-73.
- **Jaenish, R. y Bird, A. 2003.** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nature Genetics Supplement, 33:245-254.
- **Jain, S.M. 2001.** Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica, 118: 153-166.
- **Jiménez-Terry, F.A.; Ramírez-Aguilar, D. y Agromonte-Peñalver, D. 2001.** Use of biobras-6 in micropropagation of FHIA-21. InfoMusa, 13(1): 4-6.
- **Joyce, S. M.; Cassells A.C. y Jain S.M. 2003.** Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74: 103-121.
- **Kadman, A. y Ben Ya'cov, A. 1980.** G.A.-13 avocado rootstock selection. Hortscience, 15 (2): 206.
- **Kadota, M.; Imizu, K. y Hirano, T. 2001.** Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduce hyperhydricity in Japanese pea. Scientia Horticulturae, 89 (3): 207–215.
- **Katsumi, M. 1985.** Interaction of a brassinosteroid with IAA and GA₃ in the elongation of cucumber hypocotyls sections. Plant and Cell Physiology, 26 (4):615-625.
- **Kawiak, A.; Królicka, A. y Lojkowska, E. 2003.** Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 75 (2): 175-178.

- **Kester, D. E. 1976.** The relationship of juvenility to plant propagation. Proceedings of International Plant Propagators Society, 26:71-84.
- **Khalafalla, M.M. y Daffalla, H.M. 2008.** *In vitro* micropropagation and micrografting of gum arabic tree [*Acacia senegal* L. Wild.]. Int J Sust Crop Prod, 3 (1): 19-27.
- **Kiani, M.; Zamani, Z. y Ebadi, A. 2006.** *In vitro* germination of three olive cultivars. Acta Horticulturae, 725: 333-336.
- **Kibbler, H.; Johnston, M.E. y Willians, R.R. 2004.** Adventitious root formation in cuttings of *Backhousia citriodora* F. Muell: plant genotype, juvenility and characteristics of cuttings. Scientia Horticulturae, 1: 133-143.
- **Klekowsky, E.J. 1988.** Mechanisms that maintain the genetic integrity of plants. En: Proceedings 14th International Botany Congress (Greuter, W.; Zimmer, B. eds), pp: 137-152.
- **Klekowsky, E.J. y Godfrey, P.J. 1989.** Ageing and mutation in plants. Nature, 340: 389-390.
- **Kling, G.J.; Meyer, M.M. y Seigler. 1988.** Rooting co-factor in five *Acer* species. Journal of American Society for Horticultural Science, 113: 252-257.
- **Knop, W. 1865.** Citado por Rugini y Fontanazza, 1981.
- **Königshofer, H. 1989.** Seasonal changes in polyamine content in different parts of juveniles spruce trees (*Picea abies* (L.) KARST.). Journal of Plant Physiology, 134: 377-380.
- **Königshofer, H. 1990.** Polyamine content in needles, shoot-axes, buds and xylem exudates of mature spruce trees [*Picea abies* (L.) KARST.]. Journal of Plant Physiology, 136: 377-380.
- **Kotoda, N.; Hayashi, H.; Suzuki, M.; Igarashi, M.; Hatsuyama, Y.; Kidou, S.; Igasaki, T.; Nishiguchi, M.; Yano, K.; Shimizu, T.; Takahashi, S. y Iwanami, H. 2010.** Molecular characterization of FLOWERING LOCUS T-like genes of apple (*Malus x domestica* Borkh). Plant and Cell Physiology, 51 (4):561-565.
- **Kotoda, N.; Iwanami, H.; Takahashi, S. y Abe, K. 2006.** Antisense expression of MdTFL1 a TFL1-like gene, reduces the juvenile phase in apple. Journal of American Society for Horticultural Science, 131: 74-81.
- **Koukourikou, M.A. y Bangerth, F. 1997.** Effect of changing the endogenous concentration of auxins and cytokinins and the production of ethylene in pea stem cuttings on adventitious root formation. Plant Growth Regulation, 22: 101-108.
- **Kozomara, B.; Vinterhalter, B.; Radojević, Lj. y Vinterhalter, D. 2008.** *In vitro* propagation of *Chimonanthus praecox* (L.), a winter flowering ornamental shrub. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 44 (2):142-147.
- **Kuo, J-L.; Huang, H.; Cheng, C-M.; Chen, L-J.; Huang, B.; Huang, L. y Kuo, T. 1995.** Rejuvenation *in vitro*: modulation of protein phosphorylation in *Sequoia sempervirens*. Journal of Plant Physiology, 146: 333-336.
- **Kyung-Hwan H.; Dong-Ill, S. y Daniel E. K. 1997.** Tissue culture responses of explants taken from branch sources with different degrees of juvenility in mature black locust (*Robinia pseudoacacia*) trees. Tree Physiology, 17: 671-675.

- **Lagarda, A.; Martín, G. y Kester, D. E. 1983.** Influence of environment, seed tissue and seed maturity on 'Manzanillo' olive germination. *HortScience*, 18 (6): 868-869.
- **Lambardi, M.; Benelli, C.; de Carlo, A.; Fabbri, A. y Grassi, S. 2002.** Medium and long-term *in vitro* conservation of olive germplasm (*Olea europaea* L.). *Acta Horticulturae*, 586: 109-112.
- **Larkin, P.J. y Scowcroft, S.C. 1981.** Somaclonal variation- a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60: 197-214.
- **Lauter, N.; Kampani, A.; Carlson, S.; Goebel, M. y Moose, S.P. 2005.** MicroRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 102 (26): 9412-9417.
- **Lavee, S.; Avidan, N.; Haskal, A. y Ogrudovich, A. 1996.** Acortamiento del periodo juvenil en los plantones de olivo obtenidos de semilla. Un instrumento para la revalorización de la mejora genética. *Olivae*, 60: 33-41.
- **Leitao, L.F. y Feveireiro, P.S. 1998.** Continuous somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of *Olea europaea* (cv. Galega vulgar). Cost Action 822- 824. Embryogenic Potential and Transformation of Gametic and Somatic Cells. Dun Laoghaire, Abst. nº 48.
- **Leva, A. 2009.** Morphological evaluation of olive plants micropropagated *in vitro* culture through axillary buds and somatic embryogenesis methods. *African Journal of Plant Science*, 3(3): 37-43.
- **Leva, A. 2011.** Innovative protocol for "ex vitro rooting" on olive micropropagation. *Central European Journal of Biology*, 6(3): 352-358.
- **Leva, A.R.; Dadeghi, H. y Petruccelli, R. 2012.** Carbohydrates modulate the *in vitro* growth of olive microshoots. I. The analysis of shoot growth and branching patterns. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32 (1): 53-60.
- **Leva, A.R.; Muleo, R. y Petruccelli, R. 2003.** Reproductive, vegetative and agronomic behaviour of the micropropagated olive cv. Maurino. *Acta Horticulturae*, 616: 309-312.
- **Leva, A.R. y Petruccelli, R. 1995.** Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. *Journal of Horticultural Science*, 70: 417-421.
- **Leva, A.R. y Petruccelli, R. 2007.** Field performance of olive somaclones from somatic embryos. *Acta Horticulturae*, 748: 181-190.
- **Leva, A.R. y Petruccelli, R. 2012.** Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers. *Biologia Plantarum*, 56 (2): 373-376.
- **Leva, A.R.; Petruccelli, R. y Bartolini, G. 1994.** Mannitol in *in vitro* culture of *Olea europaea* L. (cv. 'Maurino'). *Acta Horticulturae*, 356: 43-46.
- **Leva, A.R.; Petruccelli, R.; Montagni, G. y Muleo, R. 2002.** Field performance of micropropagated olive plants (cv. Maurino): morphological and molecular features. *Acta Horticulturae*, 586:891-894.
- **Libby, W.J.; Brown, A.G. y Fielding, J.M. 1972.** Effects of hedging radiate pine on production, rooting and early growth of cuttings. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 2: 263-284.

- **Liljegren, S.J.; Gustafson-Brown, C.; Pinyopic, A.; Ditta, G.S. y Yanosky, M.F. 1999.** Interactions among APETALA1, LEAFY and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. *Plant Cell*, 11: 1007-1018.
- **Little, C.H.A. y McDonald, J.E. 2003.** Effects of exogenous gibberellins and auxin on shoot elongation and vegetative bud development in seedlings of *Pinus sylvestris* and *Picea glauca*. *Tree Physiology*, 23:73-83.
- **Liu, J.H. y Reid, D.M. 1992a.** Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Heliantus annuus*) seedling 4. The role of changes in endogenous free and conjugated indol-3-acetic acid. *Physiologia Plantarum*, 86: 285-292.
- **Liu, J.H., y Reid, D.M. 1992b.** Auxin and ethylene-stimulated adventitious rooting in relation to tissue 9. *Journal of Experimental Botany*, 43 (9): 1191-1198.
- **Lloyd, G. y McCown, B. 1980.** Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of International Plant Propagators Society*, 30: 421-427.
- **Lopes, T.; Capelo, A.; Brito, G.; Loureiro, J. y Santos, C. 2009.** Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea spp.* using nuclear microsatellites. *Trees*, 23(1):29–36
- **Lu, C.Y. 1993.** The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 29: 92-96.
- **Lucchesini, M. y Vitagliano, C. 2002.** *In vitro* micro-environments to improve growth of olive plantlets during rooting phase. *Acta Horticulture*, 586: 895-898.
- **Lyrene, M.P. 1981.** Juvenility and production of fast-rooting cuttings from blueberry shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106 (3):396-398.
- **MacDaniel, C. N. 1996.** Developmental physiology of floral initiation in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Experimental Botany*, 47: 465-475.
- **Maene, L. y Debergh, P. 1985.** Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5 (1): 23-33.
- **Mandel, M.A. y Yanofsky, M.F. 1995.** A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature*, 377:522-524.
- **Margara, J. 1982.** Bases de la multiplicación végétative. Les méristèmes et l'organogénese. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris.
- **Marín, J.A.; Gella, R. y Herrero, M.1988.** Stomatal structure and functioning as a response to enviromental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. *Annals of Botany*, 62 (6): 663-670.
- **Marks, T.R. 1996.** The role of the shoot apex in controlling rhizogenesis *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 20: 57-60.
- **Márquez, B.; Pérez, M.G.; Barceló, A.; Quesada, M.A.; Mercado, J.A. y Pliego-Alfaro, F. 1999.** Organogénesis y embriogénesis somática de olivo (*Olea europea*, L.) III Congreso de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales, Torremolinos, p: 9.

- **Martínez, T.; Vidal, N.; Ballester, A. y Vieitez A. 2012.** Improved organogenic capacity of shoot cultures from mature pedunculate oak trees through somatic embryogenesis as rejuvenation technique. *Trees*, 26:321-330.
- **Martini, A.E.; Papafotiou, M. y Vemmos, S.N. 2013.** Season and explant origin affect phenolic content, browning of explants and micropropagation of *Malosorbus florentina* (Zucc.) Browicz. *HortScience*, 48 (1): 102-10.
- **Materán, M.E.; Fernández, M.; Valenzuela, S.; Sáez, K.; Seeman, P.; Sánchez-Olate, M. y Ríos, D. 2009.** Absciscic acid and 3-indoleacetic acid levels during the reinvigoration process of *Pinus radiata* D. Don adult material. *Plant Growth Regulation*, 59: 171-177.
- **Materán, M.E.; Vega, M.; Sánchez-Olate, M.; Sáez, K.; Rodríguez, R. y Ríos, D. 2008.** Reactivación de material vegetal élite de *Pinus radiata* D. Don mediante microinjerto *in vitro*. *Interciencia*, 33: 66-70.
- **Matsuda, N., Ikeda, M.; Kurosaka, M.; Isuzugawa, K.; Endo, T.; Omura, M. y T. Takashina, 2006.** Citado por Flachowsky *y col.*, 2009.
- **Mazri, M.A.; Belkoura, I.; Pliego-Alfaro, F. y Belkoura, M. 2013.** Somatic embryogenesis from leaf petiole explants of the Moroccan olive cultivar Dahbia. *Scientia Horticulturae*, 159: 88-95:
- **Mazri, M.A.; Elbakkali, A.; Belkoura, M. y Belkoura, I. 2011.** Embryogenic competence of calli and embryo regeneration from various explants of Dahbia cv, a Moroccan olive tree (*Olea europaea* L.). *African Journal of Biotechnology*, 10 (82): 19089-19095.
- **Mazzuca, S.; Bitonti, M.M.B.; Ruffini, M.C.; Cozza, R. y Innocenti, A.M. 1995.** Nuclear changes and cytochemical aspects in olive shoot meristem following the transition to adult phase. *Cytobios*, 83: 105-115.
- **McDaniel, C.N.; Singer, S.R.; Gebhardt, J.S y Denin, K.A. 1987.** Floral determination: a critical process in meristem ontogeny. En: *Manipulation of Flowering*. J.G. Atherton (ed.), Butterworth, London, pp: 109-120.
- **McGowran, E.; Douglas, G.C. y Parkinson, M. 1998.** Morphological and physiological markers of juvenility and maturity in shoot cultures of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*). *Tree Physiology*, 18: 251-257.
- **Meddad-Hamza, A.; Beddiar, A.; Gollotte, A.; Lemoine, M.C.; Kuszala, C.; Gianinazzi, S. 2010.** Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth of olive trees and their resistance to transplantation stress. *African Journal of Biotechnology*, 9(8): 1159-1167.
- **Medford, J.I. 1992.** Vegetative apical meristems. *The Plant Cell*, 4:1029-1039.
- **Meeks-Wagner, D.R. 1993.** Gene expression in the early floral meristem. *The Plant Cell*, 5: 1167-1174.
- **Meier, K. y Reuther, G. 1994.** Factor controlling micropropagation of mature *Fagus sylvatica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39: 231–238.
- **Meier-Dinkel, A. y Kleinschmit J. 1990.** Aging in tree species: present knowledge. En: *Plant –Aging: Basic and Applied Approaches*. R. Rodríguez, R. Sánchez Tamés y D.J. Durzan (eds). Springer-Verlag, US, pp. 51- 63.

- **Meilan, R. 1997.** Floral induction in woody angiosperms. *New Forest*, 14: 179-202.
- **Meiners, J.; Schwab, M. y Szankowski, I. 2007.** Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium species*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89: 169-176.
- **Mellerowicz, E.J.; Riding, R.T. y Greenwood, M.S. 1995.** Nuclear and cytoplasmic changes associated with maturation in the vascular cambium of *Larix laricina*. *Tree Physiology*, 15: 443-449.
- **Mencuccini, M. 2003.** Effect of medium darkening on *in vitro* rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 97: 129-139.
- **Mencuccini, M. y Rugini, E. 1993.** *In vitro* shoot regeneration from olive cultivar tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32: 283-288.
- **Mencuccini, M.; Micheli, M. y Standardi, A. 1997.** Micropropagazione dell'olivo: effetto di alcune citochinine sulla proliferazione. *Italus Hortus*, 4 (6):32-37.
- **Mendoza-de Gyves, E.; Mira, F.R.; Ruiu, F. y Rugini, E. 2008.** Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) by using dikegulac. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92: 233-238.
- **Ministerio de Agricultura, 1972.** Citado por Civantos, 2004.
- **Missiaggia, A. A.; Piacezzi, A. L. y Grattapaglia, D. 2005.** Genetic mapping of Eefl, a major effect QTL for early flowering in *Eucalyptus grandis*. *Tree Genetics & Genomes*, 1(2): 79-84.
- **Mitrakos, K.; Alexaki, A. y Papadimitriou, P. 1992.** Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age. *Journal of Plant Physiology*, 139: 269-273.
- **Mneney, E.E. y Mantell, S. 2001.** *In vitro* micrografting of cashew. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66: 49-58.
- **Molnár, G. 1987.** A new patented method for mass propagation of shoot cultures. *Acta Horticulturae*, 212:125-130.
- **Monteuuis, O. 1985.** La multiplication vegetative du sequoia géant en vue du clonage. *Annales AFOCEL*, 1984: 139-171.
- **Monteuuis, O. 1987a.** Profils méristématiques de séquoias géants (*Sequoiadendron giganteum* Buchholz) jeunes et âgés durant les stades de repos végétatif el de débourrement. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 305, Série III: 715-720.
- **Monteuuis, O. 1987b.** *In vitro* meristem culture of juvenile and mature *Sequoiadendron giganteum*. *Tree Physiology*, 3: 265-272.
- **Monteuuis, O. 1990.** Rejuvenation of a 100-years old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture. I: Organogenic and morphological arguments. *Physiologia Plantarum*, 81: 111-115.
- **Monteuuis, O. 1991.** Rejuvenation of a 100-years old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture. II: Biochemical arguments. *Physiologia Plantarum*, 81: 116-120.
- **Monteuuis, O. 1994.** Effect of technique and darkness on the success of meristem micrografting of *Picea abies*. *Silvae Genetica*, 43: 2-3.
- **Monteuuis, O. 1995a.** *In vivo* grafting and *in vitro* micrografting of *Acacia mangium*: impact of ortet age. *Silvae Genetica*, 44: 190-193.

- **Monteuuis, O. 1995b.** Influence of the grafting technique on meristem micrografting of Douglas-fir. *New Forests*, 10: 267-273
- **Monteuuis, O. 1996.** *In vitro* shoot apex micrografting of mature *Acacia mangium*. *Agroforestry Systems*, 34: 213-217.
- **Monteuuis, O. 2004.** *In vitro* rooting of juvenile and mature *Acacia mangium* microcuttings with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Trees*, 18: 77-82.
- **Monteuuis, O. y Bon, M. C. 1990.** Phase change in *Sequoiadendron giganteum*. En *Plant –Aging: Basic and Applied Approaches*. R. Rodriguez, R. Sánchez Tamés y D.J. Durzan (eds.). Springer-Verlag, US, pp: 377-382.
- **Monteuuis, O. y Bon, M.C. 2000.** Influence of auxins and darkness on *in vitro* rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*. *Plant Cell, Tissue and Organs Culture*, 63: 173-177.
- **Monteuuis, O. y Gendraud M. 1987.** Nucleotide and nucleic acid status in shoot tip from juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum* during rest and growth phases. *Tree Physiology*, 3: 257-263.
- **Moreno-Álías, I.; Rapoport H.F.; León, L. y de la Rosa, R. 2010.** Olive seedling first-flowering position and management. *Scientia Horticulturae*, 124:74–77.
- **Murashige, T. y Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- **Murray, J.R. y Hackett, W. 1991.** Dihydroflavonol reductasa activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. *Plant Physiology*, 97: 343-351.
- **Murray, J.R.; Smith, A.G. y Hackett, W. 1994.** Differential dihydroflavonol reductasa transcription and anthocyanin pigmentation in juvenile and mature phases of ivy (*Hedera helix* L.). *Planta*, 194: 102-109.
- **Muthan; Bagyalakshmi; Rathore, T.S. y Rai, V.R. 2006.** Factors influencing *in vivo* and *in vitro* micrografting of sandalwood (*Santalum album* L.): and endangered tree species. *Journal Forestry Resource*, 11: 147-151.
- **Nas, M.N.; Read, P.E.; Miller, V. y Rutter, P.A. 2002.** *In vitro* rejuvenation of woody species is temporary. *Acta Horticulturae*, 625: 211-215.
- **Németh, G. 1986.** Induction of rooting. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 1: Trees. Chapter IV. Y.P.S. Bajaj (ed.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp: 49-64.
- **Niang, D.; Gassama, Y.K.; Ndiaye, A.; Sagna, M.; Ndiaye, S.A. y Toure, M.A. 2010.** *In vitro* micrografting of *Sterculia setigera* Del. *African Journal of Biotechnology*, 9(50): 8613-8618.
- **Niklas, K.J. y Cobb, E.D. 2010.** Ontogenetic changes in the numbers of short vs. long-shoot account for decreasing specific leaf area in *Acer rubrum* (Aceraceae) as trees increase in size. *American Journal of Botany*, 97: 27-37.
- **Nyitrai, P.; Bóka, K.; Gáspár, L.; Sárvári, E. y Keresztes, A. 2004.** Rejuvenation of ageing bean leaves under the effect of low-dose stressors. *Plant Biology*, 6 (6): 708-714.

- **Ojeda, M. A.; Barranco, D. y Trujillo, I. 2006.** Identificación varietal en el programa de obtención y control de plantas certificadas de olivo en Andalucía. <http://www.ivia.es/mejora2006/apdf/OLIVO> (Consultado, 26/11/2014).
- **Oliveros, M.T. y Jordana, J. 1968.** La agricultura en tiempos de los Reyes Católicos. INIA, Madrid.
- **Onay, A.; Pirinç, V.; Isikalan, Ç.; Tilkat, E. y Basaran D. 2003.** *In vivo* and *in vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. cv. "Siirt". Turkish Journal of Biology, 27: 95-100.
- **Onay, A.; Pirinç, V.; Yildirim, H. y Basaran D. 2004.** *In vitro* micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* L. var. Siirt). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 77: 215-219.
- **Orinos, T. y Mitrakos, K. 1991.** Rhizogenesis and somatic embryogenesis in callo from wild olive [*Olea europea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr] mature zygotic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27: 183-187.
- **Ormenese, S.; Havelange, A.; Bernier, G. y Van der Schoot, C. 2002.** The shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. expands its central symplasmic field during the floral transition. Planta, 215 (1): 67-78.
- **Ortiz, J.M.; Aguinagalde, I. y Martín, J.P. 2000.** Identificación varietal. En: Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. F. Núñez y J. M. Carillo (eds.). Sociedad Española de Genética y Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Universidad Politécnica de Valencia, pp: 545- 550.
- **Osterç, G.; Stefancic, M. y Stampar, F. 2009.** Juvenile stockplant material enhances root development through higher endogenous auxin level. Acta Physiologiae Plantarum, 31 (5): 899-903.
- **Ozkaya, M.T.; Lionakis, S.M. y Vasilakakis, M.D. 2003.** Factors affecting the *in vitro* regeneration and the rooting of defoliated cuttings of the olive cultivars 'Kalamon' and 'Koroneiki'. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 17: 70-76.
- **Padilla, I.M.G. y Encina, C.L. 2011.** The use of consecutive micrografting improves micropropagation of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) cultivars. Scientia Horticulturae, 129(1):167-169.
- **Panagiotidis, C.A.; Artandi, S.; Calame, K. y Silverstein, A.J. 1995.** Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions. Nucleic Acids Research, 23 (10): 1800-1809.
- **Parkinson, M.; O'Neill, C.M. y Philip J. D. 1990.** *In vitro* grafting. En: Plant Cell and Tissue Culture. Vol. 6. J. W. Pollard y J. M. Walker (eds.). Humana Press, New Jersey, pp: 105-112.
- **Parra, R.; Pastor, M.T.; Pérez-Payá, E. y Amo-Marco, J.B. 2001.** Effect of *in vitro* shoot multiplication and somatic embryogenesis on 5-methylcytosine content in DNA of *Myrtus communis* L. Plant Growth Regulation, 33: 131-136.
- **Paton, D.M.; Willing, R.R.; Nichols, W. y Pryor, L.D. 1970.** Rooting of stem cuttings of eucalyptus: a rooting inhibitor in adult tissue. Australian Journal Botany, 18: 175-183.

- **Peixe, A.; Raposo, A.; Lourenço, H.; Cardoso, H. y Macedo, E. 2007.** Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 113: 1-7.
- **Pelaz, S.; Gustafson-Brown, C.; Kohalmi, S.E.; Crosby, W.L. y Yanosky, M.F. 2001.** APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development. *Plant Journal*, 26:385-394.
- **Peña-Ramírez, Y.; Juárez-Gómez, J.; Gómez-López, L.; Jerónimo-Pérez, J.; García-Sheseña, I.; González-Rodríguez, J. y Robert, M. 2010.** Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 46 (2): 149-160.
- **Pereira-Netto, A.B.; Cruz-Silva, C.T.A.; Schaefer, S.; Ramírez, J.A. y Galagovsky, L.R. 2006.** Brassinosteroid-stimulated branch elongation in the marubakaido apple rootstock. *Trees*, 20: 286-291.
- **Pérez-Tornero, O.; López, J.M.; García-Montiel, F. y Burgos, L. 2006.** Field performance differences in three apricot cultivars propagated by tissue culture or by grafting. *Acta Horticulturae*, 717: 255-258.
- **Perrin, P.; Doumas, P.; Lardet, L. y Carron, M.P. 1997.** Endogenous cytokinins as biochemical markers of rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) clone rejuvenation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 239-245.
- **Peyvandi, M.; Farahani, F.; Hosseini-Mazinani, M. Noormohamadi, Z.; Attai, S., Asgharzade, A. 2010.** *Pseudomonas fluorescens* and its ability to promote root formation of olive microshoots. *International Journal of Plant Production*, 4 (1): 63-66.
- **Peyvandi, M.; Farahani, F.; Noormohamadi, Z.; Baninashemi, O.; Hosseini-Mazinani, M. y Atae, S. 2009a.** Mass production of *Olea europaea* L. (cv. Rowghani) through micropropagation. *General and Applied Plant Physiology*, 35 (1-2): 35-43.
- **Peyvandi, M.; Noormohamadi, Z.; Baninashemi, O.; Farahani, F.; Majd, A.; Hosseini-Mazinani, M. y Sheidai, M. 2009b.** Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Olea europaea* L. (cv. Dezful). *Asian Journal of Plant Sciences*, 8 (2): 146-152.
- **Philipson, J.J. 1990.** Prospects for enhancing flowering of conifers and broadleaves of potential silvicultural importance in Britain. *Forestry*, 63 (3): 223-240.
- **Piatczaka, E.; Wielanekb, M. y Wysokinskaa, H. 2005.** Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn. *Plant Science*, 168 (2): 431-437.
- **Pierik, R.L.M. 1990a.** *El Cultivo In Vitro de las Plantas Superiores*. Mundi-Prensa, Madrid.

- **Pierik, R.L.M. 1990b.** Rejuvenation and micropropagation. En: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plas, y J. Van Aartrijk (eds.). Kluwer Academic, Dordrech, The Netherlands, pp: 91-101.
- **Pillitteri, L.J.; Lovatt, C.J. y Wallin, L. 2004a.** Isolation and characterization of a TERMINAL FLOWER homolog and its correlation with juvenility in *Citrus*. Plant Physiology, 135 (3): 1540-1551.
- **Pillitteri, L.J.; Lovatt, C.J. y Wallin, L. 2004b.** Isolation and characterization of *LEAFY* and *APETALA1* homologues from *Citrus sinensis* L. Osbeck 'Washington'. Journal American Society for Horticultural Science, 129 (6): 846-856.
- **Pliego-Alfaro, F. y Murashige, T. 1987.** Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. HortScience, 22: 1321-1324.
- **Poethig, R. S. 1988.** Heterochronic mutations affecting shoot development in maize. Genetics, 119: 959-973.
- **Poethig, R. S. 1990.** Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. Science, 250: 923-930.
- **Poethig, R. S. 2003.** Phase change and the regulation of developmental timing in plants. Science, 301: 334-336.
- **Poethig, R. S. 2010.** The past, present and future of vegetative phase change. Plant Physiology, 154: 541-544.
- **Polito, V.S. y Alliata, V. 1981.** Growth of calluses derived from shoot apical meristem of adult and juvenile English ivy (*Hedera helix*, L.). Plant Science Letter, 22: 387-393.
- **Ponsamuel, J.; Huhman, D.V.; Cassidy, B.G. y Post-Beittenmiller, D. 1998.** In vitro regeneration via caulogenesis and brassin-induced shoot conversion of dormant buds from plumular explants of peanut (*Arachis hypogaea* L. cv. "Okrun"). Plant Cell Report, 17(5): 373-378.
- **Ponsonby, D. J. y Mantell, S. H. 1993.** *In vitro* establishment of *Picea pungens* f. *glauca* and *P. sitchensis* seedling rootstocks with an assessment of their suitabilities for micrografting with scions of various *Picea* species. Journal of Horticultural Science, 68 (3): 463-475.
- **Pontikis, C.A. y Xiroychakis S.S. 1985.** Juvenility as a factor in propagating carob (*Ceratonia siliqua* L.). The Plant Propagator, 31 (4): 5-6.
- **Prasad, V. S. S. y Dutta-Gupta, S. 2006.** *In vitro* shoot regeneration of gladiolus in semi-solid agar versus liquid cultures with support systems. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 87(3): 263-27.
- **Pritsa, T.S. y Voyiatzis. 1999.** The *in vitro* morphogenetic capacity of olive embryos, as affected by their developmental stage and the L-arginine and L-glutamine concentration in the nutrient substrate. Acta Horticulturae, 474:87-90.
- **Puroshotham, K. y Sulladmath, U.V. 1985.** Estudios on the rooting of invigorated sucker cuttings of coffee. J. Cofee Res. (India), 15 : 21-28.
- **Puthra, G.T. y Anil, S.R. 2002.** *In vitro* grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). Scientia Horticulturae, 92: 177-182.
- **Quoirin, M. y Lepoivre, P. 1977.** Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* spp. Acta Horticulturae, 78: 437-442.

- **Rache-Cardenal, L.; Rojas-Pinzón, E. y Pacheco-Maldonado, J. 2008.** Revigorización y clonación de yemas adultas de árboles de olivo: establecimiento *in vitro* de microinjertos. *Bioagro*, 20: 57-65.
- **Rama, P. y Pontikis, C.A. 1990.** *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea sativa* L.) 'Kalamón'. *Journal of Horticultural Science*, 65 (3): 347-353.
- **Raman, K.M.; Raced, H. y Carwash, A. 2002.** Development of aseptic protocols in olive (*Olea europaea* L.) cv. Pantaloon. *Asian Journal of Plant Science*, 1 (3): 200-221.
- **Ramzan-Kan, M.; Rashid, H. y Quraishi, A. 2002.** *In vitro* shoot development from juvenile cuttings of field-growth olive (*Olea europaea* L.) cv. Leccino. *Journal of Biological Sciences*, 2 (7): 438-440.
- **Rani, V. y Raina, S. N. 2000.** Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(5): 319-330.
- **Ranjit, M y Kester, D.E. 1988.** Micropropagation of cherry rootstocks: II. Invigoration and enhanced rooting of "46-1 Mazzard" by co-culture with "Colt". *Journal of American Society for Horticultural Science*, 113 (1): 150-154.
- **Rapoport, H. F. 2004.** Botánica y morfología. En: *El Cultivo del Olivo*. D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). Mundi-Prensa, Madrid, pp: 39-62.
- **Read, P.E. y Bavougian, C.M. 2013.** *In vitro* rejuvenation of woody species. En: *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology*. M. Lambardi, E.A. Ozudogru y S.M. Jain (eds). Springer Science, New York, pp:383-395.
- **Revilla, M.A.; Pacheco, J.; Casares, A. y Rodríguez, R. 1996.** *In vitro* reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 32: 257-261.
- **Rey, M.; Astorga, R; Díaz-Sala, C.; Tiburcio, A. F. y Rodríguez, R. 1990.** Changes in polyamines related with pruning as a method for rejuvenation in filbert. En: *Plant -Aging: Basic and Applied Approaches*. R. Rodríguez; R. Sánchez-Tamés y D.J. Durzan (eds.), Springer-Verlag, US, pp. 439-443.
- **Rey, M.; Díaz-Sala, C. y Rodríguez, R. 1998.** Free polyamine content in leaves and bud of hazelnut (*Coryllus avellana* L. cv. Negret) trees subjected to repeated severe pruning. *Scientia Horticulturae*, 76: 115-121.
- **Rey, M.; Tiburcio, A. F.; Díaz-Sala, C. y Rodríguez, R. 1994.** Endogenous polyamine concentrations in juvenil, adult and *in vitro* reinvigorated hazel. *Tree Physiology*, 14: 736-740.
- **Riachy, M.; Rallo, L.; de la Rosa, R. y León, L. 2011.** May soil solarization reduce the juvenile period in olive? *HortScience*, 6 (9): 1241-1244.
- **Robins, 1957.** Citado por Meier-Dinkel, A. y Kleinschmit, J. 1990.
- **Robinson, L. W. y Wareing, P. F. 1969.** Experiments on the juvenile-adult phase change in some woody species. *New Phytologist*, 68:67-78.
- **Rodríguez, R; Díaz-Sala, Cuozzo, L. y Ancora, G. 1991.** Pear *in vitro* propagation using a double-phase culture system. *HortScience*, 26 (1): 62-64.

- **Rogler, C. E. y Hackett W.P. 1975a.** Phase change in *Hedera helix*: induction of the mature to juvenile phase change by gibberellins GA₃. *Physiologia Plantarum*, 34:141-147
- **Rogler, C. E. y Hackett W.P. 1975b.** Phase change in *Hedera helix*: stabilization of mature form with abscisic acid and growth retardants. *Physiologia Plantarum*, 34:148-152.
- **Romano, A.; Noronha, C. y Martins-Loução, M. A. 1992.** Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. *Annals of Botany*, 70 (6): 531-536.
- **Rostami, A.A. y Shahsavar, A.R. 2012.** *In vitro* micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) “Mission” by nodal segments. *Journal of Experimental Science*, 6 (17): 155-159.
- **Roussos, P.A. y Pontikis, C.A. 2001.** Phenolic compounds in olive explants and their contribution to browning during the establishment stage *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft*, 66 (6): 298–303.
- **Roussos, P.A. y Pontikis, C.A. 2002.** *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. *Plant Growth Regulation*, 37: 295-304.
- **Roussos, P.A.; Tolia-Marioli, A.; Pontikis, C.A. y Kotsias, D. 1999.** Rapid multiplication of jojoba seedlings by *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57: 133-137.
- **Rugini, E. 1984.** *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae*, 24: 123-134.
- **Rugini, E. 1986.** Olive (*Olea europaea* L.). En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 1: Trees. Y.P.S. Bajaj (ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 253-266.
- **Rugini, E. 1988.** Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14: 207-214.
- **Rugini, E. 1992.** Involvement of polyamines in auxin and *Agrobacterium rhizogenes* induced rooting of fruits trees *in vitro*. *Journal American Society for Horticultural Science*, 117: 532-536.
- **Rugini, E. 1995.** Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). En: *Somatic Embryogenesis in Woody Plant*, S. Jain; P. Gupta; R. Newton (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 171-189.
- **Rugini, E. y Baldoni, L. 2005.** *Olea europaea* olive. En: *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. R.E. Litz (ed.), CABI, Cambridge, pp: 404-428.
- **Rugini, E. y Caricato, G. 1995.** Somatic embriogenesis and plant recovery from mature tissue olive cultivars (*Olea europea* L) “Canino” and “Moraiolo”. *Plant Cell Report*, 14: 257-260.
- **Rugini, E. y Fedeli, E. 1990.** Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 10. Y.P.S. Bajaj (ed.), Springer-Verlag, New York, pp: 593-635.

- **Rugini, E. y Fontanazza, G. 1981.** *In vitro* propagation of 'Dolce Agogia' olive. HortScience, 16 (4): 492-493.
- **Rugini, E.; Jacobini, A. y Bazzoffia, A. 1987.** A simple *in vitro* method to avoid the initial dark period and increase rooting in woody species. Acta Horticulturae, 227: 438-440.
- **Rugini, E. y Muganu, M. 2008.** Preliminary results on polyamine variation in olive (*Olea europaea* L.) buds as markers of floral bud induction and differentiation. Acta Horticulturae, 791: 497-505.
- **Rugini, E. y Pannelli, G. 1993.** Olive (*Olea europaea* L.) biotechnology for short term genetic improvement. Agro-Food-Industry Hi-Tech, 4: 3-5.
- **Rugini, E.; Pezza, A.; Muganu, M. y Caricato. 1995.** Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). En: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Vol. 30. Y.P.S., Bajaj (ed.), Springer Verlag, Berlin, pp: 404-414.
- **Sambrook, J.; Russell, D.W. y Sambrook, J. 2001.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- **San José, M.V.; Vieitez, A.M. y Ballester, A. 1990.** Clonal propagation of juvenile and adult trees of sessile oak by tissue culture technique. Sylvae Genetica, 39: 50-55.
- **Sánchez, M. C. y Vieitez, A. M. 1991.** *In vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. Tree Physiology, 8: 59-70.
- **Sánchez-Olate, M.; Ríos, D.; Rodríguez, R.; Materán, M.E y Pereira, G. 2004.** Duration of the reinvigorating effect of severe pruning of mature European hazelnut plants (*Corylus avellana* L.) cv. Negretta with *in vitro* cultivation. Agricultura Técnica (Chile), 64(4): 338-346.
- **Sánchez-Romero, C.; García-Gómez, M.L.; Pliego-Alfaro, F. y Heredia, A. 1993.** Peroxidase activity and isoenzyme profiles associated with development of avocado (*Persea americana* Mill.) leaves at different ontogenetic stages. Journal of Plant Growth Regulation, 2: 95-100.
- **Sandal, I.; Bhattacharya, A. y Ahuja, P.S. 2001.** An efficient liquid culture system for tea shoots proliferation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 65 (1): 75-80.
- **Sansberro, P.; Rey, H.; Bernardis, A.; Luna, C.; Collavino, M. y Mroginski, L. 2000.** Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by *in vitro* culture of nodal segments. Biocell, 24(1): 53-63.
- **Santos, C.V.; Brito, G.; Pinto, G. y Fonseca, H. 2003.** *In vitro* plantlet regeneration of (*Olea europaea* spp. *Maderensis*). Scientia Horticulturae, 97: 83-87.
- **Sax, K. 1962.** Aspects of aging in plants. Annual Review of Plant Physiology, 13: 489-506.
- **Schmitzer, V.; Stampar, F.; Veberic, R. y Osterc, G. 2009.** Phase change modifies anthocyanin synthesis in *Acer palmatum* Thunb. (Japanese maple) cultivar. Acta Physiologia Plant., 31: 415-418.
- **Schoof, H.; Lenhard, M.; Haecker, A.; Mayer, K.F.; Jürgens, G. y Laux, T. 2000.** The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. Cell, 100: 635-644.

- **Schwartz, M.; Altman, A.; Cohen, Y.; Arzee, T. 1986.** Localization of ornithine decarboxylase and change in polyamines in roots of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*, 67: 485-482.
- **Scott, D. B.; Wei J.; Ledford, H.K.; Jung, H. y Honma, M.A. 1999.** EAF1 regulates vegetative-phase and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 120: 675-684.
- **Sefc, K.M.; Lopes, M.S.; Mendça, D.; Rodrigues Santos, M.; Da Câmara Machado, M. L. y Da Câmara Machado, A. 2000.** Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology*, 9 (8): 1171-1193.
- **Selby, C.; Lee, R. y Harvey, M.R. 1990.** Partial rejuvenation of 20-year-old Sitka Spruce by lower crown pruning. En: *Plant Aging: Basic and Applied Approaches*. R. Rodriguez, R., Sánchez Tamés y D.J. Durzan (eds). Springer-Verlag, US, pp: 373-375.
- **Seyhan, S. y Özzambak, E. 1994.** Shoot multiplication of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Acta Horticulturae*, 356: 35-38.
- **Sghir, S.; Chatelet, P.; Ouazzani, N.; Dosba, F. y Belkoura, I. 2005.** Micropropagation of eight Moroccan and French olive cultivars. *HortScience*, 40 (1): 193-196.
- **Shannon, S. y Meeks-Wagner, D.R. 1991.** A mutation in *Arabidopsis* TFL1 gene affects inflorescence meristem development. *Plant Cell*, 3: 877-892.
- **Shibli, R.A.; Shatnawi, M.; Abu, E. y Al-Juboory, K.H. 2001.** Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of ‘Nabali’ olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 88:243–256.
- **Smith, M.A.L. y Spomer, L.A. 1994.** Vessels, gels, liquid media, and support systems. In: *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. J. Aitken-Christie, T. Kozai and M.A.L. Smith (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 371-404.
- **Snowball, A.M.; Halligan E. A. y Mullins, M. 1988.** Studies in juvenility in *Citrus*. *Proceedings International Society Citriculture* .Vol. 1 , R. Goren y K. Mendel (eds.), N. Goren, Tel Aviv, pp. 467-473.
- **Snowball, A. M.; Zeman, A.M.; Tchan, Y.T; Mullins M.G. y Goodwin, P.B. 1991.** Phase change in *Citrus*: immunologically detectable differences between juvenile and mature plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 18: 385-396.
- **Sotomayor-León, E.M. y Caballero, J.M. 1990.** An easy method of breaking olive stones to remove mechanical dormancy. *Acta Horticulturae*, 206: 113-116
- **Stapleton, J. y Devay, J. 1983.** Response of phytoparasites and free-living nematods to soil solarization. *Phytopathology*, 73: 1429-1436.
- **Stein, O.L. y Fosket, E. B. 1969.**Comparative developmental anatomy of shoot of juvenile and adult *Hedera helix*. *American Journal of Botany*, 56: 546-551.
- **Suárez, M.P., Casanova, L.; Jiménez, R.; Morales-Sillero, A.; Ordovás, J y Rallo, P. 2011.** Variability of first flower to ground distance in olive seedlings and its relationship with the length of the juvenile and parent genotype. *Scientia Horticulturae*, 129 (4): 747-751.

- **Taiz, L. y Zeiger, E. 2010.** Plant Physiology, Fifth edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- **Tao, R.; Ito, J. y Sigiura, A. 1994.** Comparison of growth and rooting characteristics of micropropagated adult plants and juvenile seedlings of persimmon (*Diospyros kaki* L.). Journal Japan for Horticultural Science, 63(3): 537-541.
- **Toma, R. y Duhoki, M. 2010.** Factors involved in *in vitro* shoot-tip grafting of apple (*Malus domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus* sp. L.). "World Food System: A Contribution from Europe", Tropentag, Zurich, pp:14-16.
- **Tooke, F.; Orddige, M.; Chiurugwi, T. y Battey, N. 2005.** Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion. Journal of Experimental Botany, 56 (420): 2587-2599.
- **Trabelsi, E.B.; Bouzid, S.; Bouzid, M.; Elloumi, N.; Belfeleh, Z.; Benabdallah, A. y Ghezal, R. 2003.** In vitro regeneration of olive tree by somatic embryogenesis. Journal of Plant Biology, 46 (3):173–180.
- **Trabelsi, E.B.; Naija, S.; Elloumi, N.; Belfeleh, Z.; Msellem, M.; Ghezal, R. Y Bouzid, S. 2011.** Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) 'Chetoui'. Acta Physiologiae Plantarum, 33:319–324.
- **Tranvan, H.; Bardat, F. ; Jacques, M. y Arnaud, Y. 1991.** Rajeunissement chez le *Sequoia sempervirens*: effects du microgreffage *in vitro*. Canadian Journal of Botany, 69: 1772-1779.
- **Trippi, V. S. 1990.** Maturation and senescence: types of aging. En: Plant –Aging: Basic and Applied Approaches. R. Rodriguez, R. Sánchez Tamés y D.J. Durzan (eds). Springer-Verlag, US, pp. 3-10.
- **Tsai, C.; Miller, A.; Spalding, M. y Rodermeil, S. 1997.** Source strength regulates an early phase transition of tobacco shoot morphogenesis. Plant Physiology, 115: 907-914.
- **Valdés, A. E.; Centeno, M.L.; Espinel, S. y Fernández, A.B. 2002.** Could plant hormones be the basis of maturation indices in *Pinus radiata*? Plant Physiology and Biochemistry, 40 (3): 211-216.
- **Valdés, A.E.; Fernández, A.B. y Centeno, M.L. 2003.** Alterations in endogenous levels of cytokines following grafting of *Pinus radiata* support ratio of cytokinins as an index of ageing and vigour. Journal of Plant Physiology, 160: 1407-1410.
- **Valdés, A. E.; Fernández, A.B. y Centeno, M.L. 2004.** Hormonal changes throughout maturation and ageing in *Pinus pinea*. Physiology and Biochemistry, 42 (4): 335-340
- **Valdés, A. E.; Galuszka, P.; Fernández, A.B.; Centeno, M.L. y Frébort, I. 2007.** Developmental stage as a possible factor affecting cytokinin content and cytokinin dehydrogenase activity in *Pinus sylvestris*. Biologia Plantarum, 51 (1): 193-197.
- **Valledor, L.; Meijón, M.; Hasbún, R.; Cañal, M.J. y Rodríguez, R. 2010.** Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenetic capability. Journal of Plant Physiology, 167 (5): 351-357.
- **Valles, M. y Boxus, Ph. 1987.** Micropropagation of several *Rosa hybrida* L. cultivars. Acta Horticulturae, 212: 611-617.

- **Varlaro, M.E.; Casacchia, T.; Alfei, B. y Briccoli-Bati, C. 2009.** *In vitro* adaptability of some Italian olive genotypes. *Acta Horticulturae*, 812: 125-128.
- **Vega, S.H.; Sauer, M.; Orkwiszewski, J.A.J. y Poethig, S. 2002.** The early phase change gene in maize. *The Plant Cell*, 14: 133-147.
- **Vidal, N.; Arellano, G.; San-José, M.S.; Vieitez, A.M. y Ballester, A. 2003.** Developmental stages during the rooting of in-vitro-cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. *Tree Physiology*, 23: 1247-1254.
- **Vidoy-Mercado, I.; Imbroda-Solano, I.; Barceló-Muñoz, A. y Pliego-Alfaro, F. 2012a.** Differential *in vitro* behavior of the Spanish olive (*Olea europaea* L.) cultivars 'Arbequina' and 'Picual'. *Acta Horticulturae*, 949: 27-30.
- **Vidoy-Mercado, I.; Imbroda-Solano, I.; Barceló-Muñoz, A.; Viruel, M.A. y Pliego-Alfaro, F. 2012b.** The influence of *in vitro* micrografting on vegetative propagation of the olive cv. Arbequina. *Acta Horticulturae*, 949: 31-34.
- **Vieitez, A.M.; Sánchez, M.C.; Amo-Marco, J.B. y Ballester, A. 1994.** Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37: 287-295.
- **Viseur, J. 1987.** Micropropagation of pear, *Pyrus communis* L., in a double phase culture medium. *Acta Horticulturae*, 212: 117-123.
- **Visser, E.J.W.; Heijink, C.J.; Vanhout, K.J.G.M.; Voesenek, L.A.C.J.; Barendse, G.W.M. y Blom, C.W.P.M. 1995.** Regulatory role of auxin in adventitious root-formation in 2 species of *Rumex*, differing in their sensitivity to waterlogging. *Physiologia Plantarum*, 93: 116-122.
- **Von Aderkas, P. y Bonga, J.M. 2000.** Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology*, 20:921-928.
- **Wareing, P.F. 1959.** Citado por Zimmerman, 1972.
- **Wareing, P.F. 1987.** Juvenility and cell determination. En: *Manipulation of Flowering*. J.G. Atherton (ed) Butterworth, London, pp: 83-92.
- **Wareing, P.F. y Frydman, V.M. 1976.** General aspect of phase change with special reference to *Hedera helix*. *Acta Horticulturae*, 56: 57-70.
- **Werner, T.; Motyka, V.; Strnad, M. y Schmölling, T. 2001.** Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy Science, USA*, 98 (18): 10487-10492.
- **Yang, H.; Liang, C.; Yang, L., y Li, Y. 2010.** *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. *Acta Physiologia Plantarum*, 32 (1): 115-120.
- **Yari, R.; Farahani, F. y Sheidai, M. 2011a.** Study of morphological traits changes in prolonged vegetative reproduction of three olive tree cultivars domesticated (Zard, Roughani and X) in Iran. *African Journal of Agricultural Research*, 6 (29): 6320-6325.
- **Yari, R. ; Farahani, F.; Sheidai, M.; Montasser, S y Fahimi, H. 2011b** The effects of prolonged vegetative reproduction of the two Iranian olive cultivars

- (Dezful Baghmalek and Dezful Safiabab) on morphological traits. African Journal of Biotechnology, 10 (45): 9076-9081.
- **Yildirim, H.; Onay, A.; Suzerer, V.; Tilkat, E.; Ozden-Tokatli, Y. y Akdemir, H. 2010.** Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars “Ferragnes” and “Ferraduel”. Scientia Horticulturae, 125: 361-367.
 - **Zacchini, M. y de Agazio, M. 2004.** Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. Biologia Plantarum, 48 (4): 589-592.
 - **Zhang, X. Z.; Zhao, Y.B.; Li, C.M. ; Chen, D.M.; Wang, G.P.; Chang, R.F. y Shu, H.R. 2007.** Potential polyphenol markers of phase change in apple (*Malus domestica*). Journal of Plant Physiology, 164: 574-580.
 - **Zhang, X. Z.; Zhao, Y.B.; Wang, G.P.; Chang, R.F.; Li, C.M. y Shu, H.R. 2008.** Dynamics of endogenous cytokinins during phase change in *Malus domestica* Borkh. Acta Horticulturae, 774: 29-34.
 - **Ziauka, J. y Kuusiene, S. 2009.** Plant hormone gibberellin induces decline of viability in isolated larch shoot buds. Baltic Forestry, 15 (1):13-22.
 - **Zimmerman, R. H. 1972.** Juvenility and flowering in woody plants: a review. Hortscience, 7 (5): 447-455.
 - **Zimmerman, R. H. 1973.** Juvenility and flowering of fruit plants. Acta Horticulturae, 34: 139-143.
 - **Zimmerman, R. H.; Hackett, W.P. y Pharis, R.P. 1985.** Hormonal aspects of phase change and precocious flowering. Encyclopedia Plant Physiology, 11 (IV): 79-115.
 - **Zuccherelli, G. y Zuccherelli, S. 2002.** *In vitro* propagation of fifty olive cultivars. Acta Horticulturae, 586: 931-934.

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido naftalenacético
ANOVA	Análisis Normalizado de la Varianza
API	APETALA1 (gen de <i>Arabidopsis</i> , que regula la formación de meristemas florales)
ARN	Ácido ribonucleico
AtCKS	Gen de la citoquinina oxidasa de <i>A. thaliana</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BAP	6-bencil-aminopurina.
BMGO	Banco Mundial de Germoplasma de Olivo
BN	Medio de cultivo de Bourgin y Nitsch (1967)
BR	24-epibrasinólido
CAL	CAULIFLOWER (gen de <i>Arabidopsis</i> , que regula la formación de meristemas florales)
CF	Cambio de fase
CG	Cianidina-3-glucósido
Chs	Chalcona-sintetasa
CiFT	Gen de cítricos, homólogo de FT
CKX	Citoquinina-deshidrogenasa
CO	Proteína CONSTANS, implicada en floración
COI	Consejo Oleícola Internacional
CR	Cianidina-3- rutinósido
CsAPI	Gen relacionado con la floración de <i>Citrus sinensis</i>
CsTFL	Gen relacionado con la floración de <i>Citrus sinensis</i>
Cv	Cultivar

dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DF	Doble fase
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DHFR	Dihidroflavonol-reductasa
DHRZ	Dihidro ribósido de zeatina
DKW	Medio de cultivo de Driver y Kuniyuki (1984)
DMSO	Dimetilsulfósido
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
ECO	Embriogénesis cíclica de olivo
EPC	Early Phase Change (cambio temprano de fase)
ES	Embriogénesis somática
FAL	Fenilalanina-amonioliasa
FT	Flowering Time, gen inductor de la floración
FUL	FRUITFULL (gen de la familia MADS-box, que controla el desarrollo de órganos florales)
g	Unidad de fuerza centrífuga relativa (FCR)
GA ₃	Ácido giberélico
H	Histonas
HPLC	Cromatografía líquida de alta definición
KDa	Kilodalton
K&H	Medio de cultivo que contiene los macros de Knop y micros de Heller
KIN	Kinetina
LFY	LEAFY (gen de <i>Arabidopsis</i> , que regula la producción de meristemos florales)
MADS-box	Familia de factores de transcripción basada en la similitud de las secuencias de sus genes
Man	Manitol

Mcj	Microinjerto
MdTFL	Gen de <i>Malus x domestica</i> , denominado Terminal Flower
Mori 1	Gen que regula la duración de la fase juvenil en <i>Oriza sativa</i>
Mpa	Megapascal ($1 \text{ Pa} = 1 \text{ kg/(m.s}^2\text{)}$)
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)
MSAP	Fragmentos de amplificación sensibles a metilación
mtDNA	ADN de origen mitocondrial
MYB-prot	Proteínas de la familia MYB
NTP	Nucleótidos trifosfato
OM	Medio de cultivo de olivo (Olive Medium (Rugini ,1984))
OMe	Medio de elongación de raíces de olivo (Cañas y col., 1987)
OMr	Medio de inducción de raíces de olivo (Cañas y col., 1987)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PIB	Producto Interior Bruto
Proteinas-G	Proteínas reguladoras ligadas a guanosina trifostato
PtFT	Gen relacionado con la floración de <i>Poncirus trifoliata</i> , homólogo de FT
QL	Formulación mineral de Quoirin y Lepoivre (1977)
QRCPE	Gen de <i>Quercus robur</i> que se expresa preferentemente en la copa
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RT-PCR	PCR en tiempo real
Rubisco	Ribulosa-1,5-difosfatocarboxilasa
RZ	Ribósido de zeatina
Sac	Sacarosa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SH	Medio de cultivo de Schenk y Hildebrant (1972)
SN	Sección nodal

SQN	SQUINT (gen de <i>Arabidopsis</i> , que regula la producción de meristemos florales)
SSRs	Microsatélites (Simple Sequence Repeats)
TDZ	Tidiazurón
TFL	Terminal Flower (gen de <i>Arabidopsis</i> que regula el crecimiento)
Tp	Teopod (gen relacionado con la juvenilidad en <i>Zea mays</i>)
TPA	Transporte polar de auxinas
V	Voltio
WPM	Medio de cultivo de leñosas (Lloyd y McCow, 1980)
XHT	Xiloglucanoendotransglicosilasa/hidrolasa
Z	Zeatina
2iP	6-(γ,γ -Dimetilalil amino) purina
5-mC	5-metilcitosina

Índice de tablas

- Tabla 1.-** Zonas olivareras del territorio español ((Ministerio de Agricultura (1972), en Civantos, (2004)).
- Tabla 2.-** Micropropagación de material juvenil (A) y adulto de olivo (B), mediante brotación de yemas axilares.
- Tabla 3.-** Duración del periodo juvenil en algunas especies leñosas (Clark, 1983).
- Tabla 4.-** Características diferenciales de las fases juvenil y adulta en distintas especies: A) Morfológicas; B) Citológicas e histológicas; C) Fisiológicas y D) Bioquímicas y moleculares.
- Tabla 5.-** Procedencia de las 41 plantas de olivo aclimatadas y mantenidas en invernadero, obtenidas tras los cinco ciclos de microinjerto sucesivos.
- Tabla 6.-** Composición de los medios de cultivo utilizados en las fases de inicio y multiplicación *in vitro* de olivo.
- Tabla 7.-** Composición de los medios de cultivo utilizados en la fase de enraizamiento.
- Tabla 8.-** Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados en la fase de multiplicación de material adulto de olivo.
- Tabla 9.-** Secuencias de los cebadores utilizados en los análisis de conformidad genética en los individuos procedentes de los microinjeritos *in vitro*.
- Tabla 10.-** Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes apicales de material juvenil de olivo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).
- Tabla 11.-** Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro* de material adulto de olivo, cv. Arbequina. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).
- Tabla 12.-** Efecto de la adición de GA_3 al medio de proliferación sobre el enraizamiento *in vitro*, en el medio RVr (Revilla y col., 1996), de material adulto de olivo, cv. Arbequina. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).
- Tabla 13.-** Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro*, de material adulto de olivo, cv. Picual. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).
- Tabla 14.-** Efecto de los microinjeritos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la estabilidad genética de las plantas obtenidas y mantenidas en invernadero. Fragmentos de amplificación obtenidos con 6 loci SSR, en 41 plantas,

procedentes de diferentes líneas y ciclos de microinjertos sucesivos *in vitro* y la planta madre adulta.

Tabla 15.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina sobre patrones juveniles, en la capacidad de enraizamiento *in vitro*, o de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en invernadero, en los medios OMr/OMe y RVr. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Índice de figuras

- Figura 1.-** Evolución de la producción de aceite de oliva en la Unión Europea y los principales países productores de Europa en el periodo 1990-2013. http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=es_ES (Fuente COI, informe: Noviembre 2013, consultado el 26/11/2014).
- Figura 2.-** Esquema de la expresión de las características juveniles y adultas en una planta adulta joven (A) y adulta en floración (B). Los procesos requeridos durante todas las fases de desarrollo para el crecimiento del meristemo apical y la iniciación de órganos laterales se ilustran con líneas en negro (Poethig, 1990).
- Figura 3.-** Hojas de *Acacia heterophylla* mostrando la transición desde la forma juvenil (hojas compuestas) hasta la forma adulta (filodios). Las características de las hojas juveniles son retenidas en las partes superiores de las formas intermedias (Taiz y Zeiger, 2010).
- Figura 4.-** Modelos alternativos de maduración (Hackett y col., 1992).
- Figura 5.-** Gradiente de juvenilidad en plantas leñosas (Bonga, 1982). A.- zona de unión raíz-tallo. B.- meristemo apical del tallo. C, D, E y F.- meristemos laterales. E.- brotes epicórmicos. P y S.- brotes procedentes de árboles severamente podados. R.- brotes procedentes de la raíz. SP.- esferoblastos.
- Figura 6.-** Material vegetal de olivo, en distintos estados ontogenéticos (juvenil, adulto y adulto microinjertado) utilizado en los experimentos llevados a cabo en este trabajo.
- Figura 7.-** Ramas de olivo del árbol madre: a) inmediatamente tras su recolección; b) tras la eliminación de las hojas.
- Figura 8.-** Secciones nodales de olivo: a) preparadas para ser desinfectadas, b) cultivadas en el medio de inicio.
- Figura 9.-** Aislamiento de embriones de olivo y establecimiento *in vitro*: a) semillas a las que se les había eliminado el mesocarpo; b) rotura del endocarpo; c) embrión tras la imbibición; d) detalle de embrión y cotiledones aislados y e) embriones en el medio de germinación.
- Figura 10.-** Realización de los microinjertos *in vitro* de material adulto de olivo: a) material vegetal: plántula juvenil (portainjerto) y sección nodal adulta (púa); b) incisión longitudinal en hipocótilo y preparación de la base de la púa en forma de cuña; c)

la parte basal de la púa se aloja en la incisión del hipocótilo y d) estabilización de la unión mediante un anillo de silicona.

Figura 11.- Brotes de naturaleza adventicia, en los microinjertos de material adulto de olivo, emergiendo del patrón: a) en la zona de unión patrón-púa; b) por debajo de la zona de unión.

Figura 12.- Aspecto del microinjerto de material adulto de olivo tras a) seis y b) doce semanas en el medio de cultivo.

Figura 13.- Realización de microinjertos sucesivos *in vitro* de secciones nodales adultas de olivo sobre patrones juveniles. Establecimiento de la línea-1. El proceso entero se repite con 30 secciones nodales del mismo árbol madre adulto para establecer 30 líneas diferentes, con sus respectivos ciclos de microinjerto.

Figura 14.- Aclimatación de los brotes enraizados procedentes de microinjertos de yemas adultas de olivo, cv. Arbequina, sobre patrones juveniles: a) brote en el medio de cultivo; b) eliminación del medio de cultivo mediante lavado; c) trasplante a sustrato y d) colocación en el túnel de aclimatación.

Figura 15.- Plantas procedentes de las distintas líneas y ciclos de microinjerto sucesivos, de yemas adultas de olivo del cv. Arbequina, sobre patrones juveniles: a) trasplante a maceta y b) crecimiento en invernadero climatizado.

Figura 16.- Tambor rotatorio (5 rpm) utilizado para el cultivo de los explantos de olivo en medio líquido.

Figura 17.- Plantas de olivo, cv. Arbequina, procedentes de los microinjertos 1º, 3º y 5º propagadas por estaquillado semileñoso: a) creciendo a un solo eje en invernadero climatizado y b) trasplantadas a la parcela experimental del BMGO (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA).

Figura 18.- Efecto de los medios IM (Rugini, 1984) y RV (Revilla *y col.*, 1996) sobre el desarrollo durante la fase de establecimiento *in vitro*, de secciones nodales de material juvenil de olivo: a) porcentaje de brotación; b) porcentaje de necrosis; c) número medio de brotes axilares/cultivo y d) longitud media de los brotes axilares. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Figura 19.- Efecto de los medios OM (Rugini, 1984) y RV (Revilla *y col.*, 1996) sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil de olivo: a) número medio de brotes axilares/cultivo y b) longitud media de los brotes axilares. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Figura 20.- Aspecto de brotes juveniles de olivo tras un periodo de cultivo de 16 y 8 semanas en los medios OM (Rugini *y col.*, 1984) y RV (Revilla *y col.*, 1996), respectivamente.

Figura 21.- Efecto del cultivo alternado en medio basal RV líquido con diferentes concentraciones de BAP y agitación en rotor y posterior transferencia a medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de material juvenil de olivo: a) número medio de brotes axilares/cultivo, b) longitud media de brotes axilares y c) número medio de hojas/brote axilar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Control.- 8 semanas en medio RV sólido (Revilla *y col.*, 1996).

Figura 22.- Efecto del cultivo alternado en medio basal RV líquido con diferentes concentraciones de BAP y agitación en rotor y posterior transferencia a medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes subapicales de olivo juvenil. Aspecto de los cultivos en los distintos tratamientos. Control.- cultivo de explantos durante 8 semanas en medio estándar RV sólido (Revilla *y col.*, 1996). Tratamientos.- cultivo en medio basal RV líquido con agitación en rotor y diferentes concentraciones de BAP (0; 0,4– 1,3 y 4,4 μM) durante dos semanas, alternado con recultivo durante 6 semanas en medio estándar RV sólido.

Figura 23.- Efecto del cultivo alternado en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de BAP y posterior transferencia a medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes apicales de material juvenil de olivo: a) longitud media del brote principal, b) número medio de hojas del brote principal y c) número medio de brotes axilares/cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Control.- 8 semanas en medio RV sólido (Revilla *y col.*, 1996).

Figura 24.- Efecto del cultivo alternado, en medio basal RV líquido con agitación en rotor y distintas concentraciones de BAP y posterior transferencia a medio estándar RV sólido, sobre la capacidad de proliferación de brotes apicales de material juvenil de olivo. Aspecto de los cultivos en los distintos tratamientos. Control.- cultivo de explantos durante 8 semanas en medio estándar RV sólido (Revilla *y col.*, 1996). Tratamientos.- cultivo en medio basal RV líquido con agitación en rotor y

diferentes concentraciones de BAP (0; 0,4 – 1,3 y 4,4 μ M), durante dos semanas, alternado con recultivo durante 6 semanas en medio estándar RV sólido.

Figura 25.- Efecto del tipo de explanto (brote apical vs subapical) sobre el enraizamiento *in vitro* de material juvenil de olivo en el medio OMr/OMe (Cañas y col., 1987).

Figura 26.- Enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de material juvenil de olivo, procedentes de cultivos en medio estándar de proliferación RV (Revilla y col., 1996) tras la inmersión durante 10 seg en una solución de AIB (14,8 mM). Como control se utilizaron brotes procedentes de los mismos stocks de proliferación, enraizados *in vitro* en el medio OMr/OMe (Cañas y col., 1987). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Figura 27.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo cv. Arbequina: a) porcentaje de brotación, b) porcentaje de necrosis, c) número medio de brotes axilares/cultivo y d) longitud media de brotes axilares. Datos de 6 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). C: explanto procedente de la copa. R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias. B: explanto procedente de la base del tronco.

Figura 28.- Aspecto de los brotes adultos de olivo cv. Arbequina, desarrollados tras 6 semanas en el medio de inicio RV (Revilla y col., 1996).

Figura 29.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo, cv. Arbequina: a) porcentaje de necrosis, b) número medio de brotes axilares/cultivo y c) longitud media de brotes axilares. Datos de 12 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). C: explanto procedente de la copa. R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias. B: explanto procedente de la base del tronco

Figura 30.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo cv. Arbequina. Aspecto de los brotes desarrollados a partir de los distintos tipos de material tras 12 semanas en el medio de inicio RV (Revilla y col., 1996). C: explanto procedente de la copa. R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias. B: explanto procedente de la base del tronco

Figura 31.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Arbequina. RV (Revilla y col., 1996); ZAD (Zachini y de Agazio, 2004); RP (Roussos y Pontikis, 2002); SS (Sghir y col., 2005) y Px (Peixe y col., 2007): a) tasa media de multiplicación y b) porcentaje de necrosis. Datos de cuatro subcultivos sucesivos y media de los cuatro subcultivos.*nc.- no contabilizado. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Figura 32.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina. Aspecto de los cultivos en los medios: a) RV (Revilla y col., 1996); b) ZAD (Zachini y de Agazio, 2004); c) RP (Roussos y Pontikis, 2002); d) SS (Sghir y col., 2005) y e) Px (Peixe y col., 2007).

Figura 33.- Efecto del cultivo alternado en presencia de RZ o TDZ y de la combinación RZ y GA₃ en la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina. Tratamientos: control.- medio RP estándar (5,7 μ M de RZ); RZ/TDZ.- cultivo alternado en medio RP estándar y medio basal RP con TDZ (1 μ M); RZ+GA₃.- cultivo en medio RP estándar + GA₃ (4,33 μ M). Datos de cuatro subcultivos sucesivos y media de los cuatro subcultivos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Figura 34.- Efecto del cultivo alternado en presencia de RZ o TDZ y de la combinación RZ y GA₃ en la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina. Aspecto de los cultivos en los medios de cultivo RP estándar (izquierda) y RP + GA₃ (4,33 μ M) (derecha).

Figura 35.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y GA₃ incorporadas al medio basal RP, sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina. Datos de cuatro subcultivos sucesivos y media de los cuatro subcultivos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Figura 36.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y GA₃ (2,17 y 4,33 μ M) incorporadas al medio basal RP, sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina. Aspecto de los cultivos en los diferentes tratamientos: a) RP- estándar; b) RZ (2,85 μ M)); c) RZ (4,28 μ M) y d) RZ (5,7 μ M).

Figura 37.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y GA₃ incorporadas al medio basal RP, sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv.

Arbequina. Aspecto de los cultivos con GA_3 (4,33 μ M) como único regulador de crecimiento.

Figura 38.- Efecto de distintas concentraciones de bencilaminopurina ó tidiazurón junto con ribósido de zeatina, sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo, cv. Arbequina: a) medio basal RP suplementado con RZ (2,85 μ M) + BAP (0- 1,1- 2,2- 4,4- 8,8 y 17,6 μ M); b) medio basal RP suplementado con RZ (2,85 μ M) + TDZ (0- 1,1- 2,2- 4,4- 8,8 y 17,6 μ M). Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,05$). Control: medio RP estándar (5,7 μ M).

Figura 39.- Efecto de distintas concentraciones de ribósido de zeatina y 24- epibrasinólido, sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Arbequina. Tasa de multiplicación y aspecto de los cultivos en: a) medio RP estándar (RZ, 5,7 μ M) adicionado con varias concentraciones de BR (0- 0,01- 0,03- 0,1- 0,3- 1 y 3 μ M) y b) medio RP modificado (RZ, 2,85 μ M) adicionado con varias concentraciones de BR (0- 0,01- 0,03- 0,1- 0,3- 1 y 3 μ M). Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,05$). *nc.- no contabilizado

Figura 40.- Efecto de los medios RVr (Revilla y col., 1996) y OMr/OMe (Cañas y col., 1987) sobre el enraizamiento *in vitro* de material adulto de olivo, cv. Arbequina, durante tres subcultivos sucesivos y media de los tres subcultivos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,05$)

Figura 41.- Efecto de los medios RVr y OMr/OMe sobre el enraizamiento *in vitro* de material adulto de olivo, cv. Arbequina. Aspecto de los cultivos tras cuatro semanas en los medios de enraizamiento: a) RVr (Revilla y col., 1996) y b) OMr/OMe (Cañas y col., 1987).

Figura 42.- Efecto de la adición de GA_3 al medio de proliferación sobre el posterior enraizamiento *in vitro*, en el medio RVr (Revilla y col., 1996), de material adulto de olivo, cv. Arbequina. Porcentaje de enraizamiento tras 3, 4 y 5 subcultivos en los medio RP-estándar (Roussos y Pontikis, 2002) y RP adicionado con GA_3 (4,33 μ M). Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,05$).

Figura 43.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de ácido indolbutírico, en el enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de material adulto de olivo , cv. Arbequina: a) Octubre de 2009, b) Noviembre de 2009, c) Marzo de 2010 y d) Junio de 2010. Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,05$).

Figura 44.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo cv. Picual: a) porcentaje de brotación, b) porcentaje de necrosis, c) número medio de brotes axilares/cultivo y d) longitud media de brotes axilares. Datos de 6 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,05$). C: explanto procedente de la copa. R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias. B: explanto procedente de la base del tronco

Figura 45.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo cv. Picual: a) porcentaje de necrosis, b) número medio de brotes axilares/cultivo y c) longitud media de brotes axilares. Datos de 12 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,05$). C: explanto procedente de la copa. R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias. B: explanto procedente de la base del tronco.* nc.- no contabilizados.

Figura 46.- Efecto del origen del explanto en el árbol madre en el establecimiento *in vitro* de secciones nodales de material adulto de olivo cv. Picual. Aspecto de los brotes desarrollados a partir de los distintos tipos de material tras 12 semanas en el medio de inicio. C: explanto procedente de la copa. R: explanto procedente de los brotes epicórmicos inducidos a partir de las ramas intermedias. B: explanto procedente de la base del tronco.

Figura 47.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Picual . RV (Revilla y col., 1996); ZAD (Zachini y de Agazio, 2004); RP (Roussos y Pontikis, 2002); SS (Sghir y col., 2005) y Px (Peixe y col., 2007): a) tasa media de multiplicación y b) porcentaje de necrosis. Datos de cuatro subcultivos sucesivos y media de los cuatro subcultivos. *nc.- no contabilizado. Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,05$). .

Figura 48.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre las tasas de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Picual. Aspecto de los cultivos en los medios: a) RV (Revilla y col., 1996); b) ZAD (Zachini y de Agazio, 2004); c) RP (Roussos y Pontikis, 2002); d) SS (Sghir y col., 2005) y e) Px (Peixe y col., 2007).

Figura 49.- Efecto de las combinaciones entre formulaciones basales y suplementos hormonales de los medios RP (Roussos y Pontikis, 2002) y ZAD (Zachini y de Agazio, 2004) sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Picual. Letras distintas indican diferencias significativas ($p= 0,05$).

Figura 50.- Efecto de las combinaciones entre formulaciones basales y suplementos hormonales de los medios RP (Roussos y Pontikis, 2002) y ZAD (Zachini y de Agazio, 2004) sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Picual. Aspecto de los cultivos en los distintos tratamientos:

a) ZAD + Z (13,68 μ M) + GA₃ (4,33 μ M) + AIB (0,49 μ M) (Zachini y de Agazio, 2004); b) ZAD + RZ (5,7 μ M); c) RP + Z (13,68 μ M) + GA₃ (4,33 μ M) + AIB (0,49 μ M) y d) RP + RZ (5,7 μ M) (Roussos y Pontikis, 2002).

Figura 51.- Efecto de la incorporación de GA₃ (4,33 μ M) al medio estándar RP (Roussos y Pontikis, 2002), sobre la tasa de multiplicación de material adulto de olivo cv. Picual. Tasa de multiplicación durante cuatro subcultivos sucesivos y media de los cuatro subcultivos. Letras distintas indican diferencias significativas (p= 0,05).

Figura 52.- Efecto de distintas concentraciones de RZ, en medio basal RP de doble fase, sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Picual. FS.- medio sólido RP (estándar [RZ - 5,7 μ M] y modificado [RZ - 2,85 μ M]). FL.- medio basal RP líquido y diferentes concentraciones de RZ [0,285 – 0,85 y 2,85 μ M]. Letras distintas indican diferencias significativas (p= 0,05).

Figura 53.- Efecto de distintas concentraciones de RZ, en medio basal RP de doble fase, sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de material adulto de olivo cv. Picual: a) medio estándar RP (Roussos y Pontikis, 2002); b) fase líquida RZ (0,285 μ M)/fase sólida RP estándar (RZ - 5,7 μ M); c) fase líquida RZ (0,285 μ M)/fase sólida RP modificado (RZ - 2,85 μ M); d) fase líquida RZ (0,85 μ M)/ fase sólida RP modificado (RZ - 2,85 μ M) y e) fase líquida RZ (2,85 μ M)/ fase sólida RP modificado (RZ - 2,85 μ M).

Figura 54.- Efecto de los medios RVr (Revilla., 1996) y OMr/OMe (Cañas y col., 1987) sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes apicales de material adulto de olivo cv. Picual. Letras distintas indican diferencias significativas (p= 0,05)

Figura 55.- Efecto de los medios RVr (Revilla., 1996) y OMr/OMe (Cañas y col., 1987) sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes apicales de material adulto de olivo cv. Picual. Aspecto de los brotes tras dos semanas en el medio de enraizamiento OMr/OMe.

Figura 56.- Efecto de la época del año y de diferentes concentraciones de AIB en el enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de olivo adulto, cv. Picual: a) Octubre

de 2009, b) Noviembre de 2009, c) Marzo de 2010 y d) Junio de 2010. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Figura 57.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, cv. Arbequina, en patrones juveniles, sobre la capacidad de enraizamiento *in vitro* de los brotes obtenidos, en el medio RVr (Revilla y col., 1996). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Figura 58.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, en patrones juveniles, sobre la capacidad de enraizamiento *in vitro* de los brotes obtenidos, en el medio RVr (Revilla y col., 1996). Aspecto de uno de los brotes del 5º microinjerto tras dos semanas en el medio de enraizamiento

Figura 59.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la capacidad de propagación por estaquillado semileñoso de las plantas obtenidas (porcentaje de enraizamiento). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Mcj.- microinjerto.

Figura 60.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la fase de establecimiento *in vitro* de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en invernadero, en el medio RV (Revilla y col., 1996): a) porcentaje de brotación a las seis semanas y b) porcentaje de necrosis a las 6 y 12 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Mcj.- microinjerto.

Figura 61.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la fase de establecimiento *in vitro*, de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en invernadero, tras 12 semanas de cultivo en el medio RV (Revilla y col., 1996): a) número de brotes axilares/cultivo y b) longitud media de brotes axilares. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Mcj.- microinjerto.

Figura 62.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la fase de multiplicación *in vitro*, de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en invernadero. Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Mcj.- microinjerto.

Figura 63.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la capacidad de enraizamiento *in vitro* de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en

invernadero, en los medios OMr (Cañas y col., 1987) y RVr (Revilla y col., 1996). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Figura 64.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo cv. Arbequina, sobre patrones juveniles, en la capacidad de enraizamiento *in vitro* de las plantas procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3, 5) y mantenidas en invernadero. Aspecto de los brotes enraizados procedentes de plantas del 5º microinjerto tras 8 semanas en los medios de enraizamiento a) RVr (Revilla y col., 1996) y b) OMr (Cañas y col., 1987).

Figura 65.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la precocidad de entrada en floración de plantas, procedentes de las líneas 8 y 15 y distintos microinjertos (1º, 3º y 5º). Porcentaje de plantas con flores tras un año de su establecimiento en campo en la parcela de experimentación del BMGO (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$).

Figura 66.- Efecto de los microinjertos sucesivos de yemas adultas de olivo, sobre la precocidad de entrada en floración, de plantas procedentes de las líneas 8 y 15 y distintos microinjertos (1º, 3º y 5º). Planta con flores tras un año de su establecimiento en campo en la parcela de experimentación del BMGO (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA).

Figura 67.- Comportamiento en campo de plantas de olivo cv. Arbequina, procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3 y 5) y de la planta madre adulta. Vigor de las plantas de distinta procedencia tras un año de permanencia en la parcela de experimentación del BMGO (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA): a) altura (m), b) superficie productiva de la copa (m^2) y c) diámetro del tronco (cm). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Mcj.- microinjerto

Figura 68.- Precocidad de entrada en producción de las plantas de olivo cv. Arbequina procedentes de distintos ciclos de microinjerto (1, 3 y 5) y de la planta madre adulta. Producción media (kg/árbol), de las plantas procedentes de estaquillado semileñoso, tras un año de permanencia en la parcela de experimentación del BMGO (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de

Andalucía, Universidad de Córdoba e IFAPA). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). Mcj.- microinjerto